

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Bc. Dominika Lyková**

Lokalizace a transport proteáz mezibuněčné hmoty  
The localization and transport of extracellular matrix proteases

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Ondřej Tolde, Ph.D.

Praha, 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1. 5. 2017

Dominika Lyková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala především svému školiteli RNDr. Ondřejovi Toldemu, Ph.D. za cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval při mém studiu a vypracovávání diplomové práce. Zároveň děkuji za spolupráci při konfokální mikroskopii. Dále bych ráda poděkovala vedoucím laboratoře doc. RNDr. Janovi Brábkovi, Ph.D. a doc. RNDr. Danielovi Röselovi, Ph.D. za to, že mi umožnili stát se členem Laboratoře invazivity nádorových buněk a za jejich ochotu a vstřícnost.

Zároveň bych ráda poděkovala všem členům laboratoře za jejich nápomocnost, vlídnost, a především za skvělou a přátelskou pracovní atmosféru. Poděkování patří jmenovitě Mgr. Jaroslavovi Branišovi, Mgr. Anetě Gandalovičové, Mgr. Michalovi Dibusovi, Mgr. Jakubovi Gemperlemu, Mgr. Ladislavovi Mertovi, Mgr. Lence Koudelkové a paní Marii Charvátové.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým přátelům a rodině, především rodičům Janě Lykové a Tomášovi Lyko, za morální a finanční podporu během celého mého studia.

## **Abstrakt**

Hlavní příčinou úmrtí pacientů se solidním nádorem jsou metastáze. Migrace buněk z prostředí primárního nádoru a zakládání sekundárních ložisek je několikastupňový proces, během kterého nádorové buňky překonávají tkáňové bariéry. Nádorové buňky jsou schopny adaptovat se na vlastnosti extracelulárního prostředí změnou způsobu migrace a dynamiky pohybu za účelem zachování pohyblivosti. Invazivní buňky vytváří výběžky cytoplazmatické membrány, které mají schopnost degradovat komponenty mezibuněčné hmoty, tzv. invadopodia. Tvorba těchto protruzí bohatých na aktinová mikrofilamenta je spojená s produkcí tzv. matrixových metaloproteáz (MMP), které mezibuněčnou hmotu proteolyticky degradují. Tvorba invadopodií, stejně tak produkce MMP, jsou klíčové pro degradaci extracelulární matrix. Nejvýznamnějšími členy skupiny MMP jsou membránově vázaná MMP-14 (MT1-MMP) a sekretované MMP-2 a MMP-9. Struktura a funkce invazivních struktur nádorových buněk ve 2D prostředí je již detailně popsána. Nicméně chybí ucelený model lokalizace a transportu MMP v souvislosti s invazivními strukturami nádorových buněk ve 3D prostředí. Tato diplomová práce je zaměřená na rozšíření poznatků týkajících se klíčových MMP a na optimalizaci podmínek pro studium proteáz ve 3D prostředí, které se více podobá situaci *in vivo*.

## **Klíčová slova**

Nádorové buňky, metastáze, invadopodia, matrixové metaloproteázy, mezibuněčná hmota, 3D prostředí, nádorové mikroprostředí

## **Abstract**

Metastasis is the main cause of death from solid cancer. The dissemination of cancer cells from a primary tumour is a very complex process that involves many steps and cells must overcome many obstacles to colonize distant organs. The tumour microenvironment influences the mode and the dynamics of invasion of cancer cells. Cancer cells have the ability to adapt to distinct environmental conditions in order to stay motile. Invasive cancer cells form membrane protrusions called invadopodia that are able to degrade extracellular matrix. The formation of invadopodia by cancer cells is interconnected to the production of matrix metalloproteases (MMPs). Metastasizing tumour cells use MMPs to break through extracellular matrix barriers and migrate in dense matrix. Both invadopodia formation and MMPs secretion is crucial for the degradation of the extracellular matrix. The most important is the membrane bound MMP-14 (MT1-MMP) and soluble MMP-2 and MMP-9. The invasive structures of tumour cells and the proteolytic enzymes in 2D environment is well described. However, a suitable model of localization and transport of MMPs and connection with invadopodia of tumour cells in 3D environment is still lacking. This diploma thesis focused on the extension of current knowledge of these key MMPs and on the optimization of experimental conditions more suitable for mimicking the situation *in vivo*.

## **Keywords**

Cancer cells, metastasis, invadopodia, matrix metalloproteases, extracellular matrix, 3D space, cancer microenvironment

## Přehled zkratk

<b>2D</b>	Two-dimensional space
<b>3D</b>	Three-dimensional space
<b>ADAMs</b>	A disintegrin and metalloproteinase
<b>Arp2/3 complex</b>	Actin-related protein 2/3 complex
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate
<b>CAFs</b>	Cancer-associated fibroblasts
<b>CD44</b>	Cluster of differentiation 44
<b>CD63</b>	Cluster of differentiation 63
<b>Cdc42</b>	Cell division control protein 42
<b>CFP</b>	Cyan fluorescent protein
<b>CSF-1</b>	Colony-stimulating factor 1
<b>DRF/mDia</b>	Diaphanous-related formins
<b>ECM</b>	Extracellular matrix (Mezibuněčná hmota)
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EGFP</b>	Enhanced green fluorescent protein
<b>EMT</b>	Epithelial-mesenchymal transition
<b>FAK</b>	Focal adhesion kinase
<b>F-actin</b>	Filamentous actin (Filamentární aktin)
<b>FAP</b>	Fibroblast activation protein (Seprase)
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HDFC</b>	High-density fibrillar collagen (Fibrilární kolagen o vysoké hustotě)
<b>HIF-1</b>	Hypoxia-inducible factor-1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin-1 $\beta$
<b>IQGAP1</b>	IQ motif containing GTPase activating protein 1
<b>LOX</b>	Lysyl oxidase
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MMP</b>	Matrix metalloproteinase (Matrixové metaloproteázy)
<b>mTurq2</b>	mTurquoise 2
<b>NHE-1</b>	Sodium/hydrogen exchanger 1

<b>N-WASP</b>	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (Polymerázová řetězová reakce)
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>PI(3,4)P<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate
<b>PI(4,5)P<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate 3-kinase
<b>PX domain</b>	Phox homology domain
<b>ROCK</b>	Rho-associated protein kinase
<b>Src</b>	Tyrosine-protein kinase Src
<b>TGF-β</b>	Transforming growth factor β
<b>TIMPs</b>	Tissue inhibitor of metalloproteinases
<b>Tks4</b>	Tyrosine kinase substrate 4
<b>Tks5</b>	Tyrosine kinase substrate 5
<b>TNF-α</b>	Tumor necrosis factor α
<b>VAMP4</b>	Vesicle associated membrane protein 4
<b>VAMP7</b>	Vesicle associated membrane protein 7
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>WASH</b>	Wiskott-Aldrich syndrome protein and Scar homolog

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>2</b>
2.1 MIGRACE NÁDOROVÝCH BUNĚK .....	2
2.2 ADHEZIVNÍ STRUKTURY BUNĚK.....	3
2.2.1 <i>Podosomy a invadopodia jako adhezivní a proteolytické struktury</i> .....	3
2.2.2 <i>Studium adhezních struktur ve 2D/3D prostředí</i> .....	4
2.2.3 <i>Struktura invadopodií nádorových buněk</i> .....	5
2.2.4 <i>Morfologie invadopodií ve 3D prostoru</i> .....	6
2.2.5 <i>Invazivní struktury in vivo</i> .....	7
2.3 EXTRACELULÁRNÍ MATRIX (ECM).....	8
2.3.1 <i>Vmezeřená pojivová tkáň</i> .....	8
2.3.2 <i>Bazální lamina</i> .....	8
2.4 VLIV NÁDOROVÉ TKÁNĚ NA MIGRACI BUNĚK .....	9
2.5 PROTEOLYTICKÁ DEGRADACE ECM .....	11
2.6 MATRIXOVÉ METALOPROTEÁZY (MMP).....	12
2.6.1 <i>Regulace aktivity MMP</i> .....	15
2.6.2 <i>MMP-2 (želatináza A, 72-kDa želatináza)</i> .....	16
2.6.3 <i>MMP-9 (želatináza B, 92-kDa želatináza)</i> .....	16
2.6.4 <i>MMP-14 (MT1-MMP)</i> .....	17
2.7 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	21
<b>3. MATERIÁL</b> .....	<b>22</b>
3.1 ORGANISMY.....	22
3.1.1 <i>Bakterie</i> .....	22
3.1.2 <i>Savčí buněčné linie</i> .....	22
3.2 KULTIVACE ORGANISMŮ .....	22
3.2.1 <i>Kultivace bakterií</i> .....	22
3.2.2 <i>Kultivace savčích buněčných linií</i> .....	23
3.3 MATERIÁL POUŽITÝ PŘI PRÁCI S DNA.....	23
3.3.1 <i>Izolace a purifikace DNA</i> .....	23
3.3.2 <i>Agarózová elektroforéza</i> .....	24
3.3.3 <i>Vektory</i> .....	25
3.3.4 <i>Inzerty</i> .....	26
3.3.5 <i>Primery</i> .....	26

3.3.6	<i>Enzymy a pufrý pro enzymatické reakce, deoxynukleotidy</i> .....	27
3.3.7	<i>Restrikční endonukleázy</i> .....	27
3.4	<b>MATERIÁL POUŽITÝ PŘI PRÁCI S PROTEINY</b> .....	28
3.4.1	<i>Příprava buněčných lyzátů a vzorků pro SDS-PAGE</i> .....	28
3.4.2	<i>SDS-PAGE a vizualizace proteinů</i> .....	29
3.4.3	<i>Želatinová zymografie</i> .....	31
3.5	<b>MATERIÁL PRO PŘÍPRAVU PREPARÁTU NA MIKROSKOPII</b> .....	32
3.5.1	<i>Mikroskopovací materiál a jeho úprava</i> .....	32
3.5.2	<i>Příprava kolagenové matrix jako 3D matrice</i> .....	32
3.5.3	<i>Imunocytochemické barvení savčích buněk</i> .....	33
<b>4.</b>	<b>METODY</b> .....	<b>35</b>
4.1	<b>KULTIVACE SAVČÍCH TKÁŇOVÝCH KULTUR</b> .....	<b>35</b>
4.1.1	<i>Pasážování savčích buněk</i> .....	35
4.1.2	<i>Kryokonzervace savčích buněk</i> .....	35
4.1.3	<i>Rozmrazování savčích buněk</i> .....	36
4.1.4	<i>Transfekce savčích buněk</i> .....	36
4.1.5	<i>Příprava buněčné suspenze o požadované koncentraci</i> .....	37
4.2	<b>IZOLACE A PURIFIKACE DNA</b> .....	<b>37</b>
4.2.1	<i>Izolace plazmidové DNA pomocí fenol-chlorofomu</i> .....	37
4.2.2	<i>Elektroforetická separace DNA v agarózovém gelu</i> .....	38
4.2.3	<i>Izolace DNA fragmentů z agarózového gelu pomocí fenolu</i> .....	39
4.2.4	<i>Purifikace DNA pomocí Agencourt AMPure XP</i> .....	39
4.3	<b>MOLEKULÁRNÍ KLONOVÁNÍ KONSTRUKTŮ</b> .....	<b>40</b>
4.3.1	<i>Polymerázová řetězová reakce (PCR)</i> .....	40
4.3.2	<i>PCR z bakteriálních kolonií</i> .....	41
4.3.3	<i>Restrikční štěpení</i> .....	42
4.3.4	<i>Defosforylace konců</i> .....	42
4.3.5	<i>Ligace DNA</i> .....	43
4.3.6	<i>Příprava kompetentních bakterií E. coli DH5α</i> .....	43
4.3.7	<i>Transformace kompetentních bakterií metodou Heat shock</i> .....	45
4.3.8	<i>Transformace kompetentních bakterií elektroporací</i> .....	45
4.4	<b>PRÁCE S PROTEINY</b> .....	<b>46</b>
4.4.1	<i>Příprava buněčných lyzátů</i> .....	46
4.4.2	<i>Stanovení koncentrace proteinů a příprava vzorků pro SDS-PAGE</i> .....	46
4.4.3	<i>SDS-PAGE elektroforéza</i> .....	47

4.4.4	<i>Barvení polyakrylamidového gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue.....</i>	48
4.4.5	<i>Western blot.....</i>	48
4.4.6	<i>Imunodetekce proteinů na membráně .....</i>	49
4.4.7	<i>Želatinová zymografie.....</i>	49
4.5	<b>PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ PRO KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPII .....</b>	<b>51</b>
4.5.1	<i>Příprava sklíček pokrytých fibronektinem .....</i>	51
4.5.2	<i>Příprava sklíček pokrytých fluorescenční želatinou .....</i>	51
4.5.3	<i>Fluorescenčně značený kolagen.....</i>	52
4.5.4	<i>Fibrilární kolagen o vysoké hustotě.....</i>	53
4.5.5	<i>Imunocytochemické barvení savčích buněk.....</i>	54
4.5.6	<i>Značení SNAP-MMP-14 pomocí substrátu SNAP-Surface.....</i>	55
4.6	<b>ANALÝZA A STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ .....</b>	<b>55</b>
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>56</b>
5.1	<b>PŘÍPRAVA KONSTRUKTŮ.....</b>	<b>56</b>
5.1.1	<i>MMP-2-mTurquoise2/MMP-9-mTurquoise2.....</i>	56
5.1.2	<i>MMP-2-SNAP/MMP-9-SNAP.....</i>	56
5.1.3	<i>MMP-2-Clover2/MMP-9-Clover2.....</i>	57
5.1.4	<i>MMP-14-SNAP.....</i>	58
5.1.5	<i>SNAP-MMP-14.....</i>	59
5.2	<b>FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE PROTEÁZ VE 2D.....</b>	<b>60</b>
5.3	<b>IMUNODETEKCE PROTEÁZ TRANSFEKOVANÝCH V SAVČÍCH BUŇKÁCH .....</b>	<b>63</b>
5.4	<b>ŽELATINOVÁ ZYMOGRAFIE .....</b>	<b>65</b>
5.5	<b>IN SITU DEGRADACE ŽELATINY .....</b>	<b>68</b>
5.6	<b>OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY 3D MATRICE .....</b>	<b>72</b>
5.7	<b>LOKALIZACE A DYNAMIKA PROTEÁZ VE 3D PROSTŘEDÍ.....</b>	<b>74</b>
5.7.1	<i>MMP-9.....</i>	74
5.7.2	<i>MMP-14.....</i>	77
5.8	<b>INTERNALIZACE A DYNAMIKA MMP-14 .....</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>83</b>
6.1	<b>PŘÍPRAVA KONSTRUKTŮ PROTEÁZ, OVĚŘENÍ EXPRESE A KVANTIFIKACE AKTIVITY.....</b>	<b>83</b>
6.2	<b>OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY KOLAGENOVÉ MATRICE JAKO 3D PROSTŘEDÍ.....</b>	<b>86</b>
6.3	<b>LOKALIZACE A TRANSPORT PROTEÁZ VE 3D PROSTŘEDÍ .....</b>	<b>87</b>
6.4	<b>STUDIUM DYNAMIKY A INTERNALIZACE MMP-14.....</b>	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>SMĚŘOVÁNÍ VÝZKUMU .....</b>	<b>91</b>

<b>8. ZÁVĚREČNÉ SHRUTÍ.....</b>	<b>92</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>93</b>

## 1. Úvod

Migrace buněk je nezbytná pro fyziologické procesy v organismu, např. pro imunitní reakci, embryonální vývoj jedince nebo hojení ran. Při patologických změnách v organismu může docházet k invazivní migraci nádorových buněk. Právě invazivita nádorových buněk je jedním z předpokladů pro vznik metastáz, které jsou příčinou úmrtí až 90 % pacientů se solidním nádorovým onemocněním. Metastazování je několikastupňový proces, kdy nádorové buňky vycestovávají z prostředí primárního nádoru a vytvářejí sekundární ložiska.

Migrující nádorové buňky se dostávají do kontaktu s cévním endotelem nebo vlákny extracelulární matrix (ECM) a tyto tkáňové bariéry ovlivňují mobilitu buněk. Invazivita buněk je podmíněná schopností přizpůsobit se svým tvarem a vyhledat volný prostor pro následnou migraci. Jinou možností je uvolňování proteolytických enzymů, které degradují mezibuněčnou hmotu.

Degradace okolního prostředí je podmíněná tvorbou invazivních struktur, které vytvářejí kontakt s extracelulárním prostředím a uvolňují proteolytické enzymy. Invazivní struktury u nádorových buněk označujeme jako tzv. invadopodia (Chen 1989). V případě fyziologické degradace ECM, se kterou se setkáváme např. u osteoklastů a makrofágů, jsou struktury označovány jako tzv. podosomy (Marchisio et al. 1984; Linder et al. 1999). V literatuře se můžeme setkat se souhrnným označením invadosomy nebo podosome-type adhesions (PTA).

Nádorové mikroprostředí je velmi komplexní, dochází k přestavbám ECM a vyskytují se zde interakce nádorových buněk s jinými buněčnými typy (např. fibroblasty, makrofágy, leukocyty). Takové podmínky nelze vystihnout v laboratorním prostředí, ale s použitím 3D matrice se přibližujeme situaci *in vivo*. Jako 3D matrice je pro studium užíván kolagen, želatina, Matrigel, případně tkáň bohatá na kolagen (kožní dermis, tkáňové substituenty).

Cílem diplomové práce je rozšířit poznatky týkající se lokalizace proteáz mezibuněčné hmoty v souvislosti s invazivními strukturami nádorových buněk ve 3D prostředí a vizualizovat degradaci ECM. Studium je zaměřeno především na tzv. matrixové metaloproteázy (MMP), které hrají klíčovou roli v invazivitě nádorových buněk.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Migrace nádorových buněk

Narušením rovnováhy mezi buněčným růstem, dělením a apoptózou vlivem poškození kontrolních mechanismů může docházet k nekontrolovatelnému dělení a případně k invazivitě buněk. V případě maligního tumoru, kromě nádorů krve tvorné povahy, nádorové buňky vykazují invazivní charakter a jejich migrace do okolních tkání vede ke vzniku sekundárních ložisek. Nádorové buňky uvolněné z primárních tumorů vstupují do krevního nebo lymfatického oběhu a malé množství z nich dokáže vystoupit z cirkulace a usídlit se v jiných tkáních (Massagué & Obenauf 2016; Carlini et al. 2011). Kolonizace sekundárních tkání je velmi limitující a neefektivní proces, během kterého přežije pouze minorita nádorových buněk schopných vytvořit sekundární tumor. Přesto jsou metastáze hlavní příčinou úmrtí u pacientů s nádorovým onemocněním (Massagué & Obenauf 2016).

Klíčovými kroky na počátku invaze jsou přestavby cytoskeletu, mobilita adhezivních interakcí, sekrece MMP a kathepsinů. Diseminace nádorových buněk je doprovázená přechodem z epiteliálního do mezenchymálního stavu (EMT), kdy dochází ke změnám ve fenotypu buněk, ztrátám mezibuněčných adhezí a epiteliální polarizace a k získání motility (Quail & Joyce 2013; Massagué & Obenauf 2016). EMT se vyznačuje např. sníženou expresí E-kadherinu a zvýšenou produkcí vimentinu (Thiery et al. 2009).

Dnes jsou popsány dva krajní způsoby migrace nádorových buněk ve 3D prostředí, améboidní a mezenchymální typ. Nicméně toto rozdělení není striktní, neboť buňky mohou zaujímat přechodný stav mezi těmito způsoby invaze. Nádorové buňky vykazující améboidní typ migrace mají kulatý tvar a pohybují se pomocí vytváření blebů, které se podobají apoptickým blebům. Hlavní úlohu v signalizaci sehrává GTPáza Rho a kináza Rho (ROCK). Invazivita améboidních buněk nemusí být závislá na proteolytické degradaci ECM (Fackler & Grosse 2008; Sahai & Marshall 2003). Oproti tomu mezenchymální způsob migrace se vyznačuje vřetenovitým tvarem buněk a tvorbou četných protruzí bohatých na fibrilární aktin, které vytváří silné adheze k ECM, a buňky mohou proteolyticky degradovat ECM. Tento proces je zprostředkován GTPázou Rac1 a Cdc42 (Clark & Vignjevic 2015; Sahai & Marshall 2003; Friedl & Alexander 2011).

Inhibicí proteolytické aktivity dochází u některých mezenchymálních buněk ke změně způsobu migrace na améboidní typ a k závislosti na signální kaskádě zahrnující kinázu ROCK (Sahai & Marshall 2003). Stejně tak blokování Rac inhibuje mezenchymální pohyb a iniciuje améboidní způsob migrace. Aktivní Rac negativně reguluje GTPázu Rho a kinázu ROCK a tím potlačuje améboidní fenotyp (Sanz-Moreno et al. 2008).

Hnací silou pro migraci mezenchymálních buněk je polymerizace aktinu. Aktin myozinové vlákna vykazují kontrakce na stranách a v zadní části buňky ve směru migrace (Hall 2009). Polymerizovaný aktin vytváří výběžky v přední části buňky, které prostřednictvím integrinových adhezí interagují s ECM. Generování trakční síly zprostředkované aktinem a myozinem umožní pohyb buňky na místo nově vzniklých adhezí. Rozrušením adhezních interakcí na zadní části buňky dojde k posunu buňky a zanechání tubulárního defektu ECM, ohraničeného nově uspořádanými kolagenovými vlákny (Friedl & Wolf 2009; Friedl & Alexander 2011).

Nádorové buňky mohou migrovat samostatně améboidním nebo mezenchymálním způsobem, případně kolektivně v uspořádané skupině a vykazovat kooperativní chování (Friedl & Wolf 2003; Friedl 2004). Na individualitu či kolektivnost migrace mezenchymálních buněk má vliv hustota ECM. Zatímco fibrilární kolagen o nižší hustotě, kdy vznikají póry o větší velikosti, indukuje migraci individuálních buněk, kolagen o vyšší hustotě s menší velikostí póru indukuje kolektivní migraci mezenchymálních buněk zprostředkovanou mezibuněčnými interakcemi. Oproti tomu fibrilární kolagen o vysoké hustotě s větší velikostí póru, čehož je dosaženo polymerizací v nižší teplotě, indukuje individuální migraci a změnu na améboidní fenotyp (Haeger et al. 2014).

## **2.2 Adhezivní struktury buněk**

### **2.2.1 Podosomy a invadopodia jako adhezivní a proteolytické struktury**

Migrace buněk spojená s proteolytickou degradací ECM je podmíněná přítomností speciálních adhezí, které zprostředkovávají kontakt s extracelulárním prostředím a zajišťují degradaci komponent ECM. První zmínky o změně distribuce cytoskeletálních proteinů se objevují u fibroblastů transformovaných virem Rous Sarcoma (David-Pfeuty & Singer 1980).

Invazivní struktury nacházející se ve fyziologických podmínkách, např. u makrofágů, osteoklastů nebo dendritických buněk, označujeme jako tzv. podosomy. Podosomy se vyskytují v místě kontaktu buněk s podkladem, případně na vedoucím okraji migrující buňky. Jejich distribuce může mít pravidelný charakter v podobě tzv. rozet, nebo se vyskytují ve shlucích či pásech (Linder 2007; Linder 2009; Linder et al. 2011). Invazivní struktury nacházející se u nádorově transformovaných buněk nazýváme invadopodia. Invadopodia se stejně jako podosomy vytváří v místě kontaktu buňky s okolním prostředím a vykazují schopnost degradace ECM (Linder 2007; Linder 2009; Linder et al. 2011; Murphy & Courtneidge 2011).

### 2.2.2 Studium adhezních struktur ve 2D/3D prostředí

Struktura a funkce adhezních struktur ve 2D je již detailně popsána. Pro následné rozvíjení poznatků v trojdimenzionálním pojetí je nezbytné porozumění situaci ve 2D. Avšak ve 2D prostředí nemůže dojít k vystihnutí interakcí a složitostí, které se vyskytují v situaci *in vivo*. Proto je nezbytné studium invazivní struktur s použitím 3D matic. Ve 2D prostředí je buňka v kontaktu s ECM pouze na styku buňky s podkladem. 3D prostředí umožňuje buňkám interagovat celým svým povrchem s okolním prostředím prostřednictvím adhezních struktur. Migrace buněk ve 2D prostředí podmiňuje tvorbu vějířkovitých struktur nazývaných lamellipodia a prostupujících tenkých výběžků, tzv. filopodia. 3D matrice indukuje změnu tvaru buňky a snížení počtu a velikosti těchto protruzí (Geraldo et al. 2012).

Pro vytvoření 3D prostředí se využívá krysí, myší nebo hovězí kolagen, případně denaturovaný kolagen neboli želatina. *Ex vivo* se využívá tkáň bohatá na přítomnost kolagenu, např. kožní dermis a tkáňové substituenty. Pro *in vivo* studium je vhodná tkáň prsní žlázy nebo chorioalantoidní membrány ptáků. Invaze nádorových buněk přes bazální laminu je studována s využitím Matrigelu, který se svým složením blíží situaci *in vivo*. Jedná se o směs proteinů, převážně laminin, kolagen typu IV a nidogen, sekretovaných buňkami myšího sarkomu (Kalluri 2003). Pro studium invaze je dále využívána Boydenova komůrka, kdy buňky migrují za chemoatraktanty přes póry membrány pokryté proteiny ECM, případně vrstvou jiných buněk (Chen 2005).

V této diplomové práci je využíván fibrilární kolagen o vysoké hustotě (High-density fibrillar collagen, HDfC), připravený podle protokolu Artym et al., 2015. Jedná se o vrstvu polymerizovaného kolagenu, u které je s použitím centrifugace dosaženo

komprese a dochází k získání kolagenové matrice o několikanásobně vyšší hustotě. Takto připravená matrix funguje jako induktor tvorby invadopodií u široké škály buněčných linií (obr. 1 A.) (Artym et al. 2015). Dále je využíván 3D rekonstituovaný kolagenový gel.

### 2.2.3 Struktura invadopodií nádorových buněk

Invadopodia jsou tvořena jádrem bohatým na přítomnost fibrilárního aktinu a prstencem adhezních molekul (Branch et al. 2012). Adhezní prstenec je klíčový pro následnou proteolytickou aktivitu. Jeho struktura je tvořena převážně integriny, které zastávají roli buněčných receptorů a zprostředkovávají interakci mezi aktinovým cytoskeletem a komponenty ECM. Kromě integrinů se adhezní prstenec skládá z adhezních molekul, např. paxillin, vinculin, talin atd. (Branch et al. 2012). Proteolytickou aktivitu zajišťují především MMP (Nakahara et al. 1997; Monsky et al. 1993; Clark & Weaver 2008).

Růstové faktory (EGF, PDGF, TGF- $\beta$ ) aktivují PI3K, což vede k aktivaci kinázy Src. Tyrosin kináza Src fosforyluje celou řadu substrátů včetně Tks4 a Tks5. Tyto proteiny se váží svou doménou PX na plazmatickou membránu bohatou na přítomnost PI(3,4)P<sub>2</sub> a jsou nezbytné pro formování a maturaci invadopodií (Buschman et al. 2009; Seals et al. 2005; Blouw et al. 2008; Courtneidge et al. 2005). V invadopodiích je zvýšený výskyt lipidových raftů a narušení jejich struktury vede k inhibici formování a funkce invadopodií u buněk prsního adenokarcinomu a melanomu (Yamaguchi et al. 2009). Nezbytnou roli pro signalizaci má PI(4,5)P<sub>2</sub> a blokování jeho produkce má za následek narušení vzniku invadopodií a proteolytické aktivity (Yamaguchi et al. 2010).

Polymerizaci aktinu regulují N-WASP a komplex Arp2/3 (Yamaguchi et al. 2005), které interagují s Cdc42 (Linder et al. 1999), cortactinem (Oser et al. 2009; Artym et al. 2006) a cofilinem (Yamaguchi et al. 2005). Pro vytvoření invadopodií, degradaci ECM a protruzi do Matrigelu jsou nezbytné forminy, převážně DRF/mDia (Lizárraga et al. 2009). Následně je pro formování a stabilitu invadopodií důležitý fascin, který svazuje aktinové filamenta především při tvorbě filopodií (Li et al. 2010; Schoumacher et al. 2010).

Klíčovou roli při maturaci a dynamice invadopodií ve 3D prostoru sehrává cortactin. Tyrosinová fosforylace cortactinu zprostředkována kinázou Src reguluje směřování Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> pump NHE-1 do míst vznikajících výběžků. Aktivitou pumpy

dochází k lokálnímu zvýšení buněčného pH a uvolnění inhibiční vazby cortactinu na cofilin. Aktivace cofilinu umožní polymerizaci aktinu regulovanou Arp2/3, N-WASP a Cdc42. Opětovná inhibice cofilinu je zprostředkována jeho fosforylací, případně vazbou defosforylovaného cortactinu po snížení buněčného pH. Dynamika invadopodií je dána frekvencí cyklu prolongace a retrakce řízeného fosforylací cortactinu a je nezbytná pro invazi invadopodií ve 3D (Magalhaes et al. 2011). Kromě regulace aktinového cytoskeletu se cortactin uplatňuje při transportu MMP do invadopodií a při sekreci proteolytických enzymů do extracelulárního prostředí (Clark & Weaver 2008; Clark et al. 2007). Snížení extracelulárního pH v místě invadopodií vlivem transportéru NHE-1 stimuluje proteolýzu ECM (Busco et al. 2010).

Pro elongaci dlouhých protruzí jsou kromě aktinových mikrofilament nezbytné mikrotubuly (Kikuchi & Takahashi 2008). Maturovaná invadopodia se vyznačují přítomností mikrotubulů a vimentinových intermediálních filament (Schoumacher et al. 2010). Funkce mikrotubulů spočívá v transportu proteolytických enzymů, jejichž aktivita je nezbytná pro invazivní charakter invadopodií (Schnaeker et al. 2004; Schoumacher et al. 2010). Kooperace aktinového cytoskeletu a mikrotubulů je zprostředkována regulátorem polaritity buněk IQGAP1, který interaguje s podjednotkami komplexu exocyst a tato interakce je řízená GTPázami Cdc42 a RhoA (Sakurai-Yageta et al. 2008).

#### **2.2.4 Morfologie invadopodií ve 3D prostoru**

Invadopodia jsou ve 2D prostoru pozorována jako bodové struktury v místě kontaktu buňky s podkladem v blízkosti buněčného jádra a Golgiho aparátu (Gimona et al. 2008). Morfologie invadopodií ve 3D prostoru je stále předmětem studia a jednotlivé pozorování se liší v závislosti na použité matrici a buněčné linii. U buněk linie MDA-MB-231 rostoucích v Matrigelu jsou pozorovány filamentární výběžky v místě proteolytické degradace pozitivní na přítomnost cortactinu a fosfotyrosinu (Lizárraga et al. 2009). S použitím pórovitého filtru převrstveného Matrigelem pro mimikování bazální laminy byla invadopodia vizualizována jako prostupující výběžky cytoplazmatické membrány (Schoumacher et al. 2010). S použitím bezbuněčné dermis Xe-Derma bylo poukázáno u krysích buněk linie RsK4 transformovaných virem Rousova Sarcomu na menší filamentární struktury vycházející z invadopodií, které postrádají přítomnost cortactinu a paxillinu a jsou pozitivní na fosfotyrosin (Tolde et

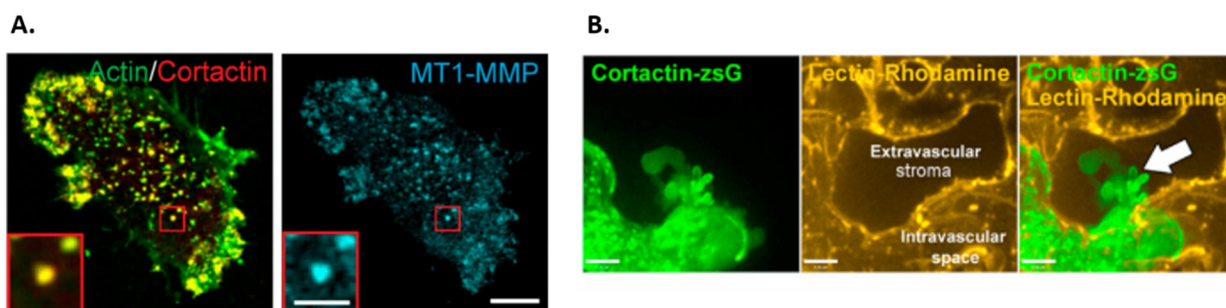
al. 2010). 3D kolagen typu I indukuje u buněk linie HT1080 vznik rozvětvených výběžků, které souvisí s rychlostí pohybu buňky (Giri et al. 2013).

### 2.2.5 Invazivní struktury *in vivo*

Použitím *ex ovo* modelu chorioalantoidní membrány kuřecího embrya bylo zobrazeno generování invadopodií u nádorové linie HEP3 při extravazaci buněk cévním endotelem. Důkazem je přítomnost markerů invadopodií, např. Tks4, Tks5, cortactinu a MMP-14 (obr. 1 B.) (Leong et al. 2014).

Homology invadosomů se vyskytují při ontogenetickém vývoji *Caenorhabditis elegans* u tzv. anchor cell. Vývoj háďátka obecného lze považovat za model pro studium interakce invadopodií s bazální laminou (Hagedorn et al. 2013). Homology invadopodií můžeme pozorovat také u buněk neurální lišty v ontogenetickém vývoji *Danio rerio* (Murphy et al. 2011), případně při vývoji nervové soustavy *Xenopus laevis* u tzv. růstového kužele (Santiago-Medina et al. 2015).

Murphy a kolektiv vizualizovali struktury ve tvaru rozet u myších buněk vaskulární hladké svaloviny. Důkazem, že se jedná o podosomy, je přítomnost Tks5 a cortactinu (Murphy & Courtneidge 2011).



**Obr. 1:** **A.** Indukce tvorby invadopodií pomocí fibrilárního kolagenu o vysoké hustotě (HDFC) u buněk linie MDA-MB-231. Invadopodia se jeví jako žlutě zbarvené tečky poukazující na kolokalizaci aktinu (zeleně) a cortactinu (červeně). Endogenní MT1-MMP (MMP-14) je nahromaděná v invadopodiích. Zvětšený detail invadopodií je v červeném rámečku. Měřítka = 10  $\mu$ m, 3  $\mu$ m. Převzato a upraveno z (Artym et al. 2015). **B.** Intravitální zobrazení invadopodií při extravazaci buňky lidského epidermoidního karcinomu (HEP3) s využitím *ex ovo* modelu kuřecího embrya. Buňka exprimuje zeleně značený cortactin, který je přítomný v protruzích procházejících do extravaskulárního stroma. Povrch lumen značen žlutě. Měřítka = 5  $\mu$ m. Převzato a upraveno z (Leong et al. 2014).

## **2.3 Extracelulární matrix (ECM)**

ECM funguje jako lešení pro buněčnou adhezi a migraci, ovlivňuje tenzi dané tkáně a zprostředkovává signalizaci. Odlišné tkáně se vyznačují specializovanými komponenty ECM a jejím uspořádáním, což zajišťuje specifičnost dané ECM. ECM můžeme rozdělit na základě organizace na vmezeřenou pojivovou tkáň a bazální lamínu (Mouw et al. 2014).

### **2.3.1 Vmezeřená pojivová tkáň**

Vmezeřenou pojivovou tkáň nalzáme např. u vazů, šlach nebo chrupavek. Hlavní proteinovou složkou je kolagen, zajišťující mechanickou pevnost a odolnost. Nejrozšířenější je fibrilární kolagen typu I, II a III. Vedle kolagenu je nezbytnou složkou glykoprotein fibronectin, zprostředkovávající vazbu komponentů ECM s buněčnými receptory, např. integriny. Dále se zde nachází elastin, proteoglykany a kyselina hyaluronová (Mouw et al. 2014).

Kolagenové vlákno je tvořeno třemi polypeptidovými řetězci uspořádanými do  $\alpha$  helixu, které jsou v endoplazmatickém retikulu sbaleny do helikální struktury a vytváří kolagenovou doménu. Těsné sbalení homo- nebo hetero-trimerů je umožněno opakováním motivu Gly-X-Y (X je nejčastěji prolin, Y je nejčastěji 4-hydroxyprolin) (Egeblad et al. 2010). Maturace kolagenu zahrnuje proteolytické štěpení N- a C-konce polypeptidových řetězců, hydroxylaci lysinu a prolinu, glykosylaci hydroxylysínu a crosslinkování zprostředkované lysyl oxidázou (LOX) (Egeblad et al. 2010), případně glukózou a ribózou (Furber 2006; Egeblad et al. 2010).

### **2.3.2 Bazální lamina**

Bazální lamina je tenká vrstva ECM, obklopující epiteliální, endotelové, svalové, tukové a nervové buňky. Zajišťuje adhezi a polarizaci buněk, stejně tak strukturu a kompartmentalizaci tkání. Mimo to se v prostředí laminy vyskytuje vyšší koncentrace růstových faktorů, zprostředkovávajících přežívání, migraci a proliferaci buněk (Glentis et al. 2014).

Bazální lamina má síťovitou strukturu tvořenou převážně lamininem a kolagenem typu IV (Glentis et al. 2014). Nefibrilární kolagen typu IV se od ostatních fibrilárních typů odlišuje v samo uspořádávání do prostorové sítě zprostředkovaným integriny na povrchu buněk, případně nepřímo interakcí s lamininem (Khoshnoodi et

al. 2008; Yurchenco et al. 2004). Stabilizaci kolagenu typu IV zajišťují kovalentní vazby (Khoshnoodi et al. 2008) a nekovalentní interakce s glykoproteinem nidogen (entactin) a proteoglykanem perlecan (Kalluri 2003; Yurchenco et al. 2004). Laminin zprostředkovává interakce mezi buněčnými receptory a ostatními komponenty bazální laminy (Mouw et al. 2014).

Bazální lamina představuje fyzickou bariéru ohraničující danou tkáň, přesto jsou některé buněčné typy schopné bariérou procházet v mnoha fyziologických i patologických procesech, např. během embryonálního vývoje, imunitní odpovědi nebo nádorové invaze (Glentis et al. 2014; Kalluri 2003). Při lokální degradaci komponent bazální laminy se uplatňují invadopodia nádorových buněk schopná proteolytické degradace zprostředkované především MMP a serinovou proteázou FAP (Mueller et al. 1999; Schoumacher et al. 2010). Invaze buněk přes bazální laminu může být zprostředkována i améboidním způsobem migrace nezávisle na proteolytické aktivitě. Prostup přes bazální laminu je dále usnadněn sníženou syntézou komponent bazální laminy v okolí invazivního tumoru (Glentis et al. 2014).

## **2.4 Vliv nádorové tkáně na migraci buněk**

Nádorové buňky jsou schopny adaptovat se na odlišné vlastnosti prostředí změnou morfologie nebo způsobem migrace za účelem zachování pohyblivosti (Friedl & Alexander 2011). Mikroprostředí je tak významným faktorem ovlivňujícím migraci buněk a jejich morfologii a dramatické změny v uspořádání vedou k pozdějším metastázám (Egeblad et al. 2010; Conklin et al. 2011). Architektura nádorové tkáně je výrazně odlišná od zdravé tkáně, a kromě vlastních nádorových buněk je tvořena nádorovým stromatem (Joyce & Pollard 2009).

Klíčovým buněčným typem nádorového stromatu jsou fibroblasty. V souvislosti s nádorovým prostředím hovoříme o tzv. Cancer-associated fibroblasts (CAFs), případně o tzv. myofibroblastech z důvodu přítomnosti  $\alpha$ -aktinu. CAFs uvolňují enzymy zprostředkovávající změny ECM, komponenty ECM, růstové faktory a modulátory imunitní odpovědi. Fibroblasty sehrávají roli v angiogenezi, progresi tumoru a pravděpodobně v metastazování primárních nádorů (Kalluri & Zeisberg 2006; Orimo et al. 2005).

Migraci nádorových buněk pozitivně ovlivňuje přítomnost makrofágů, které se nacházejí v blízkosti krevních cév a pomáhají nádorovým buňkám v intravazaci do

krevního řečiště (Wyckoff et al. 2007). Makrofágy produkují EGF, a tím stimulují migraci nádorových buněk podél kolagenových vláken do krevního řečiště. Naopak nádorové buňky produkují CSF-1, které indukují expresi EGF u makrofágů, a tím dochází ke vzniku parakrinní smyčky (Wyckoff et al. 2004). Signalizace mezi makrofágy a nádorovými buňkami také ovlivňuje aktinový cytoskelet a indukuje formování podosomů u makrofágů a invadopodií u nádorových buněk (Yamaguchi et al. 2006). Kromě toho makrofágy mají vliv na angiogenezi, remodelaci ECM a vzniku zánětlivého mikroprostředí, které přispívá ke vzniku nádoru (Condeelis & Pollard 2006).

Nádorové buňky dokáží pozměnit svůj metabolismus a k získávání energie využívají preferenčně aerobní glykolýzu než oxidativní fosforylaci (Warburgův efekt). Závislost na glykolýze je nezbytná v hypoxických podmínkách, které se vyskytují v pokročilých stádiích nádoru (Hanahan & Weinberg 2011). Hypoxie, růstové faktory a onkogeny zprostředkovávají aktivaci transkripčního faktoru HIF-1, který indukuje expresi genů důležitých pro glykolytickou dráhu, angiogenezi nebo invazivitu (Kitajima & Miyazaki 2013). Metabolické změny vedou ke snížení intracelulárního pH a následně k expresi transportních proteinů, které exportují protony a dochází k okyselení vnějšího nádorového mikroprostředí. Nižší extracelulární pH zásadně ovlivňuje buněčné adheze a migraci nádorových buněk (Hofschröer et al. 2017; Busco et al. 2010).

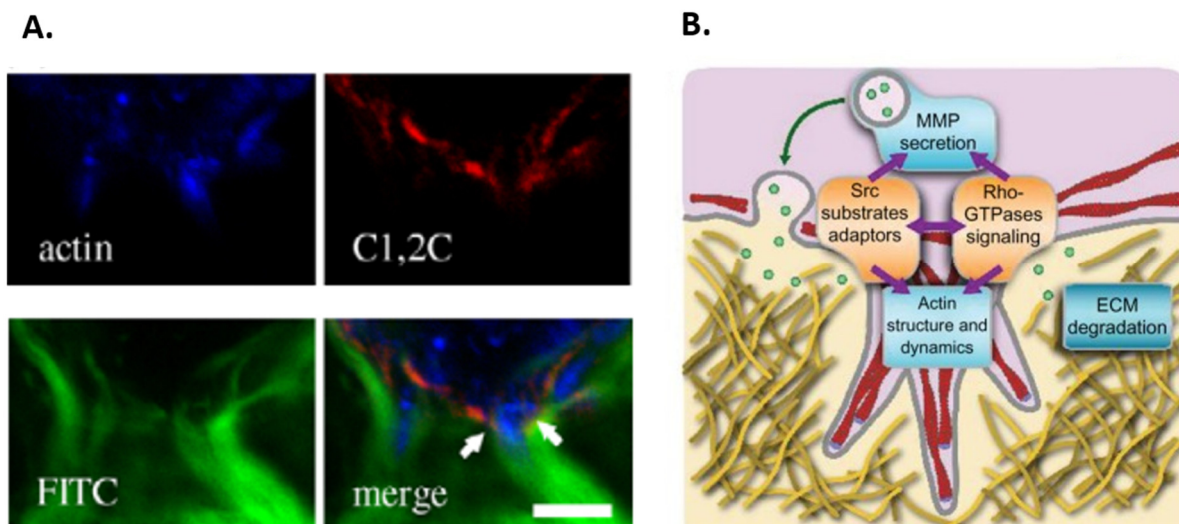
Během počátečních fází u většiny typů tumorů dochází k nadprodukcí fibrilárního kolagenu typu I a III a zvýšené degradaci kolagenu typu IV (Kauppila et al. 1998). Tento jev, nazývaný desmoplázie, je pozorován také u míst, kde dochází k usídlení sekundárního nádoru a pravděpodobně zvyšuje úspěšnost vzniku metastáze (Erler & Weaver 2009). Modifikace vláken kolagenu a zvýšení tuhosti nádorového stroma je regulováno intracelulárními lysyl hydroxylázami, jejichž exprese je regulována HIF-1 a katalyzují hydroxylaci lysinů v prokolagenové struktuře (Gilkes et al. 2013). Po sekreci kolagenu do ECM dochází vlivem růstových faktorů a HIF-1 k zvýšené expresi LOX. LOX je extracelulární enzym produkovaný nádorovými buňkami a buňkami stromatu, který katalyzuje oxidativní deaminaci na lysinu a hydroxylysínu a tím dochází k modifikaci kolagenových a elastinových vláken a jejich kovalentnímu crosslinkování. LOX mimo jiné reguluje aktivaci FAK a tím podporuje vznik buněčných adhezí (Erler et al. 2006).

Vznik nádoru indukuje zahuštění a linearizaci kolagenových vláken především v oblastech cévního zásobení tumoru a zvýšené migrace nádorových buněk (Provenzano et al. 2006; Levental et al. 2009). Nadprodukce a zesílení kolagenových vláken vede ke zvýšené schopnosti buněk vycestovávat z primárního tumoru. Nádorové buňky orientují své protruze na vedoucím konci paralelně s kolagenovými vlákny a migrují podél těchto svazků (Conklin et al. 2011; Egeblad et al. 2010; Geraldo et al. 2012). Modifikace kolagenu ovlivňuje tuhost ECM, amplifikuje integrinovou signalizaci a signalizaci fokálních adhezí a zvyšuje aktivitu PI3K (Levental et al. 2009). Následkem je zvýšená proliferace, migrace a viabilita buněk, změny v genové expresi, diferenciaci buněk a podpora kolonizace sekundárních tkání (Cox et al. 2013; Egeblad et al. 2010; Ertler & Weaver 2009; Conklin et al. 2011).

## **2.5 Proteolytická degradace ECM**

Invaze buněk přes bazální laminu, nádorové stroma nebo cévní endotel je umožněná proteolytickou degradací ECM. Enzymy schopné štěpit komponenty ECM mohou být uvolňovány do prostředí, lokalizovány v buněčné membráně, případně dochází k nitrobuněčné degradaci v lysozomech (Wolf & Friedl 2011). Nádorové buňky produkují MMP, serinové proteázy (např. plasmin, uPA), cysteinové a aspartátové proteázy (např. kathepsiny) k degradaci kolagenu, vitronektinu, lamininu nebo fibronektinu. Rodina metaloproteáz zahrnuje mimo jiné tzv. ADAMs (A disintegrin and metalloproteinase), které zprostředkovávají štěpení růstových faktorů, cytokinů, receptorů, adhezních molekul a jsou nezbytné pro vývoj a udržení homeostáze organismu (Edwards et al. 2009).

Proteolytická aktivita migrujících buněk je umožněná interakcí buňky s okolním prostředím prostřednictvím invazivních struktur. Transport váčků s proteolytickými enzymy do invadopodií a jejich sekrece je nezbytností pro formování a stabilizaci invadopodií (Hoshino et al. 2013). Degradáční aktivita je soustředěná nikoliv na koncích výběžků prostupujících do ECM, ale na bázi těchto struktur, což zajišťuje zvýšenou efektivitu degradace (obr. 2 A., B.) (Wolf et al. 2007; Tolde et al. 2010). Mimo to nekontrolovaná degradace v místě adheze buňky k ECM by narušila generaci trakční síly z důvodu předčasné ztráty kontaktu s ECM (Friedl & Wolf 2009).



**Obr. 2:** **A.** Detailní zobrazení výběžků buňky linie Rsk4 bohatých na přítomnost aktinu (modře), procházejících do bezbuněčné dermis (zeleně). Degradovaný kolagen, značen protilátkou C1,2C (červeně), je lokalizován na bázi invadopodií (bílé šipky). Měřítka = 5  $\mu\text{m}$ . Převzato a upraveno z (Tolde et al. 2010). **B.** Schématické znázornění klíčových signálních komponent nezbytných pro formování a funkci invadopodií. Převzato a upraveno z (Brabek et al. 2013).

Inhibicí proteolytické aktivity u mezenchymálních buněk linie HT1080 a MDA-MB-231 dochází k indukci améboidního fenotypu, tzv. mezenchymálně-améboidní tranzice (MAT). Buňky jsou schopné protáhnout se mezerami mezi kolagenovými vlákny bez degradační aktivity. Dochází k narušení komplexu  $\beta 1$  integrinu a MMP-14. MMP-14 je akumulována v intracelulárním prostoru, zatímco hladina  $\beta 1$  integrinu je u améboidních buněk snižena a  $\beta 1$  integrin se nachází difúzně na povrchu buňky (Wolf et al. 2003).

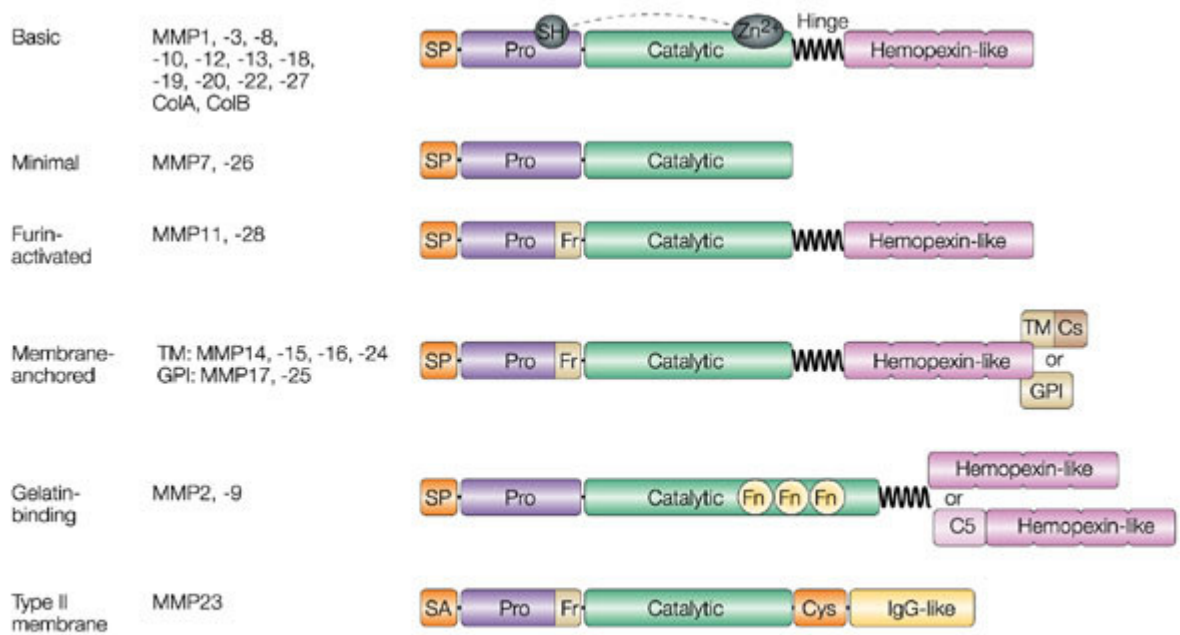
Proteolýza ECM umožňuje migraci buněk díky přestavbám struktury mezibuněčné hmoty, ale také uvolňováním fragmentů komponent ECM, které vykazují určitou biologickou funkci (Egeblad et al. 2010). Například štěpením kolagenu typu I zprostředkovaným MMP dochází ke vzniku fragmentů, které fungují jako antagonisté neštěpeného kolagenu a mohou vázat, ale nikoliv aktivovat primární receptor kolagenu typu I integrin  $\alpha 2\beta 1$  (Messent et al. 1998).

## 2.6 Matrixové metaloproteázy (MMP)

MMP jsou endopeptidázy schopné štěpit komponenty ECM a hrají významnou roli při ontogenetickém a postnatálním vývoji, ale také při autoimunitních

onemocněních, osteoartritidě a při vývoji nádoru. MMP regulují nádorové mikroprostředí a jejich produkce a aktivace u nádorové tkáně je zvýšená v porovnání se zdravou tkání (Egeblad & Werb 2002). Doposud je známo 28 MMP, z nichž 14 je spojováno s vývojem a invazivitou nádoru (Köhrmann et al. 2009). MMP jsou rozdělovány do skupin podle substrátové specifity a proteinové struktury. Mezi tyto skupiny patří kolagenázy, želatinázy, stromelysinové MMP, matrilysinové MMP, membránově vázané MMP a ostatní MMP (Yadav et al. 2014).

Struktura MMP je tvořena několika doménami. Signální peptid reguluje transport MMP a propeptid je nezbytný pro udržení proMMP v latentní formě. Dále následuje katalytická doména, bohatá na přítomnost histidinu, s vazebným místem pro zinečnatý kationt. Oblast se zvýšeným výskytem prolinových motivů je označována jako tzv. hinge region a funguje jako spojovací smyčka mezi katalytickou doménou a doménou hemopexinového typu, která určuje substrátovou specifitu dané MMP. Želatinázy navíc obsahují v katalytické doméně repetici domény fibronektinového typu II. U membránově vázaných MMP se vyskytuje transmembránová doména tvořená 20 hydrofobními aminokyselinami na C-konci domény hemopexinového typu, které jsou následovány krátkou intracelulární doménou, případně je vazba na membránu zajištěná přes GPI kotvu (obr. 3) (Johansson et al. 2000; Itoh et al. 1999; Kojima et al. 2000).



Nature Reviews | Immunology

**Obr. 3:** Schématické znázornění domén MMP rozdělených do skupin na základě strukturní podobnosti. Interakce zinečnatého kationtu v katalytické doméně s cysteinovou smyčkou v propeptidu zajišťuje latentní formu všech MMP. SP = signální peptid, Pro = propeptid, SA = N-koncová signální kotva, Fr = štěpící místo rozeznávané furinem, Fn = fibronektinová repetice, SH = thiolová skupina cysteinové smyčky, Cys = cysteinová doména, C5 = doména kolagenového typu V, TM = transmembránová doména, Cs = cytosolická doména, GPI = glykosylfosfatidylinositol. Převzato z (Parks et al. 2004).

Nativní fibrilární kolagen I, II, III, V, VII, VIII, IX, X a XI je štěpen převážně kolagenázami, mezi které řadíme MMP-1, MMP-8 a MMP-13. Štěpení vede ke vzniku fragmentů, u kterých dochází k denaturaci vlivem tělesné teploty a vytvoření želatiny, která je substrátem želatináz (Johansson et al. 2000). MMP-13 aktivuje latentní formu MMP-9 a je aktivována MMP-2 a MMP-14 (Knäuper et al. 1996).

Mezi stromelysinové MMP a MMP stromelysinového typu patří MMP-3, MMP-10, MMP-11 a MMP-12, které degradují širokou škálu ECM jako je kolagen typu IV, V, IX a X, proteoglykany, želatina, fibronektin a laminin (Johansson et al. 2000). Nadměrná exprese MMP-3 v epitelálních buňkách vede ke štěpení E-kadherinu a k indukci EMT (Lochter et al. 1997).

Skupina želatináz zahrnuje MMP-2 a MMP-9. MMP-2 (často značená jako želatináza A, 72-kDa želatináza) je exprimována nejen nádorovými buňkami, ale také fibroblasty, endoteliálními buňkami, osteoblasty nebo monocyty. MMP-9 (želatináza B,

92-kDa želatináza) je exprimována kromě transformovaných buněk také makrofágy, leukocyty, osteoklasty a keratinocyty (Waheed Roomi et al. 2015). Mezi substráty želatináz patří kolagen typu IV, V, VII, X, XI a XIV, želatina, elastin, proteoglykany, fibronektin a prekurzory TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$  (Johansson et al. 2000).

Doposud je známo 6 MMP zakotvených v plazmatické membráně. Jsou to MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 a MMP-25. Čtyři z nich (MMP-14, MMP-15, MMP-16 a MMP-24) obsahují transmembránovou doménu a krátkou cytoplazmatickou doménu, oproti tomu MMP-17 a MMP-25 jsou zakotveny v plazmatické membráně pomocí GPI kotvy (Parks et al. 2004). Membránově vázané MMP jsou aktivovány odštěpením signálního peptidu a propeptidu od katalytické domény zprostředkovaným furinovou proteázou, která rozeznává konzervovanou sekvenci aminokyselin Arg-Arg-Lys/Arg-Arg (Sato et al. 1996; Sato et al. 1994). V migraci nádorových buněk sehrává nejdůležitější roli MMP-14 a je exprimována také fibroblasty, epiteliálními buňkami a osteoklasty (Sato et al. 1997).

### 2.6.1 Regulace aktivity MMP

Exprese MMP může být regulována exogenními signály, např. cytokiny (TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ ), růstovými faktory a ECM nebo na transkripční úrovni. Proteolytická aktivita je řízená aktivací latentní formy (zymogenu) a inhibicí specifickými inhibitory, tzv. TIMPs (Tissue inhibitor of metalloproteinases). Nеспецифicky jsou inhibovány  $\alpha$ 1-proteázovým inhibítozem a plazmatickým proteinem  $\alpha$ 2-makroglobulinem (Johansson et al. 2000).

Latentní proforma MMP se vyznačuje kovalentní interakcí konzervovaného cysteinu v propeptidové sekvenci se zinečnatým kationtem v katalytické oblasti, označovanou jako cysteinová smyčka (Van Wart & Birkedal-Hansen 1990). Ve štěpení propeptidu se uplatňuje široká škála proteáz, např. plazmin nebo jiné MMP. Aktivace transmembránových MMP probíhá vlivem furinu v Golgiho aparátu a pericelulárním prostoru před transportem na plazmatickou membránu (Mazzone et al. 2004).

Dodnes jsou známy 4 typy specifických inhibitorů TIMPs. Jejich funkce spočívá v interakci s katalytickým místem. TIMP-2 a TIMP-1 se také mohou vázat na hemopexinovou doménu latentních MMP-2, respektive MMP-9. TIMP-1, TIMP-2 a TIMP-4 jsou sekretovány v solubilní formě, zatímco TIMP-3 je asociován s ECM (Leco et al. 1994). TIMP-1 inhibuje aktivitu většiny MMP s výjimkou MMP-14 a MMP-2. TIMP-

2 neinhibuje aktivitu MMP-9. TIMP-3 inhibuje MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 a MMP-13 a TIMP-4 MMP-2, MMP-9 a MMP-7 (Johansson et al. 2000).

### **2.6.2 MMP-2 (želatináza A, 72-kDa želatináza)**

MMP-14 aktivuje latentní formu MMP-2 vytvořením membránového komplexu MMP-14/TIMP-2 a interakcí s C-terminální části proMMP-2 (Butler et al. 1998; Ohuchi et al. 1997; Sato et al. 1994). Aktivaci MMP-2 zprostředkovává také MMP-15, MMP-16, MMP-24 a MMP-25, ale pouze MMP-14 tvoří navíc komplex s TIMP-2 (Takino et al. 1995; Shofuda et al. 1997; Llano et al. 1999; Velasco et al. 2000). V případě štěpení latentní formy MMP-2 nezávisle na TIMP-2 je aktivace umožněna claudiny, které zprostředkovávají těsný spoj mezi proMMP-2 a membránově vázanými MMP (Miyamori et al. 2001). MMP-2 je štěpená MMP-14 v intermediát o velikosti 64 kDa a k plné aktivaci je potřeba již aktivní forma MMP-2, která odstraní sekvenci propeptidu a dojde ke vzniku proteinu o velikosti 62 kDa (Atkinson et al. 1995).

C-konec MMP-2 zprostředkovává interakci s  $\alpha v \beta 3$  integriny (receptor pro vitronektin), což umožňuje lokalizaci aktivní formy MMP-2 na povrchu buňky, degradaci ECM a řízenou buněčnou invazi (Brooks et al. 1996). Narušení interakce MMP-2 s  $\alpha v \beta 3$  integriny vede k inhibici angiogeneze a ke zpomalení růstu nádoru s použitím *in vivo* modelu (Silletti et al. 2001). Kromě toho vazba MMP-2 s  $\alpha v \beta 3$  integriny napomáhá maturaci intermediátu MMP-2 v plně aktivní formu (Deryugina et al. 2001).

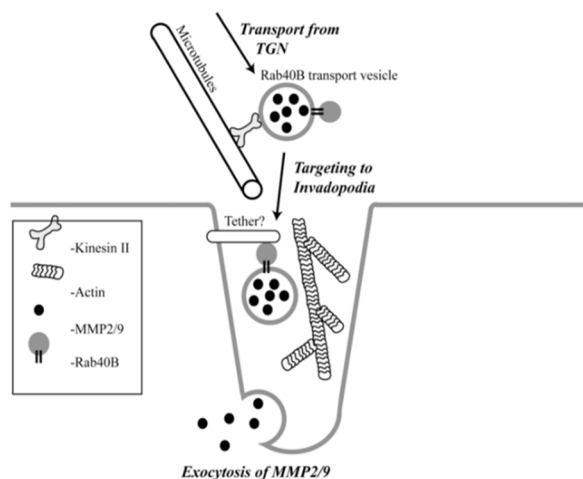
### **2.6.3 MMP-9 (želatináza B, 92-kDa želatináza)**

Proteáza je produkována eozinofily a uchována v sekrečních granulích neutrofilů, odkud je uvolňována (Stähle-Bäckdahl & Parks 1993). Sekretovaná MMP-9 může lokalizovat na membránu pomocí interakce s receptorem CD44. Membránová lokalizace MMP-9 umožní aktivaci latentní formy TGF- $\beta$ , buněčnou invazi a angiogenezi (Yu & Stamenkovic 1999; Yu & Stamenkovic 2000). Latentní forma MMP-9 je štěpená MMP-2, MMP-3, MMP-13, plazminem, trypsinem a kathepsinem G v aktivní formu o velikosti 83 kDa. V případě nádorových buněk může docházet k sekreci dimeru MMP-9, vytvořeného pomocí disulfidických můstků v hemopexinové doméně, a tvorba tohoto diméru je spjata s vyšší agresivitou nádoru (Waheed Roomi et al. 2015; Niedzwiecki et al. 2013). Vazba TIMP-1 k MMP-9 kompetitivně inhibuje

homodimerizaci MMP-9, zatímco interakce monomeru MMP-9 s CD44 vede k dimerizaci (Dufour et al. 2010).

Sekretována MMP-9 buňkami stromatu ovlivňuje angiogenezi tumoru zvyšováním hladiny dostupného VEGF (Bergers et al. 2000). Studia pojednávají také o indukcii exprese MMP-9 v buňkách plicního endotelu a makrofázích, zprostředkovanou vzdáleným primárním tumorem přes receptorovou tyrosin kinázu VEGF, a pozdějších preferenčních metastázích do plic (Hiratsuka et al. 2002).

V buňkách lidského melanomu jsou váčky s MMP-2 a MMP-9 transportovány do invadopodií pomocí mikrotubulů a kinesinu. Želatinázy se nenacházejí ve stejných váčcích, ale jednotlivé transportní váčky s MMP-2 a MMP-9 jsou v těsné blízkosti (Schnaeker et al. 2004). Stejně jako v případě MMP-14, sekrece je závislá na cortactinu (Clark & Weaver 2008; Clark et al. 2007), ale nezávislá na endocytóze a komplexu Exocyst a transport do invadopodií probíhá přímo z trans-Golgi za účasti VAMP4 a GTPázy Rab40b (obr. 4) (Jacob et al. 2013). GTPáza Rab40b vytváří komplex s Tks5, který interaguje svou doménou PX s plazmatickou membránou invadopodií, a tím je zajištěn směrovaný transport (Jacob et al. 2016). Snížení exprese GTPázy Rab40b vede k transportu váčků s MMP-2 a MMP-9 do lysozomů a následné degradaci (Jacob et al. 2013).



**Obr. 4:** Schématické znázornění transportu sekretovaných MMP-2 a MMP-9 do invadopodií. MMP-2 a MMP-9 jsou transportovány ve váčcích podél mikrotubulů přímo z trans-Golgi komplexu (TGN) za účasti kinesinu a GTPázy Rab40b. Následně jsou sekretovány do ECM. Převzato a upraveno z (Jacob & Prekeris 2015).

#### 2.6.4 MMP-14 (MT1-MMP)

MMP-14 je klíčový regulátor hustoty ECM a vytváří prostor pro následnou migraci jak jednotlivých buněk, tak buněčné masy (Wolf et al. 2007). Substrátem MMP-14 je kolagen typu I, II a III, želatina, fibronectin, laminin, vitronektin, proteoglykany

(Johansson et al. 2000) a povrchové proteiny jako je CD44 (Kajita et al. 2001),  $\alpha$ 5 integriny (Deryugina et al. 2002) nebo syndecan 1 (Endo et al. 2003). Kromě toho vykazuje neproteolytickou funkci, např. stimulace produkce ATP aktivací HIF-1 u makrofágů (Sakamoto & Seiki 2010) nebo aktivace MAPK dráhy interakcí s  $\beta$ 1 integriny (Mori et al. 2013).

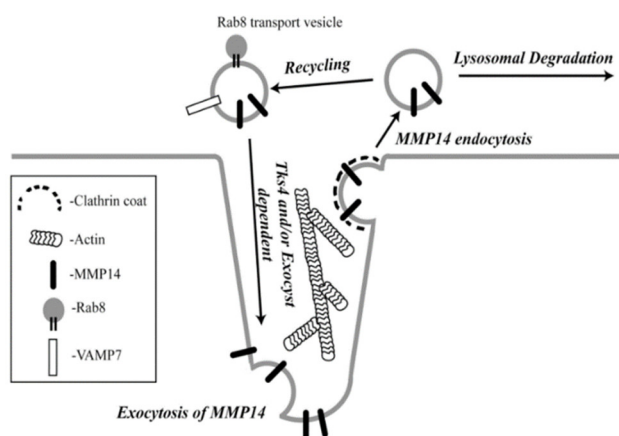
MMP-14 je transmembránová MMP o velikosti 63 kDa, štěpená v aktivní formu o velikosti 57 kDa. Endogenně je hladina membránové MMP-14 regulována TIMP-2. V nepřítomnosti tohoto inhibitoru je MMP-14 autokatalyticky štěpená a dojde ke vzniku membránově vázaného degradačního produktu o velikosti 44 kDa a uvolnění inaktivní katalytické domény o velikosti 18 kDa (Hernandez-Barrantes et al. 2000).

Komplex MMP-14/TIMP-2 funguje jako receptor pro latentní formu MMP-2, která je štěpená MMP-14 nevázanou na TIMP-2. Aktivace latentní formy MMP-2 probíhá pouze za takové koncentrace TIMP-2, která umožní vznik komplexu s MMP-14 fungující jako receptor pro latentní formu MMP-2, a zároveň aktivaci MMP-2 neinhibovanou MMP-14. Jinak řečeno, MMP-14 není schopná štěpit jiné substráty v takové koncentraci inhibitoru TIMP-2, která vede k aktivaci latentní formy MMP-2 (Kudo et al. 2007).

Aktivita stabilizované MMP-14 v komplexu s TIMP-2 na buněčné membráně je regulována rovnováhou mezi exocytózou a internalizací za účasti klathrinu a caveolinu (Remacle et al. 2003). Internalizovaná forma MMP-14 může být směřována na plazmatickou membránu z endocytických kompartmentů, případně jsou váčky směřovány do lysozomů a degradovány (Remacle et al. 2003; Jiang et al. 2001). Směrování MMP-14 do lysozomů a proteolytická degradace je zprostředkována CD63 z rodiny tetraspaninů (Takino et al. 2003). Pro internalizaci je nezbytná cytoplazmatická doména MMP-14, která interaguje s klathrinem (Uekita et al. 2001). V regulaci endocytózy aktivní formy MMP-14 sehrává roli také inaktivní degradační produkt o velikosti 44 kDa, vzniklý autokatalytickým štěpením v nepřítomnosti TIMP-2, čímž je zajištěno zachování aktivity MMP-14 na plazmatické membráně (Cho et al. 2008).

Pro směrování MMP-14 do invadopodií je nezbytná transmembránová a cytoplazmatická doména (Nakahara et al. 1997). Transport a akumulace MMP-14 v invadopodiích je řízená cortactinem (Clark et al. 2007; Clark & Weaver 2008),

komplexem Exocyst společně s IQGAP1 (Sakurai-Yageta et al. 2008; Monteiro et al. 2013), VAMP7 (Steffen et al. 2008) a GTPázou Rab8 (Bravo-Cordero et al. 2007). IQGAP1 je přítomný v invadopodiích a jeho interakce s podjednotkami Sec3 a Sec8 komplexu Exocyst zapříčiní směrování komplexu Exocyst do invadopodií, kde zprostředkovává exocytózu transportních váčků (obr. 5) (Sakurai-Yageta et al. 2008). Komplex Exocyst také interaguje s WASH, aktivátorem Arp2/3, což zapříčiní tvorbu tubulárního spojení mezi pozdním endozomálním váčkem s MMP-14 a plazmatickou membránou a k řízené exocytóze MMP-14 na plazmatickou membránu invadopodií (Monteiro et al. 2013). Roli v transportu MMP-14 do invadopodií u buněk prsního adenokarcinomu sehrává caveolin-1 (Yamaguchi et al. 2009).



**Obr. 5:** Schématické znázornění transportu transmembránové MMP-14 do invadopodií. Internalizovaná forma MMP-14 je směřována do lysozomů a následně degradována, případně transportována do invadopodií za účasti endocytické dráhy, GTPázy Rab8, komplexu Exocyst, Tks4 a VAMP7. Převzato a upraveno z (Jacob & Prekeris 2015).

Aktivní MMP-14 je lokalizována v místě kontaktu buňky s kolagenovými vlákny. MMP-14 je převážně lokalizována v protruzích na vedoucím okraji buňky a podél buněčného těla. Nicméně kolagenová vlákna, která interagují s MMP-14 na vedoucích protruzích, postrádají degradované oblasti a výběžky zaujímají především adhezivní funkci. Přední část buňky vytvářející protruze bez degradační aktivity je následována proteolyticky aktivní oblastí buňky, kde se soustřeďuje lokalizace MMP-14 s degradovanými kolagenovými vlákny. Shlukování a lokalizace MMP-14 není zapříčiněná interakcí s  $\beta 1$  a  $\beta 3$  integriny, případně s cytoskeletálními proteiny. MMP-14 se váže svou C-koncovou hemopexinovou doménou na fibrilární kolagen a její lokalizace je regulována extracelulárně (Wolf et al. 2007).

Inhibicí funkce MMP-14 dochází k narušení proteolytické a invazivní aktivity (Sabeh et al. 2004; Wolf et al. 2007), případně k získání améboidního charakteru buňky

(Wolf et al. 2003). Nadměrná exprese MMP-14 v buňkách linie HT1080 vede ke zvýšené hladině membránově vázané MMP-14, objevení degradačního produktu o velikosti 44 kDa, zvýšené hladině aktivní MMP-2, zvýšené degradaci 3D fibrilárního kolagenu a následné buněčné migraci (Wolf et al. 2007).

## 2.7 Cíle diplomové práce

- Vytvoření konstruktů tří nejvýznamnějších matrixových metaloproteáz: membránově vázané MMP-14 a sekretovaných MMP-2 a MMP9. Uvedené proteázy budou exprimovány s fluorescenčním značením a značením SNAP, které bude aktivováno pomocí komerčně dostupných substrátů.
- Ověření funkčnosti připravených konstruktů a vlivu značení na správnou aktivitu a lokalizaci v nádorových buňkách.
- Příprava a optimalizace vlastností kolagenové matrice pro simulaci trojrozměrného prostředí. 3D matrice bude připravována s různou hustotou kolagenových vláken a s fluorescenčním značením pro vizualizaci degradace.
- Analýza souvislostí mezi invazivními strukturami interagujícími s ECM a místy, kde dochází k degradaci mezibuněčné hmoty v trojrozměrném prostředí.
- Vizualizace degradace ECM zprostředkované invazivními strukturami nádorových buněk ve 3D s použitím značených kolagenových vláken.
- Příprava konstruktů MMP-14 se značením SNAP na extracelulárním konci proteinu pro studium dynamiky a internalizace membránově vázané MMP-14.

### 3. Materiál

#### 3.1 Organismy

##### 3.1.1 Bakterie

***E. coli* DH5 $\alpha$**  *dlacZ* *Delta M15 Delta (lacZYA-argF)* *U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1*

##### 3.1.2 Savčí buněčné linie

**MDA-MB-231** lidské nádorové buňky prsního adenokarcinomu

**HT1080** lidské nádorové buňky fibroblastického sarkomu

**NIH/3T3** myší embryonální fibroblasty

#### 3.2 Kultivace organismů

##### 3.2.1 Kultivace bakterií

**LB médium** 10 g Universal pepton M66 (Merck, 1070431000)  
5 g Yeast extract (Amresco, J850)  
5 g NaCl (Sigma, S3014)  
doplnit do 1 l destilovanou vodou

**Plotny s živným agarem** LB médium  
20 g/l živný agar (Amresco, J637)  
selekční antibiotikum (přidáváme po zchlazení roztoku na méně než 60°C)

**SOC Outgrowth Medium (New England Biolabs, B9020S):** bohaté médium pro čerstvě transformované bakterie

**Zásobní roztoky antibiotik** Ampicilin (Biotika) 100 mg/ml  
Kanamycin (Thermo Scientific) 100 mg/ml

Antibiotika ředíme v médiu na konečnou koncentraci 100  $\mu$ g/ml.

**Glycerol (AppliChem, A2926):** pro přípravu bakteriálních konzerv a kompetentních bakterií

## **CaCl<sub>2</sub>: příprava kompetentních bakterií**

Všechny uvedené roztoky kromě antibiotik před použitím sterilizujeme klávováním 20 minut při 121 °C a skladujeme v 4 °C. Antibiotika jsou skladována v zásobních koncentracích v -20 °C.

### **3.2.2 Kultivace savčích buněčných linií**

<b>Kompletní médium</b>	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma, D6429)	
	10% FBS (fetální bovinní sérum, Sigma, F7524)	
	Gentamicin/Ciprofloxacin	
<b>Zásobní roztoky antibiotik</b>	Ciprofloxacin	10 mg/ml
	Gentamicin (Sigma, G1272)	10 mg/ml
	Geneticin 418 (Sigma, A1720)	100 mg/ml

Antibiotika ředíme v médiu na konečnou koncentraci 10 µg/ml.

#### **10x PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, D1408)**

#### **Trypsin-EDTA solution 0,25% (Sigma, T4049)**

<b>Zamrazovací médium</b>	90% FBS (Sigma, F7524)	
	10% DMSO (dimethyl sulfoxid, Sigma, D2650)	
<b>Transfekční reagens</b>	PEI (polyethylenimine, Polysciences, Inc., 23966)	

**GM6001 (Ilomastat):** inhibitor proteáz, konečná koncentrace 10 µM

## **3.3 Materiál použitý při práci s DNA**

### **3.3.1 Izolace a purifikace DNA**

<b>TEG pufr (pH 8,0)</b>	50mM glukóza	
	25mM Tris-HCl (Serva, 37190)	
	10mM EDTA (Sigma, EDS)	
<b>TE pufr (Tris-EDTA, Sigma, T9285)</b>		
<b>Lyzační roztok</b>	200 µl 10M NaOH (Penta, 011-002-00-6)	
	1 ml 10% SDS (dodecylsírán sodný, Sigma, L3771)	

8,8 ml H<sub>2</sub>O

**NH<sub>4</sub>Ac (ammonium acetate, P-lab, 01101)**

**LiCl (lithium chloride, Sigma, 203637)**

**Fenol (Sigma, P1037):** po nasycení vodou přidat 8-hydroxychinolin pro obarvení na žluto a 0,7 g Tris na 50 ml fenolu

**Fenol-chloroform:** fenol s chloroformem (Lach:ner, 20034-AT1) v poměru 1:1 v/v

**Glykogen (Thermo Scientific, R0561)**

**Isopropanol (Lach:ner, 20037-AT0)**

**Ethanol 96% (Penta, 70390-1100)**

**RNase roztok**

RNase A (Thermo Scientific, EN0531)

TE (Tris-EDTA, Sigma, T9285)

**Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, A63881):** magnetické kuličky pro purifikaci DNA

### 3.3.2 Agarózová elektroforéza

**20x SB pufr (pH 8,5)**

8 g NaOH (Penta, 011-002-00-6)

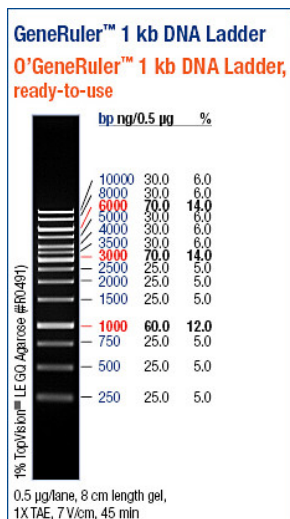
45 g kyseliny borité (Lachema, 30935-1199)

doplnit do 1 l destilovanou vodou

**Agaróza (Thermo Scientific, 16500500)**

**DNA Stain G (Serva, 3980301):** interkalační barvivo

**GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, SM0311):** marker molekulových hmotností DNA (obr. 6)



**Obr. 6:** GeneRuler 1 kb DNA Ladder ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

### 6x Loading dye

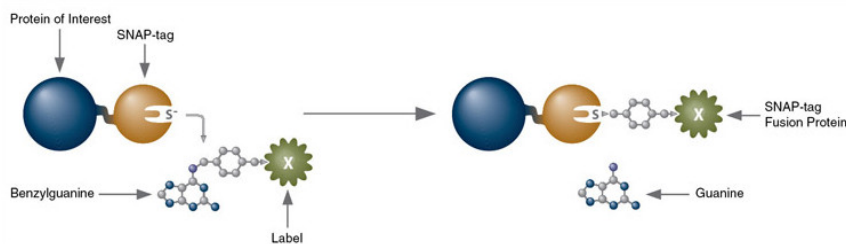
60% glycerol (AppliChem, A2926)

0,06% bromfenolová modř (P-lab, R15121)

60mM EDTA (Sigma, EDS)

### 3.3.3 Vektory

**pSNAPf (New England BioLabs, N9183S):** Vektor podmiňující expresi proteinů fúzovaných se značením SNAP v savčích buňkách. SNAP je mutantní forma DNA reparačního proteinu o velikosti 20 kDa. Při reakci fúzovaných proteinů s derivátů benzyguaninu dochází ke kovalentnímu navázání syntetické sondy (obr. 7). K této reakci dochází při použití celé řady substrátů, které podmiňují fluorescenční aktivitu, blokují signál nebo značí pouze proteiny lokalizované na membráně.



**Obr. 7:** Reakce proteinů značených SNAP se substrátem. Při reakci se substrátem dochází ke kovalentnímu navázání značení na protein fúzovaný se SNAP za uvolnění guaninu ([www.neb.com](http://www.neb.com)).

**pEGFP-N1:** Vektor pro expresi proteinů fúzovaných s GFP fluorescenčním proteinem na jejich C konci (excitace 488, emise 507).

**Clover2-N1:** Vektor podmiňující expresi proteinů fúzovaných s Clover2 fluorescenčním proteinem na jejich C konci. Jedná se o variantu GFP proteinu s posunem ve spektru (excitace 505, emise 515) a vyšší stabilitou fluorescence.

### 3.3.4 Inzerty

**MMP-2-mTurquoise2:** komerční syntéza string DNA, 2516 bp, 20 ng/μl (Invitrogen)

**MMP-9-mTurquoise2:** komerční syntéza string DNA, 2885 bp, 20 ng/μl (Invitrogen)

**MMP-14 (MT1-MMP):** získáno z konstruktu MMP-14-EGFP, který obdržela naše laboratoř darem

### 3.3.5 Primery

Všechny primery (tab. 1) byly obdrženy od Integrated DNA Technologies a byly ředěny na koncentraci 10 μM.

**Tabulka 1:** Seznam použitých primerů

<u>Primery pro amplifikaci</u>	<u>Sekvence (5'-3')</u>
<b>MMP-2</b>	F: TGGTAGCCATCTAGCTAGCATGCAG R: CTACGATAGCCTAGCTAGCTTATCC
<b>MMP-9</b>	F: TGGTAGCCATCTAGCTAGCATGAGC R: CTACGATAGCCTAGCTAGCTTATCC
<b>MMP-14 (signální peptid + propeptid)</b>	F: GCCTTAAGCTTGCCATGTCTCCC GCCCAAGA R: GTCGACCGGTACCCTGGATGGCGTAGCG
<b>MMP-14 (maturovaná forma)</b>	F: CCGGAGCTAGCGGTGGCTACGCCATCCAGGGTC R: TCTAGACGCGTCAGACCTTGTCCAGCAGGGAAC
<b>SNAP-tag</b>	F: CGGTACCGGTGGCATGGACAAAGACTGCGAAATGA R: AACCGCTAGCACCGGATCCGCCTGCAGGAC
<u>Ověřovací primery</u>	<u>Sekvence (5'-3')</u>
<b>MMP-2</b>	F: CTCGTGACCACACTGTCTTG R: TTCTGTCGTCGTCGTAGTTG
<b>MMP-9</b>	F: CCTAGCGAAAGACCTACAGC R: TATCGTCGGTGTTCGTAGTTG
<b>SNAP-tag</b>	F: GGATAGCGGTTTGACTCACG R: GAAAGTAGGCGTTGAGCCAG

*Pozn.: Tučným písmem jsou zvýrazněné nekomplementární sekvence pro zavedení restrikčních míst v amplifikovaných produktech.*

### **3.3.6 Enzymy a pufrы pro enzymatické reakce, deoxynukleotidy**

**Q5 DNA polymeráza (2 000 U/ml, New England BioLabs, M0491L)**

**Pufr pro Q5 DNA polymerázu (5x, New England BioLabs, B9027S)**

**Taq DNA polymeráza (5 000 U/ml, New England BioLabs, M0273L)**

**Pufr pro Taq DNA polymerázu (10x, New England BioLabs, M0273L)**

**Antarktická fosfatáza (5 000 U/ml, New England BioLabs, M0289L)**

**Pufr pro antarktickou fosfatázu (10x, New England BioLabs, M0289L)**

**T4 DNA ligáza (5 000 U/ml, Thermo Scientific, EL0011)**

**Pufr pro T4 DNA ligázu (10x, Thermo Scientific, B69)**

**dNTPs 10mM (New England BioLabs, N04475)**

### **3.3.7 Restrikční endonukleázy**

Všechny použité restrikční endonukleázy (tab. 2) byly obdrženy od New England BioLabs. Pufrы a podmínky reakce byly stanoveny podle doporučení výrobce. Reakční teplota je pro všechny uvedené enzymy 37 °C.

**Tabulka 2:** Přehled použitých restričních endonukleáz

<b>Enzym</b>	<b>Kód produktu</b>	<b>Pufr</b>
<b>AgeI</b>	R0552S	NEBuffer 1.1
<b>BamHI-HF</b>	R3136S	CutSmart
<b>EcoRI-HF</b>	R3101S	CutSmart
<b>HindIII-HF</b>	R3104S	CutSmart
<b>MluI</b>	R0198S	NEBuffer 3.1
<b>NheI-HF</b>	R3131S	CutSmart
<b>PstI</b>	R0140S	NEBuffer 3.1
<b>SacII</b>	R0157S	CutSmart
<b>SmaI</b>	R0141S	CutSmart

### 3.4 Materiál použitý při práci s proteiny

#### 3.4.1 Příprava buněčných lyzátů a vzorků pro SDS-PAGE

<b>10x PBS (pH 7,3)</b>	137mM NaCl (Lach:ner, 30093-APO) 2,7mM KCl (Penta, 16210-31000) 4,3mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O (Penta, 15150) 1,4mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Penta, 12300)
<b>Lyzační pufr RIPA</b>	0,15M NaCl (Lach:ner, 30093-APO) 50mM Tris-HCl (pH 7,4) (Serva, 37190) 1% Nodinet P-40 0,1% SDS (dodecylsírán sodný, Sigma, L3771) 1% deoxycholát sodný (Sigma, D6750) 5mM EDTA (Sigma, EDS) 50mM NaF (Sigma, S7920)

**Inhibitory proteáz MixM (Serva): 100x**



<b>SDS-PAGE pufr</b>	25mM Tris (pH 8,3) (Serva, 37190) 190mM glycin (Fluka chemie, 50052) 0,1% SDS (dodecylsírán sodný, Sigma, L3771)
<b>Coomassie brilliant blue</b>	20% methanol (Lach:ner, 20038-ATO) 10% kyselina octová (Lach:ner, 10047-A99) 0,114% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, 1610436)
<b>Odbarvovací roztok pro CBB</b>	5% methanol (Lach:ner, 20038-ATO) 7% kyselina octová (Lach:ner, 10047-A99)
<b>Trans-blot Turbo RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit (BioRad, 1704270):</b>	kit pro přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu
<b>Amersham Protran 0,45 µm NC (Sigma, 10600002):</b>	nitrocelulózová membrána
<b>Ponceau S</b>	0,1% Ponceau S 5% kyselina octová (Lach:ner, 10047-A99)
<b>TBS</b>	20mM Tris (pH 7,5) (Serva, 37190) 150mM NaCl (Lach:ner, 30093-APO)
<b>TTBS</b>	0,05% Tween-20 (P-lab 9127,2) v TBS
<b>BSA (Sigma, A7030A):</b>	pro blokování membrán a ředění protilátek

**Tabulka 3:** Přehled použitých protilátek pro metodu Western blot

	<b>Původ</b>	<b>Ředění</b>	<b>Velikost proteinu</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Kód produktu</b>
<b><u>Primární protilátky</u></b>					
<b>Anti-SNAP-tag</b>	rabbit	1:800-1:1000	20 kDa	New England BioLabs	P9310S
<b>Anti-actin</b>	goat	1:800-1:1000	43 kDa	Santa Cruz Biotechnology	SC-1616
<b>Anti-GFP</b>	rabbit	1:1000	27 kDa	Santa Cruz Biotechnology	SC-8334B
<b><u>Sekundární protilátky (HRP)</u></b>					
<b>Anti-rabbit</b>	goat	1:700		Thermo Scientific	32460
<b>Anti-goat</b>	donkey	1:5000		Santa Cruz Biotechnology	SC-2033

**SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, 34075):**

substrát pro křenovou peroxidázu

**3.4.3 Želatinová zymografie****Želatina (Bio-Rad, 170-6537)****Renaturační pufr**

50mM Tris-HCl (pH 7,5) (Serva, 37190)

0,1M NaCl (Lach:ner, 30093-APO)

2,5% Triton-X 100 (Sigma, 1001376742)

**Aktivační pufr**

50mM Tris-HCl (pH 7,5) (Serva, 37190)

10mM CaCl<sub>2</sub>

0,02% azid

### 3.5 Materiál pro přípravu preparátu na mikroskopii

#### 3.5.1 Mikroskopovací materiál a jeho úprava

**Krycí sklíčka:** předem omytá v HCl pro zdrsňení povrchu a následně dlouhodobě uchovávaná v ethanolu, před použitím se sklíčka z ethanolu vyjmou a opálí

**μ-Slide 8 Well (Ibidi, 80827):** 8-jamkové destičky se skleněným dnem

**35 mm dish, 20 mm glass diameter, No. 1,5 coverglass (MatTek, P35G-1,5-20-C):** misky se skleněným dnem

**Fibronektin (Serva, 110726):** protein extracelulární matrix, pokrývání povrchů

**Poly-L-lysine (Sigma, P4707):** pokrývání povrchů pro zvýšení přilnavosti kolagenu a buněk

**QCM Gelatin Invadopodia Assay (Merck Millipore, ECM671-1):** kit pro přípravu sklíček pokrytých fluorescenční želatinou

#### 3.5.2 Příprava kolagenové matrix jako 3D matrice

**Amicon Ultra 0,5 ml Centrifugal Filters (Merck Millipore, UFC510024):** kolonky pro purifikaci proteinů

**Rat tail collagen (4 mg/ml, Serva, 47256)**

**10x rekonstituční pufr** 200mM HEPES (Sigma, H4034)

262mM NaHCO<sub>3</sub> (Sigma, S8761)

**Borátový pufr (pH 9,0)** 50mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Lachema, 30935-1199)

NaOH (Penta, 011-002-00-6)

**Alexa Fluor 633 NHS Ester (Succinimidyl Ester) (Thermo Scientific, A20005):** fluorescenční značení kolagenových vláken

**TRIS pufr (pH 7,5)** 50mM TRIS (Serva, 37190)

HCl (Lach:ner, 10033-A35)

**10x PBS (pH 7,3)** 137mM NaCl (Lach:ner, 30093-APO)

2,7mM KCl (Penta, 16210-31000)

4,3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (Penta, 15150)

1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Penta, 12300)

**Kyselina chlorovodíková (Lach:ner, 10033-A35)**

**Kyselina octová (Lach:ner, 10047-A99)**

**10x DMEM (Sigma, D2429)**

**Sacharóza (Penta, 60774-1000)**

**Paraformaldehyd (Sigma, 158127)**

### **3.5.3 Imunocytochemické barvení savčích buněk**

**10x PBS (pH 7,3)**

137mM NaCl (Lach:ner, 30093-APO)

2,7mM KCl (Penta, 16210-31000)

4,3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (Penta, 15150)

1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Penta, 12300)

**Paraformaldehyd (Sigma, 158127)**

**Triton X-100 (Sigma, 1001376742)**

**Montovací médium**

6 g glycerol

2,4 g mowiol

6 ml dH<sub>2</sub>O

12 ml pufru (60mM PIPES, 25mM HEPES, 10mM EGTA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 8,3)

**Tabulka 4:** Přehled použitého faloidinu konjugovaného s Alexa Fluor

	<b>Ředění</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Kód produktu</b>
<b>Faloidin 350</b>	1:100	Thermo Scientific	A22281
<b>Faloidin 405</b>	1:50	Dyomics	405-33
<b>Faloidin 488</b>	1:100	Thermo Scientific	A12379
<b>Faloidin 594</b>	1:100	Thermo Scientific	A12381

**SNAP-Surface Alexa Fluor 488 (New England Biolabs, S9129S):** fluorescenční substrát neprocházející buněčnou membránou, značící proteiny fúzované se značením SNAP

## **4. Metody**

### **4.1 Kultivace savčích tkáňových kultur**

Savčí buňky kultivujeme v termostatu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> na plastických površích určených pro tkáňové kultury o průměru 6 a 10 cm, případně na 6-, 12- a 24-jamkových destičkách. Kulturu je nutno pravidelně kontrolovat pomocí světelného mikroskopu (Nikon-Eclipse TS100) a sledovat nárůst, morfologii buněk, případně kontaminaci. S tkáňovými kulturami pracujeme výhradně v laminárním boxu s použitím sterilního vybavení.

#### **4.1.1 Pasážování savčích buněk**

Pasážování buněk provádíme v závislosti na konfluenci misky a zbarvení pH indikátoru v médiu, zpravidla po 2-4 dnech. Pro práci s buňkami je vhodné předem ohřát médium ve vodní lázni na 37 °C a trypsin na pokojovou teplotu.

- Z misek odsajeme médium a buňky krátce opláchneme 1x PBS
- K buňkám přidáme trypsin (0,5 ml na 6cm misky, 1 ml na 10cm misky) a misky vložíme na 2-5 minut do inkubátoru, dokud nedojde k uvolnění buněk ode dna
- Aktivitu trypsinu inhibujeme přidáním média s obsahem séra (stejný objem jako objem trypsinu) a resuspendujeme za pomoci pipety pro dokonalé uvolnění buněčných agregátů
- Odsajeme přibližně 90-95 % buněčné suspenze, případně přeneseme požadovaný objem na novou misku a doplníme čerstvým médiem (4-5 ml na 6cm misky, 9-10 ml na 10cm misky)

#### **4.1.2 Kryokonzervace savčích buněk**

- Buňky kultivujeme na 10cm miskách do dosažení 90-100 % konfluence
- Připravíme si dostatečné množství zamrazovacího média (2 ml na 1x10cm misku)
- Postupujeme stejně jako při pasáži buněk až do dosažení buněčné suspenze
- Celý objem suspenze přeneseme do 15ml zkumavek Falcon a centrifugujeme (180 g, 1 000 rpm, 4 min)
- Odsajeme supernatant, pelet resuspendujeme v 2 ml zamrazovacího média a objem rozdělíme do dvou mikrozukumavek Nalgene

- Mikrozkušavky vložíme do předem vychlazené nádoby s isopropanolem a umístíme do -80 °C pro krátkodobé uchování, případně následující den přeneseme do tekutého dusíku (-196 °C) pro dlouhodobé uchování

#### 4.1.3 Rozmrazování savčích buněk

- Zkušavku se zamraženými buňkami po vyjmutí z tekutého dusíku ihned necháme roztát ve vodní lázni o teplotě 37 °C
- Buněčnou suspenzi přeneseme do 15ml Falcon zkušavky, doplníme na cca 5 ml kompletním médiem a centrifugujeme (180 g, 1 000 rpm, 4 min)
- Odsajeme supernatant, pelet resuspendujeme v 4 ml čerstvého média, přeneseme na 6cm/10cm misku (podle množství buněk) a doplníme objem média na 5 ml/10 ml
- Buňky standardně používáme na experimenty 3-5 dní po rozmrazení

#### 4.1.4 Transfekce savčích buněk

- Pro transfekci používáme přisedlé buňky v 60-80% konfluenci
- Množství transfekční reagens PEI, DNA a DMEM bez přídavku séra je závislé na množství buněk (tab. 5)

**Tabulka 5:** Složení transfekční směsi podle množství buněk

	<b>10cm misky</b>	<b>6cm misky</b>	<b>6-jamk. dest.</b>	<b>12-jamk. dest.</b>
<b><u>DNA mix</u></b>				
<b>DNA</b>	14 µg	5 µg	1440 ng	720 ng
<b>DMEM*</b>	500 µl	250 µl	100 µl	50 µl
<b><u>PEI mix</u></b>				
<b>LMW PEI</b>	112 µl	40 µl	10,6 µl	5,3 µl
<b>DMEM*</b>	388 µl	210 µl	89,3 µl	44,6 µl

\* Pro dané mixy používáme médium bez přidaného séra

- Připravíme DNA mix a PEI mix podle uvedené tabulky, řádně promícháme
- Oba mixy spojíme, řádně promícháme a inkubujeme 15-30 minut
- Směs přidáme k médiu s buňkami
- Po 18-24 hodinách vyměníme médium

#### 4.1.5 Příprava buněčné suspenze o požadované koncentraci

- Postupujeme stejně jako při pasáži buněk až do dosažení buněčné suspenze
- Buněčnou suspenzi přeneseme do 15ml Falcon zkumavky a centrifugujeme (180 g, 1 000 rpm, 4 min)
- Odsajeme supernatant, pelet resuspendujeme v x ml kompletního média (v závislosti na množství buněk) a spočítáme počet buněk
  - a) Přeneseme 12  $\mu$ l buněčné suspenze do Bürkerovy komůrky
  - b) Spočítáme průměrný počet buněk na čtverec
  - c) Určíme počet buněk v x ml
  - d) Určíme počet buněk v 1 ml
- Buněčnou suspenzi centrifugujeme (180 g, 1 000 rpm, 4 min) a resuspendujeme ve vypočteném objemu média podle požadované koncentrace buněk

## 4.2 Izolace a purifikace DNA

### 4.2.1 Izolace plazmidové DNA pomocí fenol-chlorofomu

1. den (navečer):

- Do 2 ml LB média s příslušným antibiotikem zaočkujeme bakterie z konzervy, případně agarové misky
- Inkubujeme 12-16 h na třepačce při 37 °C a 180 rpm

2. den:

- 1-1,5 ml bakteriální kultury centrifugujeme (14 000 rpm, 1 min), médium odsajeme pomocí vakuové pumpy, podle velikosti peletu případně přidáme zbylé množství kultury a postup opakujeme
- Přidáme 100  $\mu$ l TEG, inkubujeme 5 minut a pomocí vortexu resuspendujeme pelet
- Bakterie lyzujeme přidáním 280  $\mu$ l čerstvého lyzačního roztoku za současného vortexování (1300 rpm), vortexujeme následující 2 sekundy
- Po 1 minutě neutralizujeme přidáním 420  $\mu$ l 10M NH<sub>4</sub>AC za současného vortexování (1300 rpm), vortexujeme následujících 5 sekund

- Přidáme 280  $\mu$ l fenol-chloroformu, protřepeme a vortexujeme po dobu 10 sekund na maximální otáčky, poté centrifugujeme (14 000 rpm, 5 min)
- Přeneseme maximum horní bezbarvé fáze do nové zkumavky a přidáme 0,7 objemu isopropanolu (cca 450-500  $\mu$ l), pořádně promícháme a necháme inkubovat v pokojové teplotě minimálně 10 minut
- Centrifugujeme (14 000 rpm, 15 min), odlejeme isopropanol a pelet opláchneme 600  $\mu$ l 80% ethanolu, zkumavky překlápíme do oddělení peletu ode dna
- Centrifugujeme (14 000 rpm, 1 min) pro usazení peletu, supernatant odsajeme a pelet vysušíme v pokojové teplotě
- Pelet rozpustíme ve 20  $\mu$ l roztoku RNase a inkubujeme po dobu 30 minut ve 37  $^{\circ}$ C
- Plazmidovou DNA pročistíme pomocí magnetických kuliček Agencourt AMPure XP, změříme koncentraci pomocí přístroje NanoDrop (Thermo Scientific) a uchovááme v -20  $^{\circ}$ C

#### **4.2.2 Elektroforetická separace DNA v agarózovém gelu**

- Zvolíme koncentraci agarózy v závislosti na velikosti analyzovaných fragmentů DNA (pro fragmenty o velikosti 1-10 kbp volíme 1% w/v gel, pro menší fragmenty 1,5-2% w/v gel)
- Potřebné množství agarózy přidáme k 100 ml 1x SB pufru, směs ohříváme do úplného rozpuštění v mikrovlnné troubě (2-3 min), necháme zchladnout na 40-50  $^{\circ}$ C a přidáme 1  $\mu$ l interkalačního barviva pro vizualizaci DNA
- Gel nalejeme do nalévací aparatury, vložíme hřebínky pro vytvoření jamek a necháme ztuhnout (20-30 min), poté odstraníme hřebínek, gel přemístíme do elektroforetické aparatury a zalejeme 1x SB pufrem
- Na gel nanášíme 0,2-1  $\mu$ g DNA s 6x Loading dye, do jedné z jamek nanese marker (3  $\mu$ l)
- Elektroforetickou aparaturu připojíme ke zdroji a nastavíme napětí 0,5-10 V/cm gelu
- Vyhodnocení provádíme pomocí UV transluminátoru vybaveného kamerou, případně požadované fragmenty DNA izolujeme z gelu

#### 4.2.3 Izolace DNA fragmentů z agarózového gelu pomocí fenolu

- Pro izolaci z gelu volíme co nejnižší koncentraci agarózového gelu (0,7-1%)
- Fragment DNA o požadované délce vyřízneme z gelu pomocí skalpelu při vizualizaci UV transluminátorem (dbáme na co nejkratší vystavení DNA UV záření)
- Gel vložíme do zkumavky, přidáme 400  $\mu$ l fenolu a zahříváme při 72 °C do úplného rozpuštění (10-20 min)
- Přidáme 300  $\mu$ l TE, 25  $\mu$ l 10M LiCl, zvortexujeme a centrifugujeme (13 000 rpm, 10 min)
- Přeneseme horní fázi do nové zkumavky, přidáme 100  $\mu$ l 10M LiCl, 300  $\mu$ l fenol-chloroformu, zvortexujeme a centrifugujeme (13 000 rpm, 5 min)
- Přeneseme horní fázi do nové zkumavky, přidáme 1  $\mu$ l glykogenu, cca 450  $\mu$ l isopropanolu (0,7x objem), řádně promícháme a inkubujeme 10 minut, poté centrifugujeme (13 000 rpm, 15 min)
- Odstraníme supernatant a pelet opláchneme 500  $\mu$ l 80% ethanolu, centrifugujeme pro usazení peletu (13 000 rpm, 1 min), odsajeme ethanol pomocí vakuové pumpy a necháme vysušit v pokojové teplotě
- Pelet rozpustíme v 10-20  $\mu$ l vody
- Plazmidovou DNA pročistíme pomocí magnetických kuliček Agencourt AMPure XP a uchováваме v -20 °C

#### 4.2.4 Purifikace DNA pomocí Agencourt AMPure XP

- Agencourt AMPure XP magnetické kuličky necháme temperovat na pokojovou teplotu a před použitím řádně promícháme
- K DNA produktu po restrikčním štěpení nebo PCR reakci přidáme magnetické kuličky (1,8x objem purifikované DNA), řádně promícháme pipetováním a necháme inkubovat 5-10 minut
- Zkumavky vložíme do magnetického stojánku pro oddělení magnetických kuliček s navázanou DNA (2-5 min) a odstraníme přebytečný roztok
- Kuličky při stálém přichycení na magnetu opláchneme 2x v čerstvém 70% ethanolu (600  $\mu$ l)

- Odstraníme veškerý ethanol pomocí vakuové pumpy a necháme magnetické kuličky vysušit (max. 5 min)
- Zkumavky vyjmeme z magnetického stojánku, přidáme ke kuličkám požadovaný objem vody (20-40  $\mu$ l), příp. TE pufru, a resuspendujeme v homogenní suspenzi
- Vložíme zkumavky do magnetického stojánku pro oddělení kuliček (2-5 min) a přeneseme DNA roztok do nové mikrozukumavky

### 4.3 Molekulární klonování konstruktů

#### 4.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- Reakci připravíme na ledu do 0,2ml PCR mikrozukumavek podle následujícího rozpisu (tab. 6)

**Tabulka 6:** Složení reakční směsi pro PCR

<b>5x Q5 reakční pufr</b>	Finální koncentrace 1x
<b>10mM dNTPs</b>	Finální koncentrace 200 $\mu$ M (50x naředit)
<b>10<math>\mu</math>M forward primer</b>	Finální koncentrace 0,5 $\mu$ M (20x naředit)
<b>10<math>\mu</math>M reverse primer</b>	Finální koncentrace 0,5 $\mu$ M (20x naředit)
<b>Templátová DNA</b>	1 pg - 1 $\mu$ g
<b>Polymeráza Q5</b>	0,02 U/ $\mu$ l reakce (0,25-0,5 $\mu$ l)
<b>mpH<sub>2</sub>O</b>	Doplnění do požadovaného objemu

- Připravenou reakční směs promícháme a vkládáme do již předem předeřátého cycleru (98 °C) s uvedeným nastavením programu (tab. 7)

**Tabulka 7:** Podmínky pro PCR reakci

<b>Kroky</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>
<b>1. Počáteční denaturace</b>	98 °C	30 s
<b>2. Denaturace</b>	98 °C	5-10 s
<b>3. Nasedání primerů</b>	50-72 °C *	10-30 s
<b>4. Syntéza</b>	72 °C	20-30 s/kb **
<b>5. Opakujeme kroky 2, 3, 4 10-30x</b>		

<b>6. Závěrečné dosyntetizování</b>	72 °C	10 min
<b>7. Udržovací fáze</b>	4-10 °C	neomezeno

\* Teplotu nasedání volíme 3 °C nad teplotou tání použitých primerů

\*\* Trvání syntetické fáze určíme v závislosti na délce syntetizovaného fragmentu

*Pozn.: Při zavádění restričních míst do syntetizovaného fragmentu používáme primery s nekomplementárními přesahy, v tomto případě volíme teplotu nasedání primerů v prvním cyklu odlišnou od cyklů následujících.*

#### 4.3.2 PCR z bakteriálních kolonií

- Pomocí 200µl plastové špičky přeneseme vybranou bakteriální kolonii z agarové plotny na čerstvou plotnu a stejně tak do předem připravené reakční směsi v 0,2ml PCR mikrozkuvkách (tab. 8)

**Tabulka 8:** Složení reakční směsi pro PCR z bakteriálních kolonií

<b>10x Taq reakční pufr</b>	Finální koncentrace 1x
<b>10mM dNTPs</b>	Finální koncentrace 200 µM (50x naředit)
<b>10µM forward primer</b>	Finální koncentrace 0,2 µM (50x naředit)
<b>10µM reverse primer</b>	Finální koncentrace 0,2 µM (50x naředit)
<b>Templátová DNA</b>	Variabilní
<b>Polymeráza Taq</b>	0,025 U/µl reakce (0,1-0,5 µl)
<b>mpH<sub>2</sub>O</b>	Doplnění do požadovaného objemu

- Připravenou reakční směs promícháme a vkládáme do již předem předeřátého cycleru (98 °C) s uvedeným nastavením programu (tab. 9)

**Tabulka 9:** Podmínky pro PCR reakci z bakteriálních kolonií

<b>Kroky</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>
<b>1. Počáteční denaturace</b>	98 °C	3 min
<b>2. Denaturace</b>	98 °C	15-30 s
<b>3. Nasedání primerů</b>	45-68 °C *	15-60 s
<b>4. Syntéza</b>	68 °C	1 min/kb **
<b>5. Opakujeme kroky 2, 3, 4 30x</b>		

<b>6. Závěrečné dosyntetizování</b>	68 °C	10 min
<b>7. Udržovací fáze</b>	4-10 °C	neomezeno

\* Teplotu nasedání volíme 3 °C nad teplotou tání použitých primerů

\*\* Trvání syntetické fáze určíme v závislosti na délce syntetizovaného fragmentu

- Po dokončení reakce vyhodnotíme pozitivní kolonie pomocí vizualizace DNA na agarózovém gelu

#### 4.3.3 Restriční štěpení

- Objem reakce volíme podle množství DNA, zpravidla pro každý µg DNA 10 µl totální reakční směsi
- Připravíme restriční reakci (tab. 10) v požadovaném objemu

**Tabulka 10:** Složení reakce pro restriční štěpení

<b>DNA</b>	100 ng – 10 µg
<b>10x restriční pufr *</b>	Finální koncentrace 1x
<b>Restriční endonukleáza</b>	1 U/1 µg DNA (0,2-1 µl)
<b>mpH<sub>2</sub>O</b>	Doplnění do požadovaného objemu

\* Dbáme na to, aby daná restriční endonukleáza dosahovala v použitém pufru maximální aktivity

- Reakční směs necháme inkubovat v teplotě doporučené výrobcem v závislosti na typu restriční endonukleázy (zpravidla 37 °C) po dobu 1-2 hodin (pro restriční analýzu), případně přes noc (pro následné molekulární klonování)
- V případě molekulárního klonování je potřeba enzym po uplynutí inkubační doby tepelně inaktivovat podle návodu výrobce nebo DNA pročistit pomocí Agencourt AMPure XP magnetických kuliček

#### 4.3.4 Defosforylace konců

- Antarktická fosfatáza katalyzuje defosforylaci 5' konce linearizovaného vektoru a tím zabraňuje opětovné recirkularizaci vektoru a uzavření bez inzertu
- Připravíme reakci podle rozpisu (tab. 11) a inkubujeme při 37 °C po dobu 30-60 minut

**Tabulka 11:** Složení reakce pro defosforylaci 5'konců

<b>Vektor</b>	100 ng – 10 µg
<b>10x AP pufr</b>	Finální koncentrace 1x
<b>Antarktická fosfatáza</b>	1 U/1 µg DNA (0,2-1 µl)
<b>mpH<sub>2</sub>O</b>	Doplnění do požadovaného objemu

- Fosfatázu tepelně inaktivujeme v 80 °C po dobu 2 minut, případně DNA pročistíme pomocí Agencourt AMPure XP

#### 4.3.5 Ligace DNA

- Připravíme reakci podle rozpisu (tab. 12) a reakci inkubujeme při pokojové teplotě přes noc

**Tabulka 12:** Složení ligační reakce

<b>Vektor *</b>	20-50 ng
<b>Inzert *</b>	50-500 ng; molární poměr 4-10:1 (inzert:vektor)
<b>10x ligační pufr</b>	Finální koncentrace 1x
<b>T4 DNA ligáza</b>	5 U (1 µl)
<b>mpH<sub>2</sub>O</b>	Doplnění do požadovaného objemu

\* Pokud neznáme přesnou koncentraci vektoru a inzertu, požadovaný objem pro ligační reakci volíme na základě odhadu koncentrace podle analýzy separace DNA v agarózového gelu, kterou provádíme před ligací pro ověření čistoty fragmentů

- Aktivitu enzymu můžeme tepelně inaktivovat při 70 °C po dobu 10 minut, ale není to nutností

#### 4.3.6 Příprava kompetentních bakterií *E. coli* DH5α

1. den (navečer):

- Bakterie DH5α sterilně odebereme ze zásobní konzervy a zaočkujeme na agarovou plotnu bez selekčních antibiotik, inkubujeme v 37 °C do druhého dne

2. den (navečer):

- Z agarové misky zaočkujeme jednu z narostlých kolonií do 20 ml LB média a kulturu inkubujeme na třepačce (37 °C, 180 rpm) přes noc (cca 16 hodin)

3. den:

- Změříme OD<sub>600</sub> inokula pomocí spektrofotometru a sterilně zaočkujeme kulturu do 400 ml čerstvého LB média na OD<sub>600</sub> 0,05, inkubujeme na třepačce (37 °C, 180 rpm) do dosažení OD<sub>600</sub> 0,6-1,0
- Kulturu ochladíme na ledu a přeneseme do předem vychlazených a sterilních 50ml Falcon zkumavek
- Centrifugujeme (4 000 g, 15 min, 4 °C) a odstraníme supernatant

### **1) Příprava kompetentních buněk pro chemickou transformaci**

- Bakteriální pelet 2x promyjeme v 50 ml ledově vychlazeného 50mM CaCl<sub>2</sub>, pelet dokonale resuspendujeme pro odstranění zbytků média a centrifugujeme (4 000 g, 15 min, 4 °C)
- Pelet resuspendujeme v 5 ml sterilního 50mM CaCl<sub>2</sub> a sloučíme suspenzi do jedné 50ml Falcon zkumavky
- Centrifugujeme (4 000 g, 10 min, 4 °C) a pelet resuspendujeme v 5-8 ml 50mM CaCl<sub>2</sub> s 15% glycerolem
- Připravíme alikvóty bakteriální suspenze v 10% glycerolu do 1,5ml mikrozkušavek, zamrazíme v tekutém dusíku a dlouhodobě skladujeme v -80 °C

### **2) Příprava kompetentních buněk pro elektroporaci**

- Bakteriální pelet 2x promyjeme v 50 ml ledově vychlazené ddH<sub>2</sub>O, pelet dokonale resuspendujeme pro odstranění zbytků média a centrifugujeme (4 000 g, 15 min, 4 °C)
- Pelet resuspendujeme v 5 ml sterilního 10% glycerolu a sloučíme suspenzi do jedné 50ml Falcon zkumavky
- Centrifugujeme (4 000 g, 10 min, 4 °C) a pelet resuspendujeme v 2-3 ml 10% glycerolu
- Připravíme alikvóty bakteriální suspenze v 10% glycerolu do 1,5ml mikrozkušavek, zamrazíme v tekutém dusíku a dlouhodobě skladujeme v -80 °C

#### 4.3.7 Transformace kompetentních bakterií metodou Heat shock

- TOP10 kompetentní bakterie po vytažení z -80 °C pomalu rozmrazíme umístěním na led
- K 30-50 µl bakterií přidáme 3-5 µl ligační směsi (objem ligační reakce by neměl překročit 10% objemu kompetentních bakterií), jemně promícháme a inkubujeme 30 minut na ledu
- Směs vložíme do termobločku o teplotě 42 °C na 40 sekund pro aplikaci heat shock
- Inkubujeme 2 minuty na ledu a přidáme bohaté SOC médium bez antibiotik (doplnění do objemu 100 µl)  
*Pozn.: v případě kanamycinové rezistence bakterie inkubujeme v třepačce (37 °C, 750-900 rpm) a ve větším množství média bez antibiotik (500 µl) po dobu 1 hodiny před vyšetím na agarové misky s kanamycinem*
- Směs nanese na předem vyhřáté agarové misky s příslušným antibiotikem a pomocí opálené skleněné hokejky bakterie rozetřeme rovnoměrně po ploše plotny
- Inkubujeme při 37 °C do druhého dne (12-16 h)

#### 4.3.8 Transformace kompetentních bakterií elektroporací

- Elektrokompentní buňky po vytažení z -80 °C pomalu rozmrazíme umístěním na led, elektroporační kyvety vysušíme od ethanolu a vychladíme na ledu
- K 30-40 µl bakterií přidáme maximálně 1/10 objemu ligační směsi (3-4 µl) a směs převedeme do elektroporační kyvety
- Transformaci provádíme za použití přístroje Gene Pulser (Bio-Rad) s nastavením napětí 2,5 kV, odporu 200 Ω a aplikací pulzu cca 12 500 V/cm po dobu 4-5 ms
- Ihned po elektroporaci přidáme k bakteriím 1 ml LB média s 2% glukózou, řádně promícháme, přeneseme do mikrozkuvek a inkubujeme na třepačce (37 °C, 750-900 rpm) po dobu 1 hodiny
- Kulturu centrifugujeme (3 000 rpm, 3 min), odstraníme většinu supernatantu a pelet resuspendujeme ve zbylých cca 100-150 µl

- Suspenzi nanese na předem vyhřáté agarové misky s příslušným antibiotikem a pomocí opálené skleněné hokejky bakterie rozetřeme rovnoměrně po ploše plotny
- Inkubujeme při 37 °C do druhého dne, z narostlých kolonií následně můžeme vyizolovat DNA a restriční analýzou ověřit přítomnost daného konstruktů, případně můžeme kolonie analyzovat pomocí PCR

## **4.4 Práce s proteiny**

### **4.4.1 Příprava buněčných lyzátů**

Příprava buněčných lyzátů vyžaduje práci na ledu a užívání ledově vychlazených roztoků.

- Misky s buňkami přeneseme na led a opláchneme vychlazeným 1x PBS
- Odsajeme PBS a nanese rovnoměrně na misky lyzační pufr RIPA (cca 200-1000 µl, množství upravíme podle konfluency buněk a velikosti misky) s přidanými inhibitory proteáz, případně inhibitory fosfatáz a inkubujeme 10-15 min
- Pomocí škrabky seškrábneme buňky ze dna misky, přeneseme do mikrozkuvek a centrifugujeme (13 000 g, 15 min, 4°C)
- Supernatant přeneseme do nových mikrozkuvek a uchovááme krátkodobě v -20 °C, případně v -80 °C dlouhodobě

### **4.4.2 Stanovení koncentrace proteinů a příprava vzorků pro SDS-PAGE**

- Celkovou koncentraci proteinů v lyzátu stanovujeme Folinovou metodou použitím kitu DC Protein Assay
- Jako standardy použijeme ředící řadu BSA o koncentracích 0; 0,1; 0,25; 0,5 a 1 mg/ml v lyzačním pufru
- V mikrozkuvce smícháme 1 ml roztoku A s 20 µl roztoku S, čímž získáme roztok A'
- do 96-jamkové destičky napipetujeme 25 µl roztoku A', přidáme 5 µl proteinového lyzátu v triplikátech, včetně standardů BSA
- Přidáme 200 µl roztoku B a necháme inkubovat 15 minut na tmavém místě

- Po uplynutí inkubace změříme absorbanci vzorků pomocí spektrofotometru při 750 nm
- Z naměřených hodnot absorbance standardů vytvoříme graf závislosti absorbance na koncentraci, vypočítáme koncentraci proteinů v lyzátech a vzorky naředíme pomocí lyzačního pufru na požadovanou koncentraci

#### 4.4.3 SDS-PAGE elektroforéza

- Sestavíme aparaturu pro přípravu 1,5mm polyakrylamidového gelu a připravíme 6% a 15% separační gel (tab. 13)

**Tabulka 13:** Rozpis pro přípravu separačního a zaostřovacího gelu

	<b>6% separační gel</b>	<b>15% separační gel</b>	<b>Zaostřovací gel</b>
<b>Protogel AA/BIS</b>	750 $\mu$ l	1,88 ml	650 $\mu$ l
<b>4x Tris/SDS</b>	940 $\mu$ l	940 $\mu$ l	1,25 ml
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	1,99 ml	840 $\mu$ l	3,1 ml
<b>TEMED</b>	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l	5 $\mu$ l
<b>10% APS</b>	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l	25 $\mu$ l

- Do plastové pipety natáhneme nejprve 6% a poté 15% gel, následně 2 vzduchové bubliny pro promíchání gelu a vytvoření gradientu a směs pomalu nanášíme mezi skla za současného pohybu po celé délce sklíček v připravené aparatuře, gel převrstvíme vodou nebo izopropanolem pro zamezení přístupu vzduchu
- Po polymerizaci separačního gelu (15-30 min) připravíme zaostřovací gel podle rozpisu (tab. 13) a aplikujeme na separační gel po odsátí vody/izopropanolu, mezi skla vložíme hřebínek pro vymezení jamek
- Po ztuhnutí zaostřovacího gelu vytáhneme skla z aparatury, vložíme do elektroforetické aparatury a zalejeme SDS pufrem
- Z gelu opatrně vyjmeme hřebínek a jamky opláchneme SDS pufrem
- K buněčným lyzátům přidáme 1/5 objemu 6x Laemmli pufru a 1M DTT v poměru 1:30, povaříme po dobu 10 minut při 100°C

- Naneseme 20-30  $\mu\text{l}$  vzorků do jamek pomocí Hamilton injekce, případně speciálních plastových špiček, do jedné z jamek naneseme marker molekulových hmotností proteinů (4  $\mu\text{l}$ )
- Připojíme aparaturu ke zdroji napětí a pustíme při proudu 12 mA/gel
- Po dosáhnutí hranice separačního gelu a zaostření vzorku zvýšíme napětí na 24 mA/gel
- Jakmile čelo dosáhne konce gelu, vypneme zdroj napětí a gel obarvíme pomocí Coomassie Brilliant Blue, případně jej použijeme pro přenos proteinů na membránu metodou Western blot

#### 4.4.4 Barvení polyakrylamidového gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue

- Oddělíme zaostřovací část gelu a separační část přeneseme do barvicího roztoku, necháme inkubovat do úplného zabarvení gelu za mírného třepání (1-3 hod)
- Následně gel odbarvujeme v odbarvovacím roztoku po dobu několika hodin (ideálně přes noc), přičemž vyměníme roztok za nový podle potřeby

#### 4.4.5 Western blot

- Pro přenos proteinů na membránu použijeme aparaturu Trans-blot Turbo BioRad
- Z přístroje vyjmeme blotovací kazetu, kterou navlhčíme blotovacím pufrem
- Připravíme si nitrocelulózovou membránu o velikosti gelu a předem ji namočíme v blotovacím pufru, stejně tak 2 blotovací tkaniny  
*Pozn.: S membránou manipulujeme pouze pomocí pinzety, abychom zamezili kontaminaci. Dbáme na to, aby nedošlo k vysušení membrány.*
- Poskládáme blotovací „sendvič“ v blotovací kazetě podle následujícího pořadí: tkanina, membrána, gel, tkanina
- Pomocí válečku opatrně odstraníme přebytečné množství pufru a vzduchové bubliny, veškeré množství pufru z kazety vylejeme
- Kazetu uzavřeme víčkem a uzamkneme, vložíme do aparatury a nastavíme proud 1,3 A/gel po dobu 12 minut (platí pro 1,5mm gel)
- Po dokončení rozložíme aparaturu, membránu vložíme do TBS a podle potřeby ji rozstříhneme

#### 4.4.6 Imunodetekce proteinů na membráně

- Membránu blokuje v 4% BSA v TBS po dobu 45-60 minut za neustálého překlápění
- Po zablokování membránu inkubujeme v primární protilátce ředěné v 1% BSA v TTBS do druhého dne ve 4 °C za neustálého překlápění
- Následující den promýváme membránu po dobu 3x10 minut v TTBS
- Inkubujeme v sekundární protilátce ředěné v 1% mléku v TTBS po dobu 1 hodiny v pokojové teplotě
- Následně promýváme membránu po dobu 3x5 minut v TTBS, před vyvoláním krátce promyjeme v TBS
- Membránu vyvoláme pomocí substrátu (směs luminolu a peroxidu v poměru 1:1) pro křenovou peroxidázu, která je konjugovaná se sekundární protilátkou, hladinu chemiluminiscence snímáme pomocí přístroje Amersham Imager 600

#### 4.4.7 Želatinová zymografie

- Připravené buňky trypsinizujeme jako při pasážování, buněčnou suspenzi přeneseme do 15ml Falcon zkumavky a centrifugujeme (1 000 rpm, 180 g, 4 min)
- Odsajeme supernatant, pelet resuspendujeme ve 4 ml kompletního média a opět centrifugujeme (1 000 rpm, 180 g, 4 min)
- Odsajeme supernatant, pelet resuspendujeme ve 4 ml kompletního média a opět centrifugujeme (1 000 rpm, 180 g, 4 min)
- Odsajeme supernatant a pelet resuspendujeme v 1-2 ml kompletního média (podle množství buněk)
- Spočítáme množství buněk v 1 ml a připravíme si buněčnou suspenzi o 100 000-200 000 buněk v 500 µl kompletního média, suspenzi přeneseme na 24-jamkovou destičku v duplikátech
- Další den buňky 2x opláchneme médiem bez FBS a přidáme 300 µl média bez FBS
- Po 48 a 72 hodinách odebereme 100 µl z každé jamky a vzorek zamrazíme v -80 °C, před použitím vzorky rozmrazíme na ledu

- Vzorčky pro zymografii připravíme z 23  $\mu$ l odebraného supernatantu a 7  $\mu$ l 4x Laemmli pufru
- Připravíme roztok želatiny o koncentraci 5 mg/ml (konečná koncentrace v gelu 2 mg/ml), pro rozpuštění nutno zahřívát ve vodní lázni o teplotě 50 °C
- Připravíme 10% separační polyakrylamidový gel podobně jako pro SDS-PAGE, ale místo vody přidáme želatinu jako substrát (tab. 14), zbylý postup je shodný s přípravou SDS-PAGE

**Tabulka 14:** Rozpis pro přípravu 2x1mm gelu

	<b>10% separační gel</b>	<b>Zaostřovací gel</b>
<b>Protogel AA/BIS</b>	3,33 ml	867 $\mu$ l
<b>Tris/SDS 4x</b>	2,5 ml	1,7 ml
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	170 $\mu$ l	4,1 ml
<b>Želatina</b>	4 ml	-
<b>TEMED</b>	6,7 $\mu$ l	6,7 $\mu$ l
<b>10% APS</b>	33 $\mu$ l	33 $\mu$ l

- Po polymerizaci nanese se zaostřovací gel bez želatiny (tab. 14)
- Do jamek nanášíme 30  $\mu$ l vzorků
- Aparaturu přeneseme do lednice, připojíme ke zdroji napětí a pouštíme při 10-15 mA, aby nedošlo k denaturaci proteáz
- Po skončení elektroforézy renaturujeme proteiny inkubací gelu v renaturačním pufru po dobu 2 hodin, po 1 hodině vyměníme pufr za nový
- Gel opláchneme destilovanou vodou a inkubujeme přes noc v aktivačním pufru při 37 °C za velmi mírného třepání
- Po skončení inkubace barvíme gel pomocí Coomassie Brilliant Blue, odbarvíme a aktivitu proteolytických enzymů indukujeme jako neobarvená místa v gelu

## 4.5 Příprava preparátů pro konfokální mikroskopii

### 4.5.1 Příprava sklíček pokrytých fibronectinem

- Připravíme si roztok fibronectinu o koncentraci 10 µg/ml ve vodě
- Nanese kapky (70-100 µl) na vrstvu parafilmu a přiklopíme sklíčka
- Sklíčka necháme ve sterilních podmínkách uschnout (cca 2 hodiny), vložíme je do 12-jamkové destičky a aplikujeme buněčnou suspenzi

### 4.5.2 Příprava sklíček pokrytých fluorescenční želatinou

- Smícháme 35 µl/sklíčko poly-lysinu se stejným množstvím ddH<sub>2</sub>O
- Z roztoku poly-lysinu vytvoříme kapku (70 µl/sklíčko) na vrstvě parafilmu, položíme na ni sklíčko a inkubujeme 20 minut
- Sklíčko opláchneme 3x v 1x PBS (ve 12-jamkové destičce), přičemž dbáme na správnou orientaci (vrstvou poly-lysinu nahoru)
- Smícháme 5 µl/sklíčko glutaraldehydu se 75 µl/sklíčko 1xPBS
- Z roztoku glutaraldehydu vytvoříme kapku (70 µl/sklíčko) na vrstvě parafilmu, položíme na ni sklíčko, přičemž dbáme na správnou orientaci (vrstvou poly-lysinu dolů) a inkubujeme 15 minut
- Sklíčko opláchneme 3x v 1x PBS (ve 12-jamkové destičce), přičemž dbáme na správnou orientaci sklíčka
- Připravíme směs želatiny následujícím postupem:
  - a) 3 µl/sklíčko želatiny značené Cy3 zahřejeme na 60 °C po dobu 5 minut, následně smícháme s 9 µl/sklíčko 1x PBS (celkem 12 µl/sklíčko)
  - b) 12 µl/sklíčko neznačené želatiny smícháme s 36 µl/sklíčko 1x PBS (celkem 48 µl/sklíčko)
  - c) smícháme 12 µl/sklíčko značené želatiny s 48 µl/sklíčko neznačené želatiny (celkem 60 µl/sklíčko)
- Z roztoku želatiny vytvoříme kapku (60 µl/sklíčko) na vrstvě parafilmu, položíme na ni sklíčko (dbáme na správnou orientaci) a inkubujeme 10 minut (od této doby sklíčka chráníme před nadbytečným světlem)
- Sklíčko opláchneme 3x v 1x PBS (ve 12-jamkové destičce), přičemž dbáme na správnou orientaci

- Sklíčka dezinfikujeme 70% ethanolem po dobu 30 minut
- Sklíčko opláchneme 3x v 1x PBS (ve 12-jamkové destičce)
- Zbytky aldehydů odstraníme inkubací sklíček v DMEM médiu po dobu 30 minut (chráníme před světlem)
- Médium vyměníme za nové a na sklíčka aplikujeme buněčnou suspenzi v požadovaném množství buněk
- Degradaci želatinové matrix detekujeme jako fluorescenčně neaktivní plochu

### 4.5.3 Fluorescenčně značený kolagen

Metoda je převzata z Doyle, A. D. 2015

- K potřebnému množství zásobního roztoku kolagenu přidáme pro neutralizaci 1/10 objemu 10x rekonstitučního pufru a vodu pro dosažení koncentrace 3 mg/ml, pracujeme na ledu pro zamezení polymerizace kolagenu
- Zneutralizovaný roztok kolagenu necháme polymerizovat v Amicon kolonkách v pokojové teplotě po dobu 10 minut
- Po polymerizaci přidáme 50mM borátový pufr a inkubujeme 10 minut, pufr odstraníme centrifugací kolonek (14 000 rpm, 10 minut)
- Ke kolagenu přidáme Alexa Fluor NHS-ester barvicí roztok v borátovém pufru a inkubujeme v pokojové teplotě po dobu 1 hodiny (od této doby kolagen chráníme před nadbytečným světlem)
- Roztok odstraníme z kolonky centrifugací (14 000 rpm, 10 minut) a zbývající barvicí roztok odmyjeme 50mM TRIS pufrem po dobu 10 minut a odstraníme jej z kolonky centrifugací (14 000 rpm, 10 minut)
- Kolonku promýváme PBS pufrem 6-10x po dobu několika hodin, mezi jednotlivými kroky centrifugujeme pro odstranění pufru z kolonky (14 000 rpm, 10 minut)
- Barvený kolagen depolymerizujeme přidáním 200mM kyseliny chlorovodíkové a opatrně jej pipetou promícháme do rozpuštění, takto připravený kolagen může být skladován chráněn před světlem ve 4°C do následného použití
- Kyselinu chlorovodíkovou odstraníme centrifugací (14 000 rpm, 10 minut) a zaměníme ji za ledově vychlazenou 10mM kyselinu octovou
- Amicon kolonky otočíme a centrifugací (8 000 rpm, 5 minut) přemístíme roztok kolagenu do spodní zkumavky

- Kolagen neutralizujeme na ledu přidáním 10x DMEM a 10x rekonstitučního pufru v poměru 10:1:1, případně opatrným přidáním 1M hydroxidu sodného pro dosažení pH 7,4
- Neutralizovaný roztok inkubujeme na ledu po dobu 10 minut
- Kolagen nanese v tenké vrstvě na vychlazené a případně poly-L-lysinem pokryté sklíčka
- Vrstvu necháme polymerizovat ve 4-15 °C v závislosti na požadované podobě vláken do druhého dne
- Na připravený kolagen nanese buněčnou suspenzi, případně jej dále použijeme pro přípravu fibrilárního kolagenu o vysoké hustotě

#### 4.5.4 Fibrilární kolagen o vysoké hustotě

Metoda je převzata z Artym et al., 2015

- K potřebnému množství zásobního roztoku kolagenu přidáme pro neutralizaci 1/8 objemu 10x DMEM a 10x rekonstitučního pufru, pracujeme na ledu pro zamezení polymerizace kolagenu
- Pomocí pH papírku zkontrolujeme neutrální pH (7-7,5), v případě pH<7 neutralizujeme opatrným přidáváním 1M hydroxidu sodného
- Inkubujeme 5 minut na ledu a centrifugujeme (9 100 g, 3 min, 4 °C) pro odstranění bublin
- Na poly-L-lysinem pokrytý a předem vychlazený skleněný povrch nanese tenkou vrstvou kolagenu (dbáme na to, abychom kolagen aplikovali na střed jamky, nikoliv k okrajům)
- Kolagen necháme polymerizovat v 37 °C po dobu 30 minut  
*Pozn.: Je nezbytné, aby vrstva kolagenu byla plně polymerizovaná, v opačném případě dojde ke stečení kolagenu ke stěnám jamek při centrifugaci. Pokud k polymerizaci nedojde po uvedené inkubaci, vložíme destičky do 4 °C na alespoň 1 hodinu.*
- Připravený kolagen centrifugujeme s použitím adaptoru na centrifugaci destiček (3 500 g, 20 min, 25 °C)  
*Pozn.: Dbáme na dodržení daného násobku tíhového zrychlení a pokojové teploty, v opačném případě může opět dojít ke stečení kolagenu.*

- Centrifugovaný kolagen zafixujeme 4% paraformaldehydem s 5% sacharózou v 1x PBS po dobu 20 minut
- Opakovaně promyjeme v 1x PBS a zbytkové aldehydy inhibujeme pomocí DMEM média po dobu několika hodin (ideálně přes noc)  
*Pozn.: Je nezbytné, aby došlo k úplnému odstranění paraformaldehydu, který je toxický pro buňky. Odsávání tekutiny provádíme z okrajů jamek, aby nedošlo k porušení kolagenové vrstvy.*
- Na připravený kolagen naneseeme buněčnou suspenzi o požadovaném množství buněk

#### 4.5.5 Imunocytochemické barvení savčích buněk

- Buňky pro imunocytochemické barvení necháme růst na pokrytých sklíčkách nebo vrstvě kolagenu minimálně 12-24 hodin
- Buňky vyjmeme z termostatu, 2x opláchneme vychlazeným 1x PBS a fixujeme v 4% paraformaldehydu v 1x PBS po dobu 10-15 minut
- Po fixaci 3x opláchneme v 1x PBS a aplikujeme 0,3% Triton X-100 v 1x PBS pro permeabilizaci buněčných membrán po dobu 3-5 minut, následně 3x opláchneme v 1x PBS
- Pro barvení buněk faloidinem konjugovaným s fluorescenčním značením, aplikujeme faloidin ředěný v 1x PBS v poměru 1:50-100 a inkubujeme 20-30 minut, následně opět opláchneme 3x 10 minut v 1x PBS  
*Pozn.: V případě preparátů na sklíčku protilátky aplikujeme v podobě kapky na vrstvu parafilmu a sklíčka přiklopíme na vytvořené kapky, aby došlo k rovnoměrnému rozprostření malého množství protilátky po sklíčku. Je nezbytné udržovat vlhkost, abychom předešli vysušení sklíček.*
- V případě Ibidi nebo MatTek misek ponecháme preparát v roztoku 1x PBS, ve 4 °C a chráněn před světlem
- V případě preparátů na sklíčkách opláchneme sklíčka v destilované vodě pro odstranění přebytečných solí, odsajeme vodu pomocí buničiny a sklíčka přiklopíme vrstvou s buňkami na kapku (7 µl) montovacího roztoku na podložním sklíčku, sklíčka uchováváme ve 4 °C a chráněná před světlem

#### **4.5.6 Značení SNAP-MMP-14 pomocí substrátu SNAP-Surface**

- SNAP-Surface Alexa Fluor 488 je fluorescenční substrát neprocházející buněčnou membránou, který barví proteiny fúzované se značením SNAP lokalizované na membráně nebo v roztoku
- Zásobní roztok o koncentraci 1 mM naředíme v médiu s 10% FBS v poměru 1:200 (konečná koncentrace 5  $\mu$ M)
- Substrát v médiu promícháme pipetováním, abychom redukovali vzniklé pozadí po barvení
- Připravené médium se substrátem přidáme k buňkám a inkubujeme v termostatu 10-30 minut podle potřeby
- Poté buňky 3x opláchneme čerstvým médiem a pokračujeme ve fixaci preparátu, případně v mikroskopování živých buněk

#### **4.6 Analýza a statistické vyhodnocení**

Analýza degradace želatinu byla provedená pomocí programu ImageJ. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu SigmaPlot s použitím metody jednosměrná ANOVA. Symbol hvězdiček představuje hladinu významnosti (p-value) podle standardního označení:

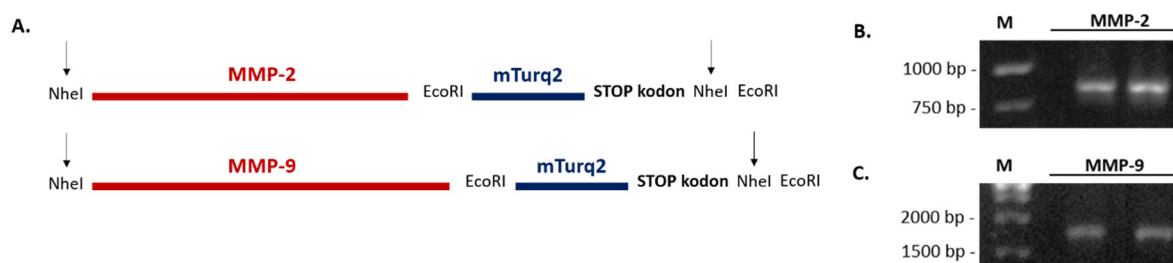
- \*  $p \leq 0,05$
- \*\*  $p \leq 0,01$
- \*\*\*  $p \leq 0,001$

## 5. Výsledky

### 5.1 Příprava konstruktů

#### 5.1.1 MMP-2-mTurquoise2/MMP-9-mTurquoise2

Kódující sekvence MMP-2-mTurq2 a MMP-9-mTurq2 byly připraveny komerční syntézou lineární DNA (obr. 9 A.). DNA byla amplifikována metodou PCR za použití primerů pro amplifikaci a polymerázy Q5. Konce purifikovaného produktu byly upraveny restriční endonukleázou NheI a inzert byl vložen do vektoru pSNAPf předem štěpeného enzymem NheI. Po transformaci bakterií byly kolonie pozitivní na přítomnost daného plazmidu detekovány metodou Colony PCR. Pro reakci byly použity ověřovací „forward“ primery pro MMP-2/MMP-9 v kombinaci s „reverse“ primerem pro SNAP-tag k ověření přítomnosti MMP-2/MMP-9 i SNAP-tag sekvence a správné orientace inzertu. V případě MMP-2 byl u pozitivních kolonií nasyntetizován produkt o velikosti 790 bp (obr. 9 B.), v případě MMP-9 produkt o velikosti 1684 bp (obr. 9 C.). Pozitivní kolonie byly následně použity pro izolaci plazmidové DNA, která byla ověřená restriční analýzou. Velikost připraveného konstruktu MMP-2-mTurq2 je 8333 bp, velikost MMP-9-mTurq2 je 8702 bp.

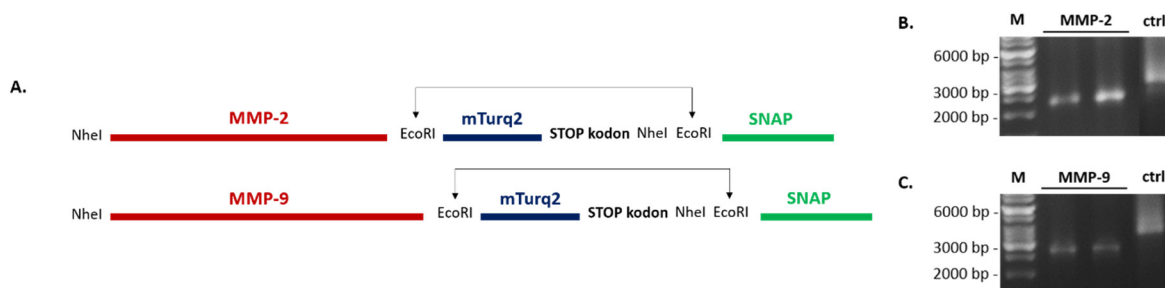


**Obr. 9:** A. Schématické znázornění sekvence MMP-2-mTurq2 a MMP-9-mTurq2 připravené komerční syntézou lineární DNA. Šipkou jsou značená restriční místa NheI, která byla použita pro úpravu konců DNA a následnou ligaci do vektoru pSNAPf. Velikost lineární DNA MMP-2-mTurq2: 2516 bp, MMP-9-mTurq2: 2885 bp. B., C. Výřez z výsledného agarózového gelu detekující kolonie pozitivní na přítomnost MMP-2-mTurq2 (B., 790 bp) a MMP-9-mTurq2 (C., 1684 bp) pomocí metody Colony PCR.

#### 5.1.2 MMP-2-SNAP/MMP-9-SNAP

Pro přípravu konstruktů MMP-2-SNAP a MMP-9-SNAP byly použity jako výchozí konstrukty MMP-2/MMP-9 se značením mTurq2 ve vektoru pSNAPf.

Odstranění sekvence mTurq2 se stop kodonem podmiňuje expresi MMP-2 a MMP-9 se značením SNAP (obr. 10 A.).



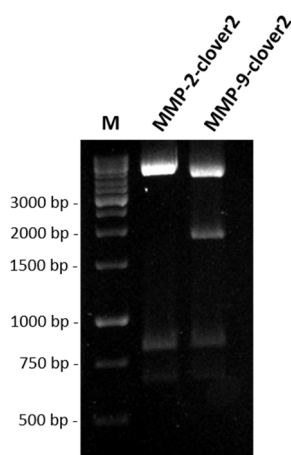
**Obr. 10:** A. Schématické znázornění přípravy konstruktů MMP-2 a MMP-9 se značením SNAP. Pro lepší přehlednost je uvedený lineární fragment pouze části cirkulárního vektoru. Šipkami je znázorněná sekvence, která byla pomocí restričního místa EcoRI odstraněná z plazmidu. Zbývá sekvence byla ligována bez inzertu. B., C. Výřez z výsledného agaróзовého gelu detekující kolonie pozitivní na přítomnost MMP-2-SNAP (B., 2260 bp) a MMP-9-SNAP (C., 2629 bp) pomocí metody Colony PCR. Jako kontrola (ctrl) byly použity bakterie pozitivní na přítomnost plazmidu MMP-2-mTurq2 a MMP-9-mTurq2 (3016/3385 bp).

Připravená plazmidová DNA MMP-2-mTurq2 a MMP-9-mTurq2 byla štěpená restričním enzymem EcoRI, čímž jsme vyštěpili fragment mTurq2 se stop kodonem. Z agaróзовého gelu byla izolována lineární DNA kódující sekvenci MMP-2/MMP-9 a vektoru pSNAPf (7577/7946 bp). Tyto fragmenty byly ligovány bez inzertu. Po transformaci bakterií byly pozitivní kolonie detekovány metodou Colony PCR s použitím ověřovacích primerů pro SNAP-tag, kdy byl v případě MMP-2-SNAP získán produkt o velikosti 2260 bp (obr. 10 B.), v případě MMP-9-SNAP produkt o velikosti 2629 bp (obr. 10 C.). Jako kontrola byly použity bakterie pozitivní na přítomnost konstruktů MMP-2-mTurq2/MMP-9-mTurq2 a s použitím shodných primerů byl nasyntetizován produkt o větší velikosti (3016/3385 bp). Izolovaná DNA z pozitivních kolonií byla dále ověřená restriční analýzou na nepřítomnost sekvence mTurq2.

### 5.1.3 MMP-2-Clover2/MMP-9-Clover2

Z důvodu přemístění naší laboratoře do BIOCEVU, kde není k dispozici mikroskop s adekvátním laserem pro excitaci, bylo nutno zaměnit značení mTurq2 za Clover2. Jako výchozí konstrukty byly použity MMP-2-mTurq2 a MMP-9-mTurq2, u kterých byla provedená záměna sekvence kódující mTurq2 za sekvenci Clover2. Připravená plazmidová DNA MMP-2-mTurq2 a MMP-9-mTurq2 byla štěpená

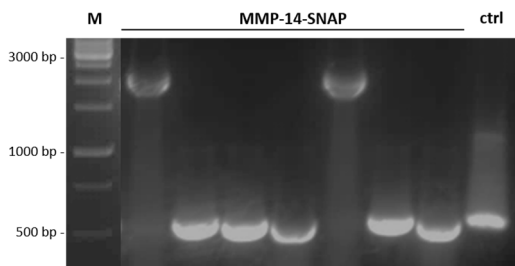
restrikčním enzymem EcoRI pro odštěpení fragmentu kódující mTurq2, obdobně jako v případě přípravy konstruktů MMP-2-SNAP/MMP-9-SNAP. Vektor Clover2 byl štěpen enzymem EcoRI a z agarózového gelu byl izolován fragment DNA, kódující značení Clover2, který jsme použili jako inzert (813 bp). Ligace s nadbytkem inzertu (molární poměr 10:1) vedla k záměně sekvence mTurq2 za sekvenci Clover2 a velikost výsledného produktu byla v případě MMP-2-Clover2 8394 bp a v případě MMP-9-Clover2 8763 bp. Po transformaci bakterií byla DNA z narostlých kolonií analyzována restrikčním štěpením pro detekci kolonií pozitivních na přítomnost inzertu Clover2 (obr. 11).



**Obr. 11:** Kontrolní restrikční štěpení DNA z kolonií pozitivních na přítomnost inzertu Clover2. Pro štěpení byla použita kombinace restrikčních endonukleáz SacII a SmaI. V případě MMP-2-Clover2 měly výsledné fragmenty velikost 6153 bp, 800 bp, 793 bp, 648 bp. V případě MMP-9-Clover2 4727 bp, 1795 bp, 800 bp, 793 bp a 648 bp.

#### 5.1.4 MMP-14-SNAP

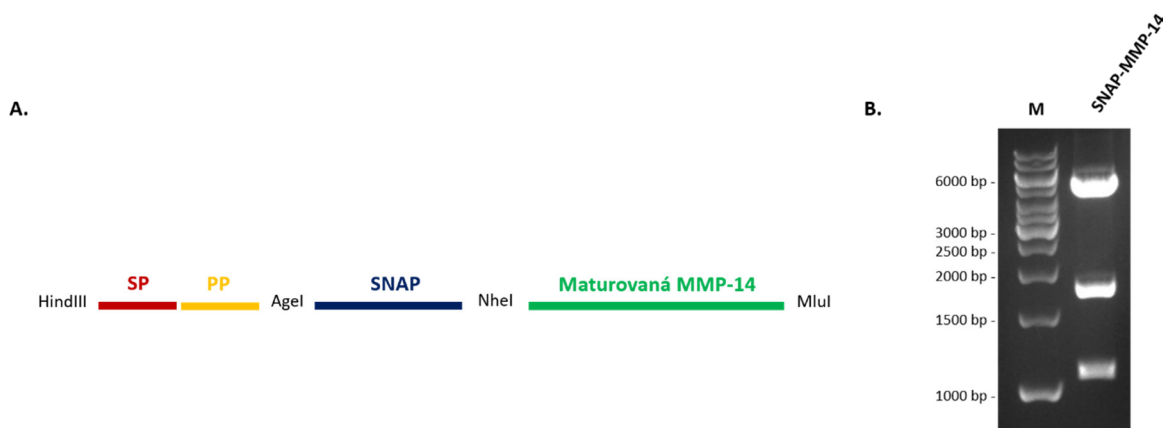
Pro přípravu konstruktů MMP-14 se značením SNAP na C konci, tzn. v intracelulárním prostoru, byl jako výchozí použit konstrukt MMP-14-EGFP. Plazmidová DNA MMP-14-EGFP byla štěpená endonukleázami NheI a AgeI a z agarózového gelu byl izolován fragment kódující MMP-14 (1827 bp). Izolovaná DNA byla vložena do vektoru pSNAPf linearizovaného pomocí restrikčních enzymů NheI a AgeI. Po transformaci bakterií byly pozitivní kolonie detekovány pomocí Colony PCR s použitím ověřovacích primerů pro SNAP-tag, kdy byl získán produkt o velikosti 2176 bp. Jako kontrola byl použit prázdný vektor s výsledným produktem 532 bp (obr. 12). Izolovaná DNA z pozitivních kolonií byla následně ověřena restrikční analýzou.



**Obr. 12:** Výřez z výsledného agarózového gelu detekující kolonie pozitivní na přítomnost plazmidu MMP-14-SNAP (2176 bp) pomocí metody Colony PCR. Jako negativní kontrola (ctrl) byl použit prázdný vektor pSNAPf, u něhož byl získán produkt o velikosti 532 bp.

### 5.1.5 SNAP-MMP-14

Konstrukt se značením SNAP na N konci, tzn. v extracelulárním prostoru, byl vytvořen pro značení membránově vázané MMP-14 a studium internalizace pomocí substrátu SNAP neprocházejícího buněčnou membránou. Při maturaci MMP-14 dochází k odštěpování signální sekvence a propeptidu na N konci, z tohoto důvodu byla sekvence pro SNAP vkládána downstream od odštěpované sekvence, aby nedošlo ke ztrátě značení při proteolytickém štěpení proteinu. Konstrukt je exprimován se značením SNAP vloženým mezi signální peptid s propeptidem a maturovanou formou MMP-14 a po proteolytickém štěpení při maturaci proteinu dojde k tvorbě proteázy MMP-14 lokalizované na membráně se značením SNAP na N konci v extracelulárním prostoru (obr. 13 A.).



**Obr. 13:** **A.** Schématické znázornění pořadí vložených inzertů do vektoru se zavedenými restrikčními místy. Pro přehlednost je znázorněn pouze vkládaný lineární fragment bez zbytku vektoru. Odštěpení signálního peptidu a propeptidu při maturaci proteinu podmiňuje expresi maturované formy MMP-14 se značením SNAP na N konci, tedy v extracelulárním prostoru. SP = signální peptid, PP = propeptid. **B.** Výsledný agarózový gel po restrikční analýze připraveného konstruktů. Plazmid byl štěpen restrikčními endonukleázami BamHI a PstI a velikost vzniklých fragmentů byla 4903 bp, 1730 bp a 1060 bp.

Pro přípravu konstruktů bylo nezbytné amplifikovat 3 následující fragmenty: sekvenci kódující signální peptid a propeptid, sekvenci kódující SNAP a sekvenci kódující maturovanou formu MMP-14 a zavést do amplifikovaných úseků štěpící místa. Toho bylo dosaženo metodou PCR s použitím amplifikačních primerů s nekomplementárními přesahy kódující místa rozeznávané restričními enzymy. Templátem pro PCR reakci byl pro úseky MMP-14 linearizovaný a purifikovaný konstrukt MMP-14-SNAP, pro sekvenci SNAP linearizovaný a purifikovaný vektor pSNAPf. Nejprve byla provedená testovací reakce s nižší teplotou pro nasedání nekomplementárních primerů v prvním cyklu reakce. Po ověření syntézy produktů pomocí agarózové elektroforézy byla provedená preparativní reakce, kdy byl použit jako templát produkt testovací reakce. Výsledným produktem PCR reakce byl fragment kódující signální peptid a propeptid o velikosti 372 bp, sekvence maturované formy o velikosti 1443 bp a sekvence kódující SNAP o velikosti 587 bp. Všechny uvedené produkty měly zavedená restriční místa pro následnou inzerci. Konce purifikovaných produktů PCR byly upraveny restričními endonukleázami a postupně vloženy do předem štěpeného a purifikovaného vektoru Clover2.

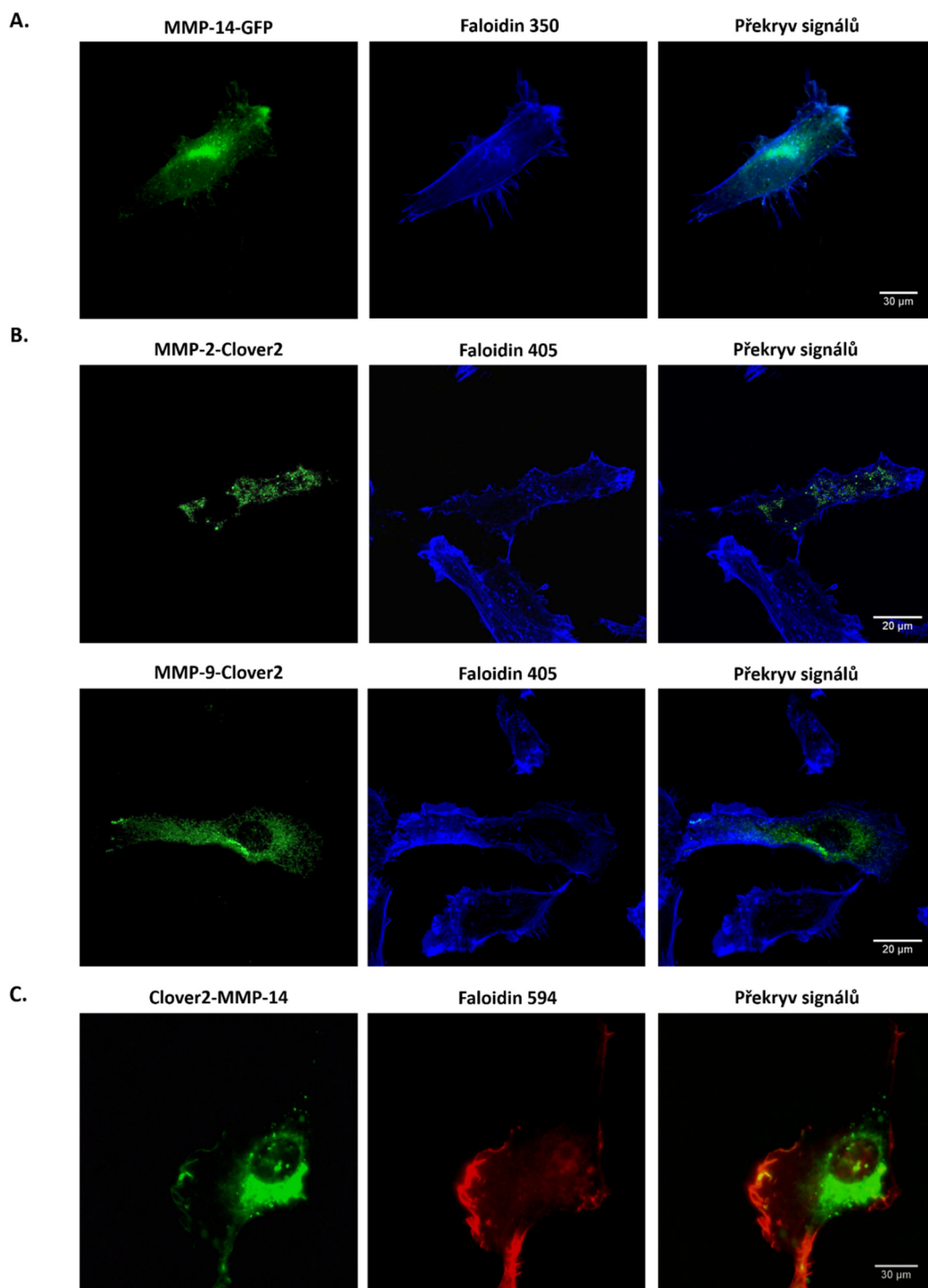
V prvním kroku byla vkládána sekvence kódující signální peptid s propeptidem, dále byla vkládána sekvence maturované formy MMP-14 a nakonec byla sekvence Clover2 zaměněná za sekvenci pro SNAP. Varianta konstruktů před záměnou Clover2 za SNAP byla použita jako kontrola exprese proteinu pomocí fluorescenční mikroskopie. Po první ligaci signálního peptidu a propeptidu byla z transformovaných bakterií izolovaná plazmidová DNA, která byla ověřená restričním štěpením na přítomnost daného inzertu. DNA z pozitivních kolonií byla použita pro vkládání následujícího inzertu. Po ověření přítomnosti inzertu maturované formy MMP-14 byla provedená záměna Clover2 za SNAP a přítomnost SNAP byla ověřená restriční analýzou (obr. 13 B.). Velikost výsledného konstruktů je 7701 bp.

*Pozn.: Amplifikační primery s nekomplementárními přesahy pro zavedení restričních míst byly navrženy za asistence Mgr. Vladimíra Čermáka, Ph.D.*

## **5.2 Fluorescenční mikroskopie proteáz ve 2D**

Expresí proteáz MMP-2, MMP-9 a MMP-14 fúzovaných s fluorescenčním značením Clover2, případně GFP byla ověřená pomocí fluorescenční mikroskopie. Buňky linie HT1080 byly transfekovány připravenou DNA. Následující den byla

buněčná suspenze přenesená na sklíčka pokrytá želatinou, případně fibronectinem. O den později po přisednutí buněk k podkladu, byly preparáty fixovány paraformaldehydem a aktinový cytoskelet byl značen faloidinem konjugovaným s Alexa Fluor 350/405/594 (obr. 14).

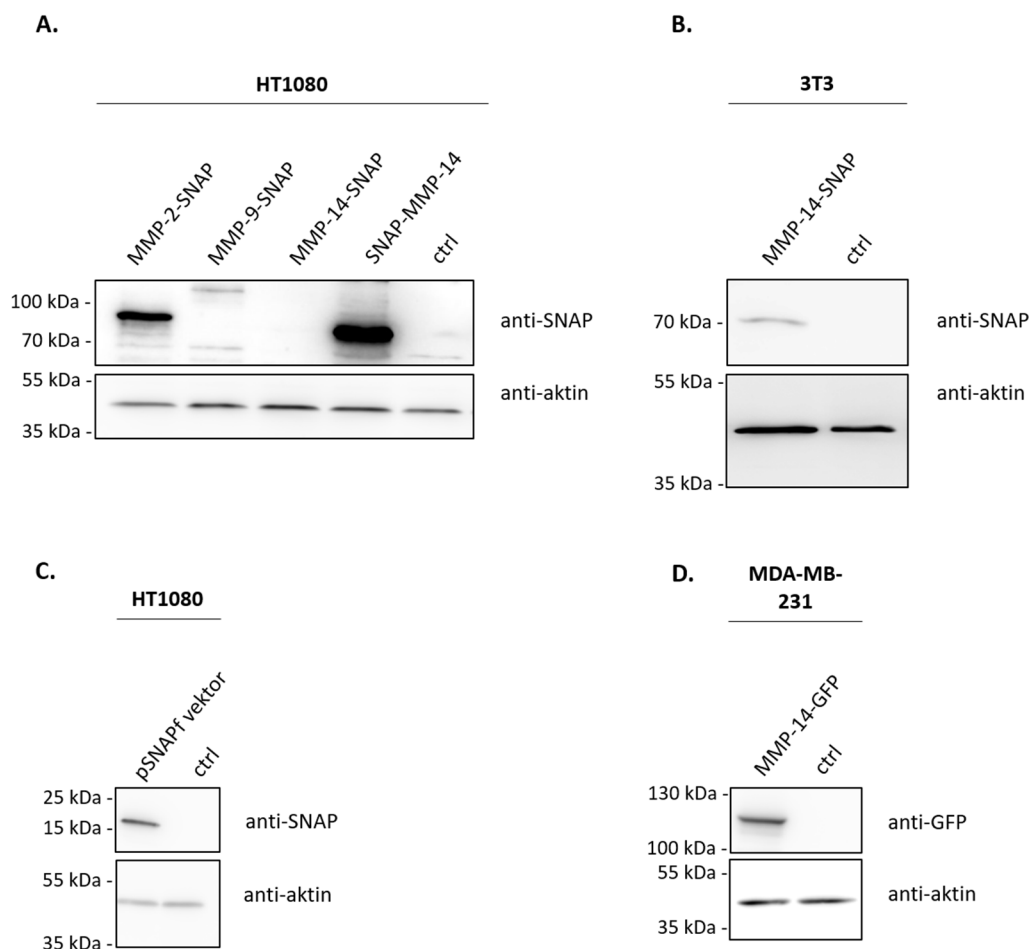


**Obr. 14:** **A.** Buňky linie HT1080 transientně transfekované MMP-14-GFP (zeleně) a fixované na sklíčkách pokrytých želatinou. Aktinový cytoskelet je značen faloidinem konjugovaným s Alexa Fluor 350 (modře). **B.** Buňky linie HT1080 transientně transfekované MMP-2-Clover2, MMP-9-Clover2 (zeleně) a fixované na sklíčkách pokrytých fibronectinem. Aktinový cytoskelet je značen faloidinem konjugovaným s Alexa Fluor 405 (modře). **C.** Buňky linie HT1080 transientně transfekované Clover2-MMP-14 s fluorescenčním značením na N konci proteinu (zeleně). Buňky jsou fixovány na sklíčkách pokrytých fibronectinem a aktinový cytoskelet je značen faloidinem konjugovaným s Alexa Fluor 594 (červeně).

### 5.3 Imunodetekce proteáz transfekovaných v savčích buňkách

Expres transientně transfekovaných proteáz fúzovaných se značením SNAP/GFP v savčích buněčných liniích byla detekována pomocí metody Western blot s použitím protilátky proti SNAP/GFP. Buňky linie HT1080, 3T3 a MDA-MB-231 byly transfekovány připravenou DNA. Po 24 hodinách bylo vyměněno médium za čerstvé. Následující den byly připraveny buněčné lyzáty, u kterých byla změřená celková koncentrace proteinů a vzorky byly naředěny na stejnou celkovou koncentraci proteinů v závislosti na nejnižší hodnotě. Jako kontrola byl použit lyzát z netransfekovaných buněk.

Po přenosu proteinů na nitrocelulózovou membránu byla exprese proteáz fúzovaných se značením SNAP detekována protilátkou proti SNAP (obr. 15 A., B.). Pro kontrolu správného srovnání celkové koncentrace proteinů na stejnou hodnotu a správné nanášky vzorků byla u všech imunoblotů použita protilátka proti aktinu. Jako kontrola funkčnosti protilátky proti SNAP byl použit lyzát z buněk exprimujících pouze samotný vektor pSNAPf bez inzertu (obr. 15 C.). Expres MMP-14 s fluorescenčním proteinem GFP byla ověřena pomocí protilátky proti značení GFP u buněk linie MDA-MB-231 (obr. 15 D.).



**Obr. 15:** **A.** Detekce exprese proteáz fúzovaných se značením SNAP u transientně transfekovaných buněk linie HT1080 pomocí metody Western blot s použitím protilátky proti SNAP. Ctrl = kontrolní netransfekovaná buněčná linie. Jako kontrola nanášky byla u všech imunoblotů použita protilátka proti aktinu. **B.** Exprese MMP-14-SNAP u transfekovaných buněk linie 3T3 detekovaná protilátkou proti SNAP. **C.** Kontrola funkčnosti protilátky proti SNAP u buněk linie HT1080 transientně transfekovaných vektorem pSNAPf bez inzertu. **D.** Kontrola exprese MMP-14 se značením GFP protilátkou proti GFP u buněk linie MDA-MB-231.

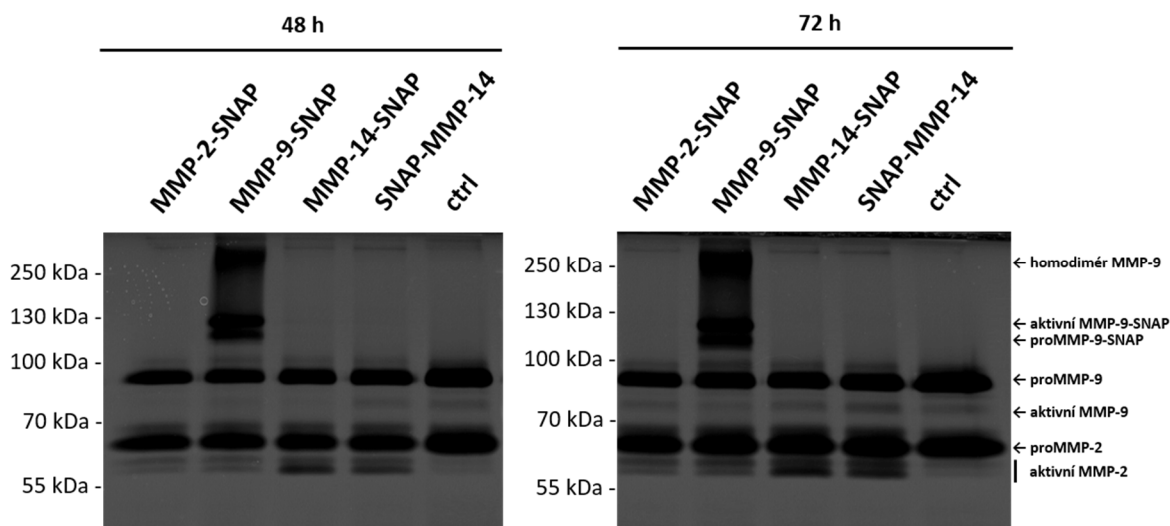
Z uvedených imunoblotů vyplývá, že exprese MMP-2-SNAP u transientně transfekovaných buněk linie HT1080 probíhá a je viditelně silnější, než exprese MMP-9-SNAP (obr. 15 A.). Přítomnost MMP-14-SNAP se podařilo detekovat pouze u fibroblastů 3T3 (obr. 15 B.), zatímco exprese konstruktů SNAP-MMP-14 je v buňkách linie HT1080 velmi výrazná (obr. 15 A.). Samotný vektor pSNAPf bez inzertu transfekován do buněk linie HT1080 je exprimován velmi silně a tento imunoblot potvrzuje specifičnost protilátky proti SNAP (obr. 15 C.). Expresi MMP-14-GFP v transientně transfekovaných buňkách linie HT1080 byla ověřena pomocí

fluorescenční mikroskopie, nicméně uvedený imunoblot prokazuje expresi MMP-14 fúzovanou se značením GFP také u buněk linie MDA-MB-231 (obr. 15 D.).

Pro studium proteáz fúzovaných jak s fluorescenčním značením, tak značením SNAP jsme se pokusili vyselektovat buňky linie HT1080 a MDA-MB-231 pozitivní na přítomnost daných konstruktů pomocí rezistence na antibiotikum G418. Po ověření exprese proteinů pomocí metody Western blot se přítomnost proteáz neprojevila i přes přetrvávající rezistenci buněk na antibiotikum. Kromě toho se na nitrocelulóзовé membráně objevily nespecifické signály, a proto jsme se rozhodli pro následující experimenty využívat transientní transfekci.

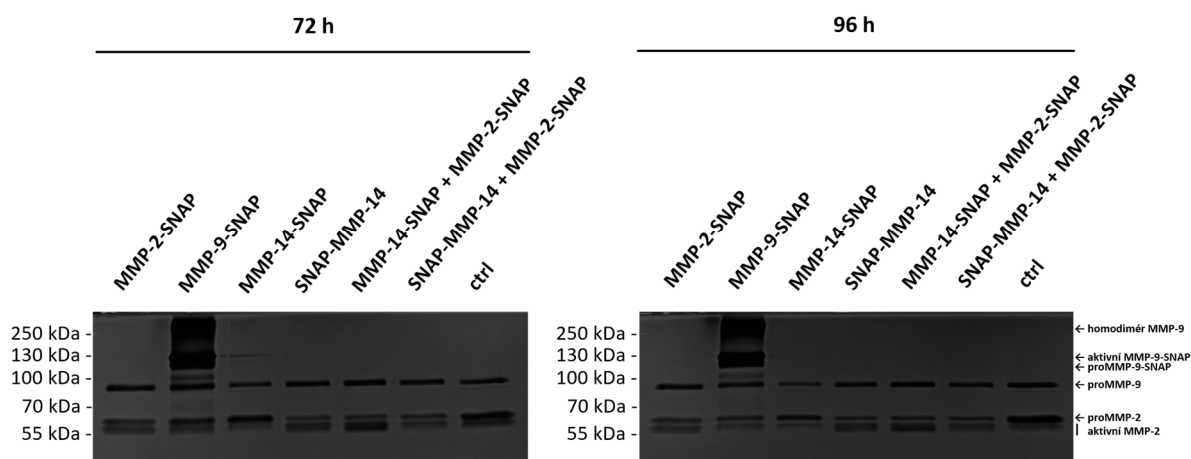
#### **5.4 Želatinová zymografie**

Pro studium aktivity proteáz se značením SNAP byla použita metoda želatinové zymografie. Buňky linie HT1080 byly transientně transfekovány připravenou DNA a následující den vysety na 24-jamkovou destičku v počtu 200 000 buněk pro každý konstrukt. Poté byly buňky kultivovány v médiu bez přidaného séra a byl odebrán vzorek média po 48, 72 a 96 hodinách. Po aktivaci proteáz v želatinovém gelu dochází k degradaci želatiny, která je substrátem proteolytických enzymů. Aktivitu proteáz detekujeme jako neobarvená místa v polyakrylamidovém gelu z důvodu chybějící želatiny. Výsledné želatinové gely jsou foceny v negativu pro lepší viditelnost degradovaných míst.



**Obr. 16:** Želatinový gel po působení proteáz přítomných v médiu u transientně transfekovaných buněk linie HT1080. Buňky byly transfekovány proteázami fúzovanými se značením SNAP. Médium bylo odebíráno po 48 a 72 hodinách. Jako kontrola (ctrl) byly použity netransfekované buňky linie HT1080.

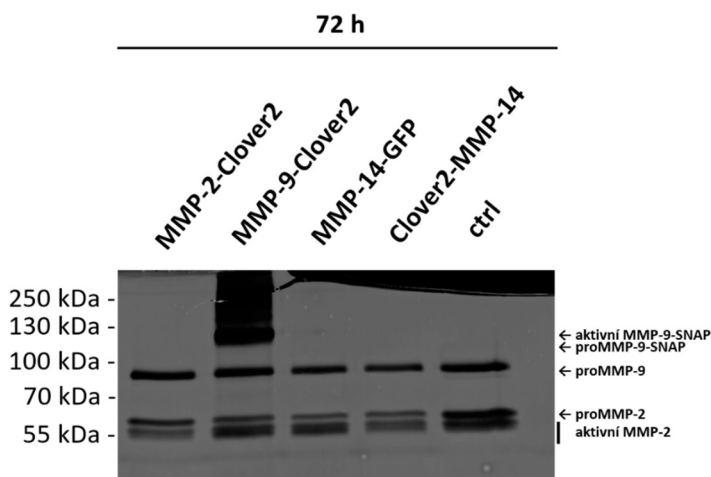
Degradované oblasti vyskytující se u všech vzorků včetně kontrolních poukazují na aktivitu endogenních proteáz. U buněk transfekovaných MMP-9-SNAP je vysoká degradační aktivita, která velikostně odpovídá proenzymu, štěpené formě MMP-9-SNAP a homodimeru MMP-9. Buňky exprimující MMP-14-SNAP a SNAP-MMP-14 vykazují zvýšenou proteolytickou aktivitu proforem MMP-2. Aktivitu MMP-2-SNAP v médiu se nepodařilo detekovat. Z tohoto důvodu byly pro další experiment použity buňky současně transfekovány MMP-2 a MMP-14 pro možnou aktivaci exprese MMP-2 (obr. 17).



**Obr. 17:** Želatinová zymografie proteáz přítomných v médiu u transientně transfekovaných buněk linie HT1080. Buňky byly transfekovány proteázami fúzovanými se značením SNAP. Médium bylo odebíráno po 72 a 96 hodinách. Jako kontrola (ctrl) byly použity netransfekované buňky linie HT1080.

U buněk transientně transfekovaných MMP-2-SNAP se ani po zopakování experimentu nepodařilo detekovat degradační aktivitu, zatímco degradační aktivita MMP-9-SNAP je velmi výrazná jako u předchozího výsledku. U vzorku MMP-14-SNAP byl získán odlišný výsledek s ohledem na předchozí zymografii. V tomto případě došlo k silnější aktivaci neštěpených proforem MMP-2 a tento výsledek je shodný s negativní kontrolou. U konstruktu SNAP-MMP-14 s extracelulárním značením došlo k aktivaci štěpených proforem MMP-2. Při kotransfekci MMP-2-SNAP s MMP-14-SNAP/SNAP-MMP-14 také došlo k aktivaci štěpené formy MMP-2, silněji u varianty s MMP-14-SNAP.

Pro další experiment byly použity buňky linie HT1080 transientně transfekované proteázami fúzovanými s fluorescenčním značením Clover2 a GFP, aby došlo k vyloučení možného vlivu značení SNAP na správnou funkci proteáz (obr. 18).



**Obr. 18:** Želatinová zymografie proteáz přítomných v médiu u transientně transfekovaných buněk linie HT1080. Buňky byly transfekovány proteázami fúzovanými se značením Clover2/GFP. Médium bylo odebíráno po 72 hodinách. Jako kontrola (ctrl) byly použity netransfekované buňky linie HT1080.

Želatinová zymografie s užitím média buněk transientně transfekovaných proteázami fúzovanými s fluorescenčním značením byla provedená z důvodu vyloučení možného vlivu značení SNAP na správnou funkci proteáz. V případě MMP-2-Clover2 nebyla prokázána žádná degradační aktivita. V případě MMP-9-Clover2 byl získán stejný výsledek jako u MMP-9-SNAP, oba konstrukty jsou tedy funkční a dochází ke správné sekreci MMP-9-SNAP/MMP-9-Clover2 do média. V případě MMP-14 fúzované se značením GFP dochází ke stejnému efektu jako u MMP-14-SNAP na obr. 16 a aktivované jsou štěpené proformy MMP-2. U Clover2-MMP-14 se značením Clover2 na extracelulárním konci byl získán obdobný výsledek jako v případě SNAP-MMP-14. Větší aktivita vlivem endogenní proteáz u negativní kontroly je pravděpodobně způsobená vyšším počtem buněk, jelikož transfekční agens může snížit viabilitu buněk. Případně transfekce může snížit expresi endogenních proteáz, a proto v případě netransfekovaných kontrolních buněk je proteolytická aktivita vyšší.

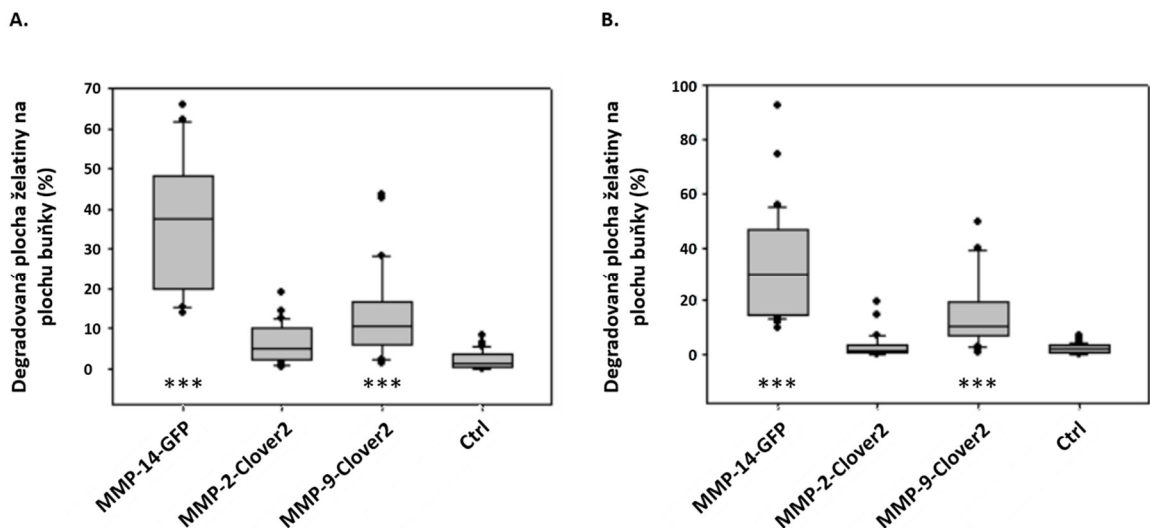
## 5.5 *In situ* degradace želatiny

Pro srovnání proteolytické aktivity u buněk transfekovaných připravenými konstrukty vzhledem k buňkám s endogenní proteolytickou aktivitou byla použita metoda *in situ* degradace želatiny. Buňky linie HT1080 byly transfekovány konstrukty proteáz fúzovaných s fluorescenčním značením GFP/Clover2 a následující den bylo médium vyměněno za čerstvé bez přítomnosti transfekčního agens. O den později byly

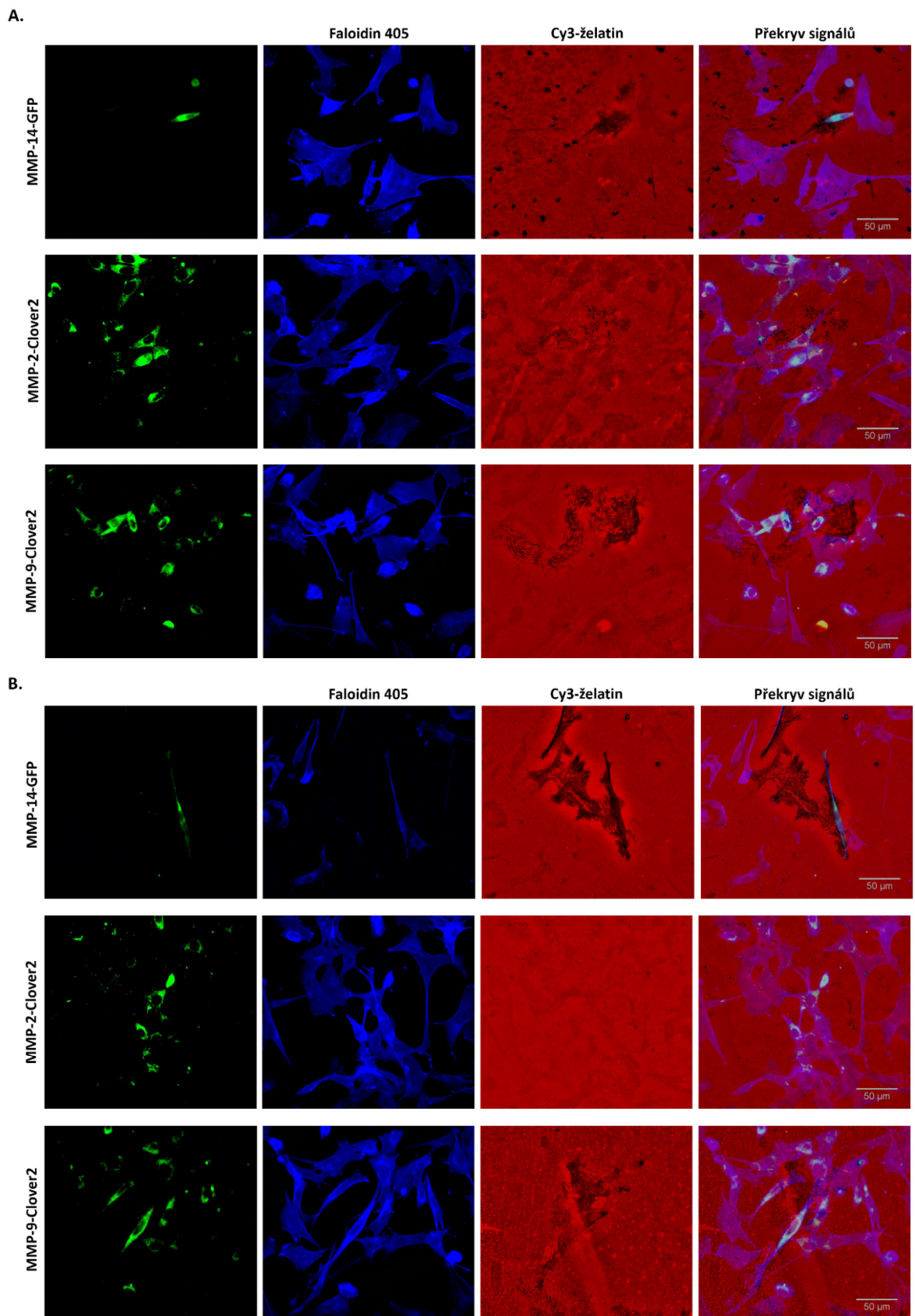
buňky vysety na sklíčka pokrytá fluorescenční želatinou paralelně s přítomností inhibitoru proteáz GM6001 a bez tohoto inhibitoru. Inhibitor byl použit pro zamezení degradace želatiny během přisedání buněk k podkladu a ke spuštění degradace až po přisednutí na sklíčka. Po rovnoměrném rozprostření buněk (cca 4 hodiny) bylo vyměněno médium za čerstvé u buněk s přítomností GM6001 a buňky byly nadále kultivovány po dobu 15 hodin. Následně byly fixovány 4% paraformaldehydem a aktinový cytoskelet byl značen pomocí faloidinu konjugovaným s Alexa Fluor 405.

Pro porovnání degradace u buněk transfekovaných připravenými konstrukty s kontrolními buňkami linie HT1080 byly pořízeny snímky z fluorescenčního mikroskopu, které byly vyhodnocovány pomocí programu ImageJ. Analýza spočívala v náhodném výběru transfekované, případně kontrolní buňky bez viditelnosti degradované plochy, aby nedošlo k ovlivnění výběru. Tvar buňky byl ručně obtáhnut pomocí značeného aktinu a byla vypočtená plocha buňky v  $\mu\text{m}^2$  podle nastaveného měřítka kalibrovaného mikroskopu. Následně byl obrys buňky zkopírován do červeného kanálu, ve kterém byly pořízeny snímky fluorescenční želatinu a pomocí funkce Threshold a následné analýzy byla vypočtena plocha bez fluorescenčního signálu pod vyznačenou buňkou v  $\mu\text{m}^2$ . Rozmezí funkce Threshold bylo nastaveno automaticky, případně poupraveno, aby do výsledné analýzy nebylo započteno případné poškození želatinu vzniklé manipulací se sklíčky. Pro každý konstrukt a kontrolu bylo vyhodnoceno 30 buněk. Pro analýzu byly vybírány pouze buňky znatelně exprimující dané konstrukty, naopak jako kontrolní ty, u kterých šlo s jistotou říct, že nebyly transfekované.

Následně byl vypočten poměr degradované oblasti pod buňkou a buněčné plochy v procentech pro připravené konstrukty proteáz fúzovaných s fluorescenčním značením, včetně kontroly a v přítomnosti i nepřítomnosti inhibitoru proteáz GM6001. Výsledné porovnání degradace u transfekovaných buněk ke kontrolním netransfekovaným buňkám bylo statisticky vyhodnoceno pomocí programu SigmaPlot s použitím metody jednosměrná ANOVA a metody Holm-Sidak. Výstup z programu je prezentován v podobě grafu se zaznamenanou hladinou významnosti (p-value) (obr. 19). Také jsou uvedeny reprezentativní snímky z fluorescenčního mikroskopu (obr. 20).



**Obr. 19:** Výsledný graf statistické analýzy degradace pomocí programu SigmaPlot. Buňky linie HT1080 byly transfekovány danými konstrukty a degradace byla porovnávána s kontrolními netransfekovanými buňkami (Ctrl). Graf **A.** znázorňuje výsledné poměry v nepřítomnosti inhibitoru proteáz GM6001, graf **B.** v přítomnosti inhibitoru proteáz při přisedání buněk k podkladu. Chybové úsečky značí standardní chybu. Symbol hvězdičky označuje hladinu významnosti vzhledem k negativní kontrole (Ctrl). V případě MMP-2-Clover2 chybí hladina významnosti z důvodu nesignifikantního rozdílu vzhledem ke kontrole ( $p = 0,138/0,885$ ).



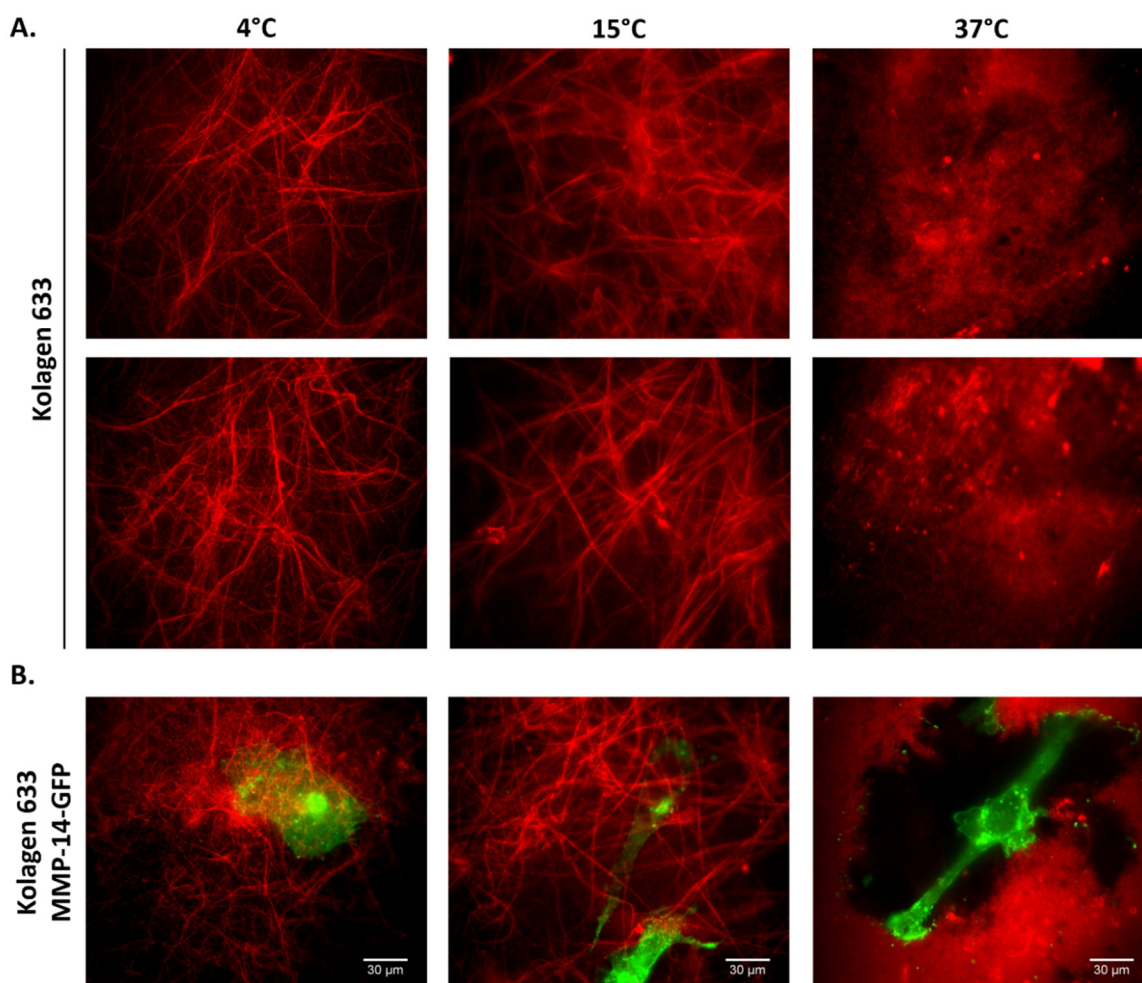
**Obr. 20:** Reprezentativní snímky z fluorescenčního mikroskopu, které byly použity pro následnou analýzu degradace u buněk transfekovaných značenými proteázami v porovnání s kontrolními buňkami linie HT1080. Pro viditelnost tvaru buňky byl značen aktinový

cytoskelet pomocí faloidinu 405. Degradované plochy lze detekovat jako plochy v želatině značené Cy3 bez fluorescenčního signálu. Nespecifické degradace, vzniklé při manipulaci se sklíčky, nikoliv vlivem proteáz, byly upraveny pomocí hladiny funkce Threshold, aby nebyly započítávány do buněčné degradace. U buněk na obrázku **A.** nebyl použit inhibitor. K buňkám na obrázku **B.** byl přidán inhibitor proteáz GM6001, který byl odmyt po přisednutí buněk k podkladu.

## **5.6 Optimalizace přípravy 3D matrice**

Pro naše účely byl využíván jako 3D matrice fluorescenční kolagen, případně fibrilární kolagen o vysoké hustotě s fluorescenčním značením nebo bez značení. Příprava matrice vychází z protokolů uvedených v Doyle, A. D. 2015 a Artym et al., 2015. Nicméně bylo potřeba optimalizovat přípravu vzhledem k možnostem naší laboratoře. Jednalo se především o zvolení nejvhodnější koncentrace fluorescenční barvy, odstranění nadbytečné barvy z kolagenových vláken, polymerizaci kolagenu do fibrilárních vláken, vhodná volba typu kolagenu a vytvoření viabilního prostředí pro následnou kultivaci buněk.

Příprava fluorescenčního kolagenu byla optimalizována pro vizualizaci interakce invazivních struktur nádorových buněk s extracelulárním prostředím a případné degradace kolagenových vláken. Příprava fluorescenčního kolagenu zahrnuje polymerizaci kolagenu, fluorescenční značení kolagenových vláken a odstranění nenavázané barvy, následně depolymerizaci vláken v kyselém prostředí a po neutralizaci opětovná polymerizace ve vhodné teplotě podle požadovaných vlastností vláken.

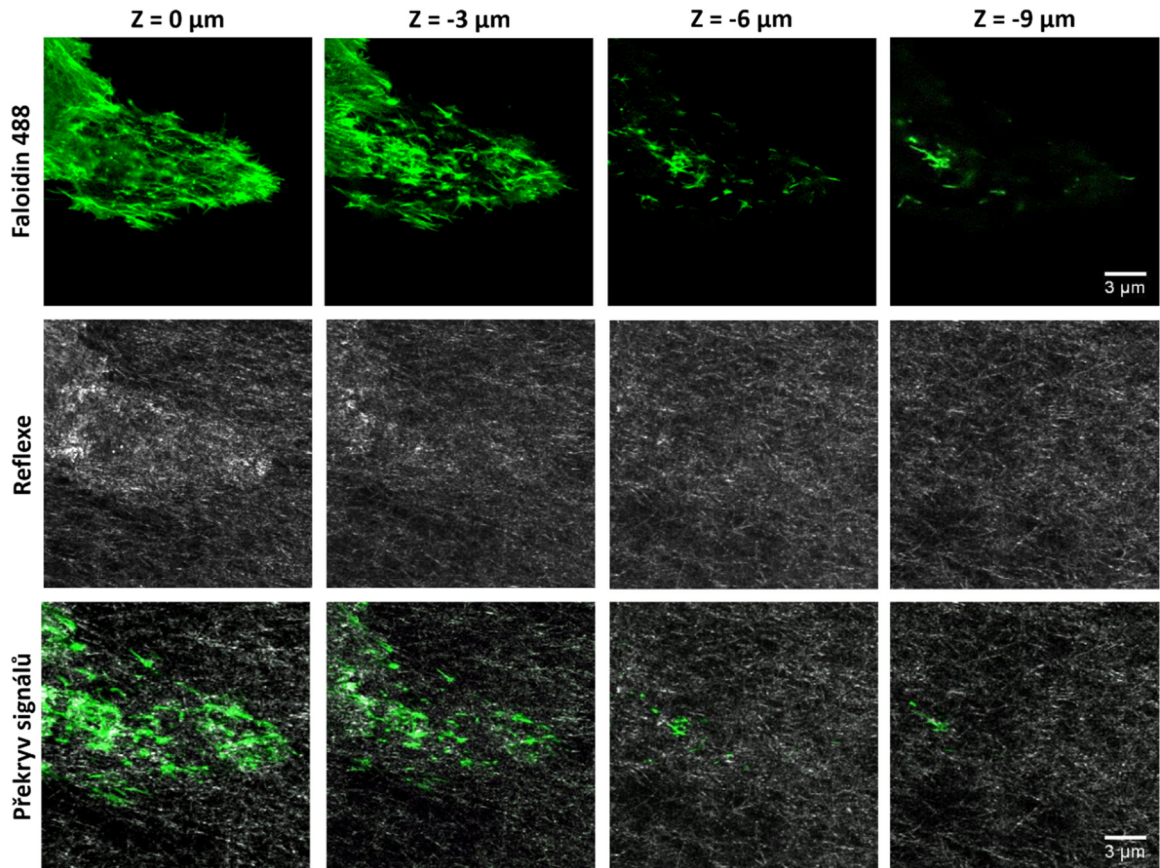


**Obr. 21:** **A.** Výsledná struktura fluorescenčního „rat tail“ kolagenu značeného Alexa Fluor 633, který byl opětovně polymerizován ve 4, 15 a 37 °C. **B.** Buňky linie MDA-MB-231 transientně transfekované MMP-14-GFP vyšetě na kolagen polymerizovaný v odlišných teplotách podle požadovaných vlastností kolagenu.

Z obr. 21 je zřejmé, že největší vliv na vlastnosti kolagenových vláken má teplota, ve které dochází k opětovné polymerizaci. Zatímco v nižší teplotě se vytváří viditelná kolagenová vlákna o vysoké hustotě, se stoupající teplotou počet vláken klesá. Teplota 37 °C indukuje tvorbu drobných vláken, která nejsou rozeznatelná a je zjevná degradace způsobená buňkami linie MDA-MB-231 transientně transfekovaných MMP-14-GFP.

Příprava vláknitého kolagenu o vysoké hustotě zahrnuje centrifugaci polymerizované vrstvy kolagenu, pomocí které je dosaženo komprese a získáme tak kolagen o několikanásobně vyšší hustotě. Pro tento postup lze využít i fluorescenčně značený kolagen, ale nejprve bylo potřeba optimalizovat přípravu, jelikož připravený značený kolagen má nižší hustotu a při centrifugaci docházelo k stečení kolagenu ke

stěnám jamek. Z toho důvodu je nutné Ibidi, případně MatTek misky předem pokryt poly-L-lysinem, vytvořit tenkou vrstvu kolagenu a upravit podmínky pro centrifugaci.

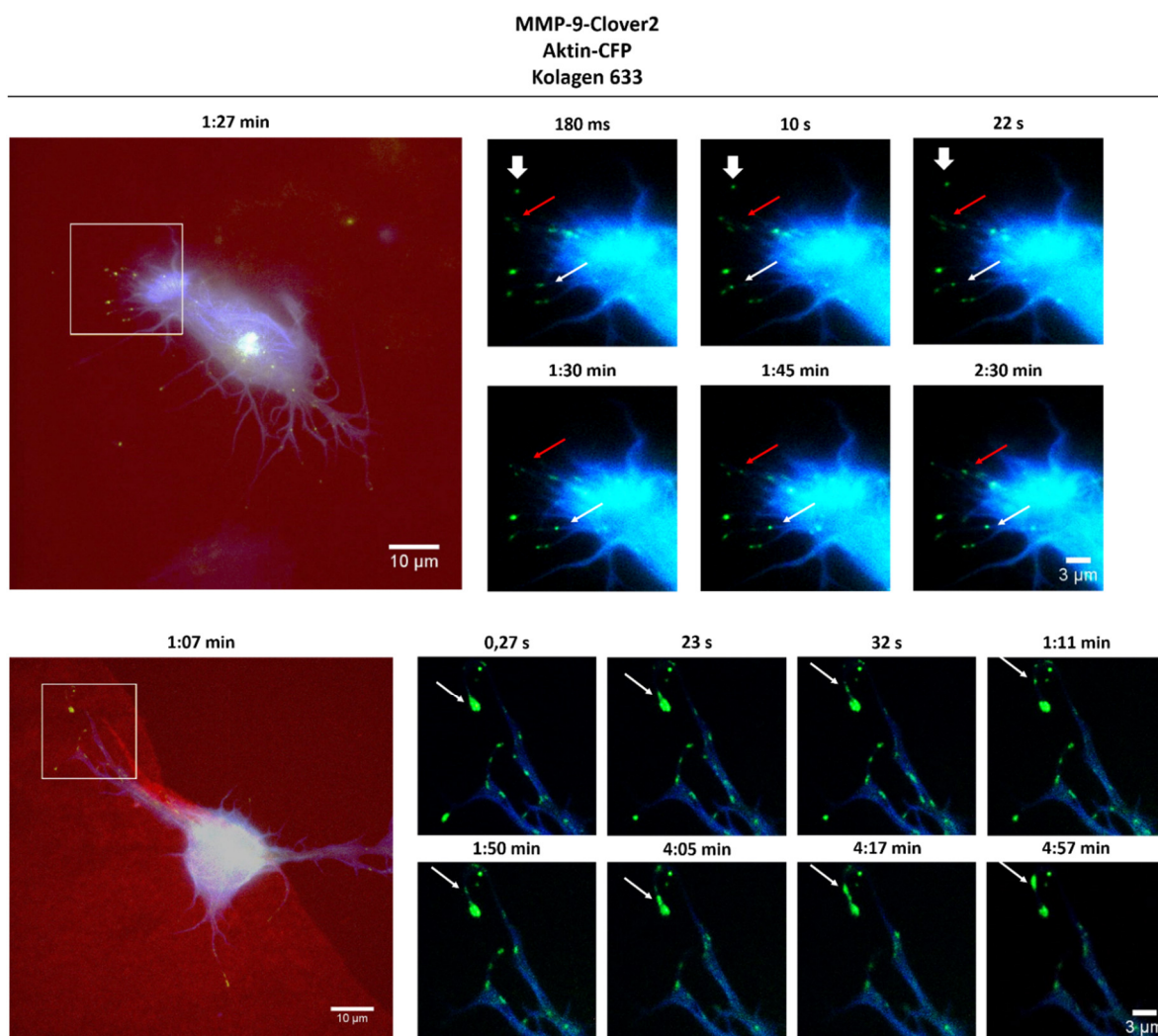


**Obr. 22:** Obrázek představuje postupné konfokální řezy buňkou linie MDA-MB-231 se značeným aktinovým cytoskeletem pomocí faloidinu konjugovaným s Alexa Fluor 488, která je fixovaná na vláknitém kolagenu o vysoké hustotě připraveného centrifugací. Struktura kolagenu je zobrazená pomocí reflexe. Je zřetelné, že fibrilární kolagen vytváří 3D matici a buněčné výběžky prochází do kolagenové matrix.

## 5.7 Lokalizace a dynamika proteáz ve 3D prostředí

### 5.7.1 MMP-9

Pro sledování lokalizace MMP-9 u živých buněk na fluorescenčním vláknitém kolagenu o vysoké hustotě byly transfekovány buňky linie HT1080 MMP-9-Clover2 a aktinem konjugovaným s CFP. Snímky byly pořízeny pomocí přístroje Nikon Ti-E s možností environmentální kontroly pro udržení teploty 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> a 100% vlhkosti.



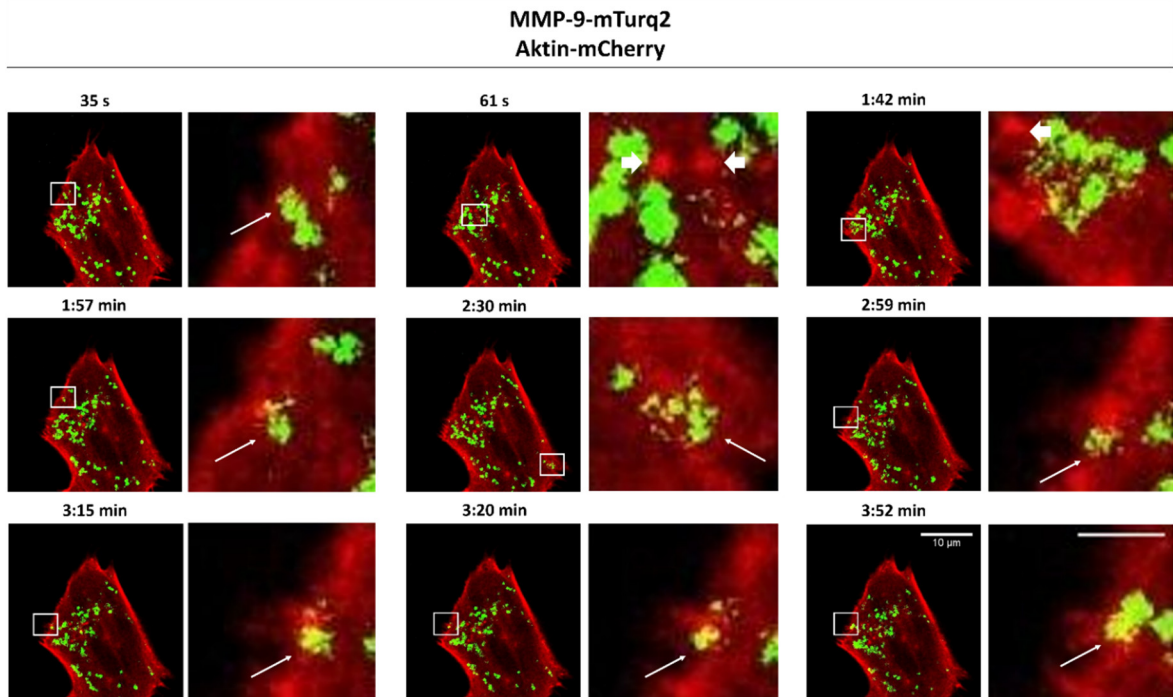
**Obr. 23:** Dynamika váčků s MMP-9 u buněk linie HT1080 transientně transfekované současně MMP-9-Clover2 (zeleně) a aktinem značeným CFP (modře). 3D matrici představuje fluorescenční vysoce zahuštěný kolagen (červeně). Výřezy na pravé straně zobrazují detail oblasti vyznačené obdélníkem na obrázku celé buňky v odlišných intervalech. Pro lepší viditelnost není v těchto detailů zobrazen fluorescenční kolagen. Tenkými bílými a červenými šipkami jsou označeny váčky, u kterých byla pozorována dynamika v daném časové úseku. Plná bílá šipka poukazuje na váček, který byl pravděpodobně uvolněn do extracelulárního prostředí.

Z obr. 23 je viditelné, že dochází k transportu váčků s MMP-9 do fibrilárních aktinových výběžků, kde se váčky hromadí a pravděpodobně uvolňují do extracelulárního prostředí.

Pro další studium dynamiky a lokalizace MMP-9 ve 3D prostředí byly buňky linie MDA-MB-231 současně transfekované MMP-9-mTurq2 a aktinem značeným mCherry. Matrici představuje vláknitý kolagen o vysoké hustotě bez fluorescenčního

značení. Obrázky byly pořízeny v daných intervalech pomocí konfokálního mikroskopu Leica SP8 se zajištěním environmentální kontroly pro udržení viabilního prostředí.

*Pozn.: Všechny snímky v této diplomové práci, které byly získány pomocí konfokálního mikroskopu Leica SP8, byly pořízeny za asistence mého školitele RNDr. Ondřeje Toldeho, Ph.D. S mikroskopem Nikon Ti-E jsem pracovala samostatně.*

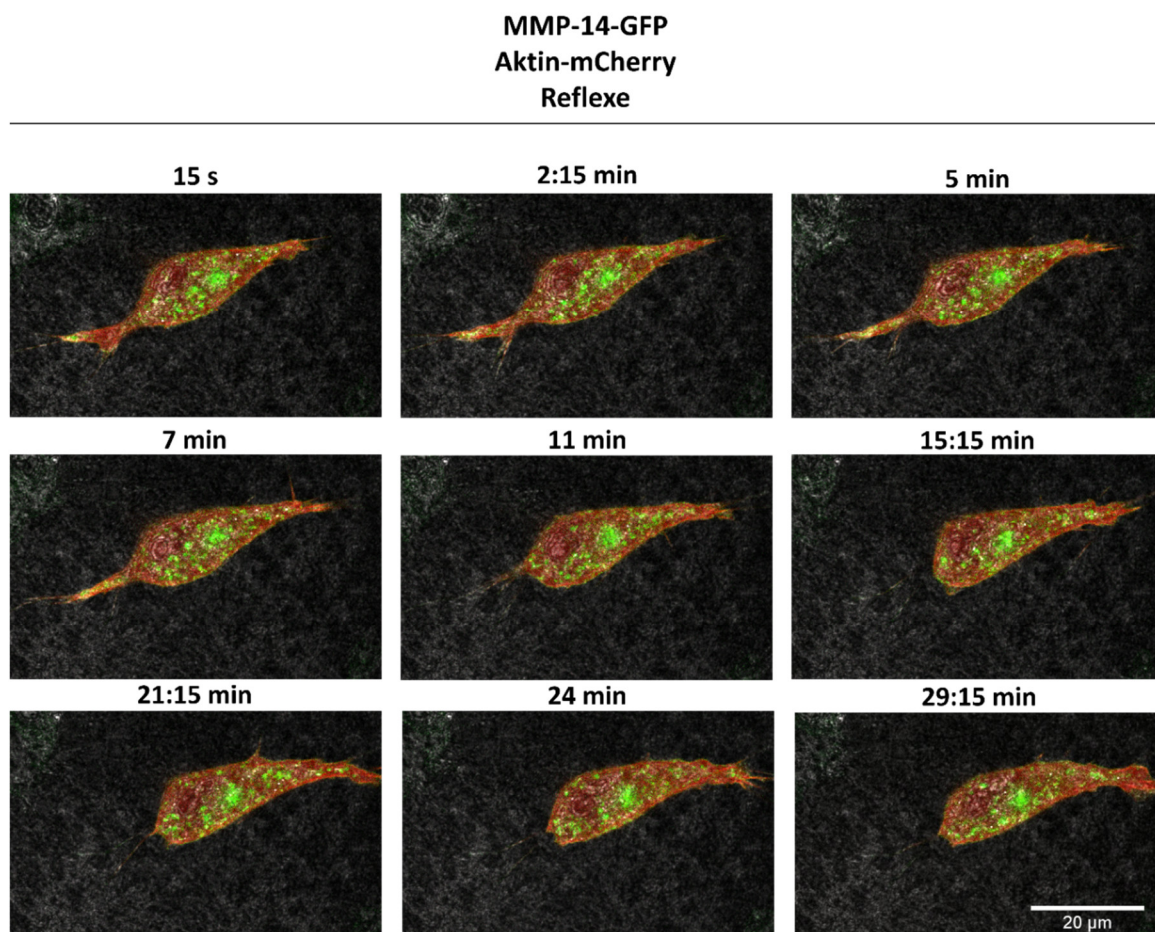


**Obr. 24:** Dynamika váčků u buněk linie MDA-MB-231 exprimující současně MMP-9-mTurq2 (zeleně) a aktin fúzovaný s mCherry (červeně). 3D matici představuje vláknitý kolagen o vysoké hustotě. Detailně jsou zobrazeny oblasti vyznačené obdélníky na obrázcích celých buněk. Měřítka u těchto detailů je 2 µm. Bílé tenké šipky poukazují na váčky v blízkosti rozvětveného aktinu. Akumulace struktur bohatých na aktin je označena bílými plnými šipkami.

Z obr. 24 v daných časových intervalech můžeme vypořadovat velmi dynamický pohyb váčků s MMP-9. Detailní výřezy poukazují na akumulaci váčků v oblasti zvýšeného výskytu invadopodií, které detekujeme nahromaděním aktinu. Dále dochází k směřování váčků k okrajům buňky, kde dochází k rozvětvení aktinu a k uvolňování MMP-9 do extracelulárního prostředí.

### 5.7.2 MMP-14

Dynamika a lokalizace váčků s MMP-14 byla studována u buněk linie MDA-MB-231 současně transfekovaných MMP-14-GFP a aktinem fúzovaným se značením mCherry. 3D matrix představuje fibrilární kolagen o vysoké hustotě, jehož struktura je zobrazená pomocí reflexe. Snímky byly pořízeny pomocí mikroskopu Leica SP8 se zajištěnou environmentální kontrolou v uvedených časových intervalech.

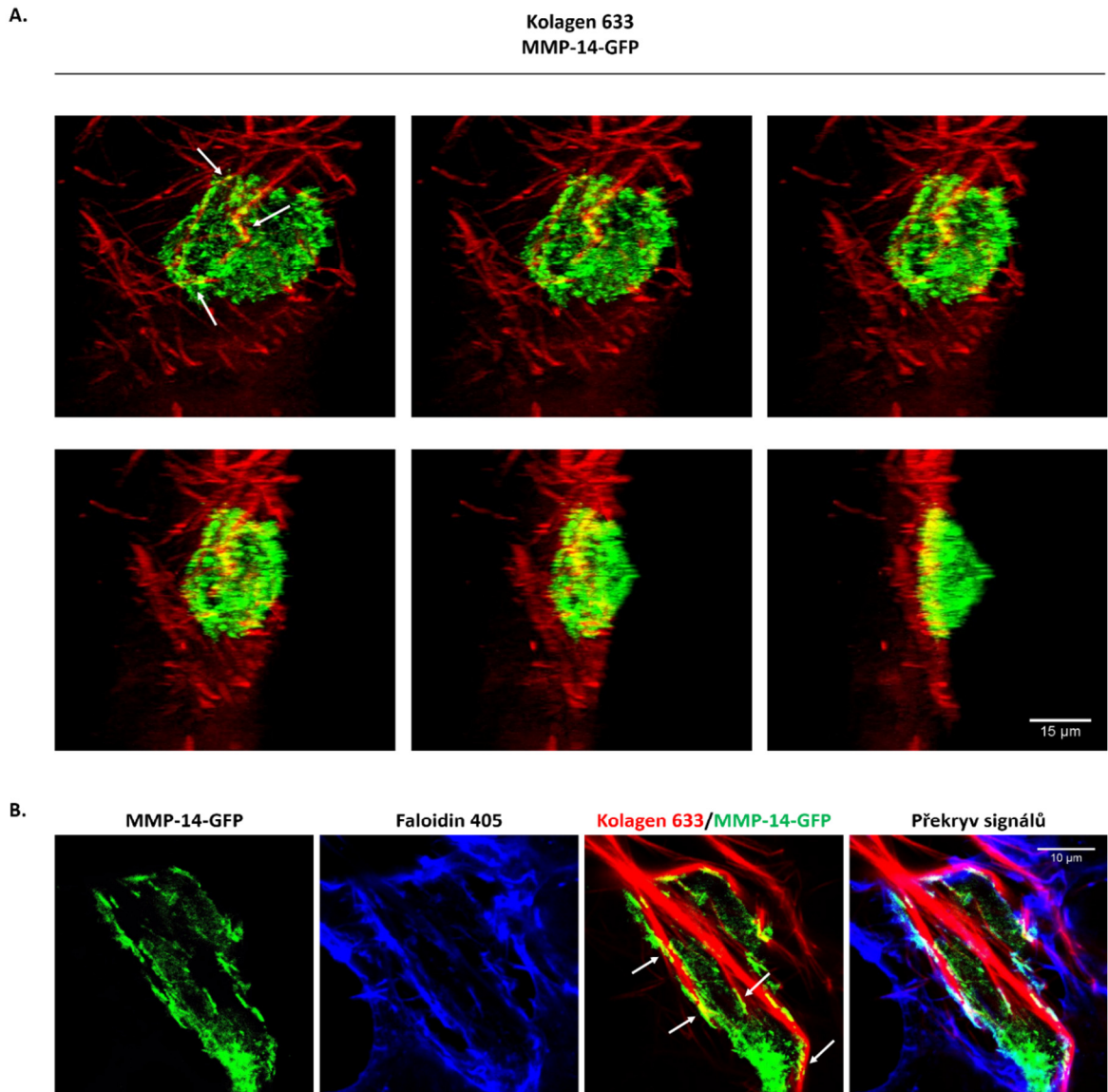


**Obr. 25:** Buňka linie MDA-MB-231 současně transfekovaná MMP-14-GFP (zeleně) a aktinem se značením mCherry (červeně). 3D matici představuje fibrilární kolagen o vysoké hustotě, jehož struktura je zobrazena pomocí reflexe.

Na uvedených snímcích u obr. 25 můžeme pozorovat zvýšenou akumulaci MMP-14 ve střední části buňky. V menší míře se váčky nachází po celé buňce v endozomálních kompartmentech. Váčky s MMP-14 jsou směřovány k vedoucímu okraji buňky.

Následující snímky představují buňky linie HT1080 transientně transfekované MMP-14-GFP a vyšetě na fluorescenčně značený kolagen o vysoké hustotě,

polymerizovaný v nižších teplotách pro vznik viditelných vláken. Snímky byly pořízeny pomocí mikroskopu Leica SP8 a preparáty byly před mikroskopií fixovány pomocí paraformaldehydu.

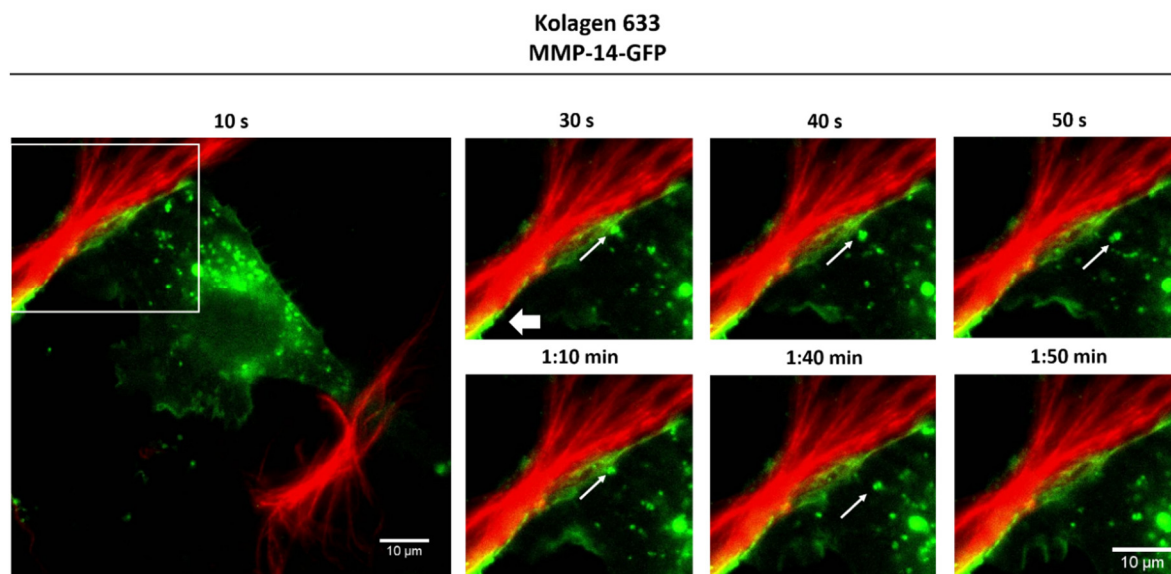


**Obr. 26:** **A.** Projekce buňky linie HT1080 exprimující MMP-14-GFP (zeleně) na fluorescenčně značeném kolagenu (červeně). Bílé šipky poukazují na lokalizaci MMP-14 na styku s kolagenovými vlákny. **B.** Buňka linie HT1080 transientně transfekovaná MMP-14-GFP (zeleně) interagující s vlákny fibrilárního kolagenu o vysoké hustotě (červeně). Po fixaci byl aktinový cytoskelet značen faloidinem konjugovaným s Alexa Fluor 405 (modře). Bílé šipky poukazují na nahromadění MMP-14 při styku buňky s kolagenovými vlákny.

Obr. 26 zobrazuje interakci MMP-14 s fluorescenčně značenými kolagenovými vlákny. Můžeme pozorovat zvýšený výskyt MMP-14 v adhezích interagujících

s kolagenovými vlákny jako překryv signálů MMP-14-GFP a fluorescenčně značeného kolagenu (označeno šipkami).

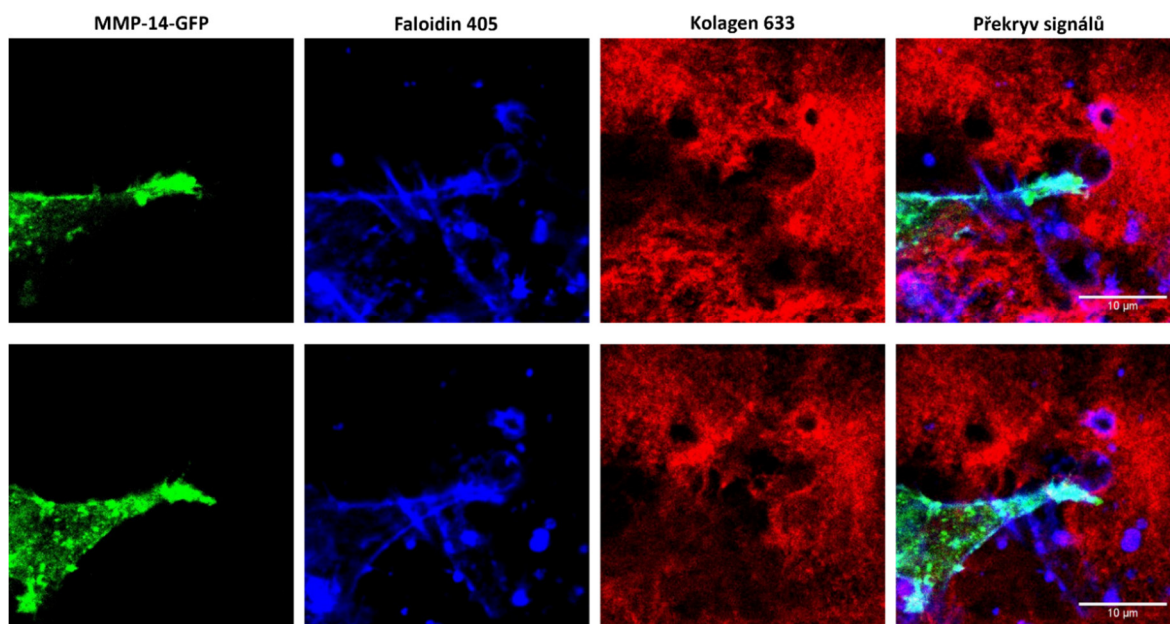
Následující snímky na obr. 27 poukazují na interakci živých buněk linie HT1080 s kolagenovými vlákny v různých časových intervalech a směřování pohybu váčků vzhledem k okolnímu prostředí. Snímky byly pořízeny pomocí mikroskopu Nikon Ti-E s možností environmentální kontroly pro udržení viability buněk.



**Obr. 27:** Interakce buňky linie HT1080 transfekované MMP-14-GFP (zeleně) s fluorescenčně značenými fibrilárními kolagenovými vlákny (červeně). V pravé části je detailně zobrazená oblast vyznačená obdélníkem na obrázku celé buňky v časových intervalech. Bílé tenké šipky poukazují na váček, který byl pravděpodobně internalizován. Plná šipka poukazuje na akumulaci MMP-14 podél kolagenového vlákna.

Z uvedených snímků v časových intervalech na obr. 27 vyplývá dynamický pohyb váčků a jejich směřování ke kolagenovým vláknům, nikoliv do volného 2D prostoru bez vláken. Interakce MMP-14 s kolagenovými vlákny je detekována jako překryv signálů (žlutě). Šipka poukazuje na váček, který byl pravděpodobně internalizován do buňky a poté dochází k transportu váčku mimo sledovanou rovinu, případně k jeho degradaci.

Na obr. 28 můžeme pozorovat buňky linie MDA-MB-231, které byly fixovány na fluorescenčně značeném fibrilárním kolagenu o vysoké hustotě polymerizovaném ve vyšší teplotě pro získání tenkých vláken a zvýraznění případné proteolytické degradace kolagenu. Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu Leica SP8.

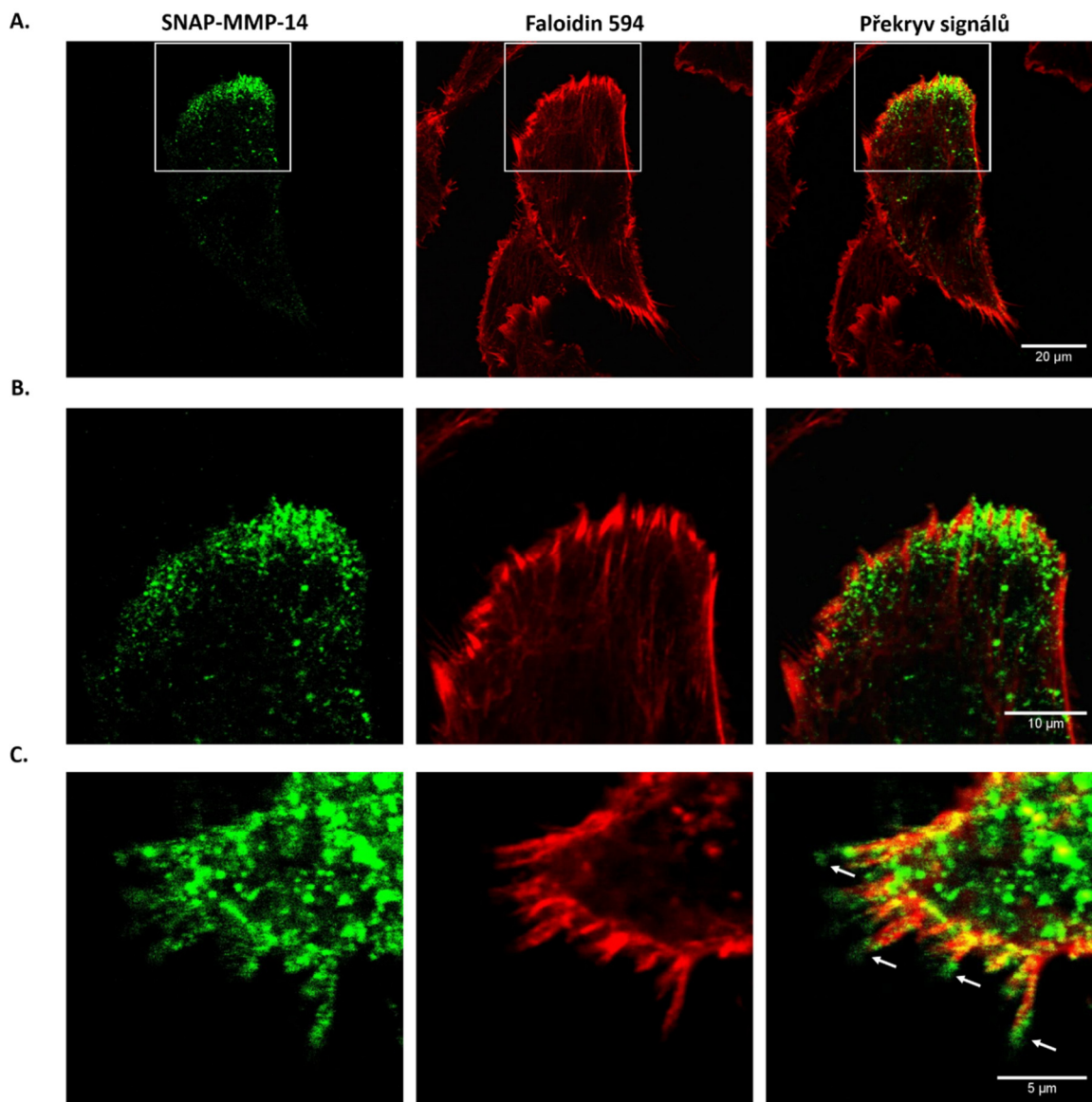


**Obr. 28:** Buňka linie MDA-MB-231 transientně transfekovaná MMP-14-GFP (zeleně) a vyseta na fibrilární kolagen o vysoké hustotě (červeně), který byl opětovně polymerizován ve 37 °C, a proto vytvořil velmi tenká vlákna. Po fixaci buněk byl aktinový cytoskelet značen pomocí faloidinu konjugovaným s Alexa Fluor 405 (modře). Zobrazena je stejná buňka s různou polohou osy z.

Z daných snímků fluorescenčně značeného kolagenu je viditelná degradace vláken pravděpodobně zapříčiněná buněčnými proteolytickými enzymy. Největší degradovaná oblast se tvarově podobá výběžku transfekované buňky, nicméně degradace se nachází i v okolí netransfekovaných buněk.

## 5.8 Internalizace a dynamika MMP-14

Pro studium internalizace MMP-14 z buněčné membrány byl vytvořen konstrukt se značením SNAP na extracelulárním konci proteinu. Pomocí substrátu SNAP neprocházejícího buněčnou membránou došlo k označení membránově vázané MMP-14 se značením SNAP na extracelulárním konci. Pro následující snímky byly buňky linie HT1080 transfekované SNAP-MMP-14 a inkubovány se substrátem SNAP-Surface po dobu 30 minut podle doporučení výrobce. Po odmytí substrátu byly preparáty fixovány a pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu Leica SP8.

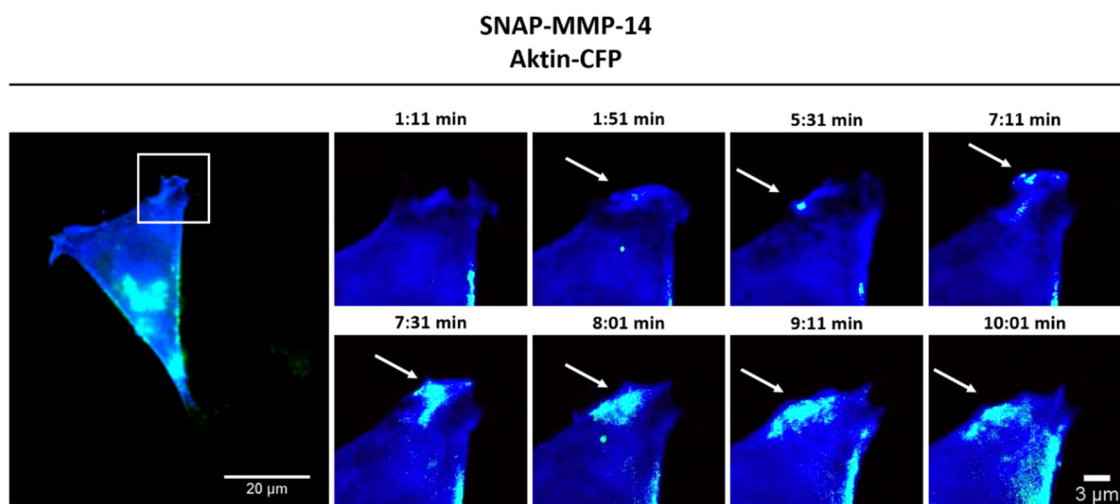


**Obr. 29:** A. Buňka linie HT1080 transientně transfekovaná SNAP-MMP-14 se značením SNAP v extracelulárním prostoru a značená pomocí substrátu SNAP-Surface 488 neprocházejícím buněčnou membránou (zeleně). Aktinový cytoskelet byl značen faloidinem 594 (červeně). B. Detail na vedoucí okraj buňky z obrázku A (výřez značen obdélníkem na obrázku A). C. Detail na výběžek jiné buňky linie HT1080 poukazující na lokalizaci SNAP-MMP-14 na buněčné membráně (označeno šipkami).

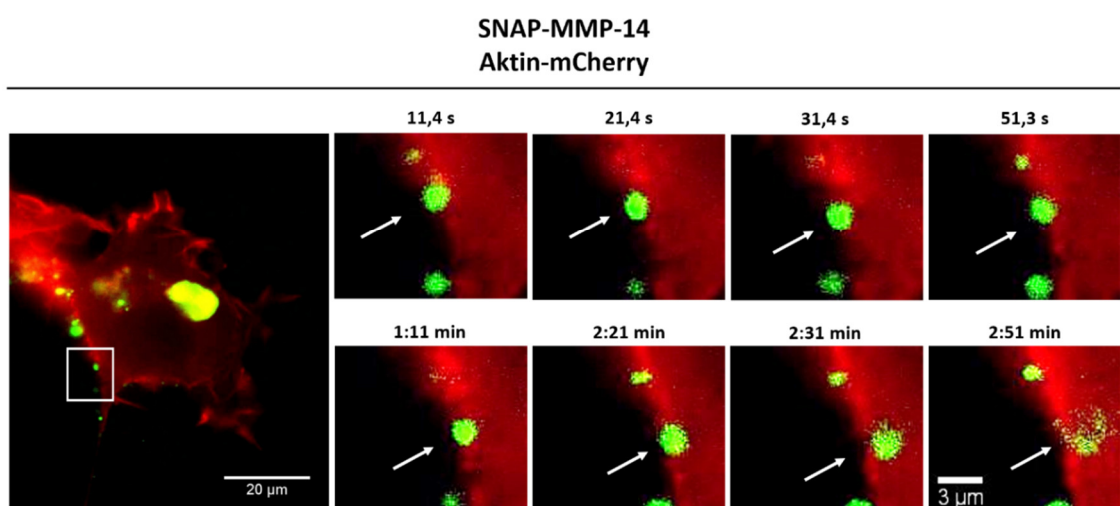
Jelikož je internalizace velmi rychlý děj, docházelo vlivem transportu váčků do intracelulárního prostoru k silnému signálu i v endozomálních kompartmentech uvnitř buňky (obr. 29). Signál internalizované formy MMP-14 je silný převážně na vedoucím okraji buňky (obr. 29 A., B.). Nicméně lze pozorovat MMP-14 lokalizovanou na membráně v tenkých protruzích (obr. 29 C.). Pro redukci signálu v intracelulární části a sledování procesu internalizace, byla zkrácena doba inkubace se substrátem na

nejmenší možnou hodnotu (5-10 minut). Ihned po odstranění substrátu byly buňky snímány fluorescenčním mikroskopem Nikon Ti-E se zajištěním environmentální kontroly (obr. 30).

**A.**



**B.**



**Obr. 30:** **A.** Buňka linie HT1080 současně transfekována aktinem konjugovaným s CFP (modře) a SNAP-MMP-14. MMP-14 byla značená pomocí substrátu SNAP (zeleně). **B.** Buňka linie HT1080 stabilně exprimující mCherry-aktin (červeně) a transfekovaná SNAP-MMP-14 s použitím substrátu SNAP (zeleně). V pravé části jsou u obrázků A. i B. detailně zobrazeny oblasti vyznačené obdélníky na obrázcích celé buňky v časových intervalech. Bílé šipky poukazují na část buňky, kde dochází k internalizaci váčků s MMP-14.

*Pozn.: Stabilní buněčná linie HT1080 exprimující mCherry-aktin byla připravená kolegyní Mgr. Anetou Gandalovičovou.*

## 6. Diskuze

U 90 % pacientů se solidním nádorovým onemocněním jsou přímou příčinou úmrtí metastáze. Nádorové buňky jsou schopné adaptovat se na vlastnosti extracelulárního prostředí změnou morfologie nebo způsobem migrace. Zaměnitelnost migračních módů značně komplikuje úspěšnou léčbu. Z tohoto důvodu je nezbytné porozumět mechanismům nádorové invazivity, abychom dokázali zacílit protimetastatickou léčbu a redukovali vznik sekundárních ložisek. Vzhledem k tomu, že zvýšená hladina exprese MMP koreluje se zvýšeným metastatickým potenciálem, je důležité studium regulace lokalizace a transportu MMP do invazivních struktur nádorových buněk.

Struktura invadopodií ve 2D prostředí je detailně popsána. Sklíčka pokrytá tenkou vrstvou substrátu (např. želatina, fibronectin) umožní tvorbu invadopodií, nicméně nemůže dojít vzhledem k tloušťce matrice k rozvoji invazivních struktur a invadopodia jsou ve 2D pozorována jako bodové struktury při styku buňky s podkladem. Zatímco s užitím 3D matrice dochází k rozvoji dlouhých protruzí prostupujících do ECM. Příkladem je práce Schoumacher et al. 2010, která zobrazuje výběžek cytoplazmatické membrány prostupující bazální laminou (Schoumacher et al. 2010). Další rozdíl mezi invadopodií ve 2D a 3D prostředí je tvorba tenkých filopodií, které vycházejí z větších protruzí (Tolde et al. 2010).

Tato diplomová práce se zabývá třemi nejvýznamnějšími proteázami mezibuněčné hmoty: membránově vázanou MMP-14 a sekretovanými MMP-2 a MMP-9. Získané znalosti o regulaci produkce a transportu se neustále rozšiřují, avšak chybí ucelený model lokalizace a transportu v souvislosti s invazivními strukturami nádorových buněk ve 3D prostředí. V naší laboratoři byl popsán dosud nejdetailnější model invazivních struktur ve 3D prostředí s použitím bezbuněčné dermis (Tolde et al. 2010). Výsledky jsou zároveň v souladu s pozorováním lokalizace aktivity proteáz na bázi těchto invazivních struktur, nikoliv na jejich konci (Wolf et al. 2007).

### 6.1 Příprava konstruktů proteáz, ověření exprese a kvantifikace aktivity

Pro studium uvedených MMP byly v první řadě připraveny konstrukty proteáz fúzovaných s fluorescenčním značením mTurq2/Clover2, stejně tak se značením SNAP.

Konstrukt MMP-14-GFP jsme dostali darem. Proteiny fúzované se značením SNAP mohou být značeny pomocí široké škály substrátů SNAP, které mohou být fluorescenčně aktivní, blokovat signál nebo neprocházející přes buněčnou membránu. Fluorescenční značení proteáz se v průběhu studia ukázalo jako více vhodnější varianta než značení SNAP z důvodu specifitějšího a stabilnějšího signálu, proto je používáno v uvedených experimentech. Nicméně proteázy fúzované se SNAP budou využity v elektronové mikroskopii. V případě přípravy konstruktů MMP-14 se značením SNAP na N-konci pro studium internalizace se tato možnost ukázalo jako vyhovující pro naše potřeby.

U připravených konstruktů s fluorescenčním značením bylo ověřeno pomocí fluorescenční mikroskopie, že dochází k expresi a správné lokalizaci v savčích buňkách ve 2D prostředí. Obr. 14 poukazuje na lokalizaci MMP ve váčcích ve velké míře v centrální části buňky a také v buněčných protruzích.

Expresi proteáz fúzovaných se značením SNAP v buněčných liniích byla ověřena pomocí metody Western blot s užitím protilátky proti SNAP. Transfekované buňky linie HT1080 vykazují expresi MMP-2, MMP-9 i SNAP-MMP-14 (se značením SNAP na extracelulárním konci) (obr. 15 A.), nicméně exprese MMP-14-SNAP (s intracelulárním značením) byla prokázána pouze u transfekovaných buněk linie 3T3 (obr. 15 B.). Možným vysvětlením je vyšší úspěšnost transfekce u buněk linie 3T3, případně malá exprese konstruktů z důvodu vysoké exprese endogenní MMP-14 u buněk linie HT1080.

Želatinová zymografie byla provedená pro studium aktivity transfekovaných proteáz a možného negativního vlivu značení na jejich funkci. Dalším důvodem byl výsledek Western blotu, který detekoval nižší expresi MMP-9-SNAP než MMP-2-SNAP v buňkách linie HT1080 a exprese MMP-14-SNAP nebyla u této buněčné linie zjištěná vůbec (obr. 15 A.).

Obr. 16 poukazuje na silnou sekreci MMP-9-SNAP do média, která je přítomná jak v aktivní štěpené, tak neaktivní neštěpené formě. Stejného výsledku bylo dosaženo u opakování experimentu (obr. 17) a u buněk transfekovaných konstruktem MMP-9-Clover2 (obr. 18). Na základě uvedených výsledků lze tvrdit, že připravené konstrukty s proteázou MMP-9 jsou štěpeny v proteolyticky aktivní formu a značení SNAP/Clover2 nijak nenarušuje jejich funkci, včetně tvorby homodiméru. Toto tvrzení

potvrzuje statistická analýza *in situ* degradace želatiny, kdy byla proteolytická aktivita u buněk linie HT1080 transfekovaných MMP-9-Clover2 signifikantně vyšší než u negativní kontroly (obr. 19).

Proteolytickou aktivitu MMP-2-SNAP, případně MMP-2-Clover2 se nepodařilo detekovat metodou želatinové zymografie ani při současné transfekci s MMP-14, která je aktivátorem MMP-2 (obr. 16, 17). S ohledem na výsledek imunoblotu (obr. 15 A.), kdy bylo poukázáno na zvýšenou expresi MMP-2-SNAP v buněčných lyzátech a naopak nižší expresi MMP-9-SNAP je možné vysvětlení takové, že MMP-2-SNAP/MMP-2-Clover2 konstrukt je hromaděn v buňkách a nedochází k sekreci do extracelulárního prostoru, zatímco hladina MMP-9-SNAP je v buněčných lyzátech nižší, jelikož dochází k silné sekreci do média. Potvrzením je výsledek *in situ* degradace želatiny, kdy buňky linie HT1080 transfekované MMP-2-Clover2 vykazovaly nesignifikantní rozdíl v aktivitě oproti kontrolním buňkám (obr. 19). MMP-2 se značením Clover2/SNAP je silně exprimována v transfekovaných buňkách linie HT1080, pravděpodobně dochází i k aktivaci na buněčné membráně vzhledem k přítomnosti signálu protilátky na nitrocelulózkové membráně o menší velikosti proteinu, než je velikost neaktivní formy (obr. 15 A.). Nicméně nedochází k sekreci aktivní ani neaktivní formy, což může být způsobeno značením na C konci proteinu, případně nesprávným navržením konstruktů. V následujícím studiu je v plánu příprava nového konstruktů MMP-2 s fluorescenčním značením a značením SNAP.

Vzhledem k tomu, že MMP-14 je transmembránový enzym neuvolňovaný v aktivní formě do extracelulárního prostředí (média), nedochází v žádném z uvedených výsledků zymografie k proteolytické aktivitě MMP-14-SNAP/SNAP-MMP-14. Jejich funkce v případě zymografie spočívá v aktivaci latentních forem MMP-2. Na obr. 16 byla v případě buněk transfekovaných MMP-14-SNAP a SNAP-MMP-14 zvýšená proteolytická aktivita štěpených endogenních proforem MMP-2, stejného výsledku bylo dosaženo současnou transfekcí MMP-14-SNAP/SNAP-MMP-14 s MMP-2-SNAP (obr. 17) a při použití konstruktů se značením GFP/Clover2 (obr. 18). Oproti tomu obr. 17 poukazuje na silnější aktivaci neštěpených proforem MMP-2 u buněk transfekovaných MMP-14-SNAP. Vzhledem k podobnosti s negativní kontrolou je možným vysvětlením, že v tomto případě nedošlo k transfekci buněk MMP-14-SNAP nebo k expresi konstruktů. Z obr. 16 lze říct, že expresí MMP-14 se značením SNAP

v buňkách linie HT1080 dochází k navýšení proteolytické aktivity endogenních latentních forem MMP-2.

Kvantifikace proteolytické aktivity buněk linie HT1080 transfekovaných MMP-14-GFP byla analyzována *in vitro* degradací želatiny. Jak již bylo zmíněno, buňky transfekované MMP-9-Clover2 vykazovaly signifikantní rozdíl v degradaci želatiny oproti kontrolním buňkám, zatímco buňky exprimující MMP-2-Clover2 nebyly proteolyticky aktivní ve srovnání s negativní kontrolou. Buňky transfekované MMP-14-GFP vykazovaly procentuálně vyšší degradační aktivitu ve srovnání s MMP-9-Clover2 a tedy signifikantní rozdíl oproti negativní kontrole (obr. 19). Uvedená data jsou v souladu s literaturou, která uvádí MMP-14 jako klíčovou MMP při proteolytické degradaci ECM (Wolf et al. 2007).

## **6.2 Optimalizace přípravy kolagenové matrice jako 3D prostředí**

Pro studium lokalizace a transportu MMP ve 3D prostředí bylo nezbytné optimalizovat přípravu 3D matrice vzhledem k možnostem naší laboratoře a zavést platný protokol. Fluorescenční značení kolagenových vláken vychází z protokolu Doyle, A. D. 2015, příprava vysoce koncentrovaných fibrilárních vláken z publikace Artym et al., 2015.

Optimalizace přípravy fluorescenčně značené kolagenové matrix vyžadovala dokonalé odstranění nenávané fluorescenční barvy, nalezení vhodné koncentrace kolagenových vláken, podmínek pro opětovnou polymerizaci a vytvoření viabilního prostředí pro živé buňky. Příprava fibrilárního kolagenu o vysoké koncentraci zahrnovala upravení podmínek pro centrifugaci, vzhledem k přemístění naší laboratoře do BIOCEVU a změny laboratorního vybavení. Dále nalezení podmínek pro centrifugaci fluorescenčně značeného fibrilárního kolagenu, který je méně koncentrovaný a nestabilní při centrifugaci.

Postup pro přípravu 3D kolagenové matrice jak s fluorescenčním značením, tak bez značení byl přizpůsoben možnostem naší laboratoře a byl zaveden obecně platný protokol. V následujícím studiu je potřeba zavést postup pro značení proteinů u buněk, které jsou vyšetě na fluorescenční kolagen, pomocí protilátek konjugovaných s fluorescenčním značením. V našem případě docházelo k interakci protilátek s fluorescenčně značenými kolagenovými vlákny a tím k nespecifickému signálu a vysokému pozadí.

### 6.3 Lokalizace a transport proteáz ve 3D prostředí

Připravené konstrukty proteáz s fluorescenčním značením byly použity pro následující studium lokalizace a transportu ve 3D prostředí. Konstrukt s MMP-2 byl vzhledem k uvedeným výsledkům považován za nevyhovující a již nebylo možno jej z časových důvodů znovu vytvořit. Z tohoto důvodu se práce zaměřuje pouze na MMP-9 a MMP-14. Jako 3D matrice je využíván jak nefluorescenční, tak fluorescenčně značený fibrilární kolagen o vysoké hustotě. Pro mikroskopii byl využíván fluorescenční mikroskop Nikon Ti-E a konfokální mikroskop Leica SP8, oba s možností environmentální kontroly pro snímání živých buněk.

Obr. 23 poukazuje na dynamický pohyb váčků s MMP-9, které jsou transportovány do dlouhých aktinových protruzí. V těchto výběžcích docházelo k pohybu váčků v rámci tenké protruze (označeno šipkami), případně se u některých neměnila lokalizace během snímání. Vzhledem k ověření funkčnosti konstruktů a sekrece MMP-9 do extracelulárního prostředí je proteáza pravděpodobně uvolňována do mezibuněčného prostoru. Nicméně nelze tvrdit bez dalšího studia, že dochází k sekreci právě z těchto tenkých protruzí, jelikož podle publikovaných výsledků dochází k uvolňování proteáz na bázi těchto struktur (Wolf et al. 2007).

Na obr. 24 jsou zobrazeny váčky s MMP-9 u buňky linie MDA-MB-231, která netvoří četné protruze jako buňky linie HT1080 (obr. 23). MMP-9 je nahromaděná převážně v blízkosti adhezních struktur bohatých na přítomnosti aktinu (plné šipky). U tenkých protruzí je MMP-9 lokalizována na jejich bázi a v místě, kde dochází k rozvětvení aktinových mikrofilament (označeno šipkami).

V případě exprese fluorescenčně značené MMP-14, dochází k silnému signálu v okolí jádra a pravděpodobně Golgiho aparátu, kde je proteáza syntetizována a upravována. V menší míře jsou váčky rozptýlené v intracelulárním prostoru v endozomálních kompartmentech. Migrací buňky došlo k retrakci zadní části a transportu MMP-14 na vedoucí okraj (obr. 25).

Studium MMP-14 s použitím fibrilárního kolagenu o vysoké hustotě s fluorescenčním značením poukázalo na obohacení přítomnosti MMP-14 ve fokálních adhezích při styku s kolagenovými vlákny (obr. 26). Výskyt MMP-14 v kontaktu buňky s ECM je v souladu s publikovanými daty (Wolf et al. 2007). Nicméně uvedené snímky zobrazují výraznou kolokalizaci MMP-14 se značenými kolagenovými vlákny (obr. 26

A., B.) a akumulaci buněčných struktur bohatých na přítomnosti proteázy na kolagenových vláknech (obr. 26 B., značeno šipkami).

Obr. 27 zobrazuje dynamický pohyb váčků a jejich akumulaci v místě kontaktu buňky s kolagenovými vlákny (značeno plnou šipkou). Současně můžeme pozorovat váček, který byl pravděpodobně internalizován z plazmatické membrány a transportován do intracelulárního prostoru (označeno bílými šipkami). Následně dochází k transportu váčků mimo snímanou rovinu, případně k jeho degradaci.

Z obr. 28 je zřetelná degradace kolagenových vláken, způsobená pravděpodobně proteolytickými enzymy, uvolňovanými jak buňkou transfekovanou MMP-14-GFP, tak netransfekovanými buňkami. Z obr. 28 a 21 B. vyplývá, že pro vizualizaci proteolytické degradace je nejvhodnější opětovná polymerizaci fluorescenčně značeného kolagenu v teplotě 37 °C.

#### **6.4 Studium dynamiky a internalizace MMP-14**

Studium internalizace bylo umožněno vytvořením konstruktů MMP-14 se značením SNAP na extracelulárním konci proteinu. Vzhledem k tomu, že se jedná o membránový protein, který je během transportu proteolyticky štěpen v aktivní formu, musela být příprava konstruktů navržena tak, aby došlo ke správné maturaci proteinu, lokalizaci na membránu a nedošlo ke ztrátě značení během maturace. Připravený konstrukt nám umožní značit membránově vázanou a internalizovanou formu MMP-14.

Po ověření neprůchodnosti fluorescenčního substrátu SNAP-Surface přes buněčnou membránu lze s jistotou tvrdit, že veškerý signál v intracelulárním prostoru je způsoben internalizovanou formou MMP-14, která byla značená na membráně. Nicméně internalizace MMP-14 z buněčné membrány do endozomálních kompartmentů je velmi rapidní děj a pro sledování tohoto jevu bylo nutné optimalizovat podmínky. Jednou z možností bylo zkrácení doby inkubace se substrátem SNAP, aby došlo k omezení internalizace během barvení, kdy není možné buňky pozorovat vzhledem k fluorescenčním vlastnostem nenavázaného substrátu. Další možností byla inkubace buněk během barvení v nižších teplotách pro zpomalení metabolismu a transportu váčků, nicméně i přes udržení pH prostředí docházelo k velké úmrtnosti buněk.

Na obr. 29 A., B. z konfokálního mikroskopu je vidět velké množství internalizovaných váčků v endozomálních kompartmentech, zejména na vedoucím okraji buňky. Preferenční internalizace na vedoucím okraji migrující buňky je v souladu s publikovanými daty (Uekita et al. 2001). I přes silný intracelulární signál způsoben rapidní internalizací, lze na základě obr. 29 C. poukázat na membránovou lokalizaci značené MMP-14 (označeno šipkami). Lze tedy tvrdit, že dochází ke značení membránově vázané formy MMP-14, která je následně rapidně internalizována.

Pro další studium internalizace bylo nezbytné redukovat množství internalizovaných váčků během inkubace se substrátem a před mikroskopií buněk. Cílem bylo poukázat na označení váčků lokalizovaných na membráně a jejich transport do intracelulární oblasti. Toho bylo částečně dosaženo zkrácením doby značení substrátem na nejmenší možnou hodnotu a mikroskopií živých buněk, nikoliv fixovaných preparátů.

Snímky živé buňky na obr. 30 A. byly pořízeny ihned po odstranění substrátu a zobrazují internalizaci MMP-14 na vedoucím okraji buňky během její migrace. Můžeme pozorovat rozšiřující se signál prostupující do intracelulární části během procesu „membrane ruffling“. Internalizovaná forma MMP-14 je následně hromaděná ve střední a zadní části buňky a v blízkosti struktur bohatých na přítomnost aktinu. „Membrane ruffling“ je proces reorganizace kortikálního aktinového cytoskeletu, který je nezbytný pro tvorbu buněčných protruzí a fokálních adhezí (Lopez-Guerrero et al. 2017). Z tohoto důvodu je pravděpodobná vysoká míra internalizace MMP-14 během procesu „membrane ruffling“, což bylo zjevné u více pozorovaných buněk.

Obr. 30 B. poukazuje na internalizaci váčku bohatého na přítomnost značené MMP-14. S ohledem na publikovaná data nelze tvrdit, zda je váček před internalizací navázán na povrch buňky. Dosavadní studie popisují vznik tubulárního spojení mezi endozomální membránou a plazmatickou membránou a částečné uvolnění MMP-14 na buněčnou membránu (Monteiro et al. 2013). Zda může docházet také k úplnému uvolnění váčků do extracelulárního prostoru a následné internalizaci z buněčného povrchu nelze s jistotou říct vzhledem k experimentálnímu uspořádání. Tento jev vyžaduje další studium např. současnou expresi značeného klathrinu, případně caveolinu.

Pro následné studium internalizace by bylo vhodné optimalizovat koncentraci substrátu na takovou hodnotu, která by nezpůsobila vysoké fluorescenční pozadí, a zároveň umožnila značení proteáz fúzovaných se SNAP. Substrát by v tomto případě nemusel být odmytý a internalizace by mohla být pozorována po delší časový úsek. Z časových důvodů nebylo již možné provést tento experiment v rámci diplomové práce.

## **7. Směřování výzkumu**

Studium transportu a lokalizace MMP v souvislosti s invazivními strukturami nádorových buněk ve 3D prostředí bude nadále pokračovat. Následující projekt bude zaměřen na analýzu významu transportu a funkce matrixových metaloproteáz pro aktivitu invadopodií nádorových buněk. Cílem bude rozšířit experimentální přístupy a navázat na poznatky a výsledky diplomové práce. Současně bude studium věnováno internalizaci MMP-14 a dynamice tohoto procesu.

Pro práci budou využity připravené konstrukty a zároveň bude znova zhotoven konstrukt s MMP-2. Současnou expresí MMP s markery invadopodií bude upřesněná lokalizace pericelulárním proteolýzy pomocí metod konfokální mikroskopie. Konstrukty fúzané se značením SNAP budou využity pro transmisní elektronovou mikroskopii. Jako 3D matrice bude používán fluorescenčně značený fibrilární kolagen o vysoké hustotě, případně fluorescenčně značená bezbuněčná dermis.

## **8. Závěrečné shrnutí**

Tato diplomová práce přispěla především k rozšíření metodiky přípravy 3D matrice a k optimalizaci vizualizace transportu nejvýznamnějších proteáz mezibuněčné hmoty ve 3D. Současně byl zhotoven nástroj pro studium internalizace membránově vázané MMP-14. Diplomová práce zahrnovala šest hlavních cílů, z nichž čtyři z nich byly splněny a dva vyžadují další studium s použitím pokročilejší mikroskopie. Připravený materiál a získané poznatky jsou nezbytným základem pro následující studium.

## 9. Seznam použité literatury

- Artym, V. V et al., 2006. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer research*, 66(6), pp.3034–43. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-2177> [Accessed April 2, 2017].
- Artym, V. V. et al., 2015. Dense fibrillar collagen is a potent inducer of invadopodia via a specific signaling network. *Journal of Cell Biology*, 208(3), pp.331–350.
- Atkinson, S.J. et al., 1995. Intermolecular autolytic cleavage can contribute to the activation of progelatinase A by cell membranes. *The Journal of biological chemistry*, 270(51), pp.30479–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8530478> [Accessed April 11, 2017].
- Bergers, G. et al., 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature cell biology*, 2(10), pp.737–44. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/35036374> [Accessed April 8, 2017].
- Blouw, B. et al., 2008. A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo. *European journal of cell biology*, 87(8–9), pp.555–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417249> [Accessed January 21, 2017].
- Brabek, J. et al., 2013. Drugs for solid cancer the productivity crisis prompts a rethink. *OncoTargets and Therapy*, 6, p.767. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23836990> [Accessed April 17, 2017].
- Branch, K.M., Hoshino, D. & Weaver, A.M., 2012. Adhesion rings surround invadopodia and promote maturation. *Biology Open*, 1(8), pp.711–722. Available at: <http://bio.biologists.org/content/1/8/711>[http://bio.biologists.org.gate1.inist.fr/content/1/8/711.abstract?ijkey=505dcd5827215f42a8cffeafbdfcd9dc32a0c55d&keytype2=tf\\_ipsecsha](http://bio.biologists.org.gate1.inist.fr/content/1/8/711.abstract?ijkey=505dcd5827215f42a8cffeafbdfcd9dc32a0c55d&keytype2=tf_ipsecsha)<http://bio.biologists.org/content/1/8/711.full.pdf><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22511111>
- Bravo-Cordero, J.J. et al., 2007. MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. *The EMBO Journal*, 26(6), pp.1499–1510. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332756> [Accessed April 9, 2017].
- Brooks, P.C. et al., 1996. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface

- of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*, 85(5), pp.683–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8646777> [Accessed April 4, 2017].
- Busco, G. et al., 2010. NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. *The FASEB Journal*, 24(10), pp.3903–3915. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547664> [Accessed April 9, 2017].
- Buschman, M.D. et al., 2009. The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation. *Molecular biology of the cell*, 20(5), pp.1302–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144821> [Accessed January 21, 2017].
- Butler, G.S. et al., 1998. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase &quot;receptor&quot; regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *The Journal of biological chemistry*, 273(2), pp.871–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9422744> [Accessed April 8, 2017].
- Carlini, M.J., De Lorenzo, M.S. & Puricelli, L., 2011. Cross-talk between tumor cells and the microenvironment at the metastatic niche. *Current pharmaceutical biotechnology*, 12(11), pp.1900–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21470134> [Accessed January 12, 2017].
- Clark, A.G. & Vignjevic, D.M., 2015. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology*, 36, pp.13–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26183445> [Accessed January 12, 2017].
- Clark, E.S. et al., 2007. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer research*, 67(9), pp.4227–35. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-3928> [Accessed March 27, 2017].
- Clark, E.S. & Weaver, A.M., 2008. A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *European journal of cell biology*, 87(8–9), pp.581–90. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171933508000241> [Accessed March 27, 2017].
- Condeelis, J. & Pollard, J.W., 2006. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell

- Migration, Invasion, and Metastasis. *Cell*, 124(2), pp.263–266. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16439202> [Accessed April 18, 2017].
- Conklin, M.W. et al., 2011. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *The American journal of pathology*, 178(3), pp.1221–32. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010002336> [Accessed April 2, 2017].
- Courtneidge, S.A. et al., 2005. The Src substrate Tks5, podosomes (Invadopodia), and cancer cell invasion. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 70(0), pp.167–171. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16869750> [Accessed April 9, 2017].
- Cox, T.R. et al., 2013. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res*, 73(6), pp.1721–1732.
- David-Pfeuty, T. & Singer, S.J., 1980. Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11), pp.6687–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6256755> [Accessed January 21, 2017].
- Deryugina, E.I. et al., 2001. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Experimental cell research*, 263(2), pp.209–23. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482700951188> [Accessed April 8, 2017].
- Deryugina, E.I. et al., 2002. Processing of Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Subunit by Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Stimulates Migration of Breast Carcinoma Cells on Vitronectin and Enhances Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), pp.9749–9756. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11724803> [Accessed April 17, 2017].
- Dufour, A. et al., 2010. Role of matrix metalloproteinase-9 dimers in cell migration: design of inhibitory peptides. *The Journal of biological chemistry*, 285(46), pp.35944–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20837483> [Accessed April 20, 2017].
- Edwards, D.R., Handsley, M.M. & Pennington, C.J., 2009. The ADAM metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(5), pp.258–289. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762209> [Accessed April 9, 2017].
- Egeblad, M., Rasch, M.G. & Weaver, V.M., 2010. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(5), pp.697–706. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.015>.
- Egeblad, M. & Werb, Z., 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(1474–175X (Print)), pp.161–174. Available at: <http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n3/abs/nrc745.html>.
- Endo, K. et al., 2003. Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *The Journal of biological chemistry*, 278(42), pp.40764–70. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M306736200> [Accessed April 17, 2017].
- Erler, J.T. et al., 2006. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 440(7088), pp.1222–6. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature04695> [Accessed January 14, 2017].
- Erler, J.T. & Weaver, V.M., 2009. Three-dimensional context regulation of metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 26(1), pp.35–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18814043> [Accessed March 26, 2017].
- Fackler, O.T. & Grosse, R., 2008. Cell motility through plasma membrane blebbing. *The Journal of Cell Biology*, 181(6), pp.879–884. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541702> [Accessed April 2, 2017].
- Friedl, P., 2004. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(1), pp.14–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037300> [Accessed April 2, 2017].
- Friedl, P. & Alexander, S., 2011. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*, 147(5), pp.992–1009. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411013547> [Accessed January 15, 2017].
- Friedl, P. & Wolf, K., 2009. Proteolytic interstitial cell migration: A five-step process. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1–2), pp.129–135.
- Friedl, P. & Wolf, K., 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), pp.362–374. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724734> [Accessed April 1, 2017].
- Furber, J.D., 2006. Extracellular Glycation Crosslinks: Prospects for Removal. *Rejuvenation Research*, 9(2), pp.274–278. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16706655> [Accessed March 26, 2017].
- Geraldo, S. et al., 2012. Do cancer cells have distinct adhesions in 3D collagen matrices and in vivo? *European Journal of Cell Biology*, 91(11–12), pp.930–937. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22939225> [Accessed March 27, 2017].
- Gilkes, D.M. et al., 2013. Procollagen lysyl hydroxylase 2 is essential for hypoxia-induced breast cancer metastasis. *Molecular cancer research : MCR*, 11(5), pp.456–66. Available at: <http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-12-0629> [Accessed January 14, 2017].
- Gimona, M. et al., 2008. Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), pp.235–241.
- Giri, A. et al., 2013. The Arp2/3 complex mediates multigeneration dendritic protrusions for efficient 3-dimensional cancer cell migration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(10), pp.4089–99. Available at: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.12-224352> [Accessed January 22, 2017].
- Glentis, A., Gurchenkov, V. & Vignjevic, D.M., 2014. Assembly, heterogeneity, and breaching of the basement membranes. *Cell Adhesion & Migration*, 8(3), pp.236–245. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.28733> [Accessed February 8, 2017].
- Haeger, A. et al., 2014. Cell jamming: Collective invasion of mesenchymal tumor cells imposed by tissue confinement. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), pp.2386–2395. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721714> [Accessed March 26, 2017].
- Hagedorn, E.J. et al., 2013. The netrin receptor DCC focuses invadopodia-driven basement membrane transmigration in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 201(6), pp.903–913. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23751497> [Accessed March 27, 2017].
- Hall, A., 2009. The cytoskeleton and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1–2), pp.5–14. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10555-008-9166-3> [Accessed January 14, 2017].

- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> [Accessed January 15, 2017].
- Hernandez-Barrantes, S. et al., 2000. Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *The Journal of biological chemistry*, 275(16), pp.12080–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766841> [Accessed April 11, 2017].
- Hiratsuka, S. et al., 2002. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer cell*, 2(4), pp.289–300. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12398893> [Accessed February 6, 2017].
- Hofschröder, V. et al., 2017. Extracellular protonation modulates cell-cell interaction mechanics and tissue invasion in human melanoma cells. *Scientific reports*, 7, p.42369. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28205573> [Accessed April 18, 2017].
- Hoshino, D. et al., 2013. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell reports*, 5(5), pp.1159–68. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124713006529> [Accessed January 22, 2017].
- Chen, H.-C., 2005. Boyden chamber assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 294, pp.15–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576901> [Accessed April 18, 2017].
- Chen, W. ???T, 1989. Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *Journal of Experimental Zoology*, 251(2), pp.167–185.
- Cho, J.-A. et al., 2008. The inactive 44-kDa processed form of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) enhances proteolytic activity via regulation of endocytosis of active MT1-MMP. *The Journal of biological chemistry*, 283(25), pp.17391–405. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M708943200> [Accessed April 17, 2017].
- Itoh, Y. et al., 1999. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17)

- is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *The Journal of biological chemistry*, 274(48), pp.34260–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567400> [Accessed April 17, 2017].
- Jacob, A. et al., 2013. Rab40b regulates trafficking of MMP2 and MMP9 during invadopodia formation and invasion of breast cancer cells. *Journal of Cell Science*, 126(20), pp.4647–4658. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23902685> [Accessed April 8, 2017].
- Jacob, A. et al., 2016. The role and regulation of Rab40b–Tks5 complex during invadopodia formation and cancer cell invasion. *Journal of Cell Science*, 129(23), pp.4341–4353. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27789576> [Accessed April 8, 2017].
- Jacob, A. & Prekeris, R., 2015. The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 3, p.4. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fcell.2015.00004/abstract> [Accessed April 8, 2017].
- Jiang, A. et al., 2001. Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), pp.13693–13698. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698655> [Accessed April 9, 2017].
- Johansson, N., Ahonen, M. & Kähäri, V.M., 2000. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 57(1), pp.5–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10949577> [Accessed April 18, 2017].
- Joyce, J.A. & Pollard, J.W., 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews. Cancer*, 9(4), pp.239–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279573> [Accessed April 18, 2017].
- Kajita, M. et al., 2001. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *The Journal of cell biology*, 153(5), pp.893–904. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11381077> [Accessed April 8, 2017].
- Kalluri, R., 2003. Angiogenesis: Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), pp.422–433. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778132> [Accessed March 26, 2017].
- Kalluri, R. & Zeisberg, M., 2006. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(5), pp.392–401. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16572188>

- [Accessed March 27, 2017].
- Kaupilla, S. et al., 1998. Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancerin vivo. *The Journal of Pathology*, 186(3), pp.262–268. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10211114> [Accessed March 26, 2017].
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V. & Hudson, B.G., 2008. Mammalian collagen IV. *Microscopy Research and Technique*, 71(5), pp.357–370. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18219669> [Accessed March 28, 2017].
- Kikuchi, K. & Takahashi, K., 2008. WAVE2- and microtubule-dependent formation of long protrusions and invasion of cancer cells cultured on three-dimensional extracellular matrices. *Cancer Science*, 99(11), pp.2252–2259. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18795939> [Accessed March 27, 2017].
- Kitajima, Y. & Miyazaki, K., 2013. The Critical Impact of HIF-1a on Gastric Cancer Biology. *Cancers*, 5(1), pp.15–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24216696> [Accessed April 18, 2017].
- Knäuper, V. et al., 1996. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 271(29), pp.17124–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663255> [Accessed April 8, 2017].
- Köhrmann, A. et al., 2009. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer*, 9(1), p.188. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19531263> [Accessed April 9, 2017].
- Kojima, S. et al., 2000. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS letters*, 480(2–3), pp.142–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034316> [Accessed April 17, 2017].
- Kudo, T. et al., 2007. Substrate choice of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is dictated by tissue inhibitor of metalloproteinase-2 levels. *Cancer Science*, 98(4), pp.563–568. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425593> [Accessed April 11, 2017].
- Leco, K.J. et al., 1994. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in

- mouse cells and tissues. *The Journal of biological chemistry*, 269(12), pp.9352–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132674> [Accessed April 8, 2017].
- Leong, H.S. et al., 2014. Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis. *Cell Reports*, 8(5), pp.1558–1570. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.050>.
- Levental, K.R. et al., 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139(5), pp.891–906. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19931152> [Accessed January 20, 2017].
- Li, A. et al., 2010. The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Current biology : CB*, 20(4), pp.339–45. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982209021599> [Accessed March 27, 2017].
- Linder, S., 2009. Invadosomes at a glance. *Journal of cell science*, 122(Pt 17), pp.3009–3013.
- Linder, S., 2007. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in Cell Biology*, 17(3), pp.107–117.
- Linder, S. et al., 1999. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), pp.9648–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449748> [Accessed January 21, 2017].
- Linder, S., Wiesner, C. & Himmel, M., 2011. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, pp.185–211. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21801014>.
- Lizárraga, F. et al., 2009. Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells. *Cancer research*, 69(7), pp.2792–800. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-08-3709> [Accessed January 22, 2017].
- Llano, E. et al., 1999. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer research*, 59(11), pp.2570–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10363975> [Accessed April 8, 2017].
- Lochter, A. et al., 1997. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of

- molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *The Journal of cell biology*, 139(7), pp.1861–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9412478> [Accessed April 4, 2017].
- Lopez-Guerrero, A.M. et al., 2017. Regulation of membrane ruffling by polarized STIM1 and ORAI1 in cortactin-rich domains. *Scientific Reports*, 7(1), p.383. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28341841> [Accessed April 27, 2017].
- Magalhaes, M.A.O. et al., 2011. Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway. *The Journal of cell biology*, 195(5), pp.903–20. Available at: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201103045> [Accessed January 22, 2017].
- Marchisio, P.C. et al., 1984. Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *The Journal of cell biology*, 99(5), pp.1696–705. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6436255> [Accessed January 21, 2017].
- Massagué, J. & Obenauf, A.C., 2016. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529(7586), pp.298–306. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26791720> [Accessed January 12, 2017].
- Mazzone, M. et al., 2004. Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains. *Journal of cell science*, 117(Pt 26), pp.6275–87. Available at: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.01563> [Accessed April 17, 2017].
- Messent, A.J. et al., 1998. Effects of collagenase-cleavage of type I collagen on alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. *Journal of cell science*, pp.1127–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9512508> [Accessed March 26, 2017].
- Miyamori, H. et al., 2001. Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry*, 276(30), pp.28204–11. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M103083200> [Accessed April 11, 2017].
- Monsky, W.L. et al., 1993. Binding and localization of M(r) 72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia. *Cancer research*, 53(13), pp.3159–

64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8391388> [Accessed April 9, 2017].
- Monteiro, P. et al., 2013. Endosomal WASH and exocyst complexes control exocytosis of MT1-MMP at invadopodia. *The Journal of Cell Biology*, 203(6), pp.1063–1079. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24344185> [Accessed April 9, 2017].
- Mori, H. et al., 2013. Transmembrane/cytoplasmic, rather than catalytic, domains of Mmp14 signal to MAPK activation and mammary branching morphogenesis via binding to integrin 1. *Development*, 140(2), pp.343–352. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23250208> [Accessed April 9, 2017].
- Mouw, J.K., Ou, G. & Weaver, V.M., 2014. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(12), pp.771–785. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25370693>.
- Mueller, S.C. et al., 1999. A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *The Journal of biological chemistry*, 274(35), pp.24947–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10455171> [Accessed April 9, 2017].
- Murphy, D.A. et al., 2011. A Src-Tks5 pathway is required for neural crest cell migration during embryonic development. M. Parsons, ed. *PloS one*, 6(7), p.e22499. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022499> [Accessed March 27, 2017].
- Murphy, D.A. & Courtneidge, S.A., 2011. The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(7), pp.413–26. Available at: <http://www.nature.com.libproxy.temple.edu/nrm/journal/v12/n7/full/nrm3141.html#a1>.
- Nakahara, H. et al., 1997. Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(15), pp.7959–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9223295> [Accessed April 4, 2017].
- Niedzwiecki, A. et al., 2013. Effect of a nutrient mixture on matrix metalloproteinase-9 dimers in various human cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, 44(3), pp.986–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24378964>

- [Accessed April 20, 2017].
- Ohuchi, E. et al., 1997. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *The Journal of biological chemistry*, 272(4), pp.2446–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8999957> [Accessed April 4, 2017].
- Orimo, A. et al., 2005. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121(3), pp.335–48. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867405002370> [Accessed March 27, 2017].
- Oser, M. et al., 2009. Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *The Journal of cell biology*, 186(4), pp.571–87. Available at: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200812176> [Accessed January 21, 2017].
- Parks, W.C., Wilson, C.L. & López-Boado, Y.S., 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 4(8), pp.617–629. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286728> [Accessed April 16, 2017].
- Provenzano, P.P. et al., 2006. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Medicine*, 4(1), p.38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17190588> [Accessed March 26, 2017].
- Quail, D.F. & Joyce, J.A., 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, 19(11), pp.1423–37. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.3394> [Accessed January 14, 2017].
- Remacle, A., Murphy, G. & Roghi, C., 2003. Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. *Journal of Cell Science*, 116(19), pp.3905–3916. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915589> [Accessed April 9, 2017].
- Sabeh, F. et al., 2004. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *The Journal of cell biology*, 167(4), pp.769–81. Available at:

- <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200408028> [Accessed February 7, 2017].
- Sahai, E. & Marshall, C.J., 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nature cell biology*, 5(8), pp.711–9. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb1019> [Accessed March 28, 2017].
- Sakamoto, T. & Seiki, M., 2010. A Membrane Protease Regulates Energy Production in Macrophages by Activating Hypoxia-inducible Factor-1 via a Non-proteolytic Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 285(39), pp.29951–29964. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20663879> [Accessed April 9, 2017].
- Sakurai-Yageta, M. et al., 2008. The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *The Journal of cell biology*, 181(6), pp.985–98. Available at: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200709076> [Accessed March 27, 2017].
- Santiago-Medina, M. et al., 2015. Regulation of ECM degradation and axon guidance by growth cone invadosomes. *Development (Cambridge, England)*, 142(3), pp.486–96. Available at: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.108266> [Accessed March 27, 2017].
- Sanz-Moreno, V. et al., 2008. Rac Activation and Inactivation Control Plasticity of Tumor Cell Movement. *Cell*, 135(3), pp.510–523. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867408012361> [Accessed April 2, 2017].
- Sato, H. et al., 1994. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, 370(6484), pp.61–5. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/370061a0> [Accessed April 8, 2017].
- Sato, H. et al., 1996. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS letters*, 393(1), pp.101–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8804434> [Accessed April 8, 2017].
- Sato, T. et al., 1997. Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *Journal of cell science*, pp.589–96. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9092941> [Accessed April 8, 2017].
- Seals, D.F. et al., 2005. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell*, 7(2), pp.155–165. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610805000279> [Accessed January 21, 2017].
- Shofuda, K. et al., 1997. Expression of three membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of MT3-MMPs with and without transmembrane domain. *The Journal of biological chemistry*, 272(15), pp.9749–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9092507> [Accessed April 8, 2017].
- Schnaeker, E.-M. et al., 2004. Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion. *Cancer research*, 64(24), pp.8924–31. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-04-0324> [Accessed April 7, 2017].
- Schoumacher, M. et al., 2010. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *Journal of Cell Biology*, 189(3), pp.541–556.
- Silletti, S. et al., 2001. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha vbeta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1), pp.119–24. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.011343298> [Accessed April 8, 2017].
- Stähle-Bäckdahl, M. & Parks, W.C., 1993. 92-kd gelatinase is actively expressed by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma. *The American journal of pathology*, 142(4), pp.995–1000. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682768> [Accessed April 8, 2017].
- Steffen, A. et al., 2008. MT1-MMP-Dependent Invasion Is Regulated by TI-VAMP/VAMP7. *Current Biology*, 18(12), pp.926–931. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18571410> [Accessed April 9, 2017].
- Takino, T. et al., 1995. Identification of the second membrane-type matrix

- metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *The Journal of biological chemistry*, 270(39), pp.23013–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559440> [Accessed April 8, 2017].
- Takino, T. et al., 2003. Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochemical and biophysical research communications*, 304(1), pp.160–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12705901> [Accessed April 11, 2017].
- Thiery, J.P. et al., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), pp.871–90. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409014196> [Accessed January 14, 2017].
- Tolde, O. et al., 2010. The structure of invadopodia in a complex 3D environment. *European Journal of Cell Biology*, 89(9), pp.674–680.
- Uekita, T. et al., 2001. Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *The Journal of cell biology*, 155(7), pp.1345–56. Available at: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200108112> [Accessed April 16, 2017].
- Velasco, G. et al., 2000. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer research*, 60(4), pp.877–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706098> [Accessed April 8, 2017].
- Waheed Roomi, M. et al., 2015. Failure of matrix metalloproteinase-9 dimer induction by phorbol 12-myristate 13-acetate in normal human cell lines. *Oncology letters*, 9(6), pp.2871–2873. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26137162> [Accessed April 20, 2017].
- Van Wart, H.E. & Birkedal-Hansen, H., 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(14), pp.5578–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2164689> [Accessed April 8, 2017].
- Wolf, K. et al., 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-

- amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *The Journal of cell biology*, 160(2), pp.267–77. Available at: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200209006> [Accessed March 27, 2017].
- Wolf, K. et al., 2007. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nature cell biology*, 9(8), pp.893–904. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb1616> [Accessed January 22, 2017].
- Wolf, K. & Friedl, P., 2011. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends in Cell Biology*, 21(12), pp.736–744. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.006>.
- Wyckoff, J. et al., 2004. A Paracrine Loop between Tumor Cells and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors. *Cancer Research*, 64(19), pp.7022–7029. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466195> [Accessed April 18, 2017].
- Wyckoff, J.B. et al., 2007. Direct Visualization of Macrophage-Assisted Tumor Cell Intravasation in Mammary Tumors. *Cancer Research*, 67(6), pp.2649–2656. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17363585> [Accessed April 2, 2017].
- Yadav, L. et al., 2014. Matrix metalloproteinases and cancer - Roles in threat and therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(3), pp.1085–1091.
- Yamaguchi, H. et al., 2009. Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer research*, 69(22), pp.8594–602. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-09-2305> [Accessed March 27, 2017].
- Yamaguchi, H. et al., 2005. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *The Journal of cell biology*, 168(3), pp.441–52. Available at: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200407076> [Accessed January 21, 2017].
- Yamaguchi, H. et al., 2010. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase I $\alpha$  are required for invadopodia formation in human breast cancer cells. *Cancer*

- Science*, 101(7), pp.1632–1638. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20426790> [Accessed March 27, 2017].
- Yamaguchi, H., Pixley, F. & Condeelis, J., 2006. Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *European Journal of Cell Biology*, 85(3–4), pp.213–218.
- Yu, Q. & Stamenkovic, I., 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & development*, 14(2), pp.163–76. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652271> [Accessed April 8, 2017].
- Yu, Q. & Stamenkovic, I., 1999. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes & development*, 13(1), pp.35–48. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887098> [Accessed April 8, 2017].
- Yurchenco, P.D., Amenta, P.S. & Patton, B.L., 2004. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biology*, 22(7), pp.521–538. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996432> [Accessed March 28, 2017].