

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta

Ústav klinické a molekulární patologie



**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Studium invazního růstu u nádorů prsu  
a monitorování odpovědi na poškození DNA  
u nádorů prostaty**

Olomouc 2016

Mgr. Dana Šimková

# PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci zpracovala samostatně s využitím citované literatury.

Olomouc 29. června 2016

---

Dana Šimková

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala především svému školiteli, Mgr. Janu Bouchalovi, Ph.D. za vynikající vedení a koordinaci spolupráce se spřátelenými laboratořemi. Dále bych ráda poděkovala mým kolegům z týmu Laboratoře molekulární patologie, především Mgr. Gabriele Kořínkové, Ph.D. a MUDr. Gvantse Kharaisvili, Ph.D. za pomoc při zpracování a vyhodnocování vzorků nádorů. Panu MUDr. Karlu Čwiertkovi, Ph.D. děkuji za možnost ozařovat buněčné linie na Oddělení radiologie, Onkologické kliniky FN Olomouc. Děkuji také Mgr. Evě Slabákové, Ph.D. a Mgr. Zuzaně Kahounové, Ph.D. z Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně za výbornou spolupráci a vstřícnost po celou dobu trvání projektů. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za emocionální podporu a toleranci po celou dobu studia.

## ABSTRAKT

Nádory jsou komplexní tkáně složené z buněčných i nebuněčných složek, přičemž nádorová progresse a metastazování je výsledkem dynamické komunikace mezi různými typy buněk v nádoru i okolním stromatu. Asporin, člen „small leucine rich“ proteoglykanové rodiny proteinů, je důležitým prvkem v normálním vývoji chrupavek, kostí a zubů a také je asociován s několika typy nádorů (např. karcinomy prsu, prostaty a žaludku). V souladu s literaturou jsme potvrdili expresi asporinu pomocí RNA scope *in situ* hybridizace u fibroblastů asociovaných s nádory (CAF). Mezi testovanými nádorovými liniemi exprimovala asporin pouze Hs578t, což jsme potvrdili na mRNA i proteinové úrovni. Prokázali jsme, že asporin může být downregulován po působení BMP4, zatím co upregulace byla zprostředkována kultivací v bezsérových podmínkách nebo pěstováním ve 3D podmínkách na polystyrenové matici Alvetex. Downregulace pomocí shRNA inhibovala invazi jak Hs578t, tak CAF a T47D buněk. Invaze asporin negativních modelů MDA-MB-231 a BT-549 přes kolagenovou bariéru byla zvýšena v přítomnosti asporinu. Detailní *in silico* metaanalýza ukázala, že u dobře diferencovaných nádorů je vyšší exprese asporinu spojena s lepším bezpříznakovým přežitím, ale u karcinomů s gradem 3 je tomu naopak. Tato pozorování mohou souviset s polymorfismem polyaspartátové repetice asporinu, kdy alela D13 byla u karcinomu prostaty popsána jako tumor suprimující, kdežto alela D14 podporuje progresi onemocnění. Dále jsme provedli rozsáhlou western blot analýzu odpovědi na poškození DNA u nádorových buněk prostaty jako doplněk ke klonogením testům po kombinovaném působení DNA-PK nebo PARP inhibitorů a ozařování.

**Klíčová slova:** metastazování, asporin, nádory prostaty, nádory prsu, odpověď na poškození DNA

## ABSTRACT

Tumors are not solely masses of neoplastic cells but complex tissues composed of cellular and noncellular elements. Tumour progression and metastasis is a result of dynamic crosstalk between different cell types within the tumour itself and its surrounding stroma. Asporin, the member of small leucine rich proteoglycan family I, is an important player in normal development of cartilage, bone and teeth, and has also been associated with different tumors (e.g. breast, prostate and gastric cancer). In line with other studies, we have confirmed asporin expression by RNA scope *in situ* hybridization in cancer associated fibroblasts. We have also found asporin expression in the Hs578t breast cancer cell line which we confirmed by quantitative RT-PCR and western blotting. From multiple testing, we found that asporin can be downregulated by bone morphogenetic protein 4 while upregulation may be facilitated by serum-free cultivation or by three-dimensional growth in stiff Alvetex scaffold. Downregulation by shRNA inhibited invasion of Hs578t as well as of CAFs and T47D cells. Invasion of asporin-negative MDA-MB-231 and BT-549 breast cancer cells through collagen type I was enhanced by recombinant asporin. According to our *in silico* search, high asporin expression associates with significantly better relapse free survival in patients with low-grade tumors, however, the opposite was observed in patients with grade 3 tumors. This observation may be related to the polymorphism of asporin polyaspartate repeat, when D13 allele was described as tumor suppressive while D14 allele promoted prostate cancer progression. Furthermore, we performed large western blot analysis of the main DNA damage response markers in prostate cancer cell lines as a supplement to the clonogenic analysis after co-treatments of DNA-PK or PARP inhibitors and irradiation.

Keywords: metastasis, asporin, breast cancer, prostate cancer, DNA damage response

## OBSAH

1	TEORETICKÝ ÚVOD .....	8
1.1	Molekulární charakteristika nádorů prsu a prostaty.....	8
1.2	Nádorové mikroprostředí a progrese onemocnění .....	10
1.2.1	Význam nádorového mikroprostředí pro vznik a progresi nádorů .....	10
1.2.2	Složky mikroprostředí nádoru: Extracelulární matrix .....	11
1.2.3	Složky mikroprostředí nádoru: Endotel a neoangiogeneze .....	11
1.2.4	Složky mikroprostředí nádoru: Infiltrující imunitní buňky .....	12
1.2.5	Složky mikroprostředí nádoru: Fibroblasty asociované s nádory.....	13
1.3	Dormance nádorů.....	14
1.4	Metastatická kaskáda .....	15
1.4.1	Lokální invaze do okolního stromatu .....	16
1.4.1.1	Typy invaze buněk .....	16
1.4.2	Transport v krevním a lymfatickém řečišti .....	17
1.4.3	Metastatická kolonizace a orgánový tropismus .....	18
1.4.4	Detekce nádorových buněk a jejich derivátů v řečišti a modulace tumorigeneze a metastazování pomocí exosomů .....	19
1.5	Epitelovo-mezenchymová tranzice (EMT).....	21
1.5.1	Molekulární podstata EMT .....	22
1.5.2	Extracelulární matrix a EMT .....	23
1.5.3	EMT a nádorové kmenové buňky.....	23
1.6	Asporin a rodina malých proteinů s repeticemi bohatými na leucin .....	26
1.6.1	Asporin a jeho charakterizace .....	26
1.6.2	Asporin a onemocnění pohybového aparátu .....	26
1.6.3	Asporin a nádorová onemocnění .....	27
1.6.4	Mechanismy oprav poškození DNA .....	28
2	CÍLE PRÁCE.....	31
2.1	Projekt 1: Význam exprese asporinu v invazních karcinomech prsu .....	31
2.2	Projekt 2: Mechanismy integrity a nestability genomu v patogenezi a potenciální individualizovaná molekulárně-cílená léčba karcinomu prostaty.....	31
3	METODIKA .....	32
3.1	Nádorové buněčné linie .....	32
3.2	Normální fibroblasty získané ze zubní pulpy a hDPSC.....	32
3.3	Typy ovlivnění Hs578t .....	32

3.4	Sferoidní assay .....	33
3.5	Stabilně transfekované buněčné linie.....	33
3.6	Test kolagenové fibrilogeneze .....	34
3.7	Adheze a proliferace .....	34
3.8	Scratch assay .....	34
3.9	Invazní assay .....	34
3.10	xCELLigence systém .....	35
3.11	Izolace RNA, reverzní transkripce and kvantitativní PCR .....	36
3.12	Colony forming assay .....	37
3.13	Extrakce proteinů a westernblotová analýza.....	37
3.14	Analýza DDR odpovědi vybraných modelových linií karcinomu prostaty .....	38
4	Výsledky .....	40
4.1	Využití veřejných databází pro získání experimentálního modelu a zhodnocení klinického významu exprese asporinu .....	40
4.2	Validace anti ASPN protilátek.....	43
4.3	Regulace asporinu BMP4 starvací a kultivací na 3D matrici u Hs578t.....	45
4.4	Vliv downregulace asporinu na migraci, invazivitu a sferoidní růst Hs578t.....	46
4.5	Invazní testy .....	46
4.5.1	Vliv asporinu na kolagenovou fibrilogenezi .....	46
4.6	Snížení exprese asporinu v nádorově asociovaných fibroblastech snižuje jejich koordinovanou invazi s nádorovými buňkami.....	48
4.7	Vliv ozáření na DDR u vybraných buněčných prostatických linií .....	49
4.8	Vymezení mého podílu práce: .....	52
5	DISKUZE .....	53
6	POUŽITÁ LITERATURA .....	59
7	SEZNAM PUBLIKACÍ A KONFERENCEČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ .....	71
8	SEZNAM ZKRATEK .....	73
9	PŘÍLOHY .....	77
	Příloha č. 1 .....	78
	Příloha č. 2 .....	79
	Příloha č. 3 .....	80
	Příloha č. 4 .....	81
	Příloha č. 5 .....	82

# 1 TEORETICKÝ ÚVOD

## 1.1 Molekulární charakteristika nádorů prsu a prostaty

Nádory prsu jsou komplexní a heterogenní onemocnění, celosvětově jedno z nejčastěji diagnostikovaných nádorových onemocnění s více než milionem případů a 450 tisíci úmrtí každý rok (TCGA, Nature, 2012). Z perspektivy patologa se nádory prsu rozdělují do 18 histopatologických subtypů (Lakhani et al., 2012). Podle molekulárního profilování se identifikují 4 hlavní třídy nádorů (viz níže), které dobře korelují s klinicko-patologickými parametry jako jsou grading tumorů, pozitivní hormonální receptory a přítomnost HER2 amplifikace (TCGA, Nature, 2012).

Nádory prsu jsou klasifikovány podle několika kritérií. Podle histologie se dělí především na duktální a lobulární karcinomy. Expresí estrogenového, progesteronového a HER2 receptoru rozděluje nádory na subtypy ER+, HER2+ a ER-/PR-/HER2- (TNBC – „triple negative“ nádory prsu).

**Luminal A** je nejčastějším molekulárním subtypem. Jsou to nádory s ER+ nebo PR+ a Her2-. Častý výskyt p53 mutací je faktorem spojeným se špatnou prognózou.

**Luminal B** subtyp vykazuje ER+, PR+, Her2+ nebo vysoce pozitivní Ki67, často je diagnostikován u mladších žen. Luminal B nádory mají horší grading, větší tumory, pozitivní lymfatické uzliny a p53 mutace. Oba subtypy ER pozitivních nádorů nejčastěji metastazují do kostí.

„**Triple negative**“ znamená negativitu pro ER-, PR- i Her2-, časté jsou mutace BRCA1 a p53. Většinou se vyskytuje u mladších žen, zejména afroamerického původu. Tyto agresivní tumory mají špatnou prognózu a obvykle metastazují do viscerálních orgánů, mozku a kostí.

**Her2/neu** subtyp je charakteristický pozitivitou receptoru Her2+ a negativními ER- a PR-. Tyto nádory mají tendenci diseminovat do jater a plic. (Polyak et Metzger, 2013; Cadoo, 2013; Dai et al., 2015)

Nádory prsu mohou být rozděleny také podle kompozice extracelulární matrix (ECM), která může být prognostickým i prediktivním faktorem vývoje onemocnění. Tumory s vysokou expresí proteázových inhibitorů v ECM mají dobrou prognózu, zatímco špatná prognóza je asociována s vysokou expresí integrinů a MMP (matrix metaloproteinázy) (Bergamashi et al., 2008).



Karcinom prostaty je jednou z nejčastějších malignit a hlavní příčinou úmrtí mužů v zemích západního světa. Jeho incidence stoupá navzdory screeningu a monitorování antigenu PSA (prostate specific antigen), který umožňuje klinické sledování nemoci a následně snad i snižovat mortalitu. Během časných stádií je nádorový růst androgen dependentní a androgenová ablace je standardní léčbou karcinomů, 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 refrakterního stádia, pro které v současné době neexistuje uspokojivá léčba (Culig et Santer, 2014). Tento problém vedl k intenzivní snaze lépe pochopit molekulární patogenezi, genetiku a biologii prostatických nádorů a následně identifikovat nové terapeutické cíle a léčebné strategie.

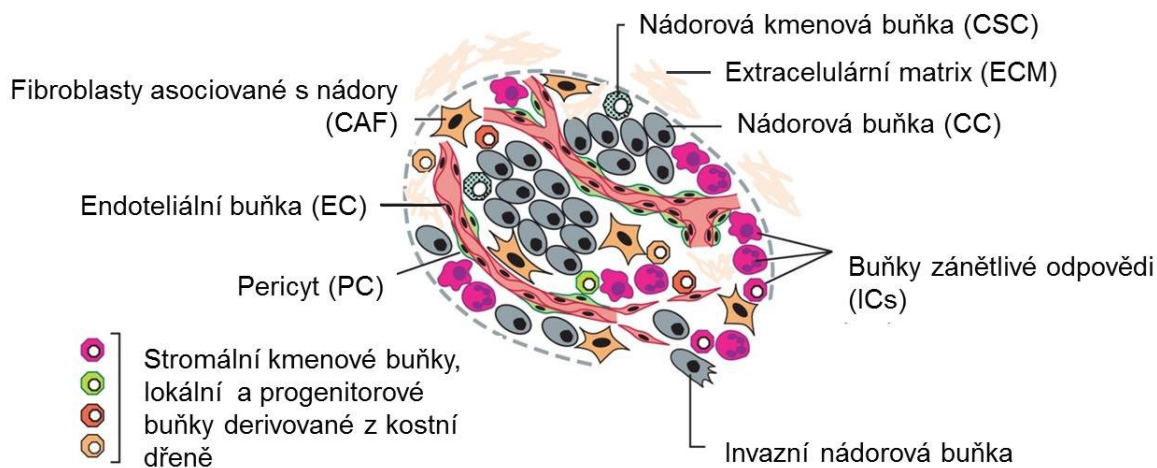
Nádory prostaty mohou být na základě celogenomového sekvenování a exomových analýz kategorizovány podle specifických změn, jako jsou delece CHD1 genu, ERG přestavby a SPOP mutace, které mohou tvořit až 8 % všech nádorů prostaty (Barlow et Shen, 2013). Histologické rozčlenění nádorů se provádí podle Gleasonova systému, který je v rozmezí grade 1 (nejvíce diferencovaný tumor) po 5 (nejméně diferencovaný tumor). Každý z nádorů je posuzován podle jejich nejvíce prevalentních a druhých nejvíce prevalentních histologických stupňů. Kombinace dvou stupňů dává celkové skóre od 2 do 10, většina nádorů přitom spadá mezi 6–8 (Barlow et Shen., 2013). U nádorů prostaty chybí molekulární subtypy, na základě kterých by se vytvořil management léčby onemocnění pacienta. Nedávný objev genové fúze regulující overexpresi ETS proteinů (především TMPRSS2-ERG na -ETV1) a následné celogenomové sekvenování nádorů prostaty pomohly odhalit strukturální rozdíly v genomech ETS pozitivních nebo ETS negativních nádorů. ETS pozitivní tumory mají více chromozomálních přestaveb než ETS negativní skupina. I když v jedné prostatické žláze může být více nádorových ložisek, každé s jiným statutem ETS, vykazují pokročilé a metastazující nádory homogenitu v ETS fúzích, které přicházejí časně ve vývoji nádoru (Demichelis et Attard., 2013).

## 1.2 Nádorové mikroprostředí a progresse onemocnění

### 1.2.1 Význam nádorového mikroprostředí pro vznik a progresi nádorů

V minulosti byly nádory zobrazovány jako heterogenní onemocnění s aberantními mutacemi u nádorových buněk, zatímco dnes je zřejmé, že se nádory liší i kompozicí a aktivitou okolního mikroprostředí (Hannahan et Coussens, 2012; Hannahan et Weinberg, 2011; Kharaishvili et al., 2014). Obousměrná vazba mezi nádorem a mikroprostředím je zásadní jak pro vznik, tak i pro růst nádoru. V návaznosti na měnící se podmínky prostředí i signálů z nádorových buněk se vyvíjí i samotné mikroprostředí (Quail et Joyce, 2013).

Invazně metastatická kaskáda je dynamický a komplexní proces, v němž je mikroprostředí kritickým prvkem jak u primárního nádoru, tak u vzdálených metastáz. Zacilení terapie na mikroprostředí nádoru může být dobrou volbou, např. kvůli tomu, že stromální buňky obvykle nejsou mutované a ECM interaguje s celou populací nádorových buněk. Přestože je nádorové stroma slibným terapeutickým cílem, zaostávají studie funkce a kompozice stromatu za výzkumem samotných nádorových buněk (Brabletz et al., 2013).



**Obr. 1: Buňky nádorového mikroprostředí**

Parenchym i stroma nádoru obsahují rozličné typy a podtypy buněk, které společně umožňují růst a progresi nádoru. Vyobrazeny jsou buňky typické pro většinu solidních nádorů. Buňky zánětlivé odpovědi mohou zahrnovat obojí tumor podpůrné, tak i protinádorově působící imunitní buňky. (Upraveno podle Hannahan et Weinberg, 2011).

### **1.2.2 Složky mikroprostředí nádoru: Extracelulární matrix**

Extracelulární matrix (ECM) je významnou nebuněčnou složkou mikroprostředí. Vyznačuje se dynamickou strukturou poskytující podporu stavbě tkání, jejich organizaci a orientaci (Bosman et Stamenkovic, 2003) a také iniciuje klíčové biochemické a biomechanické signály nutné pro homeostázi, diferenciaci a morfogenezi tkání (Frantz et al., 2010). ECM také poskytuje klíčové signály pro přežívání buněk, jako jsou růstové faktory, zánětlivé molekuly a další mediátory imunitní odpovědi (Jean et al., 2011). ECM tvoří především voda, proteiny a polysacharidy s různorodou strukturou a funkcí (Mecham et al., 2001). Největší zastoupení v ECM mají kolageny a fibronektin, které dodávají mechanickou pevnost. Proteoglykany zase umožňují navázání růstových faktorů a cytokinů. Každá tkáň má jedinečnou charakteristiku ECM vytvořenou v průběhu vývoje tkáně díky vzájemnému biochemickému a biofyzikálnímu „dialogu“ mezi jednotlivými typy buněk a prostředím (Frantz et al., 2010).

Nádorová ECM se liší od normální ECM. Nádorová ECM je tužší než normální tkáň, se změněnou integrinovou signalizací, zvýšenou tenzí Rho-dependentního cytoskeletu, který řídí fokální adhezi, ruší adherentní spoje a polaritu tkání. Nádorová ECM funguje jako lešení pro chemotaxi, durotaxi (cílený pohyb buněk za tuhostním gradientem podkladu) a invazi nádorových buněk (Haeger et al., 2015; Paszek et al., 2005). Paradoxní je fakt, že zvýšená tvorba ECM a pevnější provázání kolagenových fibril v ECM maligního stromatu podporuje invazi nádoru (Levental et al., 2009). Navíc desmoplastické nádorové stroma vytváří bariéru pro infiltraci léčiv a ovlivňuje architekturu nádorové vaskulatury (Stylianopoulos et al., 2012, Kharaishvili et al., 2014).

### **1.2.3 Složky mikroprostředí nádoru: Endotel a neoangiogeneze**

Neoangiogeneze, jeden z typických rysů nádorového onemocnění, je nutná pro zásobování nádoru kyslíkem a výživou. Bez něj by buňky upadly do dormance (Hannahan et Weinberg, 2011). Vaskularizace tumoru vyžaduje kooperaci mnoha typů buněk z mikroprostředí nádoru, především endoteliálních buněk, pericytů a prekursorů buněk z kostní dřeně.

V průběhu maligní progresy je tvorba nových cév kritická a dochází k ní v časně fázi tumorigeneze. Aktivace angiogenního spínače (angiogenic switch) je esenciální pro zásobování nádoru živinami a kyslíkem, ale umožňuje také rozšiřování metastáz. V porovnání s normálními krevními cévami s vysoce organizovanou strukturou jsou cévy v nádoru většinou vágně uspořádané, se změněnou anatomii a turbulentním tokem krve. Pro neoangiogenezi je mimo jiné klíčový „prototypický“ faktor VEGF-A. Jeho exprese negativně koreluje s celkovým přežíváním

u různých nádorů. Zdrojem VEGF-A mohou být jak samotné nádorové buňky, tak i nádorové mikroprostředí. Aktivace receptoru VEGFR2 rozvolňuje pevné spoje mezi endoteliálními buňkami, což způsobuje jednak prosakování krve do intersticiální TME (tumour microenvironment), jednak usnadňuje intravazaci nádorových buněk do cirkulace, především u nádorů s vysokým intersticiálním tlakem (interstitial fluid pressure). Inhibicí receptorů TGF beta nebo PDGF se snižuje intersticiální tlak v nádoru, což zlepšuje dynamiku dodání léčiva (Kano et al., 2007, Sounni et al., 2010; Pietras et al., 2001). Nádorový cévní systém má často menší počet pericytů i jejich volnější vazbu na endotel. Podobná situace nastává v místě sekundárních metastáz, kdy stimulační VEGF je produkován primárním nádorem nebo lokálně diseminovanými buňkami (Klemm et Joyce, 2015).

#### **1.2.4 Složky mikroprostředí nádoru: Infiltrující imunitní buňky**

Kromě dalších typů stromálních buněk se v nádorech vyskytují i různé buňky derivované z kostní dřeně, jako makrofágy, neutrofilů, mastocyty, myeloidní supresorové buňky a mezenchymové kmenové buňky. Myeloidní supresorové buňky potlačují imunitní reakce na nové nádorové antigeny a podporují metastatický potenciál nádoru. Mezenchymové kmenové buňky mohou diferencovat do širokého spektra buněčných typů. Mezenchymové kmenové buňky jsou lákány do primárního tumoru, kde podporují metastazování. Počty neutrofilů stoupají u pacientů s nádory kolorekta, žaludku a plic. Ve zvířecích modelech neutrofilů podporovaly angiogenezi a metastazování nádoru (Joyce et Pollard, 2009).

Mastocyty a makrofágy v primárním nádoru poskytují širokou škálu proteáz serinových, cysteinových a metaloproteináz. Tyto enzymy umožňují invazi do lokální tkáně remodelací kolagenových fibril, fibrinu nebo elastinu, což vytváří prostor pro pohyb buněk. Proteolytické štěpení navíc vytváří fragmenty ECM s vlastnostmi proinvasivní signalizace (Klemm et Joyce, 2015).

Fyziologické funkce leukocytů jsou spojeny se zánětlivými reakcemi, které se u nádorů rovněž vyskytují. Mnoho typů leukocytů v TME napomáhá nádorovým buňkám v přežívání, růstu, invazi a diseminaci, např. prostřednictvím TAM (tumor associated macrophages). TAM hrají v nádorové progresi podpůrnou roli, na rozdíl od normálních makrofágů, které růst nádoru inhibují. Nejvýraznější vliv můžeme u makrofágů vidět na invazním čele nádoru, kde zprostředkovávají invazi nádorových buněk díky produkci proteáz (MMP2 a 9, kathepsiny), CSF-1 (colony stimulating factor1) a EGF (epidermal growth factor). Makrofágy jsou schopny přirozeně se přizpůsobovat různým fyziologickým podmínkám a mohou přecházet mezi dvěma

stádiu, M1 a M2. M1, klasicky aktivované makrofágy, produkují prozánětlivé cytokiny, participují na prezentaci antigenů a mají protinádorovou úlohu. M2 jsou naproti tomu aktivovány alternativně, v tomto případě produkují cytokiny typu II, mají prokazatelně protumorigenní funkci a působí protizánětlivě. TAM se hromadí v hypoxických oblastech nádoru, kde v závislosti na podmínkách a zastoupení jednotlivých faktorů může docházet k jejich přeměně z M1 do M2 (Quail et Joyce, 2013).

### **1.2.5 Složky mikroprostředí nádoru: Fibroblasty asociované s nádory**

Fibroblasty jsou majoritní buněčnou složkou pojivových tkání, které vytvářejí ECM, regulují diferenciaci u přidružených epitelových buněk, moduluji imunitní odpovědi a zprostředkovávají homeostázu. Fibroblasty asociované s nádory (CAF, cancer associated fibroblasts) se v nádorové tkáni vyskytují ve vysokých počtech, a navíc se od normálních fibroblastů odlišují morfologicky i funkčně. Na příkladu intraepitelové neoplazie u myši byl prokázán protumorigenní účinek CAF při společné injikaci s normálními prostatickými epitelovými buňkami. Injikace normálních fibroblastů podobný efekt nevykazovala (Quail et Joyce, 2013). V případě nádorů prsu CAF podporují metastazování a mezenchymový fenotyp premaligních i maligních epitelových buněk, zatímco normální fibroblasty udržují epitelový fenotyp buněk a inhibují metastazování. Není jasné, jestli CAF vznikají v průběhu progresu nádoru. Experimenty na myším melanomu a pankreatických neuroendokrinních nádorech ukázaly endoteliální původ CAF poukazující na endoteliálně-mezenchymovou tranzici. Tyto buňky dediferencují do takzvané pseudo-mezenchymové populace (mesenchymal like), která vykazuje CAF markery (Quail et Joyce, 2013). CAF jsou v mikroprostředí nádoru aktivovány růstovými faktory a cytokiny jako TGF beta, monocyte chemotactic protein (MCP1), PDGF a FGF. Po aktivaci jsou CAF hlavním zdrojem pro-tumorigenních růstových faktorů, např. VEGF a také prozánětlivých faktorů, které aktivují pronádorovou NF kappa B signalizaci (Quail et Joyce, 2013). Mezi potentní faktory sekretované CAF patří HGF (ligand c-Met), který přes c-Met signalizaci stimuluje proliferaci a invazivitu nádorových buněk (Chaffer et al, 2011). CAF exprimují i fibroblastový aktivační protein  $\alpha$ , který moduluje ECM a který stimuluje invazi. Dále produkují fibroblastový specifický faktor (FSP1, S100A4), který zvyšuje buněčnou motilitu. V neposlední řadě CAF sekretují komponenty ECM (jako tenascin C, fibronectin a kolageny). Výše uvedené faktory mohou podporovat migraci ostatních typů buněk do místa primárního nádoru a pravděpodobně i do budoucích míst metastatické kolonizace (Hannahan et Coussens, 2012).

### 1.3 Dormance nádorů

Dormance primárního nádoru a metastatická dormance se od sebe liší (Weinberg, 2008). Primární nádory prochází dormancí v průběhu neoplastické přeměny, kdy preneoplastické buňky získávají další somatické mutace, aby se vyhnuly senescenci nebo onkogenem indukované apoptóze. V pozdějších fázích využívá nádor dormanci pro ochranu před imunitním dozorem a k vyvolání neoangiogeneze. V premetastatickém místě dochází k dormanci buněk v důsledku adaptace na cizí mikroprostředí. Diseminované buňky tedy po úspěšném dosažení cílového orgánu nemají jasnou cestu ke kolonizaci. Mikroprostředí cílového orgánu může aktivně suprimovat jejich růst, nicméně nádorové buňky mohou odolávat primárním obranným mechanismům a existovat řadu let jako asymptomatické dormantní metastázy. Tento klidový stav souvisí s několika mechanismy, jako jsou buněčná dormance (buňky s pozastaveným růstem v G<sub>0</sub> fázi), dormance nádorové masy (rychlost proliferace odpovídá rychlosti apoptózy) a imunitně zprostředkovaná dormance (Aguirre-Ghiso, 2007).

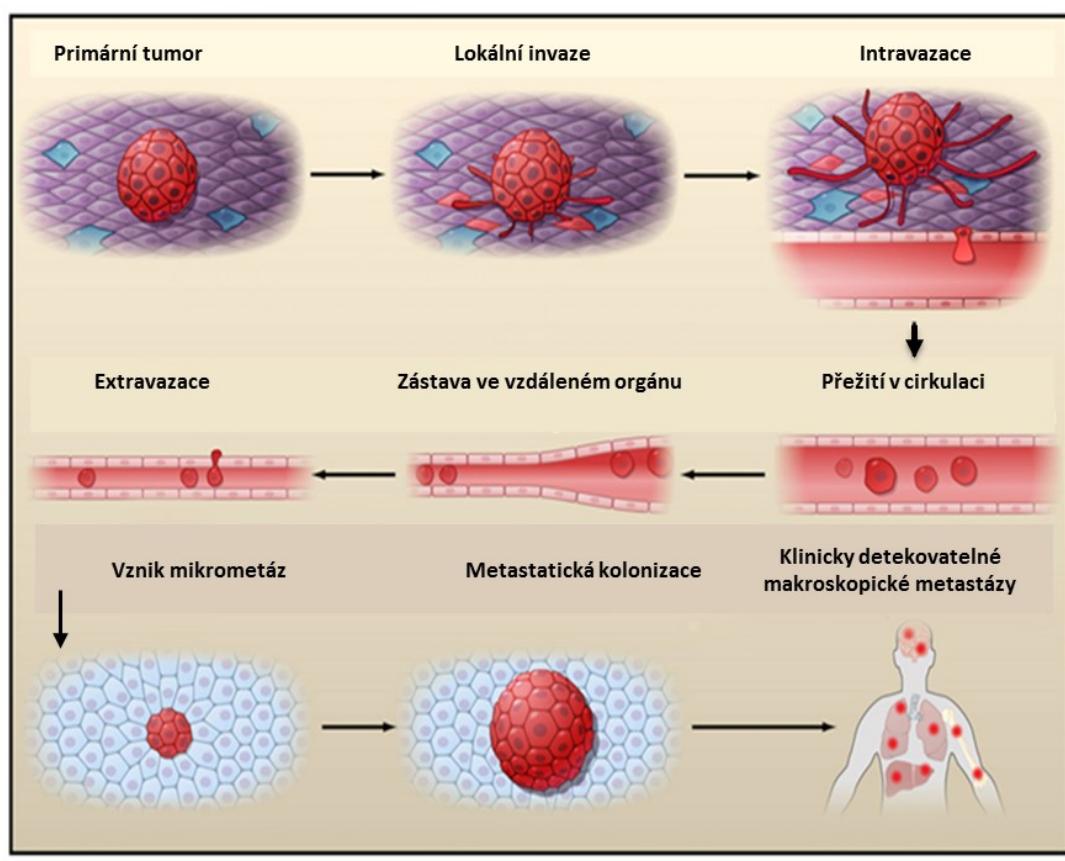
I přes posun ve studiu dormance stále 20% až 30% časných karcinomů prsu vykazuje relaps se vzdálenými metastázami. Riziko opětovného výskytu nádoru je ovlivněno několika faktory, především stádiem při vzniku a celkovou biologii nádoru. Velikost nádoru, zasažení uzlin, invaze do lymfatického řečiště, grading, ER a HER2 status jsou spíše nezávislé faktory rizika relapsu (Kennecke et al., 2010). Na myších modelech se ukázalo, že u nádorů prsu a prostaty vstupují diseminované nádorové buňky do proliferační dormance v premetastatických místech (Aguirre-Ghiso, 2007). I v případě, že se u nádorů prsu detekují metastázy většinou do 10 let od chirurgického odstranění, jsou dokumentovány i případy úmrtí v důsledku metastáz i 20 let po resekci nádoru (Gianconti, 2013). Většina pacientů s Her2+ nebo triple negativními nádory prsu má však relaps s metastázami do plic, mozku nebo jater do 5 let od resekce. ER+ nádory mají relativně konstantní dobu relapsu s tendencí ke kostním metastázám (Kennecke et al., 2010; Smid et al., 2008). U ER+ nádorů prsu a adenokarcinomů prostaty dochází k dormanci v reakci na hormonální terapii. Proto mohou mít antagonisté estrogenových i androgenových receptorů, běžně používaní v adjuvantní terapii, aditivní efekt na prevenci růstu mikrometastáz (Giancotti 2013).

Metastatická reaktivace po dormanci závisí na signálech z okolního mikroprostředí, podobně jako u normálních kmenových buněk. Příkladem může být Coco, antagonist a TGFβ způsobující reaktivaci jednotlivých nádorových buněk v metastázách plic. Coco se akumuluje na povrchu metastazujících buněk a chrání je před inhibičním působením rodiny BMP proteinů z plicní tkáně. Coco není nutný při kolonizaci mozku a kostí, protože tyto tkáně mají okrsky bez bioaktivních BMP (Gao et al., 2012). Tuhost ECM rovněž podporuje únik z dormance. U modelu nádoru prsu bylo prokázáno, že TGFβ indukovaná fibróza plic (aberantní rozložení fibril kolagenu 1) podporuje únik z dormance (Barkan et al., 2010).

## 1.4 Metastatická kaskáda

Nádor je systémové onemocnění, při němž jsou metastázy z 90 % zodpovědné za úmrtí pacienta. Metastazování je tradičně pojato jako lineární řada kroků, tzv. invazně metastatická kaskáda. Jedná se o komplexní sled událostí, kterými musí metastatická buňka projít k úspěšné kolonizaci sekundárního orgánu:

1. Lokální invaze do blízkého okolí extracelulární matrix,
2. Intravazace do lumen krevních/lymfatických cév,
3. Transport a přežívání v nepřátelském prostředí cévního řečiště,
4. Zastavení migrace ve vzdáleném místě,
5. Extravazace a osídlení vzdálené tkáně/orgánu,
6. Přežívání v místě kolonizace a tvorba mikrometastáz,
7. Spuštění proliferace v místě metastázy, a tím vytvoření klinicky detekovatelného novotvaru (Valastyan et Weinberg, 2011).



**Obr. 2: Invazně metastatická kaskáda**

Klinicky detekovatelné metastázy jsou „konečným produktem“ komplexního biologického procesu, při němž nádorové buňky v průběhu progresu onemocnění opouštějí místo primárního nádoru, systematicky se přemísťují a adaptují se na nové prostředí v cílovém orgánu. Nádorové buňky jsou vykresleny červeně. (Upraveno podle Valastyan et Weinberg, 2011).

### 1.4.1 Lokální invaze do okolního stromatu

Invadující buňky se mohou v místě primárního ložiska oddělit od nádorové masy, a pokud již došlo k narušení bazální membrány, penetrují do okolní intersticiální matrix (Valastyan et Weinberg, 2011). Bazální membrána funguje jako důležitá bariéra a rovněž jako zdroj pro integrinovou signalizaci, která udržuje přežívání epitelových buněk, jejich polaritu, proliferaci a invazivitu (Bissel et Hinnes, 2011). Vlastnosti bazální membrány jsou důležité například u karcinomu prsu, kdy při změně struktury kolagenových fibril vzniká více či méně tuhá matrix, která má vliv na progresi nádoru. Vysoká mamografická densita je asociována s vyšším výskytem nádoru prsu. Pro hustší prsní stroma je typická ztráta CD36 a molekulární profil je podobný jako u prsních nádorů. Právě kompozice tkáně v době iniciace může mít významný vliv na to, jestli dojde k vývinu nádoru. Například výrazně cross-linkovaná kolagenová vlákna vzniklá působením HIF1 indukované lysyl oxidázy přispívají k vyšší tuhosti ECM a nadměrné integrinové stimulaci nádorových buněk (Barkan et al., 2010; Cox et al., 2013; Levental et al., 2009; Samuel et al., 2011).

Buňky stromatu a imunitního systému jsou na okraji nádoru vysoce aktivní. Nezralé myeloidní buňky se v této oblasti akumulují a zamezují diferenciaci antigen prezentujících buněk, a tím i protinádorové reakci imunitního systému (Gabilovich et al., 2012). Makrofágy se akumulují na invazním okraji nádoru díky chemoatraktantům, které nádor vylučuje (Condeelis, 2006). Jak bylo uvedeno výše, fibroblasty asociované s nádory jsou zde rovněž abundantní a vylučují proinvazivní faktory. Navíc kyslíkem bohatě zásobený invazní okraj se často výrazně liší od hypoxického centra nádoru (Quail et Joyce, 2013).

#### 1.4.1.1 Typy invaze buněk

Většina buněk z pokročilých solidních nádorů vykazuje kolektivní invazi, což představuje pohybující se kohezivní multicelulární masu buněk, která stále udržuje mezibuněčný kontakt. Důvodem pro podobný typ invaze je fakt, že u karcinomů jsou nádorové epitelové buňky organizovány do multicelulárních jednotek, jako jsou laloky, provazce, žlásky nebo pásy buněk, které jsou odděleny od okolního stromatu. Kolektivní migrace buněk se uplatňuje taktéž u hojení ran v epitelové tkáni, a nádorové buňky *de facto* kopírují stejný proces. Existují však i alternativní mechanismy pohybu tkání/invaze nádorů, které jsou plastické a jednotlivé typy mohou přecházet v další. Rozlišujeme expanzivní růst, „skládání tkáně“ (tissue folding), „multicelulární proudění“ (multicellular streaming), kolektivní invazi nebo invazi jednotlivých buněk. (Friedl et al., 2012). Individuálně migrující buňky nádoru mohou invadovat dvěma



různými způsoby. Jednak jde o *mezenchymovou invazi*, která je proteázově a integrinově dependentní, s výskytem stresových vláken a pak o *ameboidní invazi*, která je Rho/ROCK dependentní (Rho-associated kinase), ale na integrinu a proteázách nezávislá (Friedl et Wolf, 2003).

Invaze individuálních buněk je blokována pevnou hierarchií a uspořádáním normálního epitelu, především díky mezibuněčným spojům s E-kadherinem, který zamezuje oddělení buněk od sousedních. Karcinomy si adoptovaly program EMT (epitelovo mesenchymová tranzice, viz samostatná část 1.6), kterým obcházejí striktní homotypickou adhezi. Proces EMT zahrnuje rozvolnění adherentních a pevných spojů i ztrátu buněčné polarita a přeměňuje buňky z epitelové vrstvy na buňky s mezenchymovými vlastnostmi, jako je například zvýšená invazivita (Friedl et al., 2012). *In vitro* studie prokázaly pozitivní efekt EMT na motilitu nádorů. V *in vivo* podmínkách je pozorovatelný nárůst mezenchymových markerů a downregulace nebo ztráta E-kadherinu.

#### **1.4.2 Transport v krevním a lymfatickém řečišti**

Metastazování je vysoce neefektivní proces, kdy pouze 0,01 % buněk, které opustí primární nádor, je schopno vytvořit detekovatelné metastázy (Chambers, 2001). Odhaduje se, že denně uvolní do oběhu  $1 \times 10^6$  nádorových buněk, nicméně doba přežívání buněk v řečišti se pohybuje kolem 1–4 hodin (Paterlini-Brechot et al., 2000). Současné technologie umožňují monitoring cirkulujících nádorových buněk (CTC, circulating tumor cells) v periferní krvi (Alix-Panabieres et Pantel, 2014). Molekulární a funkční analýza CTC může vést jednak k lepšímu pochopení procesu metastazování, ale také pomoci ve stratifikaci pacientů k systémové léčbě. Analýza CTC z krve před podáním systémové léčby (chemoterapie, hormonální terapie, biologická léčba), v jejím průběhu a po ní poskytuje informace pro optimální podávání léčiva a pro terapii šitou pacientovi na míru (Wan et al., 2013; Scher et al., 2015).

Pro metastatickou diseminaci je důležitý okamžik, kdy se primární nádor vyhne imunitnímu dohledu, a nádorové buňky se dostanou do krevního řečiště. V krvi mohou mít trombocyty protektivní úlohu, při níž přímo interagují s nádorovými buňkami a zvyšují jejich přežívání (Kang et Pantel., 2013). Kritickým faktorem pro přežívání buněk v řečišti v různých orgánech je aktivace AKT signalizace přes kontext dependentní mechanismy. TrkB receptor inhibuje anoikis nádorových buněk aktivací PI3K dráhy v cirkulaci, zatímco v kostní dřeni SRC zprostředkovává AKT signalizaci v reakci na specifické faktory kosti jako CXCL12 chemokin

a TRAIL, aby se podpořilo přežívání diseminovaných buněk (Wan et al., 2013). Extravazace nádorových buněk je kritická pro následný růst metastáz.

Kromě krevního řečiště se nádorové buňky mohou šířit i lymfogenní cestou. Diseminace lymfatickým systémem je pro buňky výhodná z několika důvodů. Anatomie lymfatických cév je odlišná od krevních. Průměr krevních kapilár je přibližně 5–20  $\mu\text{m}$  s jednolitou, kompaktní vrstvou endotelu. Lymfatické vlásečnice mají diskontinuální bazální laminu, bez pericytů a hladké svaloviny, s průměrem 10–60  $\mu\text{m}$ . Šířka lumen lymfatických kapilár je třikrát větší než u krevních cév (Paduch, 2016). Nádorové buňky taktéž volí různou strategii při diseminaci do krevních nebo lymfatických cév. Motilita jednotlivých buněk je typická pro hematogenní cestu, zatímco kohezivní invaze se uplatňuje spíše v lymfatických cévách (Giampieri et al., 2009).

### **1.4.3 Metastatická kolonizace a orgánový tropismus**

Orgánový tropismus, tzv. hypotéza semene a půdy (seed and soil), vyslovená Stephenem Pagetem v roce 1889, popisuje nenáhodný výskyt metastáz s preferencí na určitá místa (Paget, 1889). Metastatickou niku tvoří dané endogenní mikroprostředí v orgánu, kde se metastáza vyvíjí. Primární nádor přispívá k tvorbě tzv. pre-metastatické niky ještě před příchodem a zakotvením diseminovaných nádorových buněk (Sleeman, 2012). Pronádorové premetastatické niky v sekundárních orgánech přidávají na komplexitě celého metastatického procesu. Primární nádor řídí tvorbu premetastatické niky sekrecí různých cytokinů a růstových faktorů, které stimulují mobilizaci a přilákání buněk derivovaných z kostní dřeně do budoucího metastatického místa (Scenay et al., 2013). Příkladem tzv. „homingu“ nádoru, čili predispozici jistých orgánů k metastázám specifickým podle typu nádoru může být karcinom prsu, kdy tkáň kosti, plic, mozku a sentinelové lymfatické uzliny vysoce exprimují CXCL12 (SDF1 $\alpha$  – stromal cell derived factor). Receptor pro tento ligand, CXCR4, je exprimován na povrchu nádorových buněk prsu (Scenay et al., 2013). Tvorba metastatické niky je asociována se změnami ve struktuře a depozicí ECM, jako je např. u fibronektinu, tenascin-C, periostinu, a versicanu. Právě depozice těchto faktorů vede ke koordinované remodelaci ECM, kdy periostin přemostňuje tenascinC k fibronektinu a kolagenu typu I (Sleeman, 2012). Další skupinou enzymů aktivních v remodelaci ECM v nádorové niche jsou lysyl oxidázy (LOX) a LOX-like proteiny (LOXL), které propojují kolagen a elastin v reakci na aktivaci HIF-1 $\alpha$  při hypoxii. Exprese LOX (lysyl oxidázy) u prsního nádoru způsobila imigraci myeloidních buněk a následnou kolonizaci plic (Erler et Gaccia, 2006). Myeloidní progenitory jsou lákány do premetastatických plic, kde indukují MET u nádorových buněk přes downregulaci SMAD2 signalizace a následný přechod

do makrometastáz (Gao, 2012). Zatímco chemokinová signalizace navádí nádorové buňky ke konkrétním orgánům, dialog mezi metastazujícími, stromálními a BMDC buňkami v metastatickém místě je kritický pro prostředí podporující nádor. Pronádorové prostředí určuje, jestli diseminovaná buňka (DTC) metastatickou kolonizaci přežije a bude proliferovat, nebo naopak vstoupí do quiescence, senescence, nebo případně zahyne (Sceneay et al., 2013).

DTC a CTC tvoří intermediární stádium metastatických buněk. Jsou detekovatelné u onkologických pacientů ve většině stádií onemocnění a jsou známkou špatné prognózy. DTC v kostní dřeni pacientů s karcinomem prsu jsou asociovány s relapsem metastáz, bez ohledu na sekundární místa (Wan et al., 2013). DTC i CTC je v současné době možné detekovat v klinických vzorcích (Cabiňáková et Tesařová, 2012), viz kapitola 1.4.4. Charakteristika DTC/CTC je tato: buňky jsou v klastrech, jsou větší (minimálně 4  $\mu\text{m}$ ), s vyšším nukleocytoplazmatickým poměrem, cytoplazma se silně barví na cytokeratin, EpCAM pozitivní, pozitivita na CK 8, 18, nebo 19, negativní na CD45 (Cabiňáková et Tesařová, 2012). Předpokládá se, že DTC jsou původci metastáz. Neustálá přítomnost cirkulujících nádorových buněk v řečišti i po úspěšné léčbě primárního nádoru naznačuje, že přeživší frakce DTC má schopnost uvolňovat buňky do řečiště (Ghajar, 2015). Analýza DTC také poskytuje lepší náhled do mechanismu nádorové dormance, a vedla k objevu putativního metastatického supresoru RAI2 (Werner et al., 2015). Objev dormantních DTC buněk, které osidlují prostředí jednotlivě, a toho, že je jejich chování regulováno mikroprostředím (nikou), dává možnost pro terapii a prevenci metastáz (Ghajar, 2015).

#### **1.4.4 Detekce nádorových buněk a jejich derivátů v řečišti a modulace tumorigeneze a metastazování pomocí exosomů**

Méně invazivní analýzy z krve pacientů jsou z praktického hlediska pro dlouhodobý screening lepší než aspiráty kostní dřene. Tekutou biopsií se myslí analýza cirkulující nádorové DNA, celých cirkulujících nádorových buněk a exosomů vylučovaných nádorem (Chi, 2016).

Exosomy jsou v současné době významně studovanou entitou v rámci odkrytí komplexní komunikace mezi nádorem a ostatními orgány. Jedná se o malé membránové vezikuly o velikosti 30–100 nm nesoucí membránové a cytosolické proteiny, lipidy, DNA a RNA. Pochází buďto z endoplazmatického retikula, nebo jádra. Přirozeně můžeme najít exosomy v mateřském mléce, slinách, spermatu, krvi, cerebrospinálním moku, moči a buňkách pěstovaných *in vitro* (Vlassov et al., 2012; Raposo et al., 2013).

Exosomy mají dominantní efekt na interferenci mezi iniciující buňkou a hostitelskou tkání. Změny v produkci exosomů nebo jejich obsahu mohou pozměnit přilehlé buňky, čímž napomáhají vzniku časně nádorové niky a mobilizaci stromálních buněk napomáhajícím nádoru (Barcellos-Hoff, et al., 2013). Exosomy z nádorů nesou nádorové proteiny a onkogenní kargo, např. c-MET onkoprotein, a po splynutí se stromálními buňkami, jako jsou fibroblasty v premetastatickém místě, mohou „edukovat“ buňky derivované z kostní dřeně na pro-vaskulogenní a pro-metastatický fenotyp (Brabletz et al., 2013). Peinado et al. izolovali exosomy z plazmy pacientů s melanomem a zjistili, že koncentrace proteinů v exosomech byla vyšší u pozdního stádia melanomu než u dřívějších stádií (Peinado et al, 2012).

Fragmenty DNA v cirkulaci z normálních buněk jsou přibližně 100–200 párů bází dlouhé a jsou stále navinuté na histonech. Nádorová cfDNA (cell-free DNA nebo ctDNA, circulating DNA) je naproti tomu kratší, nehledě na typ nádoru (Chi, 2016). Hladiny cfDNA v krvi mohou být využívány pro screening nádorů. V principu jde o identifikaci specifických genetických změn, jako jsou somatické mutace, ztráta heterozygotnosti a chromozomální aberace. Velké koncentrace velmi krátkých fragmentů jsou asociovány s metastazováním. Přítomnost tkáňově specifických transkripčních faktorů a ostatních markerů může odhalit původ orgánu, z kterého nádor pochází (Snyder et al., 2016). Recentní studie na 20 pacientech s nádorem mammy prokázala aberantní chromozomální přestavby v cirkulující DNA 3 roky před standardní diagnózou (Olsson et al., 2015).

CTC mohou být detekovány různými molekulárními, imunologickými i funkčními metodami. Detekce molekulárními metodami může být založená na RNA (multiplexní reverzní transkripční PCR kombinovaná s „liquid bead array“), což umožňuje paralelní amplifikaci a detekci více transkriptů. K imunologickým metodám patří detekce membránových, tkáňově specifických epitopů. Typickým příkladem je v současnosti jediný FDA (Food and Drug Administration) schválený systém Cell Search, který kvantifikuje EpCAM pozitivní nádorové buňky. K funkčním testům patří například *in vitro* test založený na EPISPOT technologii, kdy jsou sekretované nádorové proteiny zachyceny protilátkou na dně kultivační misky a po odmytí buněk se zachycené proteiny detekují sekundární protilátkou s konjugovaným fluorochromem. Odlišnou strategií pro detekci a separaci CTC buněk je využití jejich rozdílné velikosti a buněčné struktury. V současnosti probíhá intenzivní vývoj dalších detekčních systémů CTC, exosomů i cfDNA, které umožní lepší odhad chování nádorového onemocnění i přesnější predikci odpovědi na terapii (Alix-Panabieres et Pantel, 2014).

## 1.5 Epitelovo-mezenchymová tranzice (EMT)

V průběhu maligní progresse nádoru dochází u neoplastických buněk k dynamické a reverzibilní přeměně do mnoha fenotypů (fenotypických stádií), včetně striktně mezenchymového nebo epitelového charakteru (Tam et Weinberg, 2013). Shluky nádorových buněk v rámci primárního nádoru převážně exprimují epitelové markery. Nádorové buňky musí pro invazivitu, diseminaci do vzdálených tkání a následnou kolonizaci přejít, byť jen parciálně, do mezenchymového stadia. Buňka této přeměny dosáhne aktivací buněčného programu EMT (Polyak et Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). EMT může být iniciována a udržována autokrinními i parakrinními mechanismy, a to i za fyziologických podmínek při začátku vývoje a při hojení ran. V organismu dochází i k opačnému procesu, mezenchymově-epitelové tranzici (MET) (Lamouille et al., 2014).

Epitelové buňky v průběhu EMT ztrácejí mezibuněčné spoje a apikálně-bazální polaritu, reorganizují cytoskelet a dochází u nich ke změně tvaru i reprogramování genové exprese. Tyto změny vedou ke zvýšené mobilitě, a tím i k invazivnímu chování (Thiery et al., 2009). EMT, ať ve fyziologických, nebo patologických podmínkách je přísně regulována a má rozpoznatelné markery. Na druhou stranu je to flexibilní proces s různými variacemi v závislosti na typu buňky, tkáňovém kontextu a signálech vyvolávajících EMT. Plasticita epitelového fenotypu umožňuje buňkám procházet EMT/MET opakovaně (Polyak et Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009).

Rozlišujeme 3 různé typy EMT, z nichž každý má jiný dopad na fyziologii. K **EMT prvního typu** dochází při implantaci embrya, embryogenezi a vývoji orgánů. Tento typ EMT nevytváří invazní fenotyp s infiltrací do cév ani fibrózu. **Druhý typ EMT** je asociován s regenerací tkáně a fibrózou. Pro rekonstrukci tkáně po traumatech a zánětlivých poraněních EMT typu 2 generuje fibroblasty a další buňky nutné pro regeneraci. Na rozdíl od typu 1, je 2. typ EMT asociován se zánětem. K fibrotickým změnám orgánů dochází díky kontinuální aktivaci EMT typu 2 v důsledku trvajících zánětů, což může vést i ke zničení daného orgánu. **EMT třetího typu** je asociovaná s nádorovou progresí a metastazováním a je odlišná od obou předchozích typů. K EMT typu 3 dochází u buněk s genetickými a epigenetickými změnami u genů ovlivňujících růst klonů a vývoj lokalizovaných nádorů. Tyto změny pracují v souhře s EMT programem, což vede k invazi a metastazování (Kalluri et Weinberg, 2009).

### 1.5.1 Molekulární podstata EMT

Typickým rysem EMT je downregulace E-kadherinu (je kódován genem *CDH1*) s následnou destabilizací adherentních spojů a zvýšenou expresí mezenchymového N-kadherinu (*CDH2*) společně s aktivací mezenchymového fenotypu. Tato změna v expresi E a N kadherinu se nazývá kadherinový spínač (Yilmaz, 2010). Nádorové buňky ztrácejí kadherinovým přepnutím vazby s epitelovými buňkami a získávají afinitu k mezenchymovým buňkám díky homotypické N-kadherinové interakci. N-kadherinová interakce je slabší než E-kadherinová, čímž se usnadňuje buněčná migrace a invaze (Thevenau et Mayor, 2012).

Remodelace cytoskeletu také přispívá k EMT. Uspořádání intermediárních filament se mění se sníženou expresí cytokeratinu a zvýšenou expresí vimentinu, což je jeden z mezenchymových markerů. Cytokeratin s vimentinem regulují dopravu membránových proteinů a organel. Změny ve struktuře intermediárních filament umožňují motilitu buněk, pravděpodobně díky interakcím motorových proteinů a vimentinu (Mendez et al., 2010).

Transkripční kontrola EMT zahrnuje stěžejní transkripční faktory jako Snail (SNAI1), Slug (SNAI2), ZEB1, ZEB2, TWIST1, TWIST2, z nichž každý představuje přímý represor *CDH1* genu (Drasin et al., 2011). Aktivace těchto faktorů je časnou událostí v EMT. Každý z transkripčních faktorů má různý expresní profil, přičemž transkripční faktory často kooperují a regulují se navzájem. Jejich aktivace závisí na typu buňky nebo tkáně (Peinado et al., 2007). Kromě výše zmíněných faktorů se na regulaci EMT procesu podílí i „forkhead box“ (FOX) transkripční faktor a GATA proteinová rodina, které regulují epitelové spoje nebo polaritu buněk. Oba transkripční faktory řídí EMT při fyziologickém vývoji i v nádorech (Campbel et al., 2011). K řízení EMT přispívají i další mechanismy zahrnující mikroRNA, epigenetickou a postranlační regulaci (Lamouille et al., 2014). Například, mikroRNA představují negativní zpětnovazebnou smyčku pro TGF $\beta$ , konkrétně miR-200, miR-205 a miR-183, které suprimují ZEB1 a ZEB2, zatímco ZEB1 zase reprimuje miR200 (Brabletz et Brabletz, 2010).

### 1.5.2 Extracelulární matrix a EMT

Přestavby ECM jsou klíčovým prvkem v EMT. Molekuly integrinu spojující buňky a extracelulární prostor umožňují komunikaci přes signální mediátory (Lamouille et al., 2014).

Při EMT existuje také korelace exprimovaných integrinů s proteázami, hlavně matrix metaloproteázami MMP2 a MMP9. MMP cílí na transmembránové proteiny, a uvolňují tak např. extracelulární doménu E-kadherinu, což vede ke ztrátě adherentních funkcí. Například přítomnost integrinu  $\alpha V\beta 6$  koreluje s hladinou proteáz a obě skupiny proteinů se nacházejí v invadopodiích, kde zprostředkovávají invazní chování buňky (Shah et al., 2012).

Lokalizovaná degradace ECM také uvolňuje imobilizované růstové faktory, které zpětně působí na buňky. Podobným způsobem integrin  $\alpha V\beta 6$  aktivuje TGF $\beta$ , který je v ECM uchovávan v latentní formě vázaný na fibronectin a fibrilin (Friedl et Alexander, 2011; Sheppard et al., 2005).

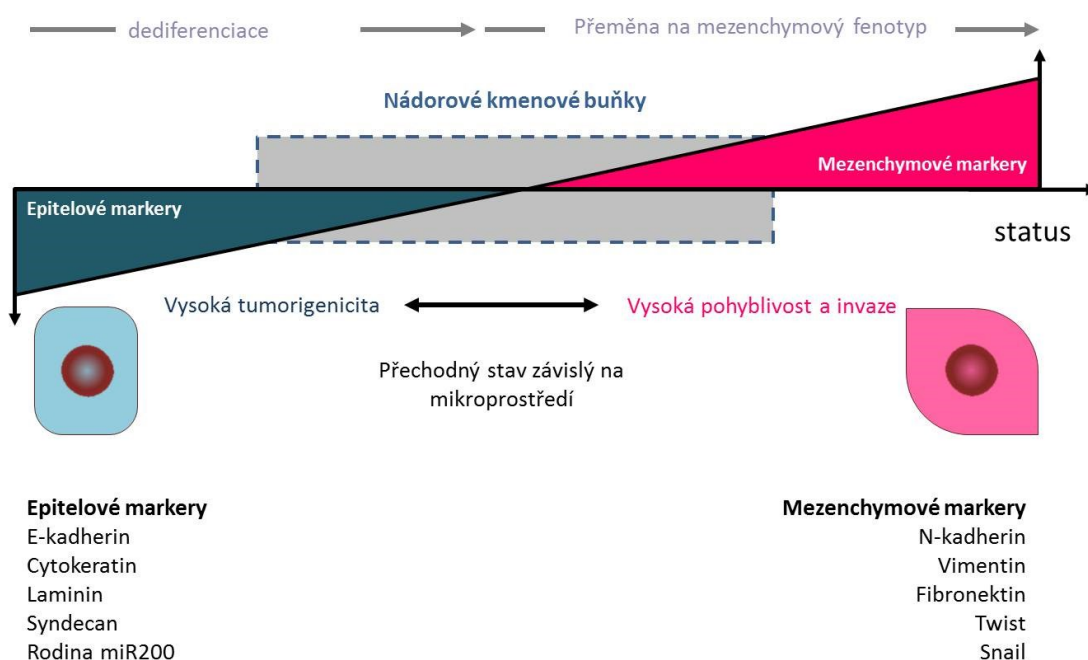
TGF $\beta$  spouští EMT pomocí WNT, jinak by epitelové buňky pod vlivem TGF $\beta$  svůj růst zastavily. SMAD proteiny u epitelových buněk prsu přímo stimulují expresi SNAIL1 a TWIST1. SNAIL1 a SMAD pak reprimují promotor CDH1 genu. BMP, které vyvolávají expresi miR-200 a miR-205 podporují mezenchymově-epitelovou tranzici a brání EMT (Massagué, 2012).

### 1.5.3 EMT a nádorové kmenové buňky

EMT program vyvolává dediferenciaci a diseminaci z primárního nádoru. Pozdější rediferenciace (MET) je nutná pro kolonizaci a růst metastáz. Indukční faktory EMT jsou taktéž zodpovědné za kmenovost („stemness“). Kombinace kmenovosti a EMT fenotypu spouští motilitu a diseminaci nádoru. CTC a DTC jsou pro metastatický proces kritické (Brabletz et al., 2013)

Mani et al. navrhli spojení mezi EMT a kmenovostí u buněk normálních i nádorově transformovaných (Mani et al., 2008). O vazbě mezi epitelové plasticitou a kmenovostí („stemness“) existují ovšem konfliktní důkazy (Ocaña et al., 2012; Celiá-Terrassa et al., 2012). Autoři Ombrato a Malanchi představili gradientový EMT model, kdy je EMT spřažená s kmenovostí v průběhu iniciální aktivace procesu, zatímco v pokročilejším mezenchymovém stádiu je EMT už nekompatibilní se schopnostmi kmenových buněk (Ombrato et Malanchi, 2014). EMT markery u nádorových kmenových buněk (CSC, cancer stem cells) se pokládají za negativní pro prognózu u pacientů s nádory prsu a prostaty (Bednarz et al., 2010). EMT markery jsou často ko-exprimovány s epitelovými markery, což poukazuje na fakt,

že CSC mohou mít semimezenchymový fenotyp. Zajímavým znakem trombocytů je, že jsou schopny indukovat EMT u CSC díky účinku TGFβ a NFκB a tím připravují buňky k metastazování. Předpokládá se, že diseminující nádorové buňky se musejí transformovat zpět na epitelový fenotyp, pokud chtějí dát vznik plně rozvinutým metastázám. To vysvětluje morfologickou podobnost metastatických ložisek s primárním nádorem. Terapeutika cílící na epitelovo-mezenchymovou plasticitu mohou úspěšně eliminovat zvýšené riziko metastáz např. při chirurgických výkonech, které produkují velké množství DTC buněk. Periostin (POSTN) je složka extracelulární matrix indukovaná u fibroblastů asociovaných s nádory a zachovává nádorové kmenové buňky aktivací Wnt dráhy (Malanchi et al., 2012). Společně s tenascinem je POSTN známkou špatné prognózy u pacientů s nádorem prsu (Kang et al., 2013).



**Obr. 3: Gradientový model EMT**

Dualita EMT programu v aktivaci epitelových buněk spřažená se „stemness“ při iniciální aktivaci po dosažení vhodného stupně diferenciaci není kompatibilní s kmenovostí po dosažení plného mezenchymového stadia. Kmenovost je udržována v jistém období mezi částečně dediferencovaným epitelovým stádiem a částečně dediferencovaným mezenchymovým stádiem. Buňky v „období kmenovosti“ vykazují různé fenotypy v závislosti na působení mikroprostředí, např. proliferativní epitelový fenotyp nebo pohyblivý mezenchymový fenotyp. U obou typů, epitelového i mezenchymového, jsou uvedeny příklady faktorů působících na proces EMT. (Upraveno podle Ombrato et Malanchi, 2014; Kalluri et Weinberg, 2009).



Tým Wicha et al. ukázal, že prsní nádorové buňky existují v alternativních stádiích charakterizovaných rozdílnou expresí molekulárních markerů (Liu et al., 2014). Mezenchymové CSC se znaky CD44+/CD24- jsou vysoce quiescentní, ale vysoce invazivní. Naproti tomu epitelové (MET) CSC jsou typické expresí aldehyd dehydrogenázy (ALDH), jsou vysoce proliferativní a schopné vytvořit více diferencovanou masu nádoru. Plasticita CSC je klíčovým prvkem v úspěšném metastatickém procesu (Liu et al., 2014). Navíc se odborníci shodují v tom, že většina CSC vykazuje funkční, ale také fenotypickou plasticitu. To znamená, že populace, které nemají CSC markery mohou dát vznik populacím, které tyto znaky i schopnost tumorigenicity mají. Například ektopická exprese EMT transkripčních faktorů může této přeměně napomáhat (Mani et al., 2008; Chaffer et al., 2013).

Sebeobnova CSC napomáhá rekurenci nádoru po standardní chemoterapii, a tudíž zacílení léčby na tento aspekt by mohlo být vhodnou strategií na inhibici progresu onemocnění. Mnoho CSC ze solidních nádorů neexprimuje diferenciační markery, jako např. karcinomu prsu, prostaty a kolorekta. Teoreticky by to mohlo znamenat, že diferenciační terapie může senzitivizovat CSC vůči chemoterapii (Vidal et al., 2014)

Dospělé kmenové nádorové buňky osidlují podpůrné mikroprostředí složené mimo jiné z mezenchymových, vaskulárních a imunitních buněk, extracelulární matrix a povrchových signálních molekul (Voog et al., 2010). Dnes už je mikroprostředí považováno za charakteristický znak regulující ve skutečnosti každý aspekt biologie nádorů (Hannahan et Weinberg, 2011)

## 1.6 Asporin a rodina malých proteinů s repeticemi bohatými na leucin

Rodina SLRP (small leucine rich repeat protein) proteinů tvoří významnou, biologicky aktivní složku většiny extracelulárních matrix (Schaefer, 2008). Tato rodina zahrnuje 18 členů. Strukturně jsou SLRP charakterizovány hlavní proteinovou páteří tvořenou na leucin bohatými repeticemi (LRR, leucine rich repeat) a mnoha kovalentně navázanými glykosaminoglykanovými (GAG) postranními řetězci různé povahy (chondroitin, dermatan, keratan nebo heparan sulfátu) (Merline et al., 2009). Po syntéze jsou tyto proteoglykany sekretovány do pericelulárního prostoru. SLRP rodina se na základě počtu repetic a rozmístění cysteinových zbytků dělí na 5 tříd (I–V). SLRP proteiny mají pleiotropní funkce, které ovlivňují růst a diferenciaci, proliferaci, přežívání, adhezi, invazi a metastazování (Merline et al., 2009; Dellet et al., 2012). Nejlépe prostudovanými členy SLRP jsou decorin, biglycan (třída I) a lumican (třída II) (Edwards, 2012). Dále se věnuji pouze námi studovanému asporinu a jeho úloze v nenádorových onemocněních a nádorových procesech.

### 1.6.1 Asporin a jeho charakterizace

Asporin byl identifikován v roce 2001 nezávisle třemi výzkumnými skupinami (Henry et al., Lorenzo et al., Yamada et al.). Gen je lokalizován na 9. chromosomu a tvoří jej 8 exonů. Protein asporin vykazuje 54% identitu s decorinem a 60% identitu s biglycanem (Kou et al., 2010). Proteinová osa asporinu je tvořena 12 LRR repeticemi, které interagují především s kolagenem typu I (Lorenzo et al., 2001; Henry et al., 2001). Glycoprotein asporin není pravým proteoglykanem, protože postrádá mnohočetná glykosylační místa. Na asparaginu 281 je přítomna N-glykosylace a putativně se na molekule vyskytuje i O-glykosylační místo na serinu 54. Asporin nemá, na rozdíl od decorinu a biglycanu, chondroitinové nebo dermatan sulfátové řetězce. Místo toho má repetici kyseliny asparagové (D-repetice), které se vyskytují v počtu 8–19, typická délka je 13 molekul kyseliny asparagové (D13) (Heinegård, 2009). Tato polyaspartátová oblast váže vápník a reguluje tvorbu hydroxyapatitu a mineralizaci kolagenové matrix (Kalamajski et al., 2009).

### 1.6.2 Asporin a onemocnění pohybového aparátu

Historicky nejprostudovanější je asociace asporinu s onemocněními pohybového aparátu. Polymorfni alela D14 je silně asociována s patogenezí osteoartritidy kolene a s vyšší prevalencí u populace východní Asie, nikoli však u kavkazoidní populace ( Song et al., 2008; Xu et al., 2015). Podobně je tato alela asporinu asociována s ankylozní spondylitidou a degenerací bederních plotének ve východních asijských populacích. Další genetický polymorfismus (v

intronu mezi exony 3 a 4) byl asociován s progresí osteoartritidy ruky v kavkazoidní populaci (Bijsterbosch et al., 2013). Kritickým regulátorem v prostředí kloubní chrupavky je TGF $\beta$ , který má klíčovou úlohu v homeostáze chrupavkové tkáně a patogenezi osteoartritidy. Asporin blokuje chondrogenezi a inhibuje expresi TGF $\beta$  indukovaných genů extracelulární matrix. Regulace asporinu přes modulaci TGF $\beta$  hladiny vytváří zpětnovazebnou smyčku, kdy jeho knock-down zvyšuje expresi chrupavkového TGF $\beta$ , což naopak stimuluje expresi asporinu u buněk kloubní chrupavky. Asporin rovněž kolokalizuje na povrchu buněk s TGF $\beta$  a blokuje aktivaci TGF $\beta$ II receptoru (Nakajima et al., 2007).

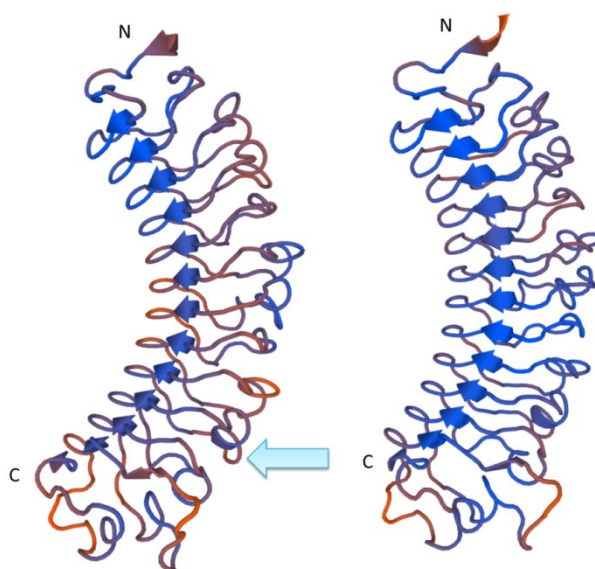
Podle prvních studií na myších tkáních je asporin převážně exprimován ve skeletu, především u perichondria/perioste chrupavek/kostí, stejně jako u specializovaných tkání, jako jsou šlachy, skléra, pojiva kolem svalů a dermis (Henry et al., 2001). Asporin je rovněž silně exprimován během vývoje zubu v dentálním folikulu, což je progenitorové stádium cement-produkující tkáně, alveolární kosti a periodontálního ligamentu (PDL) (Yamada et al., 2006). U knock-down studií na myším modelu byl prokázán negativní efekt asporinu na regulaci PDL diferenciaci a mineralizaci, čímž nedochází k osifikaci PDL, zachovává homeostázu podpůrného systému zubu a také inhibuje BMP2 indukovanou diferenciaci. Principem této inhibice je navázání ASPN na BMPRII receptor, což vede k inhibici SMAD signalizace (Tomoeda et al., 2008). V prostředí lidských kmenových buněk ze zubní pulpy (hDPSC) byl asporin exprimován v časně fázi a klesal s pozdní fází mineralizace hDPSC (diferenciaci na odontoblasty). To ukazuje, že je asporin nutný v rané fázi vývoje odontoblastů a není dále exprimován v pozdní fázi diferenciaci těchto buněk (Lee et al., 2011).

### **1.6.3 Asporin a nádorová onemocnění**

Naše výzkumná skupina identifikovala asporin jako jeden z proteinů asociovaných s nádory prsu, kde byl upregulován u invazivních karcinomů společně s dalšími proteiny extracelulární matrix (Turashvili et al., 2007). Jiná výzkumná skupina zařadila asporin mezi 22 genů specifických pro kostní metastázy nádorů prsu (Klein et al. 2009). Kostní metastázy jsou typické spíše pro ER/PR+ pozitivní subtyp než pro triple negativní skupinu nádorů prsu (Vona Davis et al., 2014). Pro triple negativní nádory byl asporin recentně popsán jako nádorový supresor (Maris et al., 2015). Indukovaná exprese asporinu v modelové linii MDA-MB-231 a MDA MB-468 omezila *in vivo* nádorový růst i schopnost metastazovat (Maris et al., 2015).

U dalších typů nádorů se role asporinu může lišit. Elegantní práce týmu Satoyoshi et al. (2014) ukázala, že asporin indukovaný nádorovými buňkami karcinomu žaludku v CAF recipročně podporuje invazi těchto nádorových buněk, a tím podporuje šíření nádoru. Dále byl asporin nalezen mezi 7 biomarkery upregulovanými v séru a solidní tkáni pacientů s pokročilým karcinomem prostaty (Klee et al., 2012) a byl také vysoce exprimován v kostních metastázách prostatických nádorů (Stanbrough et al., 2006).

Vliv polymorfizmu D-repetice na progresi onemocnění byl prokázán i u nádorů prostaty, kdy D14 v homozygotní nebo heterozygotní konstituci byla asociována s metastatickou rekurencí po terapii (Hurley et al., 2016).



**Obr. 4: 3D model struktury asporinu a decorinu.**

Modrá šipka označuje N-glykosylaci na Asn<sup>281</sup>.

Modely byly vytvořeny pomocí Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) z University of Basel.

#### 1.6.4 Mechanismy oprav poškození DNA

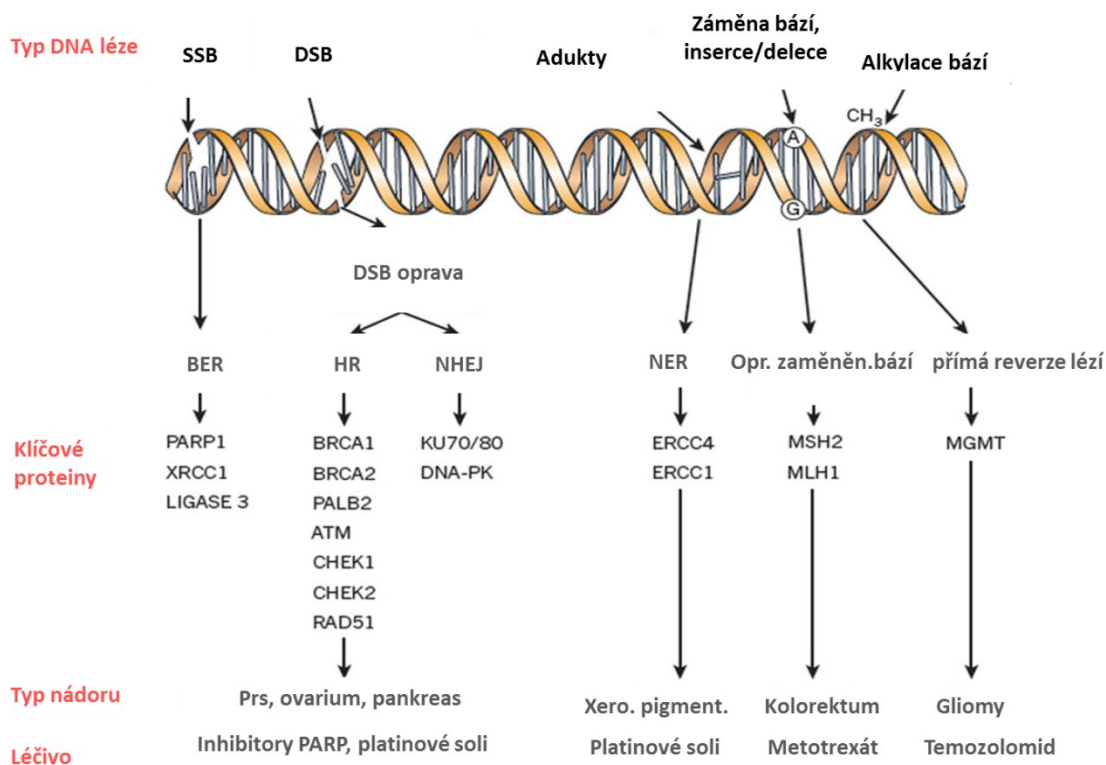
Poškození DNA vlivem prostředí může mít chemickou nebo fyzikální povahu. Příkladem fyzikálních genotoxických látek jsou ionizační záření (IR) a ultrafialové záření (UV), které může samo o sobě způsobit  $10^5$  lézí v DNA za den. IR, RTG záření nebo radioterapie způsobují oxidaci DNA bází a vytváří jedno (SSB) nebo dvouřetězcové zlomy (DSB). Kouření cigaret např. způsobuje širokou škálu aduktů a oxidativního poškození v plicích a ostatních tkáních (Ciccia et Elledge, 2010).

Obecně mohou být mechanismy odpovědi na DNA poškození (DDR, DNA damage response) rozděleny na řadu odlišných, ale funkčně provázaných drah, které závisejí na typu poškození DNA. Většina DDR signálních drah zahrnuje tyto přísně koordinované procesy: detekce poškození DNA, akumulaci reparačních faktorů v místě poškození a fyzickou opravu DNA léze (Lord et Ashworth, 2012).

V reakci na poškození DNA se vyvinulo několik reparačních mechanismů specifických pro daný typ DNA léze. Špatně spárované DNA báze jsou nahrazeny správnými bázemi mechanismem opravy zaměněných bazí (MMR – mismatch repair). Menší chemické změny bazí jsou nahrazeny procesem bázové excizní opravy (BER) vyštěpením vadné báze. Komplexnější léze jako pyrimidinové dimery a překřížená vlákna jsou zkorigovány nukleotidovou excizní opravou (NER) vyjmutím přibližně 30 bp (párů bazí) kolem poškozené báze. SSB jsou opraveny reparací jednotlivého vlákna, zatímco korekce DSB probíhá spojováním nehomologních konců (NHEJ) nebo homologní rekombinací (HR). NHEJ může vytvářet potenciálně chybné znovuspojení, zatímco homologní rekombinace přesně reparuje genomickou sekvenci poškozeného vlákna DNA s využitím sesterské chromatidy jako templátu (Ciccio et Elledge, 2010). Při NHEJ jsou DSB rozpoznány Ku proteinem, který se poté váže a aktivuje protein kinázu DNA-PKcs, což vede k aktivaci enzymů zpracovávající DNA konce, polymerázy a DNA ligázy IV. NHEJ sice má sklon k vytváření chyb, ale může pracovat v kterékoliv fázi buněčného cyklu. Naproti tomu HR je omezena na S a G2 fázi, kdy je k dispozici sesterské chromatidové vlákno jako templát pro reparaci. I když existuje několik typů HR, vždy je iniciována vznikem jednovláknové DNA, podporována různými proteiny jako MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) komplex. Jednovláknová DNA při katalýze RAD51 a BRCA1 a 2 proteinů, invaduje do nepoškozeného templátového vlákna a následnou akcí polymeráz, nukleáz, helikáz a ostatních komponent dochází k opravě a ligaci DNA. Klíčové komponenty DDR signalizace u savčích buněk jsou ATM a ATR kinázy, které jsou přitahovány a aktivovány v místě poškození DSB nebo jednovláknovou DNA obalenou RPA (replication protein A). Nejvíce studovanými downstream molekulami jsou proteinové kinázy Chk1 a Chk2, které společně s ATM a ATR pracují na snížení aktivity cyklin dependentních kináz (CDK) prostřednictvím různých mechanismů, z nichž některé jsou zprostředkovány p53. Inhibice CDK vede k zástavě buněčného cyklu v G1–S, intra S a G2–M fázi, což vytváří prostor pro opravu DNA lézí, před replikací nebo mitózou. Paralelně ATM/ATR signalizace zvyšuje transkripčně nebo post-transkripčně efektivitu oprav DNA pomocí faktorů „přivolaných“ do místa poškození. Taktéž ATM/ATR kinázy aktivují reparační proteiny modulací jejich fosforylace, acetylace,

ubikvitinace nebo SUMOylace. Pokud nejsou mechanismy DDR aberantně pozměněny, dovolují po opravách DNA normální fungování buňky. V případě, že se léze nedá opravit, spouští DDR signalizace buněčnou smrt apoptózou nebo senescencí buněk – obojí má potenciální protinádorový účinek (Jackson et Bartek, 2009).

PARP (poly-(ADP-ribóza) polymeráza) je dalším důležitým mediátorem oprav SSB a DSB lézí v DNA. Inhibice PARP funguje jako nová strategie léčby nádorů vaječníků a nadějně výsledky byly získány také u karcinomů prsu a prostaty (Kim et al. 2015, Mateo et al. 2015). Inhibitory enzymu PARP1, který je důležitou signální komponentou mechanismu DDR, a zejména dráhy opravy jednořetězcových zlomů DNA, jsou nyní testovány v řadě klinických pokusů jako nadějně léky, především u nádorů defektních v mechanismu opravy pomocí homologní rekombinace. Jde tedy o efekt syntetické letality endogenního defektu HR u daného nádoru (typicky mutace BRCA1/2), a současné inhibice mechanismu, který v takových buňkách udržuje ještě tolerovatelnou míru genomové stability. Tyto inhibitory mohou být účinné nejen u BRCA mutovaných nádorů a hledání dalších prediktivních znaků může tedy významně rozšířit jejich úspěšné terapeutické využití (Helleday 2016).



Obr. 5: DNA reparační mechanismy udržující stabilitu genomu (Upraveno podle Lord et Ashworth, 2012).

## **2 CÍLE PRÁCE**

### **2.1 Projekt 1: Význam exprese asporinu v invazních karcinomech prsu**

- \* Nalezení vhodné nádorové buněčné linie exprimující asporin a zhodnocení jeho prognostické role ve veřejně dostupných databázích
- \* Validace anti-ASPN protilátek
- \* Modulace exprese asporinu v modelové linii Hs578t a následné funkční testy invazivity a motility různých typů buněk

### **2.2 Projekt 2: Mechanismy integrity a nestability genomu v patogenezi a potenciální individualizovaná molekulárně-cílená léčba karcinomu prostaty**

- \* Western blot analýza a porovnání profilů vybraných buněčných linií karcinomu prostaty po ozáření
- \* Zhodnocení společného působení PARP a DNA-PK inhibitorů a ozáření

## **3 METODIKA**

### **3.1 Nádorové buněčné linie**

V experimentech byly použity autentizované prsní nádorové linie s negativním průkazem mykoplazmové infekce. Hs578t (z ECACC – Salisbury, UK) byly pěstovány v DMEM (Dulbecco's Modified Eagles' Medium, Life technologies Carlsbad, CA) obohaceném o 10% fetální bovinní sérum (FBS, ThermoScientific, MA, USA), 1% penicilin/streptomycin (Life Technologies) a insulin (10 µg/ml) (Life Technologies). MDA-MB-231, BT549 a T47D (zakoupené z ATCC, Rockville, MD, USA) byly kultivovány v DMEM obohaceném o 10% FBS a 1% penicilin/streptomycin. Primární fibroblasty z nádorů prsu byly laskavě poskytnuty dr. Kahounovou z Biofyzikálního ústavu v Brně. Celkově jsme pracovali se vzorky od tří pacientek, které jsme nazvali BCAF3, BCAF4 a BCAF5 (klinické a molekulární charakterizace jsou v metodické části Simkova et al., 2016). BCAF4 nejrychleji proliferovala a měla pozdní nástup senescence, proto jsme ji použili do následujících experimentů. Tyto buňky byly pěstovány v DMEM obohaceném o 10% FBS a 1% penicilin/streptomycin. Do experimentů jsme použili buňky BCAF4 v pasáži 9–12.

### **3.2 Normální fibroblasty získané ze zubní pulpy a hDPSC**

Normální fibroblasty ze zubní pulpy byly laskavě poskytnuty prof. Jitkou Ulrichovou (Ústav lékařské chemie a biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci). Fibroblasty byly získány od zdravých dárců, kteří podstoupili excizi třetích molárů. Získání a zpracování tkáně bylo provedeno podle doporučení etické komise. Izolované fibroblasty byly kultivovány v DMEM obohaceném 10% FBS a 1% penicilin/streptomycinem. Pro experimenty byly použity buňky mezi 3. a 10. pasáží. hDPSC (human dental pulp stem cells) z extrahovaných molárů použité při validaci protilátek nám laskavě poskytl prof. Jaroslav Mokry z Lékařské fakulty v Hradci Králové (viz metodická část v Simkova et al., 2016).

### **3.3 Typy ovlivnění Hs578t**

Hs578t byly použity na různé experimenty zahrnující invazní testy a prosté změny v kultivaci, adhezi a migraci ve 2D uspořádání.

Ovlivnění TGF  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) o koncentraci 10 ng/ml, BMP2 a BMP4 (bone morphogenetic protein 2 a 4) v koncentraci 100 ng/ml byly přidány do kultivačního media bez séra k buňkám starvovaným po dobu 24 hodin, Hs578t byly následně inkubovány po dobu 48 hodin. Každý cytokin byl navíc na stejnou dobu doplněn cycloheximidem (Sigma-Aldrich,



Německo) v koncentraci 10 µg/ml. IGF1 (Insulin like growth factor 1; laskavě poskytl dr. Santer, Innsbruck Medical University) byl k buňkám přidán v koncentraci 50 ng/ml a 300 ng/ml na 24 hodin. JAK inhibitor (CAS 457081-03- 7, Merck) byl přidán v 4 µM koncentraci k 24 h starvovaným buňkám a sběr proběhl po 3, 8 a 24 h. Starvované Hs578t buňky byly kultivovány v přítomnosti rekombinantního lidského insulínu (Life Technologies) v koncentraci 10 µg/ ml nebo 10 ng/ml po dobu 48 hodin. Změny v expresi asporinu byly monitorovány taktéž u buněk kultivovaných v hypoxických podmínkách 3% O<sub>2</sub>. Kultivace HS578t ve 3D podmínkách bylo dosaženo pomocí polystyrenové matrice Alvetex® (Reinervate, UK), matrix derivované z bazální membrány Geltrexu® (Life Technologies) nebo kolagenu typ I (Purecol®, Advanced BioMatrix, Carlsbad, CA). Doba kultivace byla 12 dní na matrici Alvetex a 4–5 dní na ostatních matricích.

### **3.4 Sferoidní assay**

Experimenty se sferoidním růstem buněk byly provedeny tzv. „liquid overlay“ metodou (Friedrich et al., 2009). Vybrané buněčné linie byly přidány v koncentraci 10 000 buněk, ve 100 µl DMEM, na konvexní povrch tuhého 1,5% agarozového gelu (LE, Promega, WI, USA). 96jamkový panel byl centrifugován 15 minut při 1000 ot./min, aby se iniciovalo shluknutí buněk. Formování mamosfér bylo pozorováno po 4 dnech kultivace.

### **3.5 Stabilně transfekované buněčné linie**

U MDA-MB-231 a BT-549 byla provedena overexprese asporinu pomocí plné sekvence ASPN (TrueClone, pCMV6-AC, Origene) anebo „open reading frame“ (TrueORF, pCMV6, Origene) s využitím transfekčního systému Neon (Life Technologies). Selekčním antibiotikem pro stabilně transfekované linie byl 0,5 mg/ml geneticin, který byl aplikován po 2 týdny, a pro delší kultivaci jsme použili 0,1 mg/ml geneticin.

Asporinový knock-down u buněk HS578t, byl proveden elektroporací s využitím „short hairpin RNA“ (sh17, sh18 nebo sh19 v pRS plasmidu, Origene, plné sekvence jsou uvedeny v metodické sekci Simkova et al., 2016) a selektovány 1 µg/ml puromycinem v médiu.

### 3.6 Test kolagenové fibrilogeneze

Pepsinem extrahovaný kolagen (Purecol, Nutacon) byl zneutralizovaný 0,1M NaOH a naředěn do 150mM NaCl s 20mM HEPES (pH 7,4). Do roztoku byl přidán rekombinantní asporin (laskavě poskytl prof. Åke Oldberg, Lund, Švédsko). Následovala inkubace při 37 °C (indukce kolagenové fibrilogeneze). Zvyšující se hodnota absorbance byla odečítána každou hodinu při  $\lambda = 400$  nm. Celkový odečet byl 8 hodin. Test byl zopakován dvakrát.

### 3.7 Adheze a proliferace

Buněčná adheze a proliferace se měřily na přístroji xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP (Roche diagnostic, GmbH, Německo). Pro měření adheze buněk bylo na destičku E-plate 16 nasazeno 40 000 buněk na jamku a zvyšující se cell index byl monitorován každých 30 sekund po 4 hodiny, po nichž následovalo měření proliferace po dalších 64 hodin.

### 3.8 Scratch assay

Pro měření migrační schopnosti buněk se plně konfluentní populace buněk na 6 cm misce seškrábala v jednom úzkém pruhu pomocí špičky z pipety. Buňky rostly ve standardním médiu obohaceném o 10  $\mu$ g/ml mitomycinu C (Roche). Migrující buňky byly monitorovány každé dvě hodiny po 24 hodin.

### 3.9 Invazní assay

Buněčná invaze se monitorovala na xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP. Parentální nádorové buněčné linie (MDA-MB-231, BT-549 a Hs578t) a jejich knock out/knock in klony byly použity pro následující experimenty. Nejdříve byla testována invazní schopnost parentálních linií Hs578t, MDA-MB-231 a BT-549 na kolagenu I s/bez přítomnosti rekombinantního asporinu (laskavě poskytnut profesorem Åke Oldbergem, University of Lund). Dno invertované CIM desky (Roche/Acea,CA, USA) bylo pokryto 30  $\mu$ l 200  $\mu$ g/ml roztoku kolagenu I (Purecol®, Advanced BioMatrix, Carlsbad, CA) podle Kalamajski et al., 2009. Po 30 minutách byl zbylý roztok odpipetován. Horní jamky byly pokryty 30  $\mu$ l kolagenu s/bez 10nM rekombinantního asporinu. Pokrytá destička byla inkubována při 37 °C, 6 hodin. Spodní jamky rezervoárové části destičky se naplnily 170  $\mu$ l DMEM s 10% FBS jako chemoatraktantem, horní část desky se po uplynutí 6 hodin zaplnila 30  $\mu$ l DMEM bez FBS a obě části se sepnuly dohromady. Následovala 1 hodina ekvibrace při 37 °C v inkubátoru. Po uplynutí této doby se odečetl background media. Poté se do horních jamek přidala buněčná suspenze ve 100  $\mu$ l na jamku s následnou 10 minutovou ekvibrací v inkubátoru.

Modifikovaný postup byl použit u invazní assay buněk BCAF4 a T47D, kdy se horní jamka CIM desky překryla 30  $\mu$ l směsí 200  $\mu$ g/ml kolagenu I (Advanced BioMatrix, Carlsbad, CA) Matrigelem®, (200  $\mu$ g/ml; Corning, MA, USA) a 15mM D-ribózou (Sigma-Aldrich), následovaná inkubací při 37 °C, 1 hodinu. Před sestavením obou částí desky se spodní jamky naplnily 170  $\mu$ l DMEM s 10% FBS. Zátka z kolagenu/Matrigelu/ribózy se převrstvila 30  $\mu$ l SFM média. Po sestavení desky následovala inkubace 1 hodinu v inkubátoru. Poté se změřilo pozadí media a přidala se suspence starvovaných buněk ve 100  $\mu$ l.

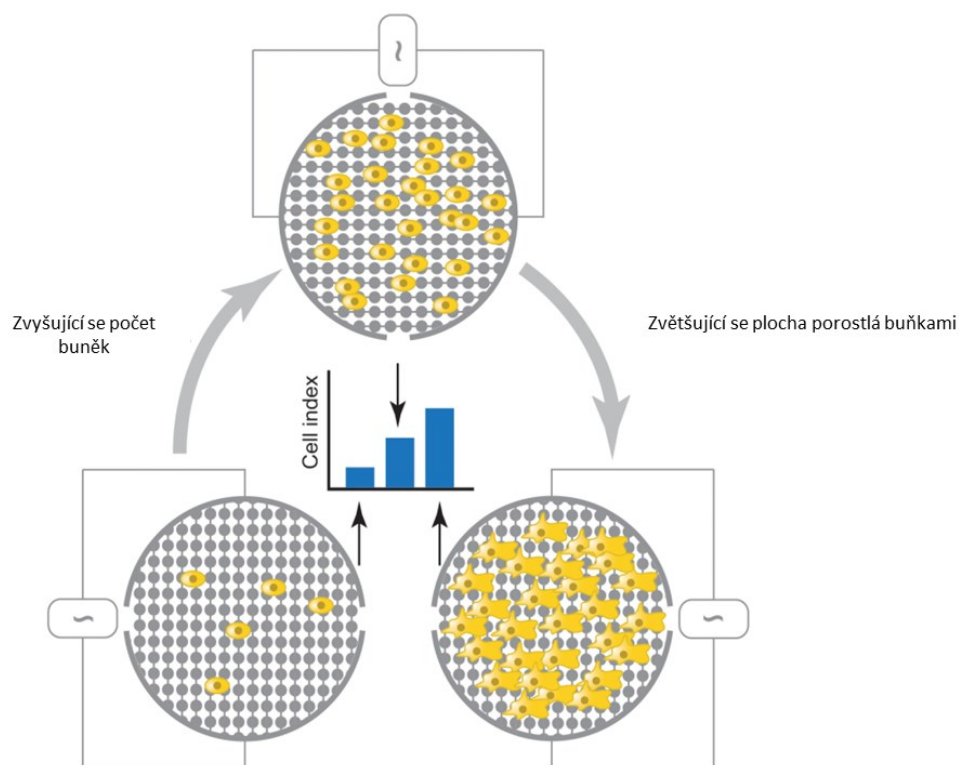
Odečítání signálu probíhalo pro všechny experimenty každých 10 min po dobu 65 hodin.

### **3.10 xCELLigence systém**

xCELLigence RTCA systém je neinvazivní kontinuální způsob měření buněčné proliferace, viability, adheze, migrace a invaze bez nutnosti buňky fixovat a barvit, který zobrazuje změny buněk v reálném čase (přehledně zpracováno v Atienza et al., 2006). xCELLigence technologie představuje alternativu k tradičním “end point” testům typu Boydenovy komůrky, kdy se zkoumané buňky nechají migrovat z horní jamky přes membránu s mikropóry do spodní jamky s chemoatraktantem. Buňky, které migrovaly do prostoru druhé jamky, jsou poté zafixovány, nabarveny a spočítány (Boyden 1962).

Technologie xCELLigence je založena na měření impedance v matricově uspořádaných zlatých elektrodách umístěných na dně jamky (E-16 plate) anebo na vnější straně dna transwelových jamek (CIM-plate). Signál se mění podle toho, jak buňky adherují/deadherují k povrchu elektrod, čímž se mění impedance, která se komplexními algoritmy převede na tzv. „cell index“ (CI). Existuje přímá korelace mezi počtem adherovaných/migrujících buněk a CI hodnotou (Roshan Moniri et al., 2015). Impedance se vztahuje k morfologii buněk, síle adheze, porostlé ploše elektrod a počtu buněk (Atienza et al., 2006; Ke et al., 2011).

Kromě klasických testů cytotoxicity, adheze, migrace a invaze je xCELLigence RTCA možné využít i pro další spektrum experimentů, např. měření kardiotoxicity (Xi et al., 2011), toxicity na modelových červech (Smout et al., 2010) nebo případně k mimikování hematoencefalické bariery (Sansing et al., 2012).



Obr. 6: Schématické znázornění měření signálu technologií xCELLigence

### 3.11 Izolace RNA, reverzní transkripce and kvantitativní PCR

K izolaci totální RNA se použil RNeasy Mini Kit (Qiagen). Reverzní transkripci s random hexamery a SuperScript III Reverzní Transkriptázou (Invitrogen) předcházel pre-treatment DNazou I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR proběhla pomocí následujících primerů a prób s UPL probe systémem (Roche). Vyhodnocení relativní kvantifikace bylo s využitím dCt metody na TBP jako referenčního genu (Pfaffl, 2001).

Tab. 1: Primery a próby použité na RT-PCR analýzu

Gen	F primer	R primer	Próba
ASPN	5'GGGTGACGGTGT CCATATC 3'	5'TTGGTGGTAAGCCT TTAGGAA 3'	5'BHQ1- TTGCAGAAGCAAACTGACC- FAM3'
TBP	5'CACGAACCACGGC ACTGATT 3'	5'TTTTCTTGCTGCCAG TCTGGAC 3'	5'BHQ1- TCTTCACTCTGGCTCCTGTGCA CA-HEX3'

### 3.12 Colony forming assay

#### *PARP inhibitor (KU58948)*

Schéma experimentu bylo následující: den 1 - po pasáži byly buňky vysety v počtu 1000 buněk na jamku pro LAPC4 a 500 buněk na jamku u DU145 a PC3 linií; den 2 - inkubace s inhibitorem PARP (poskytnut firmou Astra Zeneca díky spolupráci s prof. Jiřím Bártkem); den 3 - ozáření 2 a 4 Gy. Během následující 10denní kultivace bylo třetí den vyměno médium a současně odstraněn derivát, další výměna media pak proběhla v 7. den kultivace.

#### *Inhibitor CC115*

Schéma experimentu bylo následující: den 1 - po pasáži byly buňky vysety v počtu 1000 buněk na jamku pro LAPC4 a 500 buněk na jamku u DU145 a PC3 linií; den 2 - inkubace s inhibitorem DNA-PK (poskytnut firmou Celgene díky spolupráci s prof. Jiřím Bártkem) po dobu 2 hodin a ozáření 2 a 4 Gy. Během následující 10denní kultivace bylo třetí den vyměno médium a současně odstraněn derivát, další výměna media pak proběhla v 7. den kultivace.

Po ukončení kultivace proběhla fixace a barvení kolonií s více než 50 buňkami. Po odstranění media bylo přidáno 5 ml 70% ethanolu na jamku po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Následovalo promytí vodou a sušení 5 minut. Krystalová violet se aplikovala na 30 minut při pokojové teplotě. Po obarvení se jamky promyly vodou a nechaly zaschnout.

### 3.13 Extrakce proteinů a westernblotová analýza

Celobuněčné lyzáty v RIPA pufru (50mM Tris HCl pH 8,0; 150mM NaCl; 1% NP-40 0,5% deoxycholát sodný; 0,1% SDS) obohaceném o proteázové/fosfatázové inhibitory, byly inkubovány za neustálého třepání 1 hodinu na ledu, poté centrifugovány při 15 000 ot./min při 4 °C. Po stočení byl ze zkumavky odsát supernatant a zamražen až do dalšího použití. 20 µg celobuněčného lyzátu smíchané s nanášecím pufrem bylo elektroforeticky separováno na 10% Bis-Tris polyakrylamidovém gelu s následným transferem na nitrocelulozovou membránu. Inkubace membrány s primární protilátkou (viz tab. 2) v 5% mléku v PBS byla při 4 °C přes noc. Sekundární protilátka anti-mouse IgG nebo anti-rabbit (obojí konjugované s HRP) (#7076, #7074, Cell Signaling Technology) byla aplikována po promytí membrány na 1 hodinu. Detekce signálu byla pomocí Femto/Dura ECL substrátu (Thermo Scientific).

**Tab. 2: Seznam použitých primárních protilátek**

Protilátka	Dodavatel	Zdrojové zvíře	Katalog. číslo	Ředění
Anti -ASPN	Sigma-Aldrich	králík	HPA008435	1:1000
Anti -ASPN	Abnova	králík	H00054829	1:1000
Anti-ASPN	Abcam	králík	Ab58741	1:1000
Anti-ASPN	Lund University, prof. Åke Oldberg	králík	„in house“	1:2500
Anti-ASPN	Masarykův onkol.ústav, dr. Bořivoj Vojtěšek	králík	„in house“	1:250
Anti -FAK pY397	Life Technologies	králík	44-624G	1:500
anti-GAPDH	Sigma Aldrich	myš	G8795	1:10000

### 3.14 Analýza DDR odpovědi vybraných modelových linií karcinomu prostaty

Pro stanovení míry odpovědi na poškození DNA jsme provedli analýzu klíčových proteinů DDR signálních drah. Použili jsme následující adherentní nádorové buněčné linie: DU45 (v 17. pasáži), PC3 (v 16. pasáži), LAPC4 (v 19. pasáži), LNCaP (v 6. pasáži). DU145 a U2OS byly pěstovány v DMEM s 10% FBS, 1% penicilinem/streptomycinem. LAPC4 byly kultivovány v IMDM s 10% FBS, P-S a R1881 (syntetický androgen). PC3 a LNCaP byly pěstovány v RPMI mediu s 10% FBS a P-S. Všechny linie byly pěstovány po dosažení 70% konfluency a poté ozářeny (4 Gy) pomocí ozařovače na Onkologické klinice FN Olomouc. Neozářené buňky ve stejné pasáži a konfluenci sloužily jako kontrola. Sběr a zpracování buněk proběhly po 1 hodině od ozáření. Celobuněčné lyzáty v RIPA pufru (viz část 3.12) s nanášecím pufrem byly elektroforeticky separovány na 10% Bis-Tris polyakrylamidovém gelu s následným transferem na nitrocelulozovou membránu. Inkubace s primární protilátkou (viz Tab. 3) v 5% mléku v PBS nebo TBS, byla při 4 °C přes noc. Sekundární protilátka anti-mouse IgG nebo anti-rabbit (obojí konjugované s HRP) (#7076, #7074, Cell Signaling Technology) byla aplikována po promytí membrány na 1 hodinu. Detekce signálu byla pomocí Femto/Dura ECL substrátu (Thermo Scientific).

**Tab. 3: Seznam použitých primárních protilátek pro DDR odpověď**

Protilátka	Dodavatel	Zdrojové zvíře	Katalog. číslo	Ředění
53BP1(H300)	Santa Cruz	králík	sc-22760	1:500
Akt (pan) (C67E7)	Cell Signaling	králík	4691P	1:1000
ATM(D2E2)	Cell Signaling	králík	2873S	1:500
BRCA1 (D-20)	Santa Cruz	králík	sc-641	1:1000
DNA-PK	Cell Signaling	králík	4602S	1:500
H2AX	Cell Signaling	králík	2595S	1:500
Chk1(G-4)	Santa Cruz	myš	sc-8408	1:500
CHK2(B-4)	Santa Cruz	myš	sc-17748	1:500
Ku70 (N3H10)	Abcam	myš	ab3114	1:500
Ku80(111)	Abcam	myš	ab119935	1:500
MDC1	Abcam	myš	ab50003	1:1000
Mre11(31H4)	Cell Signaling	myš	4847P	1:1000
p21	"in house"	myš	klon waf1	1:1000
p53 (DO-1)	Invitrogen	myš	AHO0152	1:500
p95/NBS1	Cell Signaling	králík	3002P	1:1000
pAkt (Ser473) (D9E)	Cell Signaling	králík	4060P	1:1000
pAkt (Thr308)	Cell Signaling	králík	2965P	1:1000
PARP1	callbiochem	myš	AM68	1:1000
pATM (Ser1981)	Cell Signaling	myš	4526P	1:500
pATR (Ser428)	Cell Signaling	králík	2853P	1:500
pBRCA1 (Ser1524)	Cell Signaling	králík	9009P	1:500
p-c-Raf (Ser259)	Cell Signaling	králík	9421P	1:1000
pDNAPKcs(S2056)	Abcam	králík	ab18192	1:500
p-GSK-3 $\beta$ (Ser9)	Cell Signaling	králík	9323P	1:1000
pH2A.X	Cell Signaling	králík	9718P	1:1000
pChk1 (Ser296)	Cell Signaling	králík	2349P	1:500
pChk2 (Thr68)	Cell Signaling	králík	2661P	1:500
pMre11(ser676)	Cell Signaling	králík	4859p	1:1000
pNBS1(343)	Cell Signaling	králík	3001P	1:1000
pp53 (Ser15)	Cell Signaling	myš	9286	1:500
p-PTEN (Ser380)	Cell Signaling	králík	9551	1:500
pRb(ser780)	Cell Signaling	králík	9307P	1:1000
pRb(ser795)	Cell Signaling	králík	9301P	1:1000
pRb(Ser807/811)	Cell Signaling	králík	9308P	1:1000
PTEN	Abcam	králík	184	1:500
Rad50	Cell Signaling	králík	3427P	1:1000
Rad51 (H-92)	Santa Cruz	králík	sc-8349	1:200
Rb(4H1)	Cell Signaling	myš	9309P	1:1000
RNF168	Abcam	myš	ab58063	1:500

## 4 VÝSLEDKY

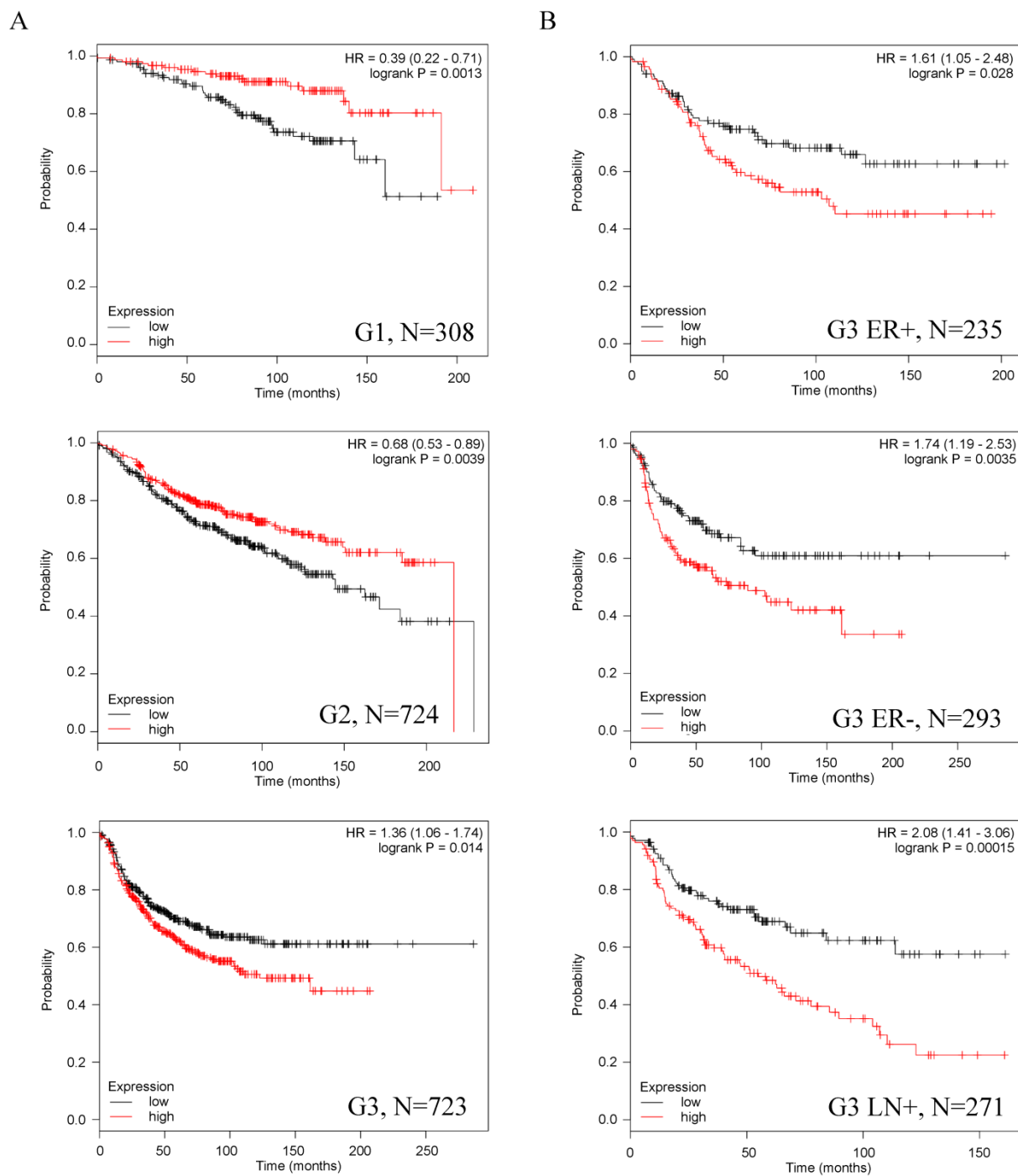
V současné době je nádorové prostředí vnímáno jako stejně významný faktor v nádorové progresi a metastazování jako samotný nádor. Extracelulární matrix může v iniciační fázi nádorového růstu působit inhibičně, ale později poskytuje řadu protumorigenních stimulů (Quail et Joyce, 2013). Konkrétní úloha malých proteinů bohatých na leucin (SLRP) je v současnosti studována především na decorinu, archetypálním zástupci SLRP proteinů, který působí jako nádorový supresor (Neil et al., 2012). Asporin naproti tomu vystupuje buď jako pozitivní prognostický faktor u nádorů prsu (Maris et al., 2015) nebo může být spojen s invazivním růstem nádorů žaludku (Satoyoshi et al. 2014). Pomocí řady testů jsme se snažili rozšířit naše současné chápání role asporinu v progresi karcinomu prsu.

### 4.1 Využití veřejných databází pro získání experimentálního modelu a zhodnocení klinického významu exprese asporinu

Pro vyhledání buněčné linie pozitivní na asporin jsme použili databáze Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) a Array Express (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>). Buňky Hs578t byly jedinou linií odvozenou od karcinomu prsu s expresí asporinu (viz „Supplementary Figure 1“ v Příloze 2, Simkova et al., 2016), což jsme potvrdili na mRNA i proteinové úrovni (viz níže).

Databáze KMPLLOT zahrnuje řadu studií, které analyzovaly celý transkriptom pomocí Affymetrix čipů u čtyř solidních nádorů, včetně karcinomu prsu. Naše detailní metaanalýza ukázala, že u dobře diferencovaných nádorů je vyšší exprese asporinu spojena s lepším RFS (relapse free survival), ale u karcinomů s gradem 3 je tomu naopak (Tab. 4, Obr. 7).





**Obr. 7: KM PLOT analýza exprese asporinu s celkovým prežíváním pacientů**

Vysoká exprese asporinu je asociovaná se signifikantně zhoršeným bezpříznakovým přežitím u obou typů receptor pozitivních i negativních tumorů s gradingem 3, konkrétně s metastázami do lymfatických uzlin. HR, hazard ratio; N, počet pacientů v KM PLOT analýze.

**Tab. 4: Prognostická hodnota vysoké exprese asporinu u subtypů nádoru prsu**

subtype*	status**	prognostic value***	RFS	patients	status	prognostic value	OS	patients	status	prognostic value	DMFS	patients
Any	any		0.43	3554	any	↑↑	0.046	1117	any		0.42	1609
	ER+	↑	0.067	1802	ER+	↑↑↑	0.0012	377	ER+	↑↑↑	0.0014	577
	ER-	↓↓	0.041	671	ER-		0.16	142	ER-		0.57	170
	Her2+	↓	0.081	168	Her2+		n.d.	28	Her2+		0.5	111
	Her2-	↑↑	0.048	756	Her2-		0.25	62	Her2-		0.18	82
	LN+		0.14	945	LN+		0.33	197	LN+		0.96	337
	LN-		0.61	1813	LN-	↑↑	0.034	425	LN-	↑↑	0.035	896
	G1	↑↑↑	0.0013	308	G1		0.13	135	G1		0.48	172
	G2	↑↑↑	0.0039	724	G2	↑↑↑	0.00053	287	G2	↑↑↑	0.0021	495
	G3	↓↓	0.014	723	G3		0.33	347	G3		0.21	391
	G3 ER+	↓↓	0.028	235	G3 ER+		0.58	96	G3 ER+		0.51	132
	G3 ER-	↓↓↓	0.0035	293	G3 ER-	↓	0.13	109	G3 ER-	↓	0.068	125
	G3 Her2+		0.67	87	G3 Her2+		n.d.	25	G3 Her2+		0.93	54
	G3 Her2-	↓↓↓	0.0025	239	G3 Her2-	↓	0.066	46	G3 Her2-		0.19	37
	G3 LN+	↓↓↓	0.00015	271	G3 LN+		0.32	122	G3 LN+		0.35	123
	G3 LN-		0.57	381	G3 LN-		0.38	160	G3 LN-		0.35	269
	G3 ER+ LN+	↓↓	0.041	117	G3 ER+ LN+		0.22	40	G3 ER+ LN+		0.9	48
	G3 ER+ LN-		0.85	114	G3 ER+ LN-		0.36	54	G3 ER+ LN-		0.75	81
	G3 ER- LN+	↓↓↓	0.0067	106	G3 ER- LN+		0.21	35	G3 ER- LN+		n.d.	27
	G3 ER- LN-		0.3	182	G3 ER- LN-		0.31	72	G3 ER- LN-		0.26	96
G3 Her2- LN+	↓↓↓	0.0055	115	G3 Her2- LN+		0.18	30	G3 Her2- LN+		n.d.	14	
G3 Her2- LN-		0.48	123	G3 Her2- LN-		n.d.	16	G3 Her2- LN-		n.d.	23	
luminal A	any		0.12	1764	any	↑↑	0.043	504	any	↑	0.074	918
	ER+	↑↑	0.027	1205	ER+	↑↑↑	0.0034	262	ER+	↑	0.048	419
	ER-		0.57	83	ER-		0.77	28	ER-		0.91	20
	LN+	↑↑	0.022	453	LN+	↑↑↑	0.00033	71	LN+		0.4	167
	LN-	↑↑	0.042	999	LN-		0.29	221	LN-	↑	0.065	546
	G3	↓	0.12	169	G3		0.5	73	G3		0.39	97
luminal B	any	↓↓	0.02	1002	any		0.52	320	any		0.77	361
	ER+	↓↓↓	0.0039	556	ER+		0.69	99	ER+		0.91	146
	ER-		0.88	128	ER-		0.28	22	ER-		0.81	28
	LN+	↓↓	0.017	275	LN+		0.5	43	LN+		0.61	87
	LN-		0.63	446	LN-	↓	0.091	80	LN-		0.38	171
	G3	↓	0.12	209	G3		0.24	96	G3		0.69	95
basal Subtype	any	↓	0.079	580	any		0.5	204	any		0.23	219
	ER+		0.41	36	ER+		n.d.	14	ER+		n.d.	10
	ER-	↓↓	0.038	339	ER-		0.19	60	ER-		0.39	74
	LN+	↓↓	0.042	144	LN+		0.31	52	LN+		0.46	48
	LN-		0.69	291	LN-		0.67	96	LN-		0.74	134
	G3		0.17	263	G3		0.59	129	G3		0.57	136

\* Molekulární subtypy byly získány genovým expresním profilováním KMPLLOT (<http://kmplot.com/analysis/>). Her2 molekulární subtyp není zobrazen.

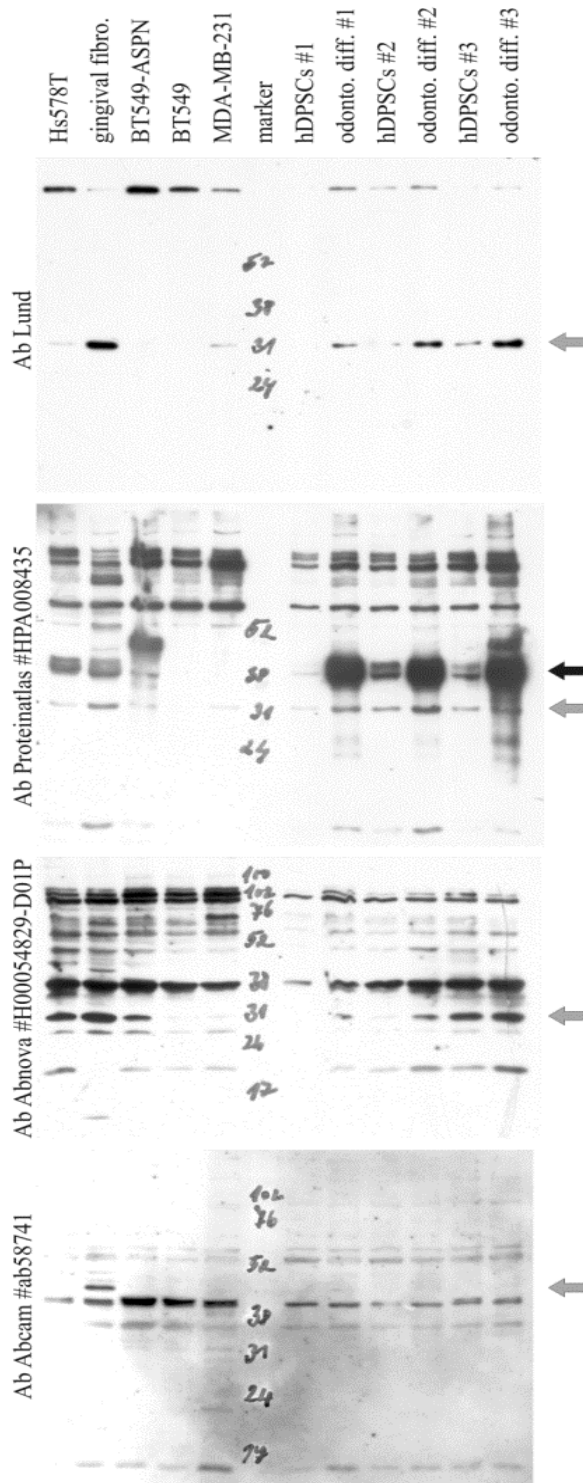
\*\* Protein. Exprese estrogenového receptoru (ER+, ER-) se může lišit od mRNA exprese, která se využívá pro molekulární klasifikaci.

\*\*\* šipky označují pozitivní (↑) nebo negativní (↓) prognostické hodnoty vysoké exprese asporinu. Significance  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  a trend  $p < 0.15$  jsou zdůrazněny jednou, dvěma nebo třemi šipkami.

n.d. „not done“ méně než 30 pacientů v souboru; RFS, relapse free survival; OS, overall survival; DMFS, distant metastasis free survival

## 4.2 Validace anti ASPN protilátek

Abychom potvrdili přítomnost asporinu u nádorové prsní linie Hs578t a jednoznačně vyvrátili expresi asporinu u linií MDA-MB-231 a BT-549, bylo nutné najít spolehlivou protilátku. Do současné doby jsou dostupné pouze polyklonální anti-ASPN protilátky, a proto jsme využili následujících 5 vybraných protilátek: Proteinatlas/Sigma HPA008435, Abnova H00054829-D01P, Abcam ab58741, protilátku poskytnutou prof. Oldbergem z Lundu a vlastní protilátku připravenou ve spolupráci s dr. Vojtěškem z Brna (antigen TVELEDFKRYKELQR). Další informace jsou poskytnuty v „Supplementary Table 2“ v příloze 2. (Obr.S2 v Simkova et al., 2016). Výsledky na gingiválních fibroblastech a prsních liniích nebyly jednoznačné, a proto jsme hledali další pozitivní kontroly. Lee et al. (2011) popsali markantní navýšení exprese asporinu během odontogenní diferenciacce lidských kmenových buněk ze zubní pulpy (hDPSC), což se nám podařilo reprodukovat ve spolupráci s dr. Soukupem z Hradce Králové (Obr. 8). Nejspolehlivější výsledky jsme získali s protilátkou Proteinatlas/Sigma HPA 008435, kterou jsme použili v dalších experimentech (Obr. 8).

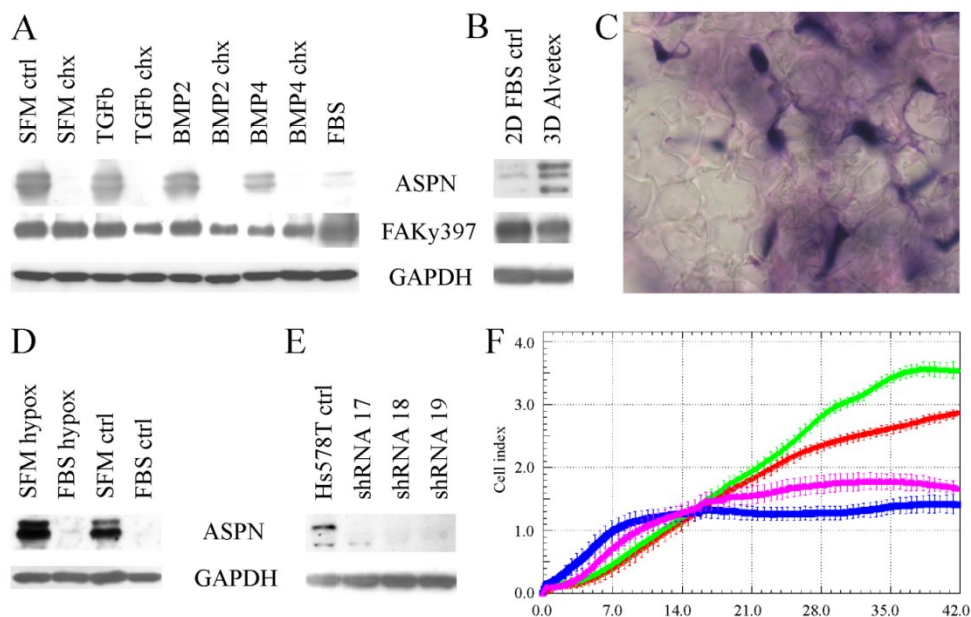


**Obr. 8: Validace protilátky anti-ASPN HPA 008435 u prsních nádorových buněčných linií, gingiválních fibroblastů a lidských kmenových buněk ze zubní pulpy.**

Černá šipka ukazuje silnou upregulaci asporinu u hDPSC buněk po ododntogenní diferenciaci. Stabilně transfekované BT-549 – ASPN buňky s ORF asporinovou sekvencí vykazovaly posun v elektroforetické mobilitě díky větší molekulové hmotnosti bandu. Inkubace primární protilátky proběhla při 4°C přes noc, v 5% mléku v PBS.

### 4.3 Regulace asporinu BMP4 starvací a kultivací na 3D matrici u Hs578t

Modulaci exprese asporinu u Hs578t buněk jsme testovali po několika typech ovlivnění. TGF $\beta$  zvyšuje expresi u chondrocytů (Kou et al., 2007; Duval et al., 2011), nicméně v našem případě jsme nezaznamenali signifikantní zvýšení u buněk Hs578t (obr. 9A). Cytokiny BMP2 a BMP4 z rodiny TGF $\beta$  zvyšují úroveň asporinu u buněk peridontálního ligamentu (Yamada et al., 2006). BMP2 byl bez efektu u Hs578t (obr. 9A), ale po ovlivnění BMP4 jsme pozorovali snížení exprese asporinu, stejně jako fosforylace kinázy FAK (pY397). Vliv BMP4 jsme viděli i na úrovni mRNA (ddCt 3,77, což koresponduje s cca 14násobnou downregulací mRNA). V porovnání s médiem s 10% FBS měla kultivace buněk Hs578t v bezsérových podmínkách překvapivě výrazný vliv na úroveň asporinu (obr. 9D). Na úrovni mRNA jsme pozorovali průměrnou ddCt 4,03 korespondující s přibližně 16násobnou upregulací. Hypoxické podmínky při pěstování ve standardním ani bezsérovém médiu neměla výrazný vliv na asporinovou expresi (obr. 9B). Jak bylo zmíněno výše, asporin inhibuje fibrilogenezi kolagenu, čímž může ovlivňovat charakter extracelulární matrix. Z toho důvodu jsme testovali kultivaci Hs578t na různých 3D matricích. Kolagen typu I ani Geltrex neměly žádný vliv, avšak polystyrenová matrice Alvetex<sup>®</sup> zvýšila asporinovou expresi jak na proteinové (obr. 9 B,C), tak na mRNA úrovni (zhruba 8 násobná upregulace).



**Obr. 9: Glykoprotein asporin u Hs578t nádorové buněčné linie.**

(A) Asporin je konzistentně upregulován u buněk v bezsérovém médiu a downregulován po dvoudenním ovlivnění 100 ng/ml BMP4. Tento cytokin taktéž snížil fosforylaci fokálně adhezni kinázy (FAKy397). Slabá downregulace TGF $\beta$  byla pozorována pouze u jednoho replikátu. Translace byla paralelně inhibována 10  $\mu$ g/ml cycloheximidem, což vedlo k downregulaci asporinu, ale ne FAK. (B) Expese asporinu byla zvýšena po 12denní kultivaci na polystyrenové matrici Alvetex<sup>®</sup> (3D) v porovnání se standartní 2D kultivací. (C) Fixované Hs578t buňky, zalité v parafinu a nabarvené hematoxylin-eosinem na matrici Alvetex<sup>®</sup>, vykazují sytě růžovou cytoplazmu, tmavě fialové jádro a tzv. stelární tvar. Zvětšení 1000 $\times$ . (D) Čtyřdenní kultivace Hs578t v hypoxických podmínkách nemění expresi asporinu. (E) Expese asporinu je snížena po stabilní transfekci třemi různými shRNA. (F) Invaze byla zpomalena u buněk se stabilní expresí sh17, 18 i 19 (parentální buňky zobrazeny zeleně, kontrolní buňky se scrambled shRNA červeně, sh17 modře a sh19 purpurově; sh18 nezobrazena). Chybové úsečky udávají standardní odchylky ze 4 jamek. Všechny experimenty byly provedeny 3krát. Zobrazeny jsou reprezentativní výsledky.

## 4.4 Vliv downregulace asporinu na migraci, invazivitu a sferoidní růst Hs578t

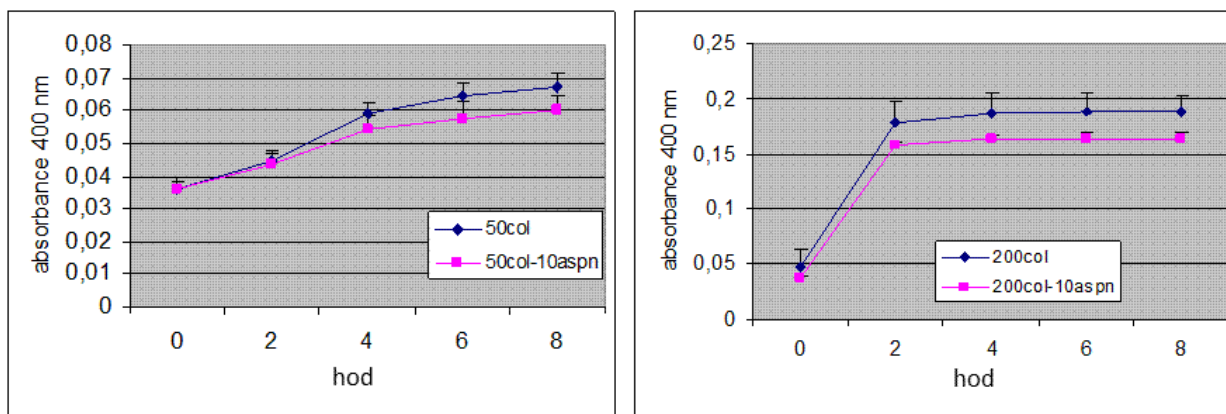
Abychom odhalili efekt snížení exprese asporinu na migraci, invazi a tvorbu sfér, připravili jsme tři stabilní klony Hs578t s různými shRNA. Úspěšná downregulace byla potvrzena na mRNA (přibližně 40násobná downregulace) i proteinové úrovni (obr. 9E). Downregulace asporinu neměla vliv na proliferaci, migraci ani na sferoidní růst (data neuvedena), ale zpomalila invazi přes kolagenovou zátku (obr. 9F).

U asporin negativních BT-549 a MDA-MB-231 buněk jsme připravili stabilní klony s expresním vektorem (ORF, open reading frame). Hladina mRNA byla výrazně zvýšena, přičemž na western blotu byl viditelný band se sníženou mobilitou. U těchto stabilních klonů jsme nepozorovali změny v proliferaci, adhezi, migraci ani invazivitě (data neuvedena). Zajímavým poznatkem bylo, že se nám opakovaně nepodařilo připravit stabilní klony s plnou sekvencí asporinu (včetně 5' a 3' UTR).

## 4.5 Invazní testy

### 4.5.1 Vliv asporinu na kolagenovou fibrilogenezi

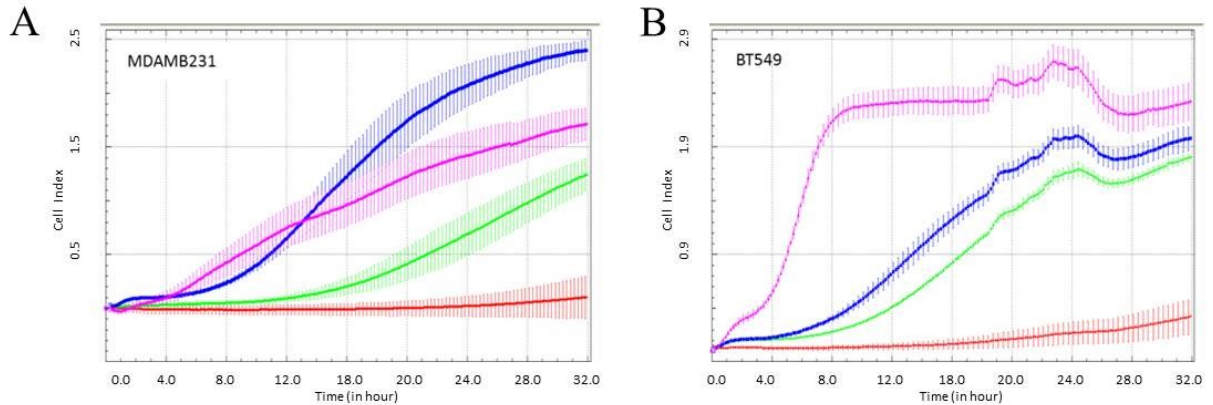
Skupina prof. Oldberga z Lundu popsala schopnost asporinu inhibovat fibrilogenezi kolagenu I (Kalamajski et al., 2009). Tyto výsledky se nám podařilo reprodukovat s poskytnutým rekombinantním proteinem u kolagenu typu I o koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  i 200  $\mu\text{g/ml}$  (obr. 10).



**Obr. 10: Rekombinantní asporin inhibuje fibrilogenezi kolagenu typu I**

Fibrilogeneze kolagenu probíhala při 37 °C za přítomnosti/nepřítomnosti rekombinantního asporinu. Zvyšující se hodnota absorbance byla odečítána každou hodinu při  $\lambda=400$  nm.

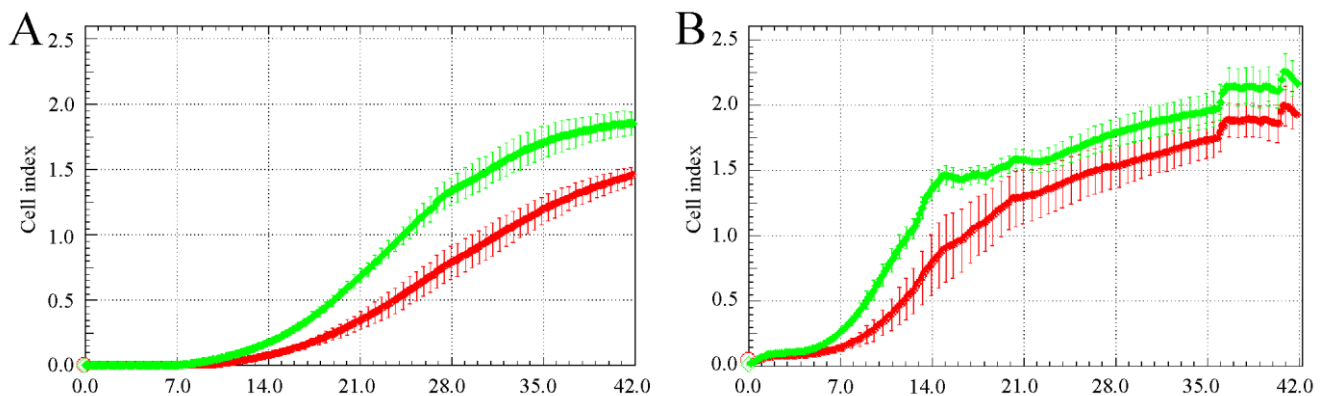
Abychom určili schopnost vybraných modelů invadovat přes kolagenovou zátku, připravili jsme sérii tří koncentrací kolagenu (800, 200 and 50  $\mu\text{g/ml}$ ). Všechny testované linie invadovaly nejoptimálněji přes 200  $\mu\text{g/ml}$  kolagen, který byl použit i v jiné studii (Sodek et al., 2008). Stejnou koncentraci jsme dále použili na test invazivity s rekombinantním asporinem. Veškeré adhezní a invazní testy proběhly na přístroji xCelligence (Roche diagnostic).



**Obr. 11: Invaze BT549 a MDA-MB-231 přes kolagenovou škálu**

Oba buněčné modely byly starvované 6 hodin a invadovaly přes škálu kolagenu I (koncentrace 800  $\mu\text{g/ml}$  červeně, 200  $\mu\text{g/ml}$  zeleně, 50 $\mu\text{g/ml}$  modře a coating BSA fialově). Medium s 10% FBS ve spodní jamce CIM destičky bylo použito jako chemoatraktant. Čtení signálu proběhlo každých 10 minut po 27 hod. Chybové úsečky udávají standartní odchylky ze 4 jamek.

Pro kvantitativní stanovení rozdílu v invazivitě nádorových buněk byl použit kolagen 200  $\mu\text{g/ml}$  připravený s 10nM rekombinantním asporinem nebo bez něj. Linie MDA-MB-231 (obr. 12 A) a BT549 (obr. 12 B) vykazovaly zvýšenou invazivitu přes kolagen s asporinem v porovnání se zátkou bez asporinu. Hs578t buňky nevykazovaly změny v invazivitě přes kolagen za přítomnosti rekombinantního asporinu a bez něj (data neuvedena).

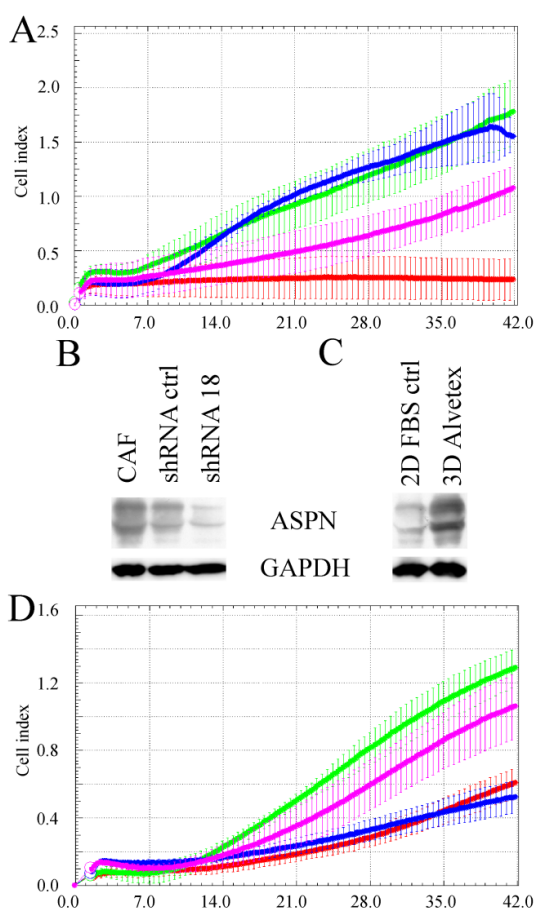


**Obr. 12: Asporin zvyšuje invazi MDA-MB-231 a BT-549 přes kolagenovou zátku**

Oba buněčné modely byly starvované 6 hodin. Kolagenová zátka s 10nM asporinem (zeleně) a bez asporinu (červeně) fungovala jako bariéra pro invazi a médium s 10% FBS ve spodní jamce CIM destičky bylo použito jako chemoatraktant. Čtení signálu proběhlo každých 10 minut po dobu 42 hodin. Chybové úsečky udávají standartní odchylku měření ze 4 jamek. Experiment byl proveden třikrát a reprezentativní výsledek je zobrazen.

## 4.6 Snížení exprese asporinu v nádorově asociovaných fibroblastech snižuje jejich koordinovanou invazi s nádorovými buňkami

Na základě požadavků oponentů našeho výsledkového článku jsme testovali tři různé CAF od pacientek s nádorem prsu. Pro experimenty jsme použili CAF s nejrychlejší proliferací (označeny jako BCAF4). Satoyoshi et al. (2014) popsal význam asporinu pro společnou invazi CAF a nádorových buněk u karcinomu žaludku. Pro testy společné invaze jsme vybrali prsní linii T47D, která má nízký invazivní potenciál. Zároveň je modelem lumenálního subtypu B, u kterého jsme pozorovali asociaci vyšší exprese asporinu s horším RFS (Tabulka 4). Na základě našich výsledků usuzujeme, že T47D buňky prochází přes matrix společně (obr. 13). Invaze samotných CAF i v kombinaci s T47D je snížena po tranzientní transfekci shRNA proti asporinu. Podobně jako Hs578t, BCAF4 buňky vykazovaly zvýšenou expresi asporinu po kultivaci na 3D matrici Alvetex® (obr.13).



**Obr. 13: Snížení koordinované invaze CAF a T47D po downregulaci asporinu**

(A) Společná invaze BCAF4 a T47D buněk přes zátku složenou z kolagenu typu I, Matrigelu® a ribozy. Pro invazní testy bylo použito vždy celkem 70 000 buněk (70 000 T47D červeně, 70 000 BCAF4 zeleně, 35 000 BCAF4 fialově a modře je zobrazena společná invaze BCAF4 a T47D po 35 000). (B) Western blot analýza ukázala downregulaci asporinu po shRNA a upregulaci po kultivaci na 3D Alvetex matrici (C). (D) Downregulace asporinu zpomalila invazi samotných BCAF4 i v kombinaci s T47D buňkami (BCAF4 ctrl shRNA zeleně, BCAF4 shRNA 18 červeně, BCAF4 ctrl shRNA společně s T47D purpurově, BCAF4 shRNA18 společně s T47D modře). Všechny experimenty byly provedeny 3krát a reprezentativní bloty/grafy jsou zobrazeny.



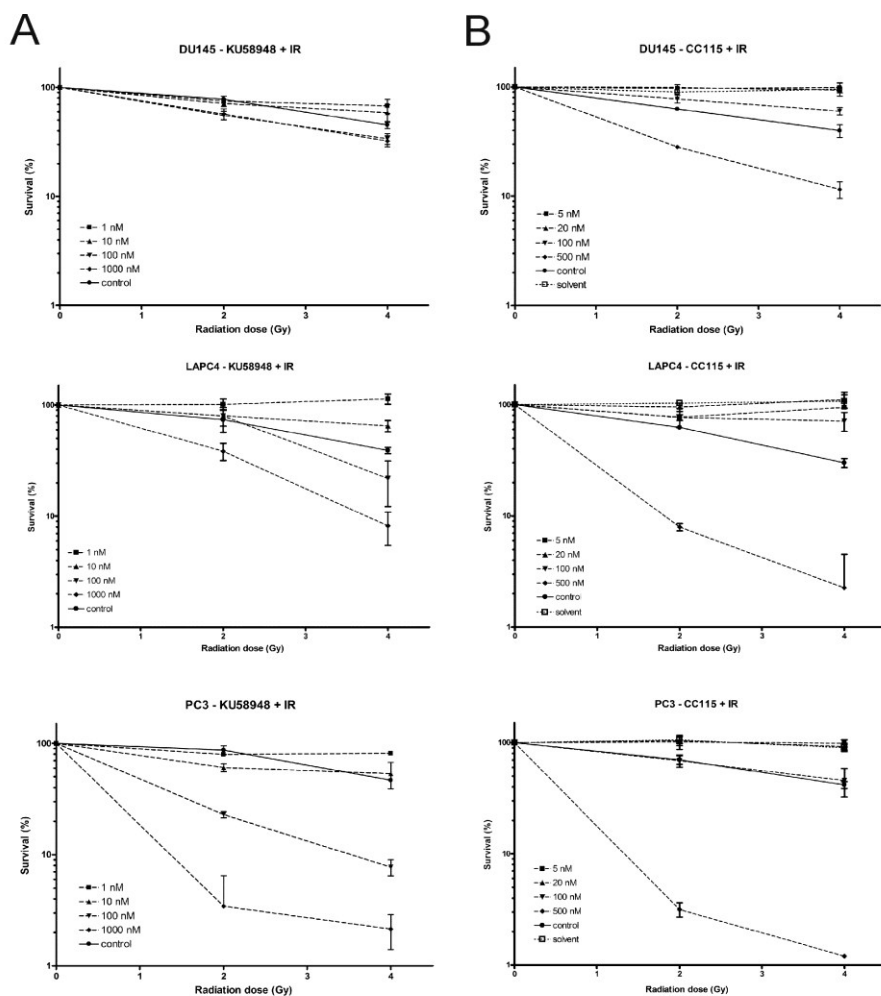
#### 4.7 Vliv ozáření na DDR u vybraných buněčných prostatických linií

Znalost stavu komponent signalizace a opravy poškozené DNA, spolu s dostupností chemických inhibitorů klíčových enzymů těchto drah, jako PARP nebo DNA-PK, by mohly být využity v individualizované léčbě u karcinomu prostaty, zejména v kombinaci se standardní léčbou například ionizujícím zářením. S cílem přispět v této oblasti jsme provedli charakterizaci panelu prostatických nádorových linií a jejich molekulárních parametrů, zaměřenou na predikci citlivosti k PARP inhibitoru poskytnutého nám firmou AstraZeneca (obr. 15A, 16, 17, 18). Paralelně bylo provedeno rovněž testování inhibitoru kinázy DNA-PK (CC115), která má význam při nepřesné opravě dvouřetězcových zlomů (obr. 15B).

Buněčná linie DU145 byla nejvíce odolná vůči kombinovanému působení ionizujícího záření s inhibitory PARP i DNA-PK (obr. 15). Western blot analýza naznačila, že u této linie může být slabší aktivace kinázy ATM a nižší hladina DNA poškození dle  $\gamma$ H2AX (Obr. 16).

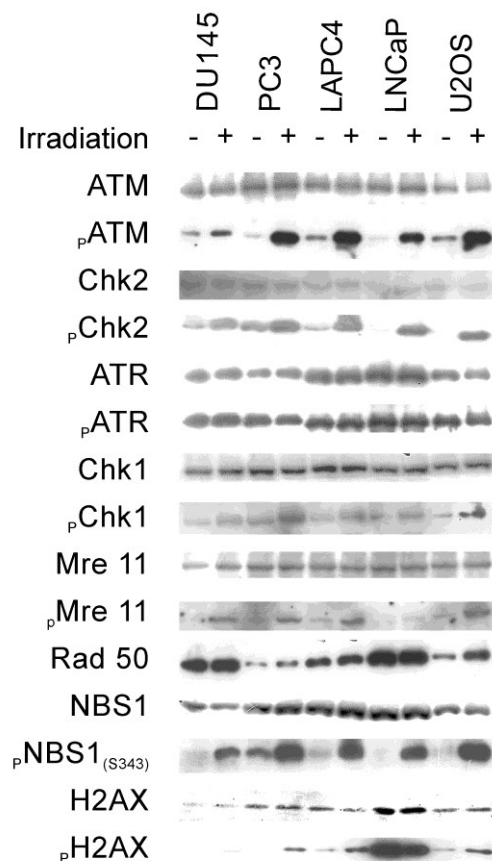
Obrázek 17 shrnuje výsledky pro dráhy p53, Rb a PI3K, které jsou vesměs v souladu s dostupnými informacemi o studovaných liniích. Linie DU145 má aberantní dráhy nádorových supresorů p53 i Rb (Gurova et al., 2003; Sharma et al., 2007) s intaktním PTEN (Whang et al., 1998). Buněčná linie PC3 má zcela deletované nádorové supresory p53 a PTEN (Tanaka et al., 2005). Delece PTEN a aktivace dráhy Akt je charakteristická i pro androgen receptor pozitivní linii LNCaP, která však netvoří kolonie a nebyla testována pro citlivost na PARP inhibitor (Bromfield et al., 2003; Toren et al., 2016). Další androgen receptor pozitivní linie LAPC4 má mutovaný p53 (Liu et al., 2011) a intaktní PTEN (Whang et al., 1998).

Sledované linie nevykazovaly výrazné změny v expresi PARP, ubiquitin ligázy RNF168 a vybraných proteinů důležitých pro HR a NHEJ (obr. 18). Buněčná linie U2OS odvozená od osteosarkomu je běžným modelem při studiu signalizace DNA poškození a následných oprav a byla použita jako referenční kontrola pro western blot analýzu panelu prostatických linií.



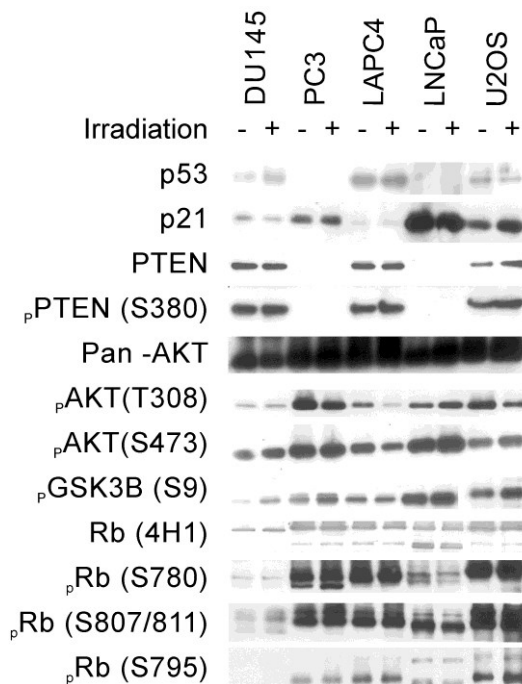
**Obr. 15: Reprezentativní výsledky klonogenních testů (colony forming assay) na vybraných liniích karcinomu prostaty**

A) Kombinované působení ozáření (2 a 4 Gy) s inhibitor PPAR (KU58948, 24 hodin před ozáření).  
 B) Kombinované působení ozáření (2 a 4 Gy) a DNA-PK inhibitoru (CC-115, 2 hodiny před ozáření).  
 Ovlivněné buňky byly následně inkubovány 10 dnů v běžném kultivačním mediu. Kolonie obsahující více než 50 buněk byly fixovány a barveny krystalovou violetí. Tyto experimenty byly provedeny ve spolupráci s Dr. Gabrielou Kořínkovou.



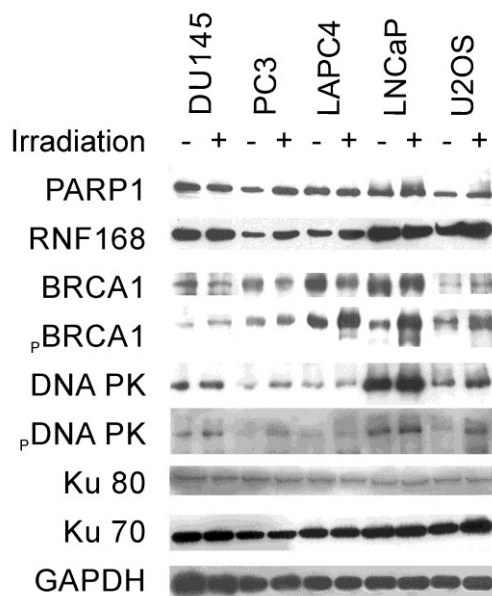
**Obr. 16: Aktivace signálních drah DNA poškození u buněčných linií karcinomu prostaty.**

V krátkém intervalu 1 hodinu po ozáření 4 Gy jsou aktivované kinázy ATM a Chk2, společně s komplexem MRN. Aktivace ATM a H2AX se jeví nižší u linie DU145.



**Obr. 17: Nádorové supresory a dráha PI3K u buněčných linií karcinomu prostaty.**

Expresse jednotlivých proteinů odpovídá známému mutačnímu stavu daných linií. V krátkém intervalu 1 hod po ozáření 4 Gy nejsou patrné výrazné rozdíly v expresi ani fosforylaci.



**Obr. 18: Western blot analýza senzorů, mediátorů a efektorů v signalizaci poškození DNA PARP-1, DNAPK,**

Vybrané proteiny zapojené do opravy poškozené DNA. Po ozáření 4 Gy dochází k očekávané fosforylaci BRCA1 a DNA-PK. Expres dalších proteinů se po hodinové inkubaci nemění.

#### 4.8 Vymezení mého podílu práce:

Aktivně jsem se podílela na experimentech zahrnujících monitoring asporin pozitivních buněčných linií. Prováděla jsem kultivaci modelových buněk, přípravu proteinových lyzátů s následnou imunodetekcí pomocí western blotu, izolaci nukleových kyselin, reverzní transkripci, kvantitativní PCR a vyhodnocování dat.

Dále jsem prováděla funkční *in vitro* experimenty zahrnující různá ovlivnění pomocí cytokinů. Optimalizovala jsem a prováděla testy s 3D kultivací, adhezí, migrací, invazí a růstem modelových buněk ve sférách. Optimalizovala jsem a aplikovala podmínky transfekce na vybraných buněčných liniích. Rovněž jsem provedla KMPLLOT analýzu u nádorů prsu.

V části věnované odpovědi nádorových linií prostaty na ozáření a inhibici PARP nebo DNA-PK jsem prováděla kultivaci buněk, ozařování, western blot analýzu a rovněž jsem se podílela na analýze klonogenního růstu.

Obdržená data byla publikována (Šimkova et al, 2016 - příloha č. 1; Oplustilova et al., 2012 – příloha č. 3) a prezentována na domácích i zahraničních konferencích a seminářích (viz kapitola 7).

## 5 DISKUZE

Šíření nádorových buněk z primárního nádoru do okolních tkání i vzdálených orgánů je určující mírou malignity a přímo souvisí s klinickým průběhem onemocnění. Během invazivního procesu nádorové buňky aktivují okolní stroma, dochází k zánětlivé reakci a angiogenezi. Vlastní invaze je umožněna sníženou buněčnou adhezí a zvýšenou motilitou a je doprovázena destrukcí bazální membrány a remodelací extracelulární matrix (Kharraishvili et al. 2014).

Současný posun ve vnímání bilaterální kooperace mezi nádorem a mikroprostředím vyžaduje komplexní 3D modely k odhalení modifikovaných drah (Correira et al., 2012). Náš model invazivní prsní nádorové linie Hs578t vykazoval vysokou upregulaci asporinu po kultivaci na polystyrénové matrici Alvetex. Polystyrenová matrice je tužší než kolagen a Geltrex a zvýšení exprese asporinu v Alvetexu může souviset s fenoménem „solid stress“ (Kharraishvili et al., 2014; Stylianopoulos et al., 2012). Skupina prof. Jaina charakterizovala zvýšené pnutí uvnitř nádorů (tzv. solid stress), což má mimo jiné za následek utlačení krevních i lymfatických cév (Stylianopoulos et al., 2012). To vede jednak k horšímu zásobení nádoru živinami a kyslíkem, ale také ke snížení účinku chemoterapeutik. Zmíněná výzkumná skupina dále ukázala, že pro utlačení cév má rozhodující význam hyaluronan a kolagenová matrix (Chauhan et al. 2013). Autoři dále zjistili, že inhibitor angiotensinu losartan snižuje stromální expresi zmíněných komponent extracelulární matrix, uvolňuje kompresi cév a zlepšuje odpověď na chemoterapii v myším modelu nádorů prsu a pankreatu. Asporin přímo interaguje s kolagenem a může být rovněž důležitý pro změněnou strukturu nádorového mikroprostředí. Hypoxické prostředí nádorů také indukuje expresi lysyl oxidázy, která vytváří kovalentní vazby mezi kolagenovými vlákny, což zvyšuje tuhost matrix a vede ke zvýšené integrinové signalizaci a nádorové progresi (Levental et al. 2009). V naší práci jsme nepozorovali zvýšení exprese asporinu v Hs578t v atmosféře s 3 % kyslíku, nicméně v další etapě bychom experiment rádi zopakovali v podmínkách s 0.1 % kyslíku, které lépe simulují hypoxický stav nádorech.

Na rozdíl od chondrocytů nebo buněk peridontálního ligamentu nebyla exprese asporinu změněna u buněk Hs578t po ovlivnění TGF $\beta$  nebo BMP2 (Duval et al., 2011; Yamada et al., 2006). Asporin byl však u Hs578t lehce snížen po ovlivnění BMP4. Exprese BMP4 je obecně snížena u invazivních karcinomů prsu, přičemž jeho signalizace je důležitá pro udržování dormantního stavu nádorových buněk (Kretschmer et al., 2011; Gao et al., 2012; Wan et al., 2013). Překvapivým výsledkem byla zvýšená exprese asporinu po sérové starvaci. Předpokládáme, že indukce asporinu může vést ke zvýšené motilitě směrem k místům s lepším zdrojem energie.

Upregulace po kultivaci buněk v bezsérových podmínkách byla popsána i pro jiné proteiny, např. glukozou regulované chaperony (Levin et al., 2010; Lee, 2014).

Z Hs578t byly odvozeny invazivnější sublinie pomocí opakované invaze přes matrigel, přičemž byla rovněž provedena Affymetrix analýza (Hughes et al., 2007 a 2008). U invazivnější sublinie (obohacené o CD44+/CD24– populaci) byla snižená exprese lumicanu a decorinu, které mohou být společně regulovány s asporinem po léčbě nádorů prsu pomocí inhibitorů aromatázy (Mackay et al., 2007). Podle emailové komunikace s korespondující autorkou McDonell (Hughes et al., 2007 a 2008) však exprese asporinu nebyla změněna u zmíněné invazivnější sublinie. Podle GSE25743 nebyl také u Hs578t buněk patrný rozdíl v expresi asporinu po stabilní transfekci EpCAM (Gostner et al., 2011). Linie Hs578t i MDA-MB-231 mají relativně velkou CD44+/CD24– subpopulaci s vlastnosti kmenových buněk, pro jejichž růst je zásadní JAK2/STAT3 signální dráha (Marotta et al., 2011). Podle této práce jsme u Hs578t otestovali JAK inhibitor, který však nevykazoval vliv na expresi asporinu (mRNA ani protein, data nezobrazena). Součástí standardního kultivačního média pro Hs578t je insulin, nicméně ani u tohoto hormonu (a „insulin-like growth factor 1“) jsme nezjistili změnu exprese asporinu.

Další modelové linie triple-negativního karcinomu prsu, MDA-MB-231 a BT-549, invadovaly rychleji přes kolagenovou bariéru obohacenou o rekombinantní asporin v porovnání s matrix bez asporinu. Vysvětlením může být méně denzní kolagen v důsledku asporinem inhibované kolagenové fibrilogeneze (Kalamajski et al., 2009). Invaze Hs578t buněk, které produkují asporin endogenně, nebyla ve stejných podmínkách nijak ovlivněna. Je však důležité, že po downregulaci asporinu se snížila schopnost Hs578t invadovat přes kolagenovou bariéru. Vysvětlením může být pozorování u modelu karcinomu žaludku, kde asporin přímo interagoval s CD44 a aktivoval Rac1 a následně i invazivní růst nádorových buněk (Satoyoshi et al., 2014).

Velké úsilí vyžadoval výběr spolehlivé protilátky proti asporinu. Pro validaci protilátky použitelné pro western blot analýzu byla důležitá práce Lee et al. (2011), která prokázala výraznou indukci asporinu během odontogenní diferenciace kmenových buněk ze zubní pulpy. Ve spolupráci s dr. Soukupem se nám podařilo toto pozorování reprodukovat na úrovni mRNA i proteinu, avšak pouze s jednou protilátkou od producenta ProteinAtlas (dodavatel Sigma Aldrich). ProteinAtlas provádí validaci i pomocí tzv. CMA (cell microarray, obdoba tissue microarray). Podle tohoto protokolu, kdy jsou buňky imobilizované v agaróze, fixované ve formalínu a zalité do parafínu (Andersson et al., 2006), jsme ve spolupráci s dr. Kharraishvili připravili sadu buněk se známou mRNA hladinou asporinu a provedli paralelní test imunohistochemického barvení. Bohužel výsledky imunohistochemie nekorelovaly se známou

mRNA expresí, což může být způsobeno nespecifickými interakcemi, které jsou patrné na western blotu u všech protilátek. Z tohoto důvodu jsme imunohistochemické barvení patientských vzorků dále neprováděli a použili nový systém *in situ* hybridizace RNA scope (viz níže). Přesto jsou i ve velmi kvalitních časopisech publikovány výsledky imunohistochemie s touto protilátkou (Orr et al., 2012; Satoyoshi et al., 2014; Maris et al., 2015), což podtrhuje význam mezinárodní výzvy REMARK (Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies) pro kvalitní validaci nových markerů i nástrojů pro jejich detekci (MsShane et al., 2005). Naše pochybnosti o vhodnosti této protilátky pro imunohistochemii rovněž podporuje fakt, že zmíněná protilátka ProteinAtlas #HPA008435 již není nejméně dva roky komerčně dostupná. Podle emailové komunikace se zástupci firmy Sigma Aldrich i Protein Atlas se prý nepodařilo docílit potřebné kvality u nové šarže této protilátky.

Pomocí *in situ* hybridizace RNA scope jsme detekovali ve vzorcích duktálních i lobulárních invazivních karcinomů pozitivitu zejména u fibroblastů asociovaných s nádory, což je v souladu s publikovanými daty z řady solidních nádorů (např karcinomy prsu, prostaty nebo žaludku) (Orr et al., 2012; Satoyoshi et al., 2014; Maris et al. 2015, Hurley et al. 2016). CAF jsou svým charakterem podobné myofibroblastům s expresí  $\alpha$  smooth muscle aktinu, který je taktéž exprimován tzv. myoepitelovými Hs578t (Leccia et al., 2012). Hs578t a SNB-75 nádorové buněčné linie, které vykazovaly nejvyšší expresi asporinu v souboru NCI-60, měly taktéž nejvyšší expresi  $\alpha$  smooth muscle aktinu (obr. S1B v Simkova et al., 2016 nebo GDS4296). Exprese asporinu byla popsána i v dalších buněčných liniích odvozených od karcinomu žaludku (Ding et al. 2015).

Recentní publikace Maris et al. mechanisticky popsala tumor supresivní účinek asporinu u nádorů prsu (Maris et al., 2015). Podle naší *in silico* analýzy na velkém souboru pacientek jsme potvrdili, že vyšší exprese asporinu je asociována se signifikantně lepším bezpříznakovým přežitím (RFS, relaps free survival) u gradu 1 a 2. Ovšem u gradu 3 byla situace opačná, zejména u pacientek s metastázami do lymfatických uzlin. Asporin byl taktéž asociován s horším RFS u bazálního subtypu po chemoterapii a u luminalního subtypu B bez terapie. Model luminalního subtypu B, linii T47D, jsme použili pro testování společné invaze s CAF, které byly získány díky spolupráci s Biofyzikálním a Masarykovým onkologickým ústavem v Brně. Podobně jako Satoyoshi et al. (2014) se nám podařilo prokázat zvýšený invazivní růst T47D s CAF, kdy downregulace asporinu v CAF tuto invazivitu snížila.

Výše zmíněné protinádorové a pronádorové účinky asporinu mohou souviset s počtem zbytků kyseliny asparagové v tzv. D repetici, která je důležitá i pro predispozici k osteoartritidě.

Genetickou analýzou velkého souboru pacientů s nádory prostaty bylo zjištěno, že přítomnost alely D14 (v homozygotní nebo heterozygotní konstituci s jakoukoli jinou alelou) byla asociována se špatnou prognózou (Hurley et al., 2016), což je v souladu se sníženou invazí našich CAF buněk po downregulaci asporinu (genotyp D13/D14). Naopak alela D13 byla spojena s lepší prognózou, což bylo potvrzeno i v experimentálním myším modelu (Hurley et al., 2016). To je v souladu i s výsledky Maris et al. (2015) u karcinomu prsu, kde byla pro *in vitro* i *in vivo* experimenty použita sekvence asporinu s alelou D13. Polyaspartátový konec molekuly asporinu váže kalcium (Kalamajski et al., 2009), což může mít za následek aberantní kalcifikace u pohybového aparátu a můžeme spekulovat, že ovlivňuje i nádorové mikroprostředí. D14 alela byla asociována s predispozicí k osteoartritidě kolene, zatímco D13 alela byla více prevalentní u zdravých jedinců (Kizawa et al., 2005). Další alely (D12, D15, D16) byly asociovány s osteoartritidou ať už jako rizikový faktor nebo protektivní faktor u Mexické a Iránské populace (Arrelano et al., 2013; Jazayeri et al., 2013). Konkrétní mechanismus a funkce těchto faktorů, jako např. D15 u linie Hs578t (D15/D15) nebo genotyp D13/D16 použitý pro přípravu rekombinantního asporinu, zůstává však otázkou pro další výzkum.

Asporin patří mezi sekretované N-glykosylované proteiny, které jsou vhodné pro sledování pomocí hmotnostní spektrometrie. Cima et al. (2011) popsali asporin jako diferenciálně exprimovaný v myších s deletovaným PTEN a následně rovněž v sérových vzorcích pacientů s karcinomem nebo benigní hyperplázií prostaty. Asporin v kombinaci s dalšími čtyřmi proteiny, včetně sérového PSA, zlepšoval diagnostiku karcinomu prostaty. Stejná skupina studovala i refraktorní karcinomy, kde však sérový asporin nepřispíval k odhadu prognózy onemocnění (Kalin et al. 2011). Zvýšenou hladinu sérového asporinu u pokročilých karcinomů prostaty zjistil také Klee et al. (2012). Turtoi et al. (2011) identifikoval asporin mezi nejvíce zvýšenými sérovými proteiny také u duktálního adenokarcinomu pankreatu. Klinický význam asporinu nádorů prsu je podpořen také recentní metaanalýzou expresních dat přibližně 5700 vzorků, kdy byl asporin zařazen mezi 58 genů nádorového modulu extracelulární matrix (Wolf et al., 2014). Asporin byl také detekován mezi nejvíce upregulovanými geny v kostních metastázách nádorů prsu i prostaty (Klein et al., 2009; Stanbrough et al., 2006).

Na závěr bych ráda konstatovala, že jsme zjistili, že asporin může být downregulován působením BMP4 u Hs578t buněk a jeho upregulace je zprostředkována kultivací v bezsérových podmínkách nebo růstem buněk ve 3D matici s vysokou tuhostí. Downregulace shRNA inhibovala invazi Hs578, stejně jako CAF a T47D buněk. Invaze buněk MDA-MB-231 a BT-549, které asporin neexprimují, byla zvýšena za přítomnosti rekombinantního asporinu



v kolagenové matrix. V kontrastu s výše uvedenými výsledky, jiné práce popsaly i protinádorové účinky asporinu. Protichůdné výsledky jsme zjistili také námi provedenou metaanalýzou, kdy byl asporin asociován s dobrou prognózou u low-grade tumorů ale ne u nádorů s vyšším gradingem. Podle našeho názoru je nutný další výzkum pro vyjasnění duální role asporinu v nádorové progresi, zejména s ohledem na polymorfismus polyaspartátové repetice.

Inhibitory enzymu PARP1, který je důležitou signální komponentou mechanismu DDR a zejména dráhy opravy jednořetězcových zlomů DNA, jsou nyní testovány v řadě klinických pokusů jako nadějná léčiva, zejména u nádorů defektních v mechanismu opravy zlomů DNA pomocí homologní rekombinace (HR). Olaparib, inhibitor firmy Astra Zeneca (komerční název Lynparza), byl již schválen pro léčbu pokročilých ovariálních karcinomů, které mají nefunkční nádorové supresory BRCA1/2 (Kim et al., 2015). V loňském roce byly také publikovány velmi nadějně výsledky u metastatického, kastračně rezistentního karcinomu prostaty v klinické studii fáze II (Mateo et al., 2015). Na základě této studie získal olaparib pro karcinom prostaty status „FDA breakthrough therapy“, což umožňuje rychlejší schválení léčebných protokolů. Jako prediktivní markery byly pro zrychlené testování vybrány mutace BRCA1/2 a ATM, které ve výše zmiňované studii predikovaly dobrou odpověď na olaparib u 90% pacientů (Helleday, 2016). V původní práci byly nalezeny také další, méně časté defekty v mechanismech DNA oprav, které rovněž mohou predikovat přispívat k eradikaci nádorových buněk po inhibici PARP (Mateo et al., 2015; Helleday, 2016).

Kromě inhibitorů PARP jsou testovány i další přístupy využívající efekt syntetické letality endogenního defektu HR u daného nádoru, a současné inhibice mechanismu, který v takových buňkách udržuje ještě tolerovatelnou míru genomové stability. Hlavním cílem v této velmi nadějně oblasti nádorové léčby je nalézt biomarkery, které by co nejspolehlivěji odhalily ty individuální nádory, které mají defektní dráhu HR, a byly by tedy s velkou pravděpodobností zvláště citlivé na chemickou inhibici PARP nebo dalších proteinů důležitých pro opravu poškození DNA (Gavande et al., 2016). V současné době je studována řada slibných látek, z nichž inhibitory ATR, Chk1, MRE11 nebo DNA-PK dosáhly klinického testování fáze I nebo II (Samadder et al., 2016).

V našich *in vitro* experimentech jsme pozorovali zvýšenou citlivost PC3 buněk vůči ozáření a inhibici PARP i DNA-PK, což může souviset se ztrátou nádorového supresoru PTEN u této linie. Delece PTEN je velmi častou mutací u nádorů prostaty a může sloužit jako prediktor dobré odpovědi na terapii (Mendes-Pereira et al., 2009; Kurfurstova et al., 2016). Naproti tomu, u nejodolnější linie DU145 byly již dříve charakterizovány mutace v obou alelách nádorového

supresoru, které jsou zodpovědné za rezistenci vůči indukci apoptózy (Gurova et al., 2003). V současné době existují možnosti snížení exprese mutovaného p53 s cílem zlepšení cytotoxického působení chemoterapie nebo ozařování (Goh et al., 2011). Jednou z nich je inhibice histonových deacetyláz (Li et al., 2011; Meidhof et al., 2015), což je předmětem našich dalších analýz, jejichž výsledky zde však nemohou být prezentovány (součást diplomové práce kolegyně Bc. Kamily Němcové a připravovaného manuskriptu dr. Dušany Majera). Zde poskytnutá rozsáhlá charakterizace prostatických linií může i nadále sloužit pro testování nových inhibitorů a pochopení mechanismu jejich účinku.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- Aguirre-Ghiso JA. 2007. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. Nov;7:834-846.
- Alix-Panabières C, Pantel K. 2014. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip*. Jan;14:57-62.
- Andersson AC, Strömberg S, Bäckvall H, Kampf C, Uhlen M, Wester K, Pontén F. 2006. Analysis of protein expression in cell microarrays: a tool for antibody-based proteomics. *J Histochem Cytochem*. Dec;54:1413-1423.
- Arellano RD, Hernandez F, Garcia-Sepulveda CA, Velasco VM, Loera CR, Arguello JR. 2013. The D-repeat polymorphism in the ASPN gene and primary knee osteoarthritis in a Mexican mestizo population: a case-control study. *J Orthop Sci*. Sep;18:826-831. Epub 2013/06/05.
- Atienza JM, Yu N, Wang X, Xu X, Abassi Y. 2006. Label-free and real-time cell-based kinase assay for screening selective and potent receptor tyrosine kinase inhibitors using microelectronic sensor array. *J Biomol Screen*. Sep;11:634-643. Epub 2006/07/22.
- Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. 2013. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. Jul;13:511-518.
- Barkan D, El Touny LH, Michalowski AM, Smith JA, Chu I, Davis AS, Webster JD, Hoover S, Simpson RM, Gauldie J, et al. 2010. Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment. *Cancer Res*. Jul;70:5706-5716.
- Barlow LJ, Shen MM. 2013. SnapShot: Prostate cancer. *Cancer Cell*. Sep;24:400.e401.
- Bednarz N, Eltze E, Semjonow A, Rink M, Andreas A, Mulder L, Hannemann J, Fisch M, Pantel K, Weier HU, et al. 2010. BRCA1 loss preexisting in small subpopulations of prostate cancer is associated with advanced disease and metastatic spread to lymph nodes and peripheral blood. *Clin Cancer Res*. Jul 1;16:3340-3348. Epub 2010/07/02.
- Bergamaschi A, Tagliabue E, Sørlie T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, Russnes HG, Nesland JM, Tammi R, Auvinen P, et al. 2008. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol*. Feb;214:357-367.
- Bijsterbosch J, Kloppenburg M, Reijniere M, Rosendaal FR, Huizinga TW, Slagboom PE, Meulenbelt I. 2013. Association study of candidate genes for the progression of hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. Apr;21:565-569.
- Bissell MJ, Hines WC. 2011. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med*. Mar;17:320-329.
- Bosman FT, Stamenkovic I. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. Jul;200:423-428.

- Boyden S. 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med.* Mar 1;115:453-466. Epub 1962/03/01.
- Brabletz S, Brabletz T. 2010. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* Sep;11:670-677.
- Brabletz T, Lyden D, Steeg PS, Werb Z. 2013. Roadblocks to translational advances on metastasis research. *Nat Med.* Sep;19:1104-1109.
- Bromfield GP, Meng A, Warde P, Bristow RG. 2003. Cell death in irradiated prostate epithelial cells: role of apoptotic and clonogenic cell kill. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 6:73-85. Epub 2003/03/29.
- Cabinakova M, Tesarova P. 2012. Disseminated and circulating tumour cells and their role in breast cancer. *Folia Biol (Praha).* 58:87-97. Epub 2012/08/02.
- Cadoo KA, Fornier MN, Morris PG. 2013. Biological subtypes of breast cancer: current concepts and implications for recurrence patterns. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* Dec;57:312-321.
- Campbell K, Whissell G, Franch-Marro X, Batlle E, Casanova J. 2011. Specific GATA factors act as conserved inducers of an endodermal-EMT. *Dev Cell.* Dec;21:1051-1061.
- Celià-Terrassa T, Meca-Cortés O, Mateo F, Martínez de Paz A, Rubio N, Arnal-Estapé A, Ell BJ, Bermudo R, Díaz A, Guerra-Rebollo M, et al. 2012. Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J Clin Invest.* May;122:1849-1868.
- Chaffer CL, Weinberg RA. 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* Mar 25;331:1559-1564. Epub 2011/03/26.
- Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ, Nadkarni KV, MacDonald IC, Groom AC. 2001. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am.* Apr;10:243-255, vii.
- Chauhan VP, Martin JD, Liu H, Lacorre DA, Jain SR, Kozin SV, Stylianopoulos T, Mousa AS, Han X, Adstamongkonkul P, et al. 2013. Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nat Commun.* 4:2516.
- Chi KR. 2016. The tumour trail left in blood. *Nature.* Apr 14;532:269-271. Epub 2016/04/15.
- Ciccia A, Elledge SJ. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.* Oct 22;40:179-204. Epub 2010/10/23.
- Cima I, Schiess R, Wild P, Kaelin M, Schüffler P, Lange V, Picotti P, Ossola R, Templeton A, Schubert O, et al. 2011. Cancer genetics-guided discovery of serum biomarker signatures for diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb;108:3342-3347.
- Condeelis J, Pollard JW. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell.* Jan 27;124:263-266. Epub 2006/01/28.
- Correia AL, Bissell MJ. 2012. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resist Updat.* 2012 Feb-Apr;15:39-49.

Cox TR, Bird D, Baker AM, Barker HE, Ho MW, Lang G, Erler JT. 2013. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res.* Mar;73:1721-1732.

Culig Z, Santer FR. 2014. Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* Sep;33:413-427. Epub 2014/01/05.

Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, Shi B. 2015. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.*5:2929-2943.

Dellett M, Hu W, Papadaki V, Ohnuma S. 2012. Small leucine rich proteoglycan family regulates multiple signalling pathways in neural development and maintenance. *Dev Growth Differ.* Apr;54:327-340.

Demichelis F, Attard G. 2013. A step toward functionally characterized prostate cancer molecular subtypes. *Nat Med.* Aug;19:966-967.

Ding Q, Zhang M, Liu C. 2015. Asporin participates in gastric cancer cell growth and migration by influencing EGF receptor signaling. *Oncol Rep.* Apr;33:1783-1790.

Drasin DJ, Robin TP, Ford HL. 2011. Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Res.*13:226. Epub 2011/11/15.

Duval E, Bigot N, Hervieu M, Kou I, Leclercq S, Galéra P, Boumediene K, Baugé C. 2011. Asporin expression is highly regulated in human chondrocytes. *Mol Med.*17:816-823.

Edwards IJ. 2012. Proteoglycans in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* Apr;9:196-206.

Erler JT, Giaccia AJ. 2006. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res.* Nov 1;66:10238-10241. Epub 2006/11/03.

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* Dec 15;123:4195-4200. Epub 2010/12/03.

Friedl P, Alexander S. 2011. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell.* Nov;147:992-1009.

Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. 2012. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* Aug;14:777-783.

Friedl P, Wolf K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* May;3:362-374.

Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. 2009. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc.*4:309-324.

Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* Apr;12:253-268.

Gao H, Chakraborty G, Lee-Lim AP, Mo Q, Decker M, Vonica A, Shen R, Brogi E, Brivanlou AH, Giancotti FG. 2012. The BMP inhibitor Coco reactivates breast cancer cells at lung metastatic sites. *Cell.* Aug;150:764-779.

Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, Hinshaw HD, Jalal SI, Sears CR, Pawelczak KS, Turchi JJ. 2016. DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacol Ther.* Apr;160:65-83.

Ghajar CM. 2015. Metastasis prevention by targeting the dormant niche. *Nat Rev Cancer*. Apr;15:238-247. Epub 2015/03/25.

Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E. 2009. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol*. Nov;11:1287-1296.

Giancotti FG. 2013. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell*. Nov;155:750-764.

Goh AM, Coffill CR, Lane DP. 2011. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*. Jan;223:116-126. Epub 2010/12/03.

Gostner JM, Fong D, Wrulich OA, Lehne F, Zitt M, Hermann M, Krobitch S, Martowicz A, Gastl G, Spizzo G. 2011. Effects of EpCAM overexpression on human breast cancer cell lines. *BMC Cancer*. 11:45. Epub 2011/02/02.

Gurova KV, Rokhlin OW, Budanov AV, Burdelya LG, Chumakov PM, Cohen MB, Gudkov AV. 2003. Cooperation of two mutant p53 alleles contributes to Fas resistance of prostate carcinoma cells. *Cancer Res*. Jun 1;63:2905-2912. Epub 2003/06/05.

Haeger A, Wolf K, Zegers MM, Friedl P. 2015. Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends Cell Biol*. Sep;25:556-566.

Hanahan D, Coussens LM. 2012. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. Mar;21:309-322.

Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. Mar;144:646-674.

Heinegard D. 2009. Proteoglycans and more--from molecules to biology. *Int J Exp Pathol*. Dec;90:575-586. Epub 2009/12/05.

Helleday T. 2016. PARP inhibitor receives FDA breakthrough therapy designation in castration resistant prostate cancer: beyond germline BRCA mutations. *Ann Oncol*. May;27:755-757.

Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, Mayne PM, Eberspaecher H, Zhou W, de Crombrughe B, Hook M, Mayne R. 2001. Expression pattern and gene characterization of asporin, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J Biol Chem*. Apr;276:12212-12221.

Hughes L, Malone C, Chumsri S, Burger AM, McDonnell S. 2008. Characterisation of breast cancer cell lines and establishment of a novel isogenic subclone to study migration, invasion and tumourigenicity. *Clin Exp Metastasis*. 25:549-557.

Hughes L, O'Brien SL, Gallagher WM, McDonnell S. 2007. DNA microarray-based transcriptomic profiling of an isogenic cell culture model of breast tumour cell invasion. *Anticancer Res*. 2007 May-Jun;27:1353-1359.

Hurley PJ, Sundi D, Shinder B, Simons BW, Hughes RM, Miller RM, Benzon B, Faraj SF, Netto GJ, Vergara IA, et al. 2016. Germline Variants in Asporin Vary by Race, Modulate the Tumor Microenvironment, and Are Differentially Associated with Metastatic Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. Jan;22:448-458.

Jackson SP, Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. Oct 22;461:1071-1078. Epub 2009/10/23.

- Jazayeri R, Qoreishi M, Hoseinzadeh HR, Babanejad M, Bakhshi E, Najmabadi H, Jazayeri SM. 2013. Investigation of the asporin gene polymorphism as a risk factor for knee osteoarthritis in Iran. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. Jul;42:313-316. Epub 2013/10/01.
- Jean C, Gravelle P, Fournie JJ, Laurent G. 2011. Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology. *Oncogene*. Jun;30:2697-2706.
- Joyce JA, Pollard JW. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. Apr;9:239-252.
- Kalamajski S, Aspberg A, Lindblom K, Heinegård D, Oldberg A. 2009. Asporin competes with decorin for collagen binding, binds calcium and promotes osteoblast collagen mineralization. *Biochem J*. Oct;423:53-59.
- Kalin M, Cima I, Schiess R, Fankhauser N, Powles T, Wild P, Templeton A, Cerny T, Aebersold R, Krek W, et al. 2011. Novel prognostic markers in the serum of patients with castration-resistant prostate cancer derived from quantitative analysis of the pten conditional knockout mouse proteome. *Eur Urol*. Dec;60:1235-1243. Epub 2011/07/12.
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. Jun;119:1420-1428.
- Kang Y, Pantel K. 2013. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell*. May;23:573-581.
- Kano MR, Bae Y, Iwata C, Morishita Y, Yashiro M, Oka M, Fujii T, Komuro A, Kiyono K, Kaminishi M, et al. 2007. Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb;104:3460-3465.
- Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. 2011. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol*. 740:33-43. Epub 2011/04/07.
- Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. 2010. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. Jul;28:3271-3277.
- Kharaishvili G, Simkova D, Bouchalova K, Gachechiladze M, Narsia N, Bouchal J. 2014. The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer Cell Int*. 14:41.
- Kim G, Ison G, McKee AE, Zhang H, Tang S, Gwise T, Sridhara R, Lee E, Tzou A, Philip R, et al. 2015. FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. Oct;21:4257-4261.
- Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, Mabuchi A, Kotani A, Kawakami A, Yamamoto S, et al. 2005. An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet*. Feb;37:138-144. Epub 2005/01/11.
- Klee EW, Bondar OP, Goodmanson MK, Dyer RB, Erdogan S, Bergstralh EJ, Bergen HR, Sebo TJ, Klee GG. 2012. Candidate serum biomarkers for prostate adenocarcinoma identified by mRNA differences in prostate tissue and verified with protein measurements in tissue and blood. *Clin Chem*. Mar;58:599-609.
- Klein A, Olendrowitz C, Schmutzler R, Hampl J, Schlag PM, Maass N, Arnold N, Wessel R, Ramser J, Meindl A, et al. 2009. Identification of brain- and bone-specific breast cancer metastasis genes. *Cancer Lett*. Apr;276:212-220.

- Klemm F, Joyce JA. 2015. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol.* Apr;25:198-213.
- Kou I, Nakajima M, Ikegawa S. 2007. Expression and regulation of the osteoarthritis-associated protein asporin. *J Biol Chem.* Nov;282:32193-32199.
- Kou I, Nakajima M, Ikegawa S. 2010. Binding characteristics of the osteoarthritis-associated protein asporin. *J Bone Miner Metab.* Jul;28:395-402. Epub 2010/01/07.
- Kretschmer C, Sterner-Kock A, Siedentopf F, Schoenegg W, Schlag PM, Kemmner W. 2011. Identification of early molecular markers for breast cancer. *Mol Cancer.*10:15.
- Kurfurstova D, Bartkova J, Vrtel R, Mickova A, Burdova A, Majera D, Mistrik M, Kral M, Santer FR, Bouchal J, et al. 2016. DNA damage signalling barrier, oxidative stress and treatment-relevant DNA repair factor alterations during progression of human prostate cancer. *Mol Oncol.* Jun;10:879-894.
- Lakhani, S. R., Ellis, I. O., Schnitt, S. J., Tan, P. H. & van de Vijver, M. J. in *WHO Classification of Tumors of the Breast.* (eds Tavassoli, F. & Devilee, P.) 13–59 (IARC Press, 2012).
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Mar;15:178-196.
- Leccia F, Nardone A, Corvigno S, Vecchio LD, De Placido S, Salvatore F, Veneziani BM. 2012. Cytometric and biochemical characterization of human breast cancer cells reveals heterogeneous myoepithelial phenotypes. *Cytometry A.* Nov;81:960-972.
- Lee AS. 2014. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer.* Apr;14:263-276.
- Lee EH, Park HJ, Jeong JH, Kim YJ, Cha DW, Kwon DK, Lee SH, Cho JY. 2011. The role of asporin in mineralization of human dental pulp stem cells. *J Cell Physiol.* Jun;226:1676-1682.
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, et al. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell.* Nov;139:891-906.
- Levin VA, Panchabhai SC, Shen L, Kornblau SM, Qiu Y, Baggerly KA. 2010. Different changes in protein and phosphoprotein levels result from serum starvation of high-grade glioma and adenocarcinoma cell lines. *J Proteome Res.* Jan;9:179-191.
- Li D, Marchenko ND, Moll UM. 2011. SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6-Hsp90 chaperone axis. *Cell Death Differ.* Dec;18:1904-1913.
- Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, Patrawala L, Yan H, Jeter C, Honorio S, et al. 2011. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med.* Feb;17:211-215. Epub 2011/01/18.
- Liu D, Yang Q, Li M, Mu K, Zhang Y. 2010. Association of an asporin repeat polymorphism with ankylosing spondylitis in Han Chinese population: a case-control study. *Clin Invest Med.*33:E63-68.



- Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, Martin-Trevino R, Shang L, McDermott SP, Landis MD, et al. 2014. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports*. Jan 14;2:78-91. Epub 2014/02/11.
- Lord CJ, Ashworth A. 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. Jan 19;481:287-294. Epub 2012/01/20.
- Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, Bayliss MT, Neame PJ, Heinegard D. 2001. Identification and characterization of asporin, a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *J Biol Chem*. Apr;276:12201-12211.
- Mackay A, Urruticoechea A, Dixon JM, Dexter T, Fenwick K, Ashworth A, Drury S, Larionov A, Young O, White S, et al. 2007. Molecular response to aromatase inhibitor treatment in primary breast cancer. *Breast Cancer Res*. 9:R37.
- Malanchi I, Santamaria-Martinez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, Huelsken J. 2012. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*. Jan 5;481:85-89. Epub 2011/12/14.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, et al. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. May;133:704-715.
- Maris P, Blomme A, Palacios AP, Costanza B, Bellahcène A, Bianchi E, Gofflot S, Drion P, Trombino GE, Di Valentin E, et al. 2015. Asporin Is a Fibroblast-Derived TGF- $\beta$ 1 Inhibitor and a Tumor Suppressor Associated with Good Prognosis in Breast Cancer. *PLoS Med*. Sep;12:e1001871.
- Marotta LL, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, Bloushtain-Qimron N, Kim JJ, Choudhury SA, Maruyama R, et al. 2011. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *J Clin Invest*. Jul;121:2723-2735.
- Massagué J. 2012. TGF $\beta$  signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Oct;13:616-630.
- Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R, Nava Rodrigues D, Robinson D, Omlin A, Tunariu N, et al. 2015. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. Oct;373:1697-1708.
- McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. 2006. REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Breast Cancer Res Treat*. Nov;100:229-235. Epub 2006/08/26.
- Mecham RP. 2001. Overview of extracellular matrix. *Curr Protoc Cell Biol*. May;Chapter 10:Unit 10.11.
- Meidhof S, Brabletz S, Lehmann W, Preca BT, Mock K, Ruh M, Schüler J, Berthold M, Weber A, Burk U, et al. 2015. ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat. *EMBO Mol Med*. Jun;7:831-847.
- Mendes-Pereira AM, Martin SA, Brough R, McCarthy A, Taylor JR, Kim JS, Waldman T, Lord CJ, Ashworth A. 2009. Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol Med*. Sep;1:315-322.
- Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. 2010. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*. Jun;24:1838-1851.

- Merline R, Schaefer RM, Schaefer L. 2009. The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs). *J Cell Commun Signal*. Dec;3:323-335. Epub 2009/10/08.
- Nakajima M, Kizawa H, Saitoh M, Kou I, Miyazono K, Ikegawa S. 2007. Mechanisms for asporin function and regulation in articular cartilage. *J Biol Chem*. Nov;282:32185-32192.
- Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. 2012. Decorin: a guardian from the matrix. *Am J Pathol*. Aug;181:380-387. Epub 2012/06/28.
- Ocaña OH, Córcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, Barrallo-Gimeno A, Cano A, Nieto MA. 2012. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*. Dec;22:709-724.
- Olsson E, Winter C, George A, Chen Y, Howlin J, Tang MH, Dahlgren M, Schulz R, Grabau D, van Westen D, et al. 2015. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Mol Med*. Aug;7:1034-1047. Epub 2015/05/20.
- Ombrato L, Malanchi I. 2014. The EMT universe: space between cancer cell dissemination and metastasis initiation. *Crit Rev Oncog*. 19:349-361.
- Oplustilova L, Wolanin K, Mistrik M, Korinkova G, Simkova D, Bouchal J, Lenobel R, Bartkova J, Lau A, O'Connor MJ, et al. 2012. Evaluation of candidate biomarkers to predict cancer cell sensitivity or resistance to PARP-1 inhibitor treatment. *Cell Cycle*. Oct;11:3837-3850.
- Orr B, Riddick AC, Stewart GD, Anderson RA, Franco OE, Hayward SW, Thomson AA. 2012. Identification of stromally expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate. *Oncogene*. Mar;31:1130-1142.
- Paduch R. 2016. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cell Oncol (Dordr)*. Apr.
- Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D, et al. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. Sep;8:241-254. Epub 2005/09/20.
- Paterlini-Bréchet P, Vona G, Bréchet C. 2000. Circulating tumorous cells in patients with hepatocellular carcinoma. Clinical impact and future directions. *Semin Cancer Biol*. Jun;10:241-249.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. Jun;7:415-428. Epub 2007/05/18.
- Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, et al. 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. Jun;18:883-891.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. May;29:e45.
- Pietras K, Ostman A, Sjöquist M, Buchdunger E, Reed RK, Heldin CH, Rubin K. 2001. Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors. *Cancer Res*. Apr;61:2929-2934.

- Polyak K, Metzger Filho O. 2012. SnapShot: breast cancer. *Cancer Cell*. Oct;22:562-562.e561.
- Polyak K, Weinberg RA. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. Apr;9:265-273.
- Quail DF, Joyce JA. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. Nov;19:1423-1437.
- Raposo G, Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. Feb;200:373-383.
- Roshan Moniri M, Young A, Reinheimer K, Rayat J, Dai LJ, Warnock GL. 2015. Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology*. Mar;67:379-386. Epub 2014/01/21.
- Samadder P, Aithal R, Belan O, Krejci L. 2016. Cancer TARGETases: DSB repair as a pharmacological target. *Pharmacol Ther*. May;161:111-131. Epub 2016/02/24.
- Samuel MS, Lopez JI, McGhee EJ, Croft DR, Strachan D, Timpson P, Munro J, Schröder E, Zhou J, Brunton VG, et al. 2011. Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and  $\beta$ -catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth. *Cancer Cell*. Jun;19:776-791.
- Sansing HA, Renner NA, MacLean AG. 2012. An inverted blood-brain barrier model that permits interactions between glia and inflammatory stimuli. *J Neurosci Methods*. May 30;207:91-96. Epub 2012/04/10.
- Satoyoshi R, Kuriyama S, Aiba N, Yashiro M, Tanaka M. 2014. Asporin activates coordinated invasion of scirrhou gastric cancer and cancer-associated fibroblasts. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2013.584
- Sceneay J, Smyth MJ, Moller A. 2013. The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev*. Dec;32:449-464. Epub 2013/05/03.
- Schaefer L IR. 2008. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction.
- Scher HI, Heller G, Molina A, Attard G, Danila DC, Jia X, Peng W, Sandhu SK, Olmos D, Riisnaes R, et al. 2015. Circulating tumor cell biomarker panel as an individual-level surrogate for survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. Apr;33:1348-1355.
- Shah PP, Fong MY, Kakar SS. 2012. PTTG induces EMT through integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3-focal adhesion kinase signaling in lung cancer cells. *Oncogene*. Jun;31:3124-3135.
- Sharma A, Comstock CE, Knudsen ES, Cao KH, Hess-Wilson JK, Morey LM, Barrera J, Knudsen KE. 2007. Retinoblastoma tumor suppressor status is a critical determinant of therapeutic response in prostate cancer cells. *Cancer Res*. Jul 1;67:6192-6203. Epub 2007/07/10.
- Sheppard D. 2005. Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta. *Cancer Metastasis Rev*. Sep;24:395-402.
- Sleeman JP. 2012. The metastatic niche and stromal progression. *Cancer Metastasis Rev*. Dec;31:429-440. Epub 2012/06/16.

Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, Foekens JA, Martens JW. 2008. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res.* May;68:3108-3114.

Smout MJ, Kotze AC, McCarthy JS, Loukas A. 2010. A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. *PLoS Negl Trop Dis.*4:e885. Epub 2010/11/26.

Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. 2016. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell.* Jan 14;164:57-68. Epub 2016/01/16.

Sodek KL, Brown TJ, Ringuette MJ. 2008. Collagen I but not Matrigel matrices provide an MMP-dependent barrier to ovarian cancer cell penetration. *BMC Cancer.*8:223.

Song YQ, Cheung KM, Ho DW, Poon SC, Chiba K, Kawaguchi Y, Hirose Y, Alini M, Grad S, Yee AF, et al. 2008. Association of the asporin D14 allele with lumbar-disc degeneration in Asians. *Am J Hum Genet.* Mar;82:744-747.

Sounni NE, Dehne K, van Kempen L, Egeblad M, Affara NI, Cuevas I, Wiesen J, Junankar S, Korets L, Lee J, et al. 2010. Stromal regulation of vessel stability by MMP14 and TGFbeta. *Dis Model Mech.* 2010 May-Jun;3:317-332.

Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, Golub TR, Rubin MA, Penning TM, Febbo PG, Balk SP. 2006. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* Mar;66:2815-2825.

Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, Jain SR, Diop-Frimpong B, Bardeesy N, Smith BL, Ferrone CR, Hornicek FJ, Boucher Y, et al. 2012. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep;109:15101-15108.

Tam WL, Weinberg RA. 2013. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med.* Nov;19:1438-1449.

Tanaka M, Rosser CJ, Grossman HB. 2005. PTEN gene therapy induces growth inhibition and increases efficacy of chemotherapy in prostate cancer. *Cancer Detect Prev.*29:170-174. Epub 2005/04/15.

TCGA Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. 2012. *Nature.* Oct 4;490:61-70. Epub 2012/09/25.

Theveneau E, Mayor R. 2012. Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Curr Opin Cell Biol.* Oct;24:677-684.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* Nov;139:871-890.

Tomoeda M, Yamada S, Shirai H, Ozawa Y, Yanagita M, Murakami S. 2008. PLAP-1/asporin inhibits activation of BMP receptor via its leucine-rich repeat motif. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun;371:191-196.

Toren P, Kim S, Johnson F, Zoubeidi A. 2016. Combined AKT and MEK Pathway Blockade in Pre-Clinical Models of Enzalutamide-Resistant Prostate Cancer. *PLoS One.*11:e0152861. Epub 2016/04/06.

- Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K, Wei W, Dziechciarkova M, Ehrmann J, Klein J, Fridman E, Skarda J, Srovnal J, et al. 2007. Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer*.7:55.
- Turtoi A, Musmeci D, Wang Y, Dumont B, Somja J, Bevilacqua G, De Pauw E, Delvenne P, Castronovo V. 2011. Identification of novel accessible proteins bearing diagnostic and therapeutic potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Proteome Res*. Sep;10:4302-4313.
- Valastyan S, Weinberg RA. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. Oct;147:275-292.
- Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, Galsky M, Cordon-Cardo C, Domingo-Domenech J. 2014. Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. *Oncogene*. Sep 4;33:4451-4463. Epub 2013/10/08.
- Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. 2012. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. Jul;1820:940-948.
- Vona-Davis L, Rose DP, Gadiyaram V, Ducatman B, Hobbs G, Hazard H, Kurian S, Abraham J. 2014. Breast cancer pathology, receptor status, and patterns of metastasis in a rural appalachian population. *J Cancer Epidemiol*.2014:170634.
- Voog J, Jones DL. 2010. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell*. Feb 5;6:103-115. Epub 2010/02/11.
- Wan L, Pantel K, Kang Y. 2013. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nat Med*. Nov;19:1450-1464.
- Weinberg RA. 2008. The many faces of tumor dormancy. *APMIS*. 2008 Jul-Aug;116:548-551.
- Werner S, Brors B, Eick J, Marques E, Pogenberg V, Parret A, Kemming D, Wood AW, Edgren H, Neubauer H, et al. 2015. Suppression of early hematogenous dissemination of human breast cancer cells to bone marrow by retinoic Acid-induced 2. *Cancer Discov*. May;5:506-519. Epub 2015/02/27.
- Whang YE, Wu X, Sawyers CL. 1998. Identification of a pseudogene that can masquerade as a mutant allele of the PTEN/MMAC1 tumor suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*. Jun 3;90:859-861. Epub 1998/06/13.
- Wolf DM, Lenburg ME, Yau C, Boudreau A, van 't Veer LJ. 2014. Gene co-expression modules as clinically relevant hallmarks of breast cancer diversity. *PLoS One*.9:e88309.
- Xi B, Wang T, Li N, Ouyang W, Zhang W, Wu J, Xu X, Wang X, Abassi YA. 2011. Functional cardiotoxicity profiling and screening using the xCELLigence RTCA Cardio System. *J Lab Autom*. Dec;16:415-421. Epub 2011/11/19.
- Xu L, Li Z, Liu SY, Xu SY, Ni GX. 2015. Asporin and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. Jun;23:933-939.
- Yamada S, Murakami S, Matoba R, Ozawa Y, Yokokoji T, Nakahira Y, Ikezawa K, Takayama S, Matsubara K, Okada H. 2001. Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. *Gene*. Sep;275:279-286.

Yamada S, Ozawa Y, Tomoeda M, Matoba R, Matsubara K, Murakami S. 2006. Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. *J Dent Res.* May;85:447-451.

Yilmaz M, Christofori G. 2010. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res.* May;8:629-642.

## 7 SEZNAM PUBLIKACÍ A KONFERENCEČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ

### Původní vědecké publikace

**Simkova D**, Kharaisvili G, Korinkova G, Ozdian T, Suchánková-Kleplová T, Soukup T, Krupka M, Galandakova A, Dzubak P, Janikova M, Navratil J, Kahounova Z, Soucek K, Bouchal J. The dual role of asporin in breast cancer progression. *Oncotarget*, **IF 6.368**, přijato k publikaci 29. 6. 2016

Oplustilova L, Wolanin K, Mistrik M, Korinkova G, **Simkova D**, Bouchal J, Lenobel R, Bartkova J, Lau A, O'Connor MJ, et al. 2012. Evaluation of candidate biomarkers to predict cancer cell sensitivity or resistance to PARP-1 inhibitor treatment. *Cell Cycle*. Oct;11:3837-3850., **IF 5.243**

### Přehledné vědecké práce v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

**Simkova D**, Kharaisvili G, Slabakova E, Murray P.G, Bouchal J. Glycoprotein asporin as a novel player in tumour microenvironment and cancer progression. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc*. Přijato k publikaci 29. 6. 2016. **IF 0.924**

Kharaisvili G, **Simkova D**, Bouchalova K, Gachechiladze M, Narsia N, Bouchal J. 2014. The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer Cell Int*.14:41. **IF 2.766**

Kharaisvili G, **Simkova D**, Makharoblidze E, Trtkova K, Kolar Z, Bouchal J. Wnt signaling in prostate development and carcinogenesis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011;155(1):11-8. **IF: 0.702**

## Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech

**Simkova D.**, Kharashvili G., Cizkova M., Bouchalova K., Kolar Z., Bouchal J. Proteoglykan asporin a jeho vliv na invazivní růst karcinomu prsu, *konference Brněnské onkologické dny*, 21.–23. 4. 2011. (abstrakt + přednáška)

**Simkova D.**, Bouchal J., Kharashvili G.: Asporin Is Associated with Invasive Growth and Bone Metastasis of Breast Cancer. *33rd San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas, USA*, 8.–12. 12. 2010. (abstrakt). Pozn.: kvůli nevyhovění žádosti o cestovní stipendium, byly výsledky na konferenci prezentovány Dr. Janem Bouchalem.

**Dana Simkova**, Gvantsa Kharashvilli, Jan Bouchal. Role of asporin in breast cancer cell lines and their invasivity, *Molecular mechanisms of selected pathological processes in the cell, studentská minikonference, Drnovice*, 30. 11. – 1. 12. 2012. (abstrakt + přednáška)

**Dana Simkova**, Jan Bouchal. Proteoglycan Asporin enhances invasion of selected breast cancer cells by reducing collagen I stiffening“, „*xCELLigence System - Global User Conference*“, 21. 6. 2012, *Stockholm, Švédsko* (poster)

**Dana Simkova**, Jan Bouchal. Asporin enhances invasion of selected breast cancer cells by inhibiting collagen I fibrillogenesis, *Tumor Microenvironment, Dublin, Irsko*, 17.–19. 9. 2012. (abstrakt)

**Simkova D.**, Kharashvili G., Bouchal J., Glykoprotein asporin ovlivňuje migrační a invazní schopnosti prsních nádorových buněk. *XXI. Biologické dny 2014, Brno* 4.–5. 9. 2014. (abstrakt).

**Dana Simkova**, Gvantsa Kharashvili, Tomas Ozdian, Gabriela Korinkova, Michal Krupka, Tomas Soukup, Petr Dzubak, Adela Galandakova, Jan Bouchal. Asporin ovlivňuje migrační a invazní schopnosti nádorových buněk prsu. *Dni molekulovej patológie, Martin* 4.–5. 6. 2015 (abstrakt + přednáška)

**Dana Simkova**, Tomas Ozdian, Gvantsa Kharashvili, Gabriela Korinkova, Jan Bouchal. Glycoprotein asporin is upregulated by three-dimensional growth and promotes invasion of breast cancer cells, *Metastasis Initiation: Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities, Madrid* 28.–30. 9. 2015 (abstrakt)



## 8 SEZNAM ZKRATEK

AKT	Protein kinase B, PKB
ALDH	Aldehyde Dehydrogenase
ASPN	Asporin
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectagia and Rad3 related
BCAF 3, 4, 5	breast cancer associated fibroblast
BDMC	bone marrow derived myeloid cells
BER	base excision repair
BMP	bone morphogenetic protein
CAF	cancer associated fibroblast
CDK	cyklin dependent kinase
cfDNA	circulating free DNA
CSF-1	colony stimulating factor 1
CTC	circulating tumour cell
ctDNA	circulating tumour DNA
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase
DSB	double strand breaks
DTC	disseminated tumour cell
ECM	extracellular matrix
EGF	epidermal growth factor
EMT	epithelial mesenchymal transition
ER-	estrogen receptor negative
ER+	estrogen receptor positive

ERG	V-ETS avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog
ETV1	ETS Variant 1
FAK	focal adhesion kinase
FBS	foetal bovine serum
FOX	forkhead box
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATA	GATA binding protein
hDPSC	human dental pulp stem cell
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HER2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
HIF1 $\alpha$	Hypoxia-Inducible Factor 1, Alpha Subunit
HR	homologous recombination
HRP	horse radish peroxidase
CHD1	chromodomain helicase dna binding protein 1
CHK1	checkpoint kinase 1
CHK2	checkpoint kinase 2
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IR	ionizing radiation
JAK	Janus kinase
LOX	lysyl oxidase
LOXL	lysyl oxidase like 3
LRR	leucine rich repeat
MCP1	monocyte chemotactic protein
c-MET	met proto-oncogene tyrosine kinase
MET	mesenchymal epithelial transition
MMP	matrix metalloproteinase

MMR	mismatch repair
MRN	complex MRE11-RAD50-NBS1
NER	base excision repair
NER	nucleotide excision repair
NHEJ	non-homologous end joining
ORF	open reading frame
PARP1	poly(ADP-ribose) polymerase 1
PDGF	platelet derived growth factor
PDL	peridontal ligament
POSTN	periostin
PSA	prostatic specific antigen
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer
RPA	replication protein a
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	sodium dodecyl sulphate
SLRP	small leucine rich repeat protein
SMAD	mothers against dpp homolog 4
SNAIL	snail family zinc finger 1
SPOP	speckle type btb/poz protein
SRC	SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase
SSB	single strand breaks
TAM	tumour associated macrophage
TBP	TATA-Box Binding Protein
TGFβ	transforming growth factor β
TME	tissue microenvironment

TMPRSS2	transmembrane protease, serine 1
TNBC	triple negative breast cancer
TrkB	tropomyosin receptor kinase b
TWIST	twist family bhlh transcription factor 1
UTR	untranslated region
VEGF-A	vascular endothelial factor A
WNT	wnt family member

## 9 PŘÍLOHY

## Příloha č. 1

Simkova D, Kharraishvili G, Korinkova G, Ozdian T, Suchánková-Kleplová T, Soukup T, Krupka M, Galandakova A, Dzubak P, Janikova M, Navratil J, Kahounova Z, Soucek K, Bouchal J. **The dual role of aspirin in breast cancer progression.** *Oncotarget*, IF 6.368, přijato k publikaci 29. 6. 2016

## Příloha č. 2

Simkova D, Kharashvili G, Slabakova E, Murray P.G, Bouchal J. **Glycoprotein asporin as a novel player in tumour microenvironment and cancer progression.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc*. Přijato k publikaci 29. 6. 2016. IF 0.924

### **Příloha č. 3**

Oplustilova L, Wolanin K, Mistrik M, Korinkova G, Simkova D, Bouchal J, Lenobel R, Bartkova J, Lau A, O'Connor MJ, et al. 2012. **Evaluation of candidate biomarkers to predict cancer cell sensitivity or resistance to PARP-1 inhibitor treatment.** *Cell Cycle*. Oct;11:3837-3850., IF 5.243



## **Příloha č. 4**

Kharaishvili G, Simkova D, Bouchalova K, Gachechiladze M, Narsia N, Bouchal J. 2014.  
**The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors  
in tumor progression and therapy resistance.** *Cancer Cell Int.*14:41. IF 2.766

## Příloha č. 5

Kharaishvili G, Simkova D, Makharoblidze E, Trtkova K, Kolar Z, Bouchal J. **Wnt signaling in prostate development and carcinogenesis.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011;155(1):11-8. IF: 0.702