

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Vývojová a buněčná biologie



Mgr. Ladislav Merta

Analýza plasticity invazivity nádorových buněk
The analysis of plasticity of cancer cell invasiveness

Disertační práce

Školitel:

doc. RNDr. Jan Brábek Ph.D.

Praha, 2020

On the back cover of their final issue was a photograph of an early morning country road, the kind you might find yourself hitchhiking on if you were so adventurous. Beneath it were the words: "Stay Hungry. Stay Foolish." It was their farewell message as they signed off. Stay Hungry. Stay Foolish. And I have always wished that for myself.

Steve Jobs

Prohlášení:

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

V Praze, 11.9.2020

.....
Ladislav Merta

Poděkování:

Doktorské studium byla nepochybně neopakovatelná zkušenost, která za téměř sedm let prověřila mé fyzické, ale i psychické síly. Zažil jsem nadšení z vědeckého bádání, poznal jsem spoustu skvělých lidí, ale také jsem zahlédl pár odvrácených stránek vědy a téměř doslova si sáhl na dno, díky čemuž jsem byl po pěti letech studia a mnoha marných bojích s větrnými mlýny pevně rozhodnut studium v rámci zachování psychického zdraví ukončit.

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Janu Brábkovi Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a ochotnou pomoc při práci v Laboratoři invazivity nádorových buněk. Mé díky rozhodně patří i druhému vedoucímu naší laboratoře doc. RNDr. Danielu Röselovi, Ph.D.

Dále bych chtěl poděkovat všem členům (současným i bývalým) Laboratoře invazivity nádorových buněk za vytvoření unikátního místa pro práci, za veškerou pomoc, za všechny úsměvy, za všechna slova podpory a za všechno milé všední i nevšední, co jsme spolu zažili. Jmenovitě bych rád poděkoval Marušce Charvátové, která je vždy ochotná s čímkoli pomoci a je pro nás všechny v podstatě takovou laborkovou mámou, bez které by tato laboratoř nebyla tím, čím je (ač si to Maruška sama nechce připustit). Dále pak děkuji Anetě Gandalovičové, se kterou jsme si vzájemně celou dobu „kryli záda“ a vybojovali společně nejednu bitvu (nejen) proti stovkám nitrocelulózových membrán a tisícům buněk v kolagenu. Rovněž chci poděkovat Vladimíru Čermákovi, který mi udělil nejbolestivější, ale zároveň nejintenzivnější lekci mezilidských vztahů a otevřel mi oči co se týče typologie lidí na pracovišti i mimo něj.

Mé obrovské díky patří prof. RNDr. Janu Černému Ph.D., který, ač má práce nad hlavu, se zajímá o osudy doktorandů a který mě svým upřímným zájmem namotivoval k překonání hluboké krize a dokončení doktorského studia, když jsem ho chtěl definitivně ukončit. Stejně tak děkuji všem, kteří mě v mém původním záměru podpořili, přestože ukončit něco těsně před cílem je pro řadu lidí nepochopitelné rozhodnutí, „když už by se to přeci dalo vydržet“.

V neposlední řadě děkuji své manželce za podporu, lásku a pochopení po dobu mého studia i mimo něj. Můj dík patří rovněž všem dalším členům mé rodiny, kteří mě po celou dobu studia velmi podporovali.

Vám všem, i těm, které jsem z prostorových důvodů nejmenoval, velice děkuji.

Práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK 712217) a The Kellner Family Foundation (Kellner Family Foundation Principal Investigator Grant).

Abstrakt

Schopnost nádorových buněk využívat různé invazivní módy (tzv. plasticita invazivity nádorových buněk) představuje značnou překážku v léčbě metastazujících nádorů. Nádorová invazivita zahrnuje mnoho různých způsobů migrace. Buňky se mohou pohybovat společně (se zachovanými mezibuněčnými kontakty; kolektivní invazivita) či individuálně. V rámci individuální invazivity pak rozlišujeme dva základní způsoby – mezenchymální a améboidní. Mezenchymální způsob migrace je charakterizován protáhlým tvarem buněk, proteolytickým štěpením vláken mezibuněčné hmoty a tvorbou pevných kontaktů s mezibuněčnou hmotou. Améboidní způsob je nezávislý na proteolytické aktivitě, buňky jsou charakteristické kulatým tvarem a zvýšenou kontraktilitou, kterou používají k protahování se skrze póry mezibuněčné hmoty. Tato disertační práce se zabývá analýzou plasticity invazivity nádorových buněk, konkrétně přechodů mezi individuálním améboidním a mezenchymálním migračním módem, ve 3D prostředí kolagenové matrix jakožto modelu mezibuněčné hmoty. Práce představuje modely mezenchymálně-améboidního přechodu (MAT), které zahrnují buněčné linie BLM, HT1080 a MDA-MB-231, v nichž je MAT indukováno expresí konstitutivně aktivní malé GTPázy RhoA či pomocí dasatinibu, inhibitoru kinázy Src. Rovněž byl ustanoven „nenádorový“ model plasticity buněk založený na M2 makrofázích v kolagenové matrix o různé hustotě. Následně byla provedena transkriptomická a proteomická analýza vybraných modelů. Tyto analýzy odhalily zvýšenou expresi prozánětlivých genů a sníženou expresi genů regulujících buněčný cyklus v améboidních buňkách. Expresní profil genů a hladina proteinových produktů vybraných cílů zapojených v MAT byly následně ověřovány pomocí RT-qPCR a imunoblotů. Následným srovnáním velice různorodých veřejně dostupných transkriptomických datasetů zachycujících přechod mezi mezenchymálním a améboidním módem invazivity ve 3D prostředí byla odhalena zvýšená exprese dlouhé nekódující RNA MALAT1 (Metastasis-Associated Long Adenocarcinoma Transcript 1) v améboidních buňkách. Toto pozorování bylo následně ověřeno pomocí RT-qPCR. Pro další výzkum úlohy MALAT1 v invazivní plasticitě nádorových buněk byly připraveny klony se sníženou expresí MALAT1 v silně améboidních buněčných liniích A375m2 a A2058. U obou sad klonů vedlo snížení exprese MALAT1 ke snížení množství aktivního RhoA, jehož vysoká hladina je typickým znakem améboidní invazivity, a zároveň ke zvýšení proliferace těchto buněk. U klonů odvozených od linie A375m2 pak snížení hladiny MALAT1 vedlo navíc k améboidně-mezenchymálnímu přechodu (AMT) a zvýšení invazivity těchto buněk ve 3D prostředí kolagenové matrix.

Klíčová slova: améboidní invazivita, AMT, invazivita nádorových buněk, lncRNA, MALAT1, MAT, mezenchymální invazivita

Abstract

The ability of cancer cells to adopt various invasive modes (the plasticity of cancer cell invasiveness) represents a significant obstacle in the treatment of cancer metastasis. Cancer invasiveness involves various modes of migration. Cells can move together (with the preserved intercellular junctions; collective invasiveness) or individually. Within individual invasiveness, we distinguish two principal invasive modes – mesenchymal and amoeboid. The mesenchymal mode of migration is characterized by an elongated shape, proteolytic degradation of the fibres of the extracellular matrix, and the formation of strong contacts with the extracellular matrix. The amoeboid mode of migration is not dependent on proteolytic activity, the cells are characterized by a round shape and increased contractility, which they use to squeeze themselves through the pores of the extracellular matrix. This thesis deals with the analysis of the plasticity of cancer cell invasiveness, specifically the transitions between individual amoeboid and mesenchymal migration modes, in the 3D environment of the collagen gel as a model of extracellular matrix. The work presents models of mesenchymal-to-amoeboid transition (MAT), which include BLM, HT1080 and MDA-MB-231 cell lines, in which MAT is induced by the expression of constitutively active small GTPase RhoA or by the treatment with the Src inhibitor dasatinib. A non-cancer model of cell plasticity based on M2 macrophages in collagen of different density was also established. Subsequently, transcriptomic and proteomic analysis of selected models was performed. These analyses revealed increased expression of proinflammatory genes and decreased expression of cell cycle regulating genes in amoeboid cells. The gene expression profile and the level of protein products of selected targets involved in MAT were subsequently verified using RT-qPCR and immunoblotting. Subsequent comparison of the very diverse publicly available transcriptomic datasets analysing the transition between mesenchymal and amoeboid mode of invasion in a 3D environment revealed increased expression of the long non-coding RNA MALAT1 (Metastasis-Associated Long Adenocarcinoma Transcript 1) in amoeboid cells. This observation was subsequently verified by RT-qPCR. To further investigate the role of MALAT1 in the invasive plasticity of cancer cells, clones with decreased level of MALAT1 expression derived from strongly amoeboid cell lines A375m2 and A2058 were prepared. In both sets of clones, a decrease in MALAT1 expression led to a decrease in the amount of active RhoA (the high level of RhoA is a typical characteristic of amoeboid invasiveness), and also to an increase in the proliferation rate of these cells. In addition, in clones derived from the A375m2 line, a decrease in MALAT1 levels led to an amoeboid-to-mesenchymal transition (AMT) and an increase in the invasiveness of these cells in the 3D environment of the collagen matrix.

Key words: amoeboid invasion, AMT, cancer cell invasion, lncRNA, MALAT1, MAT, mesenchymal invasion

Obsah

Obsah	7
1. Seznam použitých zkratk	9
2. Úvod	13
3. Literární přehled	14
3.1. Rakovina a metastazování	14
3.1.1. Rakovina	14
3.1.2. Metastazování	15
3.2. Invazivita nádorových buněk	16
3.2.1. Mezibuněčná hmota (extracelulární matrix)	17
3.2.2. Módy invazivity nádorových buněk	17
3.2.2.1. Kolektivní invazivita	17
3.2.2.2. Mezenchymální invazivita	18
3.2.2.3. Améboidní invazivita	20
3.2.2.4. Porovnání mezenchymální a améboidní invazivity	22
3.3. Plasticita invazivity nádorových buněk	23
3.3.1. Determinanty ECM v buněčné invazivitě	26
3.3.2. Buněčné determinanty v buněčné invazivitě	29
3.3.3. Epiteliálně-mezenchymální přechod (EMT)	30
3.3.4. Mezenchymálně-améboidní přechod (MAT)	30
3.3.5. Améboidně-mezenchymální přechod (AMT)	32
3.3.6. Kolektivně-améboidní přechod (CAT)	32
3.4. Dlouhé nekódující RNA ve výzkumu rakoviny	32
3.5. Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1)	33
3.5.1. Objev	33
3.5.2. Lokalizace a struktura MALAT1	34
3.5.3. Exprese MALAT1 v lidském těle	35
3.5.4. Funkce MALAT1	35
3.5.4.1. Alternativní sestřih	35
3.5.4.2. Buněčná proliferace	36
3.5.4.3. Migrace nádorových buněk	36
3.5.5. Interakční partneři MALAT1	36
4. Metody a výsledky	38
4.1. Metody	38
4.1.1. Materiál a chemikálie	38
4.1.2. Kultivace buněčných linií	41
4.1.3. Mikroskopie buněk ve 2D prostředí	41
4.1.4. Morfologie buněk ve 3D kolagenové matrix	42
4.1.4.1. Vysazování buněk do kolagenové matrix	42

4.1.4.2. Analýza buněčné morfologie v 3D kolagenu	43
4.1.5. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce na vzorcích připravených reverzní transkripcí (RT-qPCR)	43
4.1.5.1. Příprava RNA lyzátů z buněk ve 3D kolagenové matrix	43
4.1.5.2. Izolace RNA	43
4.1.5.3. Reverzní transkripce	43
4.1.5.4. RT-qPCR	44
4.1.5.5. Testování primerů a analýza standardních křivek	45
4.1.6. Imunoblots	46
4.1.7. Bioinformatické analýzy	47
4.1.7.1. Určení překryvů mezi datasety	47
4.1.7.2. <i>Enrichment</i> analýzy	48
4.2. Výsledky	49
4.2.1. Důležitost studia invazivity nádorových buněk ve 3D prostředí	49
4.2.2. Améboidní fenotyp je spjat s prozánětlivou signalizací a potlačením buněčného cyklu	49
4.2.3. Korelace buněčné morfologie ve 3D prostředí a hladiny MALAT1	58
4.2.4. Potenciální modely studia AMT	59
5. Diskuze	61
5.1. Experimentální modely využité pro analýzu MAT	62
5.2. Analýza modelů MAT	63
5.2.1. Transkriptomická a proteomická analýza buněk podstupujících MAT	63
5.2.2. Ověření vybraných cílů se zvýšenou expresí v améboidních buňkách identifikovaných „omickými“ přístupy	64
5.2.3. Ověření vybraných cílů se sníženou expresí v améboidních buňkách identifikovaných „omickými“ přístupy	66
5.3. Úloha dlouhé nekódující RNA MALAT1 v plasticitě invazivity nádorových buněk	67
6. Shrnutí	72
7. Publikace a podíl na jejich přípravě	73
8. Seznam použité literatury	75
9. Přílohy	85

1. Seznam použitých zkratek

1D	1-Dimensional (jednorozměrný)
2D	2-Dimensional (dvojměrný)
3D	3-Dimensional (trojměrný)
AMT	Amoeboid-to-Mesenchymal Transition (améboidně-mezenchymální přechod)
AP-1	Activator protein 1
ARHGAP22	Rho GTPase-activating protein 22
Arp2/3	Actin-related protein 2/3 complex
ASO	antisense oligonucleotides („antisense“ oligonukleotidy)
bp	base pairs (počet párů bází)
C/EBPβ	CCAAT-enhancer-binding protein β
C/EBPγ	CCAAT-enhancer-binding protein γ
C/EBPδ	CCAAT-enhancer-binding protein δ
C3	Complement component 3
CAF	Cancer-Associated Fibroblast (fibroblasty asociované s nádory)
CAT	Collective-to-Amoeboid Transition (kolektivně-améboidní přechod)
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
cDNA	complementary DNA (komplementární DNA)
CEBPB	CCAAT-enhancer-binding protein β gene
CEBPD	CCAAT-enhancer-binding protein δ gene
CEBPG	CCAAT-enhancer-binding protein γ gene
CEMIP	Cell Migration Inducing Protein
Cq	cycle quantification value
DAS	dasatinib
DIAPH3	Diaphanous-related formin-3
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid (deoxyribonukleová kyselina)
DOCK3	Dedicator of cytokinesis 3
dox	doxycycline (doxycyklin)
ECM	Extracellular matrix (mezibuněčná hmota)
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermální růstový faktor)
EIF4H	Eukaryotic translation initiation factor 4H
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition (epiteliálně-mezenchymální přechod)
EphA2	Ephrin type-A receptor 2
F-actin	Filamentous actin (vláknitý aktin)
FBS	Fetal Bovine Serum
FOSL1	Fos-related antigen 1 gene
Fra-1	Fos-related antigen 1
GAP	GTPase-Activating Protein

GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDP	Guanosine diphosphate (guanosindifosfát)
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GST	Glutathione S-Transferase
GTP	Guanosine triphosphate (guanosintrifosfát)
HGF	Hepatocyte Growth Factor (hepatocytární růstový faktor)
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor 1
HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
HRP	Horseradish peroxidase (křenová peroxidáza)
icaRhoA	inducible constitutively active RhoA (inducibilní konstitutivně aktivní RhoA)
IFI6	Interferon alpha-inducible protein 6
IFNγ	interferon γ
IFNω	interferon ω
IKK	I κ B kinase
IL6	Interleukin 6
IL11	Interleukin 11
IL24	Interleukin 24
ISG15	Interferon Stimulated Gene 15
JAK	Janus kinase
JAK1	Janus kinase 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAP	Liver-enriched Activator Protein
LIP	Liver-enriched Inhibitory Protein
lncRNA	long non-coding RNA (dlouhá nekódující RNA)
MALAT1	Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
mascrRNA	MALAT1-associated small cytoplasmic RNA
MAT	Mesenchymal-to-Amoeboid Transition (mezenchymálně-améboidní přechod)
MET	Mesenchymal-to-Epithelial Transition (mezenchymálně-epiteliální přechod)
MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
miR	micro-RNA
miRNA	micro-RNA
MLC	Myosin Light Chain (lehký řetězec myosinu)
MMP	Matrix Metalloproteinase (matrixové metaloproteinázy)
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger RNA
NCI	National Cancer Institute
ncRNA	non-coding RNA (nekódující RNA)
NEAT1	Nuclear Enriched Abundant Transcript 1

NEAT2	Nuclear Enriched Abundant Transcript 2
NEDD9	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NNMT	Nicotinamide N-Methyltransferase
nt	nucleotide (nukleotid)
OAS1	2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1
ORA	Over-Representation Analysis
p38	p38 mitogen-activated protein kinase
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
PKCα	Proteinkinase C α (proteinkináza C α)
p-MLC	phosphorylated Myosin Light Chain (fosforylovaný lehký řetězec myosinu)
POLR2A	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
PSMA1	Proteasome subunit alpha type-1
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RBD	Rho Binding Domain
rcf	relative centrifugal force (relativní centrifugační síla)
RhoA	Ras homolog family member A
RhoC	Ras homolog family member C
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleic Acid (ribonukleová kyselina)
ROCK	Rho-associated protein kinase
rRNA	ribosomal RNA (ribozomální RNA)
RT	Reverse Transcription (reverzní transkripce)
RT-qPCR	Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction (kvantitativní PCR s předřazenou reverzní transkripcí)
SD	Standard Deviation (směrodatná odchylka)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Standard Error of the Mean (standardní chyba průměru)
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
snoRNA	Small nucleolar RNA (malá jadéřková RNA)
snRNA	Small nuclear RNA (malá jaderná RNA)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STAT2	Signal Transducer and Activator of Transcription 2
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TBS	Tris-Buffered Saline
TGFβ	Transforming Growth Factor β
tRNA	transfer RNA (transferová RNA)

TYK2	Tyrosine kinase 2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulární endoteliální růstový faktor)
WNT	Wingless-related integration site
Xist	X-inactive specific transcript
ZFN	Zinc-Finger Nucleases (nukleázy se zinkovými prsty)

2. Úvod

Na rakovinu zemřou ročně po celém světě miliony lidí. K většině těchto úmrtí pak dojde přímo či nepřímo v důsledku schopnosti nádorových buněk šířit se z primárního nádoru a efektivně osidlovat tělo pacienta (metastazovat). V tomto ohledu je klíčová schopnost nádorových buněk vycestovat z primárního nádoru, invadovat skrze mezibuněčné hmotu, vstoupit do cévního řečiště, v cévním řečišti přežít, opustit ho a invadovat skrze mezibuněčnou hmotu do místa, kde jsou vhodné podmínky pro vytvoření sekundárního nádoru.

Jako logický krok v léčbě rakoviny se tak jeví zablokování migrace nádorových buněk v těle pacienta. V minulosti bylo testováno mnoho velice slibných látek pro léčbu metastáz (např. inhibitory proteáz štěpících extracelulární matrix), které však v praxi neměly žádný výrazný efekt nebo naopak průběh onemocnění ještě zhoršovaly. Ukázalo se totiž, že blokovaly pouze jeden z mnoha způsobů invazivity, které nádorové buňky dokážou využívat. Situaci navíc komplikuje fakt, že nádorové buňky vykazují často tzv. invazivní plasticitu – tedy mohou konkrétní mód invazivity měnit v závislosti na okolním prostředí (hustota tkáně, okolní buňky, přítomnost farmaka apod.). Tyto módy však nejsou řízeny jednou jednoduchou signální dráhou, ale celým komplexem signalizačních a regulačních drah s mnoha vstupy a výstupy, proto je třeba na jejich charakterizaci pohlížet komplexně. Ze stejného důvodu nejsou tyto módy fenotypicky úplně ostře ohraničeny a existuje mnoho mezistavů. Základním členěním je rozdělení nádorové invazivity na kolektivní, kdy buňky migrují společně, a individuální, kterou dále dělíme na mezenchymální a améboidní.

Pro účinnou léčbu metastazování nádorových buněk je třeba detailně porozumět přechodům mezi jednotlivými invazivními módy, aby bylo možno vyvinout léčbu, která bude účinně inhibovat nádorovou invazivitu, ničit konkrétní buňky a nedovolí jim uniknout této léčbě změnou migračního módu.

Velkou výzvou je výzkum nádorové invazivity ve 3D prostředí, protože ač byly základy oboru položeny výzkumem migrace buněk na plastových miskách či mikroskopických sklíčkách, ukazuje se, že invazivita buněk ve 2D a ve 3D prostředí není stejná. Aby bylo možno se co nejvíce přiblížit podmínkám *in vivo* bylo v poslední době vyvinuto nemalé úsilí ustanovit modelové matrice pro analýzu invazivity buněk ve 3D prostředí.

Tématem předkládané disertační práce je lépe porozumět přechodům mezi améboidním a mezenchymálním způsobem invazivity nádorových buněk (tedy analyzovat plasticitu invazivity nádorových buněk). Cílem disertační práce je ustanovit funkční modely AMT (améboidně-mezenchymální přechod) a MAT (mezenchymálně-améboidní přechod), následně provést plošnou studii těchto modelů na transkriptomické a proteomické úrovni a v neposlední řadě se zaměřit na funkční význam kandidátních molekul klíčových v AMT/MAT. Cílem je rovněž provést všechny klíčové analýzy ve 3D prostředí, protože invazivní plasticita se může plně manifestovat pouze pokud se buňka pohybuje v trojrozměrném prostředí. Tyto poznatky by měly výrazně rozšířit znalosti o zmíněných přechodech a identifikovat případné nové konkrétní cíle pro terapii nádorových metastáz.

3. Literární přehled

3.1. Rakovina a metastazování

3.1.1. Rakovina

National Cancer Institute (NCI) definuje pojem rakovina jako nemoc, při které se abnormální buňky nekontrolovaně dělí a mohou invadovat do okolních tkání [1]. Celosvětově přibylo v roce 2018 zhruba 17 milionů nových případů rakoviny a v důsledku tohoto onemocnění zemřelo 9,6 milionů lidí [2]. Léčba rakoviny je velice náročná, protože se jedná o komplexní onemocnění, které vzniká kombinací mnoha faktorů. V praxi to znamená, že každý případ je svým způsobem unikátní. Na druhou stranu ale každý případ vykazuje určité obecné charakteristiky. Tyto charakteristiky byly výborně shrnuty Douglasem Hanahanem a Robertem A. Weinbergem a jsou nyní známy pod anglickým označením „Hallmarks of cancer“ (do češtiny by bylo možné výraz přeložit jako „typické znaky rakoviny“) [3]. Jednotlivé obecné znaky rakoviny jsou znázorněny na Obrázku 1. Předkládaná disertační práce se zaměřuje především na jeden z těchto typických znaků rakoviny (který je však pro zdraví pacientů nejnebezpečnější a zároveň je to jediný unikátní znak zhoubných nádorů) – aktivaci invazivity a metastazování.

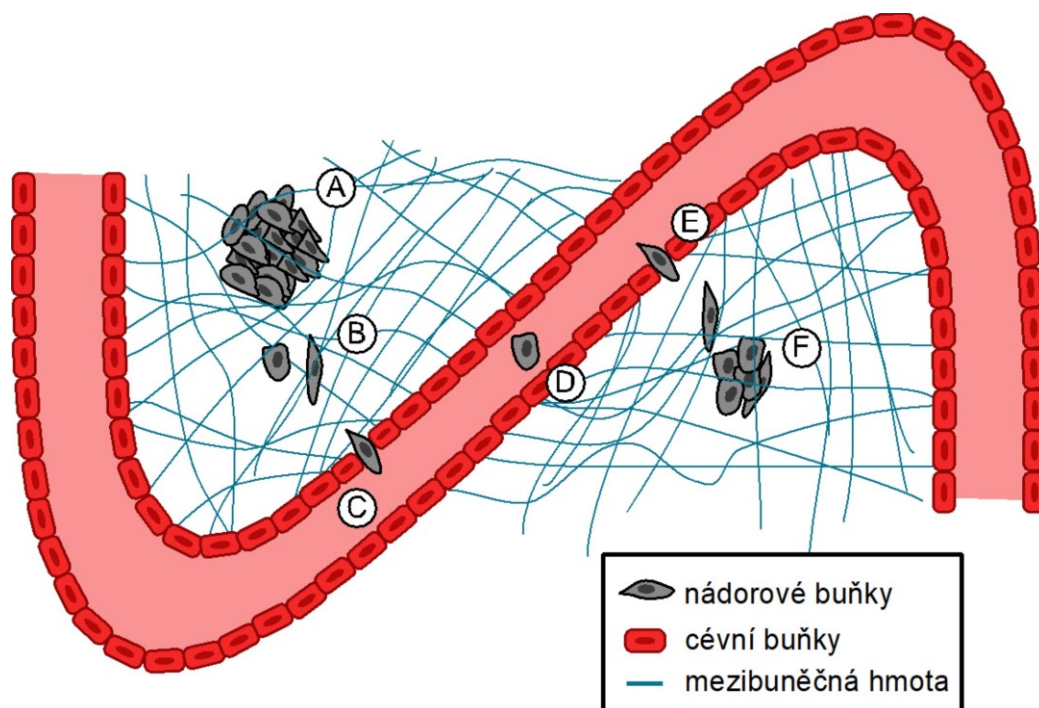


Obrázek 1 | Obecné znaky rakoviny („Hallmarks of cancer“)

Upraveno podle [3]

3.1.2. Metastazování

Odhaduje se, že více než 90 % úmrtí na rakovinu je přímo nebo nepřímo způsobeno metastazováním nádorových buněk [4]. Toto obrovské číslo je nejspíš i důvodem, proč je dnes věnováno značné úsilí zavedení nové kategorie léčiv v rámci nádorové léčby (tzv. migrastatik) do klinické praxe. Tradiční pilíře protinádorové léčby (chirurgické vynětí nádoru, radioterapie a chemoterapie) cílí totiž primárně na velikost nádorů, která však nebere v potaz schopnost nádorových buněk metastazovat [5]. Metastazování je několikastupňový proces, který zahrnuje uvolnění buněk z primárního nádoru, jejich invazi skrze mezibuněčnou hmotu (extracelulární matrix, ECM), vstup do krevního nebo lymfatického řečiště, šíření skrze cévy, opuštění cévního řečiště a kolonizaci sekundárních oblastí. V rámci této kolonizace se nádorové buňky usazují v prostředí s vhodnými podmínkami (často je to např. místo se známkami zánětu) a pokračují v nekontrolovaném dělení jako v případě primárního nádoru [6]. Celý proces je schematicky znázorněn na Obrázku 2.



Obrázek 2 | Schéma procesu metastazování

Schéma zjednodušeně zachycuje jednotlivé kroky procesu metastazování. Z primárního nádoru (A) se uvolňují buňky (B), které migrují ECM a vstupují do cévního řečiště (C), jsou unášeny proudem krve (D) a na vhodném místě krevní řečiště opouštějí (E), migrují skrze ECM a vytvářejí ihned či po období dormance (období klidu) sekundární nádor (metastázi; F).

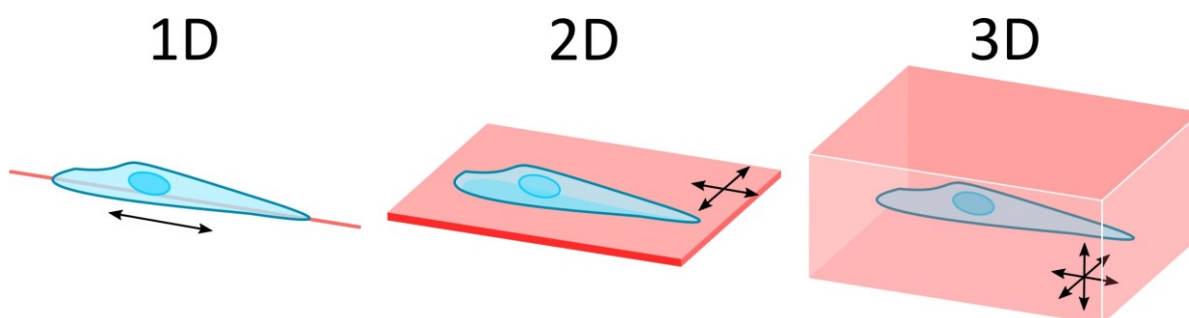
Velký zájem o výzkum metastazování dokladuje i fakt, že v rámci položky „aktivace invazivity a metastazování“ z výčtu obecných znaků rakoviny [3] již vznikla podskupina obecných znaků metastazování (z anglického „Hallmarks of Metastasis“). Autoři tohoto konceptu definovali v roce 2019 celkem čtyři základní znaky metastazování – pohyblivost a invazivitu (schopnost nádorových buněk opouštět primární nádor a pohybovat se tkáněmi), modulaci mikroprostředí (schopnost ovlivňovat, či dokonce přitahovat okolní nenádorové

buňky), plasticitu (schopnost přizpůsobovat se měnícím se podmínkám prostředí) a kolonizaci (schopnost přežít v jiném prostředí než byl primární nádor a toto prostředí si přizpůsobit) [7]. Předkládaná práce se v rámci těchto čtyřech znaků metastazování zabývá primárně plasticitou invazivity nádorových buněk a způsobem jejich pohybu.

3.2. Invazivita nádorových buněk

Buněčná migrace je naprosto zásadní pro tvorbu, organizaci a udržování stability těl mnohobuněčných organismů. Tento jev je klíčový v embryogenezi, imunitní odpovědi, udržování tkáňové homeostázy a při opravě nejrůznějších poškození tkání [8]. Všechny zmíněné fyziologické procesy využívají různé způsoby pohybu buněk v rámci organismu. Rakovinné buňky při svém šíření v těle proto mohou využívat tyto nejrůznější v genetickém materiálu předpřipravené migrační programy.

Při výzkumu invazivity buněk je třeba uvažovat i o různých typech prostředí pro migraci. Úplně obecně lze konstatovat, že se buňky mohou pohybovat v 1D prostředí (např. migrace podél vlákna mezibuněčné hmoty), ve 2D prostředí (tedy na ploše) či ve 3D prostředí (tedy obvykle ve 3D síti proteinových vláken) [9]. Zjednodušené schéma všech typů prostředí dle možných dimenzí migrace jsou znázorněny na Obrázku 3.



Obrázek 3 | Zjednodušené schéma obecných typů prostředí pro migraci

Buňky mohou migrovat v jednom rozměru (1D; např. podél vlákna mezibuněčné hmoty) ve dvou rozměrech (2D; např. stěna cévy či Petriho miska) či ve třech rozměrech (3D; např. mezibuněčná hmota).

Vytvořeno podle [10]

Doposud bylo popsáno mnoho různých způsobů invazivity nádorových buněk. Práci na výzkumu účinných látek zamezujícím tvorbě metastáz výrazně ztěžuje fakt, že nádorové buňky mohou využívat různé módy invazivity podle aktuálního genetického programu a podmínek prostředí (hlavně pak vlastností ECM v daném místě). Pokud se program nebo podmínky prostředí změní, reagují často i nádorové buňky změnou módu invazivity [11]. V této kapitole budou nejprve krátce shrnuty vlastnosti mezibuněčné hmoty jakožto prostředí pro pohyb nádorových buněk, následně budou představeny a diskutovány základní módy invazivity nádorových buněk. Poznatky o přechodech mezi módy invazivity budou představeny v následující kapitole.

3.2.1. Mezibuněčná hmota (extracelulární matrix)

Mezibuněčná hmota je složena z mnoha různých látek – převážně se jedná o vláknité proteiny (např. kolagen a elastin) a glykoproteiny (např. fibronectin, proteoglykany a laminin). Mezibuněčná hmota je v podstatě trojrozměrným molekulárním „sítím“ složeným z vláken a otvorů (pórů), kterými se mohou buňky pohybovat. Složení, hustota, architektura a další vlastnosti mezibuněčné hmoty určují, jaká bude její tuhost (překlad z anglického originálu „stiffness“) [12]. Buňky jsou schopné tuhost mezibuněčné hmoty detekovat pomocí specializovaných receptorů (integriny, syndecany, receptory s discoidinovou doménou) [13].

Nádory jsou často desmoplastické, což znamená chronický zánět, aktivované fibroblasty, zvýšenou angiogenezi, přestavby mezibuněčné hmoty a zvýšené množství proteinů mezibuněčné hmoty. Všechny tyto faktory způsobují, že je vnitřek nádoru obvykle tužší než okolní tkáň [14]. Ve studii zkoumající rakovinu prsu bylo např. popsáno zvýšené ukládání kolagenových vláken, která jsou navíc více lineární a tlustší [15]. Rovněž bylo prokázáno, že tato zvýšená tuhost nádorů a upravené vlastnosti ECM podporují invazivitu nádorových buněk a jejich šíření do okolních tkání [16].

3.2.2. Módy invazivity nádorových buněk

Pro pohyb v mezibuněčné hmotě využívají nádorové buňky 2 hlavní módy migrace – kolektivní (pohyb jako skupina) nebo individuální (pohyb jednotlivých buněk). Je velice zajímavé, že ač byly obě tyto základní kategorie invazivních módů popsány již před více než 60 lety [17], stále zůstává velké množství nezodpovězených otázek vedoucích k jejich detailnímu pochopení. Situace je totiž komplikována faktem, že v rámci těchto dvou základních kategorií rozlišujeme další podkategorie. Např. v rámci individuálních invazivních módů rozlišujeme minimálně dvě základní podkategorie – invazi améboidní a mezenchymální. Všechny zmíněné módy invazivity budou popsány v následujících podkapitolách. Důraz bude kladen hlavně na individuální invazivitu, jelikož předkládaná práce se přímo tímto typem invazivity zabývá.

3.2.2.1. Kolektivní invazivita

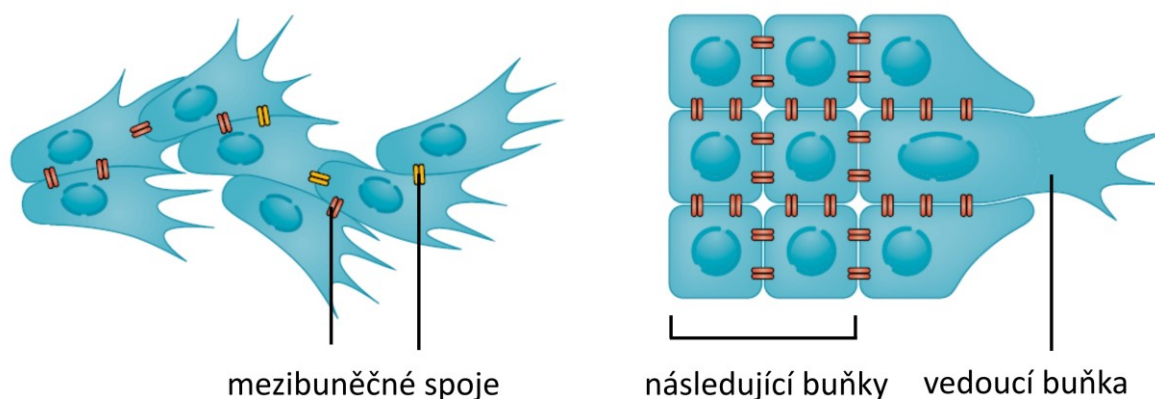
Kolektivní invazivita je zásadní pro celou řadu fyziologických procesů (např. gastrulace, prodlužování tělních os obratlovců, migrace buněk neurální lišty či uzavírání ran), ale byla popsána i v řadě případů šíření nádorových buněk [10].

Kolektivní invazivita se vyznačuje třemi základními znaky, které jsou společné pro všechny její formy. Buňky jsou během migrace fyzicky a funkčně spojeny pomocí mezibuněčných spojů, síť aktinových vláken je v celé skupině polarizovaná a generuje trakční a protruzivní síly a pohybující se skupina buněk remodeluje okolní mezibuněčnou hmotu např. vytvářením cest pomocí proteolytické degradace ECM [18]. V rámci kolektivní invazivity existuje obrovská variabilita v konkrétní formě migrace – od skupin obsahujících dvě až čtyři buňky až po útvary obsahující buňky, které ani nejsou v přímém kontaktu s ECM, jelikož se nacházejí uvnitř skupiny. Obvykle se vedle klasické kolektivní migrace skupiny spojených

buněk rozlišuje ještě tzv. „mnohobuněčný streaming“ (kdy buňky migrují v jedné řadě za sebou) a expanzivní růst (kdy se buňky nepohybují aktivně, ale jsou tlačeny masou dělicích se buněk) [19].

Kolektivně migrující skupiny buněk jsou jasně polarizované. Vpředu se nachází „vedoucí buňka“, která je následována zbytkem útvaru a která má obvykle polarizovaná aktinová vlákna a vytváří výběžky bohaté na aktin, pomocí kterých interaguje s ECM, a vytváří tak trakční sílu pohánějící útvar dopředu. Vedoucí buňky jsou obvykle schopny vylučovat proteolytické enzymy, které jsou schopné degradovat vlákna mezibuněčné hmoty, a vytvářet tak cestu pro migraci [19,20]. Roli vedoucí buňky nemusí mít pouze nádorová buňka, ale mohou ji navíc zaujmout i fibroblasty asociované s nádorem (*Cancer-Associated Fibroblasts*; CAFs) [21]. Role vedoucí buňky je velice dynamická a bylo pozorováno, že buňky v migrujícím útvaru se na této pozici střídají (tato pozice je totiž poměrně energeticky náročná). Čím hustší je prostředí pro migraci, tím rychleji se buňky na vedoucí pozici střídají. Vedoucí buňky vykazují větší příjem glukózy, ale rovněž rychlejší vyčerpání zásob energie, díky čemuž může být střídání buněk na vedoucí pozici útvaru vnímáno jako sdílení metabolické zátěže kolektivně migrujícími buňkami [22]. Schéma kolektivně migrujících buněk je na Obrázku 4.

V experimentech využívajících myší modely rakoviny prsu byly izolovány polyklonální buněčné klastry v každém stupni metastatického procesu (od stádia primárního nádoru až po plicní metastázu), což jasně dokladuje význam výzkumu kolektivního způsobu migrace nádorových buněk [23,24].



Obrázek 4 | Schéma kolektivní invazivity

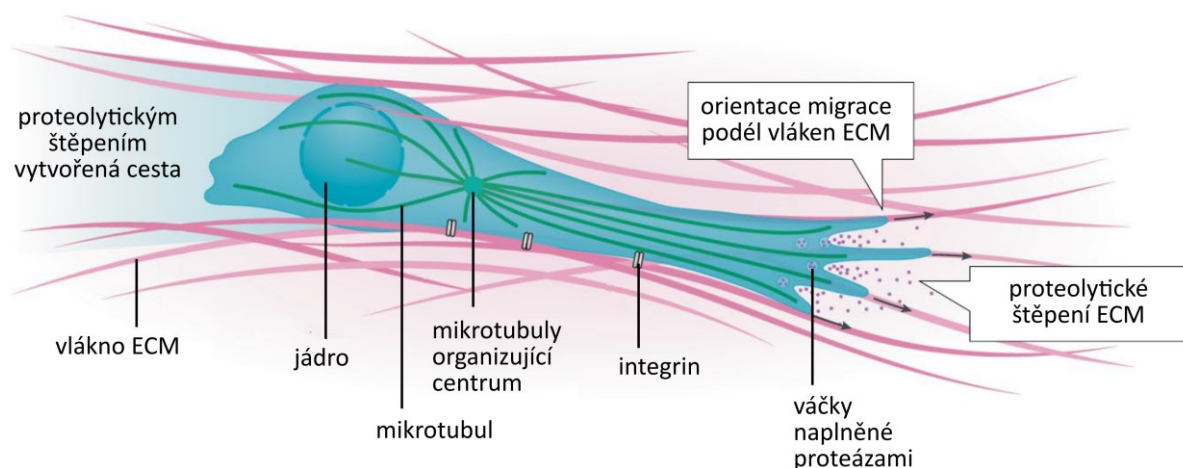
Schéma zachycuje kolektivně migrující buňky. Vlevo je znázorněna volnější kolektivní migrace, vpravo jsou k sobě buňky těsně přimknuty.

Upraveno podle [10]

3.2.2.2. Mezenchymální invazivita

Individuální mezenchymální způsob invazivity je fyziologicky typický pro fibroblasty a keratinocyty. Zároveň ho však využívá řada nádorů různých typů [8]. Mezenchymálně migrující buňky jsou typické protáhlým tvarem, závislostí na tvorbě fokálních adhezí s ECM

a produkcí enzymů degradujících ECM (matrixové metaloproteinázy (MMP), kathepsinové cysteinové proteázy a serinové proteázy). Zmíněné enzymy vytváří v síti extracelulární matrix cesty pro invadující buňky, proto můžeme mezenchymálně migrující buňky chápat jako „buňky, které si pro invazi vytvářejí cesty v ECM“ (z anglického *path-makers*) [25,26]. Schéma mezenchymálně migrující buňky je na Obrázku 5.



Obrázek 5 | Schéma mezenchymální buňky

Upraveno podle [10]

V migraci mezenchymálních buněk byla popsána celá řada membránových výběžků, jejichž tvorba a struktura je založena na polymerizaci cytoskeletárních aktinových vláken. V přední části buněk se vytváří lamellipodia a filopodia. Lamellipodia jsou obvykle ploché útvary s rozvětvenou sítí aktinových vláken (za rozvětvení je zodpovědný komplex Arp2/3, který větví aktinová vlákna pod úhlem 70°). Filopodia často (ale ne vždy) tvoří jakési prodloužení lamellipodií a jsou to tenké prstovité výběžky tvořené paralelně uspořádanými vlákny aktinu. Oba typy struktur vytváří kontakty s ECM (fokální adheze) a jsou znázorněny na Obrázku 7 na straně 23. Proteolytická aktivita štěpící vlákna ECM je spojena s tzv. invadozomy. Invadozomy se rozdělují na podozomy (tvořené normálními buňkami) a invadopodia (tvořené buňkami nádorovými) [26].

V migrující buňce jsou aktinová vlákna uspořádána do tzv. stresových vláken, která jsou orientována ve směru pohybu. Pokud se buňka pohybuje ve vláknitém prostředí jsou stresová vlákna směrově často v podstatě prodloužením vláken vně buňky [10,27]. Mikrotubuly organizující centrum je u mezenchymálních buněk obvykle umístěno před jádrem ve směru migrace [10].

Mezenchymálně migrující buňky nejprve v přední části vytvoří protruzivní struktury (lamellipodia a filopodia), které se díky polymerizaci aktinu protahují dopředu. Následně se přichycují k ligandům v extracelulární matrix (obvykle prostřednictvím integrinů), a dochází tak k tvorbě mnohosložkového komplexu (tzv. fokální adheze), který propojuje ECM a vnitřní aktinový cytoskelet. Přetrvávající polymerizace aktinu vytváří sílu, která tlačí buňku směrem vpřed. V zadní části buňky naopak dochází k rozrušování fokálních adhezí a je zde klíčová

kontrakce aktinových vláken pomocí myosinu II, čímž dochází k retrakci zadní části buňky [28,29]. Úloha lamellipodií a filopodií v mezenchymální migraci je typická v 1D a 2D prostředí, je však třeba zdůraznit, že ve 3D prostředí mají dominantní úlohu invadopodia [30].

Klíčové proteiny pro mezenchymální způsob invazivity jsou GTPázy Cdc42 a Rac1, které jsou zodpovědné za polymerizaci aktinu (tedy formování filopodií, lamellipodií a invadopodií). Pro kontrakci zadní části pohybující se buňky je pak zásadní dráha Rho/ROCK [31].

Mezenchymální invazivita je oproti améboidní považována za pomalou. Konkrétní rychlost samozřejmě závisí na konkrétním buněčném typu a prostředí, ale udává se průměrná rychlost přibližně 1 $\mu\text{m}/\text{min}$. Nižší rychlost migrace je dána hlavně nutností vytvářet a rozrušovat fokální adheze během pohybu buněk. Mezenchymální buňky ve 3D prostředí rovněž musejí degradovat ECM, což také zpomaluje celkovou rychlost migrace [32].

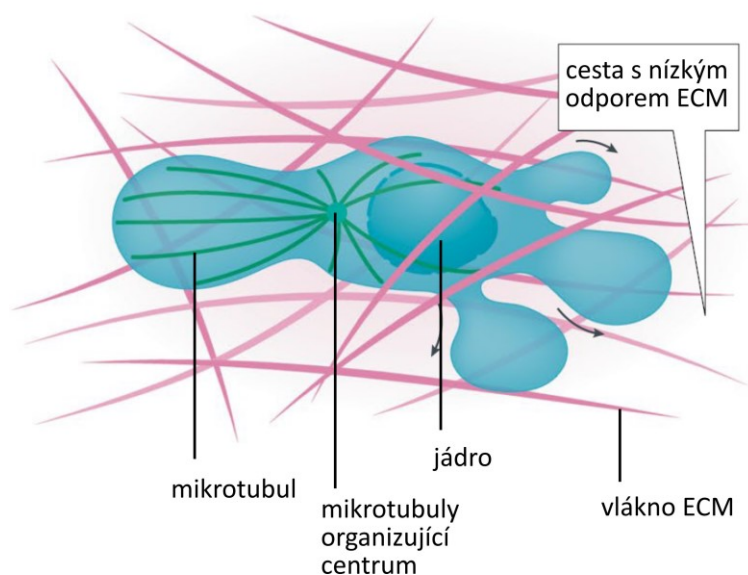
Mezenchymální invazivita je vhodná v prostředích, kde je dostatek vazebných míst pro přichycování buňky k ECM pomocí fokálních adhezí. Vzhledem k možnosti produkovat proteolytické enzymy štěpící mezibuněčnou hmotu, je tento způsob invazivity výhodný v prostředích s malými póry, kde se limitací v pohybu stane velikost rigidního buněčného jádra (viz dále) [33].

3.2.2.3. Améboidní invazivita

Druhým typem individuální migrace nádorových buněk je invazivita améboidní. V tělech obratlovců je tento způsob invazivity typický pro buňky imunitního systému a prekuzory pohlavních buněk [10]. Na rozdíl od mezenchymálního módu jsou buňky migrující améboidně spíše kulaté a často vykazují intenzivní membránové deformace (ať už ve formě membránových protruzí nebo hydrostatickým tlakem formovaných blebů). Ukázka membránových blebů je vyobrazena na Obrázku 7 (strana 23). Tyto buňky mohou vytvářet přechodné adheze s ECM, ale nevytváří silné fokální adheze jako buňky mezenchymální. Namísto toho využívají silnou kontraktilitu, díky které se protahují skrze póry existující v mezibuněčné hmotě (z tohoto důvodu je lze považovat za „buňky, které při invazi hledají cestu skrze ECM“ – z anglického *path-finders*) [10,25]. Až donedávna se uvádělo, že améboidně migrující buňky neprodukují matrixové metaloproteinázy (MMP), ovšem v některých pracích z posledních let byly tyto enzymy při améboidní migraci detekovány [34]. Schéma améboidně migrující buňky se nachází na Obrázku 6 na následující straně.

Aktinový cytoskelet je v améboidních buňkách organizován převážně ve formě tzv. kortikálního aktinu, což je silná vrstva aktomyosinových vláken přímo pod cytoplazmatickou membránou [27]. To má samozřejmě svůj funkční význam, jelikož améboidní způsob migrace je charakteristický silnou aktomyosinovou kontraktilitou řízenou pomocí dráhy Rho/ROCK [31]. Pro améboidní invazivitu často charakteristické bleby vznikají ve chvíli, kdy dojde k lokálnímu narušení připojení aktomyosinového kortexu na plazmatickou membránu. V takovém případě dojde k „vyhřeznutí“ plazmatické membrány v důsledku silných hydrostatických sil, které jsou s kontrakcemi vnitřního vodného prostředí buňky neoddelitelně

spjaté [27]. Mikrotubuly organizující centrum je u améboidních buněk obvykle umístěno za jádrem [10].



Obrázek 6 | Schéma améboidní buňky

Upraveno podle [10]

Nedávno byl experimentálně popsán základní mechanismus améboidní migrace. Aktivace RhoA v zadní části buňky spustí kontrakci kortikálního aktomyosinového prstence. Díky tomu začne plazmatická membrána putovat ve směru zadní části buňky, což generuje tangenciální viskózní síly, které buňku tlačí vpřed. Membrána je v zadní části endocytována klatrinovými váčky, které jsou polarizovaně směřovány zpět do přední části buňky. Proto se při migraci nemění tvar ani celková velikost povrchu buňky. Občas je tento model migrace buněk nazývaný „fontánový“, jelikož dozadu se pohybující (tekoucí) membrána připomíná tok vody ve vodní fontáně [35,36].

Pro améboidně migrující buňky je limitujícím faktorem velikost pórů v ECM. Bylo ukázáno, že pokud je velikost póru menší než cca $7 \mu\text{m}^2$, nádorové buňky mají problém pórem transportovat rigidní jádro (pozn. mezenchymálně migrující buňky tento problém nemají, protože mohou využít matrixové metaloproteinázy a ECM hydrolyticky štěpit), a proto je tento rozměr limitem v migraci bez možnosti proteolytického štěpení ECM [37]. Ukázalo se však, že buňky jsou schopné upravit hladinu laminů (proteinů udržujících integritu jaderného obalu) tak, aby bylo jejich jádro více deformovatelné. V takovém případě je však jádro náchylnější k prasknutí a poškození DNA [38]. Améboidně migrující leukocyty rigidní buněčné jádro využívají k hledání vhodné cesty skrze ECM. Bylo ukázáno, že pomocí protlačování jádra zkoušejí velikost pórů a následně pro další migraci volí ty o vhodné velikosti (tedy ty, které jádru kladou nejnižší odpor) [39]. Pokud se pro améboidně migrující buňku stane velikost póru limitujícím faktorem, zůstane v síti vláken uvězněna. V takové situaci se nabízí možnost přepnout na jiný (a pro aktuální podmínky vhodnější) způsob migrace – viz kapitolu 3.3.

Améboidní invazivita je oproti mezenchymální považována za rychlou. Konkrétní rychlost samozřejmě závisí na uvažovaných buňkách a prostředí, ale udává se průměrná rychlost přibližně 10-20 $\mu\text{m}/\text{min}$. Améboidní buňky mohou dosahovat těchto rychlostí pohybu, protože nepotřebují čas pro tvorbu a rozrušování fokálních adhezí a pro degradaci vláken mezibuněčné hmoty [32].

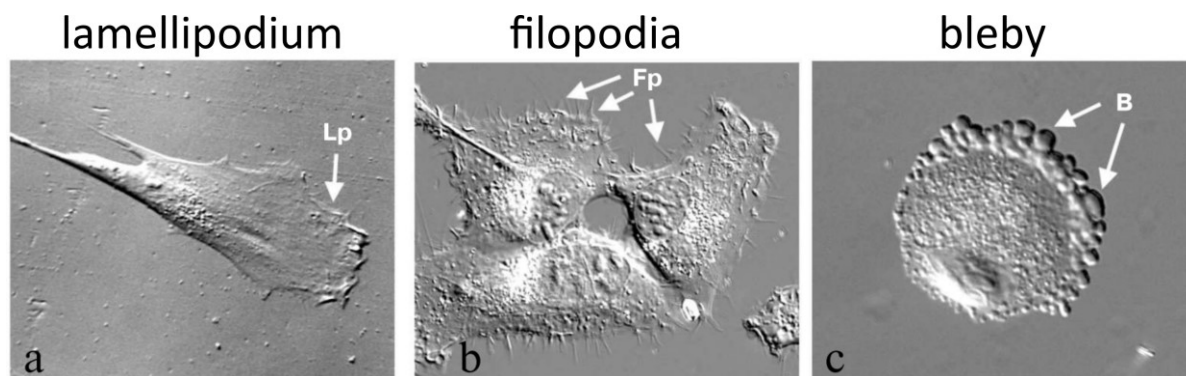
Améboidní invazivita je vhodná v prostředích, kde není dostatek vazebných míst pro „přichycování“ pomocí fokálních adhezí (neadhezivní prostředí, velmi velké póry, krevní řečiště), jelikož na tomto mechanismu není závislá [33].

3.2.2.4. Porovnání mezenchymální a améboidní invazivity

Jelikož se předkládaná práce zabývá přechody mezi améboidní a mezenchymální invazivitou, jsou základní charakteristiky obou invazivních módů pro názornost přehledně shrnuty a vzájemně porovnány v Tabulce 1. Ukázka membránových protruzí spojených s oběma typy invazivity je pak uvedena na Obrázku 7 na následující straně.

Tabulka 1 | Shrnutí rozdílů mezi mezenchymální a améboidní invazivitou

znak	mezenchymální invazivita	améboidní invazivita
tvár	protažený	kulatý
membránové výběžky	lamellipodia, filopodia, invadozomy	bleby
klíčové GTPázy	Rac1, Cdc42	RhoA
rychlost	nižší (~ 1 $\mu\text{m}/\text{min}$)	vyšší (~ 10-20 $\mu\text{m}/\text{min}$)
degradace ECM	ano	ne
nutnost tvorby kontaktů s ECM	ano	ne
organizace aktinového cytoskeletu	síť vláken vpředu (lamellipodia) a stresová vlákna napříč buňkou	kontraktilní kortikální kortex
mechanismus migrace	vysunutí membránové protruze, tvorba kontaktu s ECM, posun vpřed, retrakce zadní části buňky	tlačení se vpřed pomocí aktomyosinové kontraktility a posunu membrány vzad („fontánový model“)
limit migrace	neadhezivní prostředí	malé póry v ECM
obecná taktika migrace v ECM	tvorba cesty v ECM	hledání cesty v ECM



Obrázek 7 | Membránové protruze

Lamellipodia (a) a filopodia (b) jsou membránové protruze typické pro mezenchymální invazivitu (ve 3D prostředí jsou to pak hlavně tzv. invadopodia). Bleby (c) jsou typické pro buňky pohybuující se améboidně.

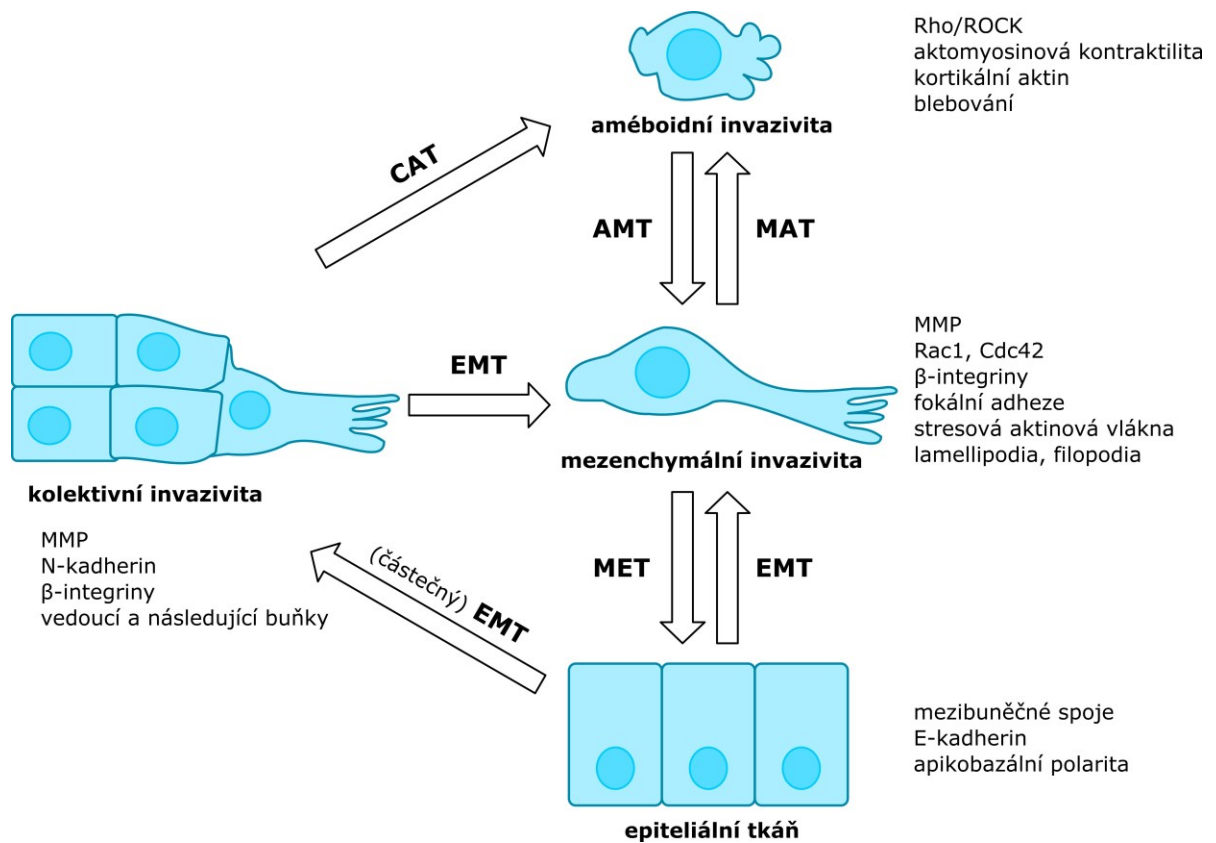
Upraveno podle [40]

3.3. Plasticita invazivity nádorových buněk

Zásadní překážkou léčby rakovinných metastáz je schopnost nádorových buněk přepínat mezi různými módy invazivity v závislosti na aktuálních podmínkách okolního prostředí (a to i přesto, že většina buněčných typů má svůj výchozí převládající mechanismus invaze). Tento jev se nazývá plasticita invazivity nádorových buněk [11]. Je třeba zdůraznit, že rozlišované kategorie módů invazivity je třeba brát jako typologii invaze, a ne jako neměnné programy, protože existují i různé mezistavy, kdy buňky využívají dle aktuálních potřeb různé prvky různých módů, aby co nejlépe reagovaly na aktuální podmínky prostředí [10,41].

Vybrané přechody, které jsou v následujícím textu diskutovány, a typické znaky, které je provázejí, jsou souhrnně zobrazené na Obrázku 8 na následující straně.

Existuje více možností, jak vyjádřit spektrum přechodů mezi různými módy invazivity, zejména podle toho, co chtějí autoři dané práce akcentovat. Většina znaků, která je v těchto schématech využita, je však podobná. Obvykle se vychází z epitelové tkáně, jakožto nemigrující apikobazálně polarizované struktury. Plasticita invazivity nádorových buněk může být vnímána jako postupná dediferenciace epitelů (viz Obrázek 9 na následující straně) [42], jako 2D matrice založená na dvou hlavních parametrech (adhezivita závislá na integrinech a kontraktilita zajištěná myosinem II; viz Obrázek 10 na straně 25) [43], jako závislost tří proměnných (mezibuněčné spoje, kontraktilita a obrat tvorby adhezí mezi buňkou a prostředím pro invazi; viz Obrázek 11 na straně 25) [19] či jako laditelný model zahrnující mnoho parametrů (z anglického *multiscale tuning model*; viz Obrázek 12 na straně 26) [41]. Vybraná schémata zahrnují i různé speciální podkategorie kolektivní, mezenchymální či améboidní invazivity. Předkládaná práce si však neklade za cíl popsat všechny tyto pozorované podkategorie.



Obrázek 8 | Schéma přechodů mezi jednotlivými invazivními módy

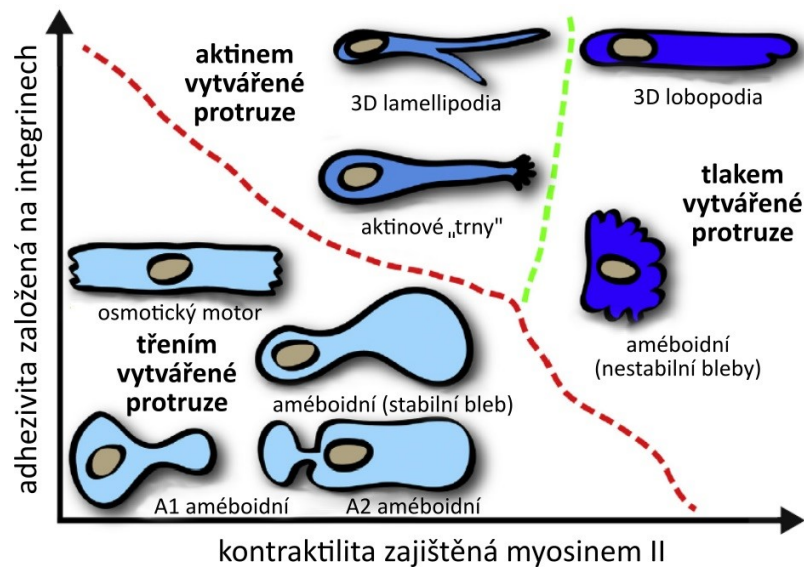
Schéma zachycuje přechody mezi různými invazivními módy, přičemž vychází z epiteliální tkáň. Pro každý mód jsou uvedeny typické znaky. EMT = epiteliálně-mezenchymální přechod; MET = mezenchymálně-epiteliální přechod; AMT = améboidně-mezenchymální přechod; MAT = mezenchymálně-améboidní přechod; CAT = kolektivně-améboidní přechod.



Obrázek 9 | Plasticita buněčné invazivity jakožto postupná dediferenciace buněk

Tento model vnímá plasticitu invazivity nádorových buněk jako postupnou dediferenciaci epitelových buněk, kdy s postupující dediferenciací jsou potlačovány mezibuněčné spoje a adhezivita buňky k ECM. Améboidní buňky jsou v tomto modelu chápány jako nejvíce dediferenciované oproti výchozím epitelovým buňkám.

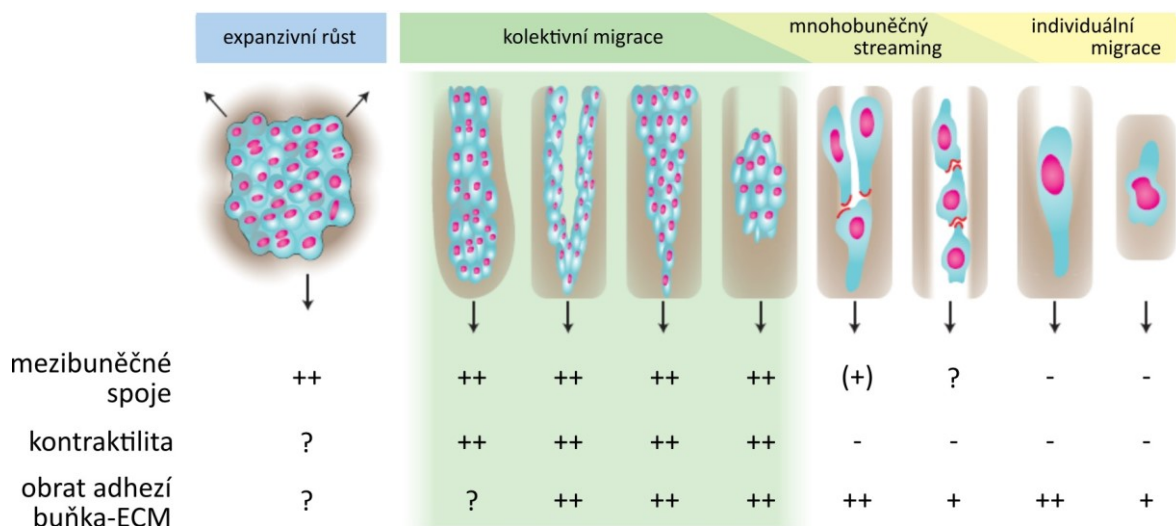
Upraveno podle [42]



Obrázek 10 | Plasticita individuální invazivity

Tento model popisuje plasticitu invazivity buněk jakožto závislost na dvou zásadních parametrech – adhezivitě založené na integrinech a kontraktilitě zajištěné myosinem II. Tento model nevyužívá klasické dělení buněk na améboidní a mezenchymální, ale třídí je dle síly, která generuje membránové protruze.

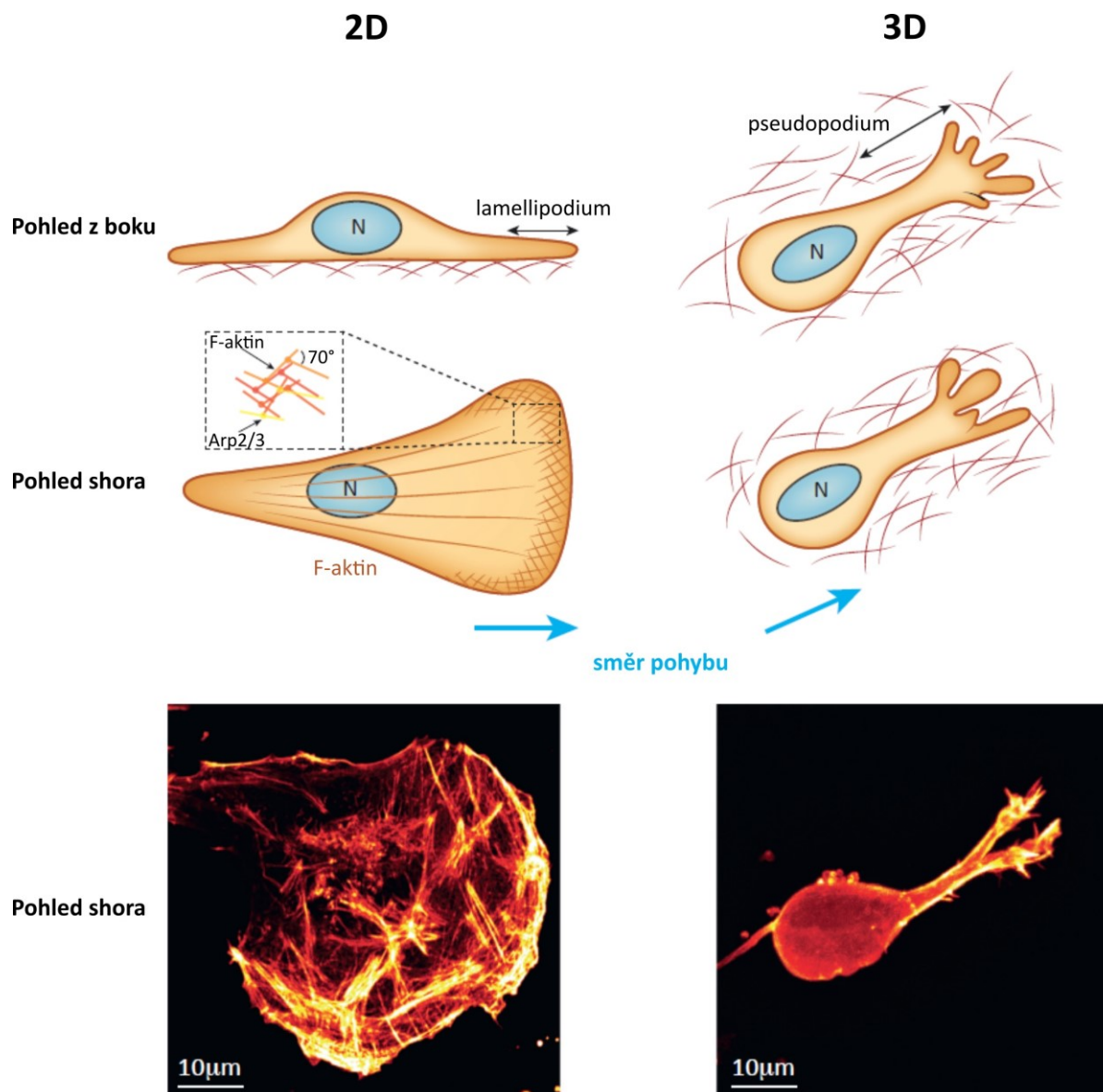
Upraveno podle [43]



Obrázek 11 | Vzorce buněčné invazivity

Schéma sleduje tři parametry v různých módech invazivity buněk. V těchto parametrech je možné sledovat obecné vzorce v různých módech invazivity (tedy např. ztrátu mezibuněčných spojů u individuální migrace apod.).

Upraveno podle [19]



Obrázek 13 | Morfologie buněk ve 2D a 3D prostředí

Buňky se ve 2D prostředí potýkají s jinou topologií okolních vláken než ve 3D, a proto je i jejich morfologie jiná. Ve 2D vytvářejí buňky plochá a poměrně rozsáhlá lamellipodia založená na polymeraci aktinu (F-aktin = vláknitý/polymerizovaný aktin) s využitím komplexu Arp2/3. Ve 3D prostředí mají buňky jiný tvar a využívají spíše prstovitá pseudopodia. N = jádro.

Upraveno podle [30]

Velice důležité je rovněž složení prostředí pro migraci buněk – tedy, zda je buňka s danými biomolekulami (proteiny či proteoglykany ECM) schopna tvořit adheze, zda je schopna tyto konkrétní látky efektivně štěpit či zda je schopna je případně deformovat. Konkrétní složení samozřejmě určuje i všechny mechanické vlastnosti takového prostředí, které jsou blíže rozebrány níže [13].

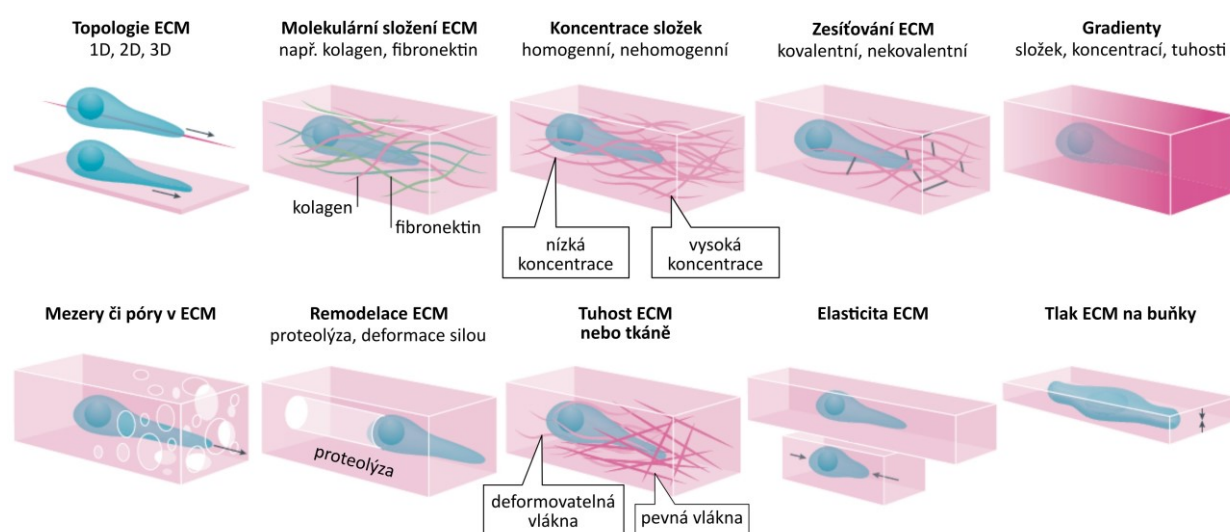
Dalším zásadním parametrem je hustota ECM (či ECM mimikující experimentální matrix) a velikost pórů. Bylo například ukázáno, že se zvyšujícím se průměrem pórů se snižuje

rychlost migrujících buněk, protože nemají příležitost vytvářet tolik adhezí s prostředím [44]. Naopak příliš malé póry (a tedy velká hustota prostředí) mohou migraci zastavit či způsobit přechod na proteolytický program [13]. V současné době existují pro výzkum invazivity buněk různé syntetické či polosyntetické matrice stejně jako přístupy využívající přirozené polymery. Standardem v tomto ohledu jsou matrice založené na kolagenu I. Pro reprodukovatelné výsledky je však třeba kontrolovat celou řadu parametrů takovýchto laboratorně připravovaných matic, protože jejich hustota a velikost vytvořených pórů je silně závislá na koncentraci použitého kolagenu, na pH či na teplotě využitých pro polymeraci – čím vyšší koncentrace, teplota a pH, tím menší póry [13,45].

Zvýšená tuhost tkáně v místě, kde se vyskytuje nádor, je jeho typickým průvodním znakem. Tuhost daného místa (nebo dané experimentální matrix) je dána mj. koncentrací matrice, jejím zesíťováním, v případě ECM pak také poměrem kolagenu a elastinu [46]. Samotný rozdíl v tuhosti prostředí pro migraci buněk může mít zásadní vliv na invazivní mód. Kupříkladu glioblastomové buňky kultivované na tuhém podkladu (sklo či různě koncentrované polyakrylamidové gely) měly protaženou morfologii s jasně viditelnými fokálními adhezemi, zatímco na málo tuhém povrchu buňky vykazovaly morfologii kulatou s malými bleby [47].

Dalším důležitým parametrem buněčné invazivity je uspořádání vláken v ECM. Bylo ukázáno, že rakovinné buňky efektivně migrují podél vláken ECM, která jsou schopny rovněž remodelovat tak, aby byla uspořádána ve směru migrace jako „kolejnice“ pro další buňky. Tuto remodelaci mohou způsobovat také buňky nádorového stromatu (hlavně pak fibroblasty asociované s nádory – CAF) [48].

Výše diskutované a další vybrané vlastnosti ECM důležité pro určení migračního módu buněk jsou schematicky zachycené na Obrázku 14.



Obrázek 14 | Vlastnosti ECM spoluurčující buněčný mód migrace

Upraveno podle [10]

3.3.2. Buněčné determinanty v buněčné invazivitě

Zásadním parametrem, který určuje, zda se buňky pohybují kolektivně nebo individuálně, je přítomnost nebo absence mezibuněčných spojů. V tomto ohledu jsou zásadními molekulami pro propojování buněk kadheriny. Kadheriny na buňkách vytváří homodimery, které následně mohou reagovat s homodimery na okolních buňkách. Pro zformování mezibuněčného kontaktu založeného na kadherinech jsou rovněž zásadní vápenaté ionty [49]. Pokud na povrchu buněk nejsou přítomné kadheriny, buňky se pohybují individuálně. Pokud jsou na povrchu přítomny kadheriny, buňky se k sobě přimykají a pohybují se kolektivně. Pokud nejsou spojeny pevně, ale jsou přítomné, hovoří se často o mnohobuněčném „streamingu“, kdy se buňky pohybují v řadě za sebou a jsou společně asociovány volněji než v klasické kolektivní migraci [41] – viz také kapitulu 3.2.2.1.

Dalším zásadním parametrem buněčné invazivity je, zda buňky vytváří s okolní mezibuněčnou hmotou adhezivní kontakty. Tyto kontakty jsou obvykle zajišťovány proteiny integriny. Integriny jsou transmembránové heterodimerní proteiny, které se svou větší extracelulární doménou vážou na komponenty mezibuněčné hmoty. Na membránu jsou transportovány v neaktivní formě a až po aktivaci se vážou na složky ECM a uvnitř buňky vytváří tzv. adhezom, což je komplex proteinů s různými funkcemi (signalizační, adaptorové či cytoskeletární proteiny). Integriny jsou tak zásadními proteiny pro tvorbu fokálních adhezí, které jsou charakteristickým znakem kolektivní a mezenchymální invazivity [50] – viz kapitolu 3.2.2.2.

Mód buněčné invazivity je rovněž spoluurčován aktivitou klíčových invazivních signalizačních drah. Proteiny z rodiny Rho GTPáz (hlavně pak Rac1, Cdc42, RhoA a RhoC) jsou spojeny s velkým počtem různých fyziologických funkcí zahrnujících např. vývoj organismu a pohyb buněk, ale jsou zároveň klíčové pro invazivitu nádorových buněk. Améboidní způsob migrace je charakteristický aktomyosinovou kontraktilitou řízenou pomocí proteinů Rho/ROCK. Tato dráha je rovněž klíčová pro tvorbu charakteristických blebů. Klíčové proteiny pro mezenchymální způsob invazivity jsou Cdc42 a Rac1, které jsou zodpovědné za polymerizaci aktinu (tedy formování filopodií a lamellipodií ve 2D a invadopodií ve 3D prostředí). Dráha Rho/ROCK je ale potřebná také pro mezenchymální invazivitu (je zodpovědná za kontrakci zadní části pohybující se buňky) [31]. Malé GTPázy jsou regulovány celou řadou signalizačních drah (od drah zodpovědných za přežití všech typů buněk až po specifické dráhy nádorových buněk). Situaci také dále komplikuje fakt, že mezi Rac a Rho/ROCK proteiny funguje systém pozitivních a negativních zpětných vazeb. Přesto je aktuálně nejvíce experimentálních přístupů zkoumajících přechody mezi améboidní a mezenchymální invazivitou cíleno právě na rovnováhu signálních drah Rac1 a Rho/ROCK [51].

Dalším faktorem určujícím invazivní mód buněk je jejich schopnost či neschopnost proteolyticky štěpit vlákna ECM. V tomto ohledu je klíčová skupina tzv. matrixových metaloproteináz. Za normálních podmínek je aktivita těchto enzymů relativně malá (v tkáních jsou totiž přítomny jejich inhibitory), ale při patologických stavech (včetně rozvoje

nádorového onemocnění) je jejich aktivita výrazně zvýšena [46]. Štěpení ECM je typické pro mezenchymální mód invazivity, zatímco améboidně migrující buňky proteolytické štěpení mezibuněčné hmoty nepotřebují [41].

3.3.3. Epiteliálně-mezenchymální přechod (EMT)

Epiteliálně-mezenchymální přechod je zásadní v embryogenezi (gastrulace, tkáňová morfogeneze), zacelování ran, ale zároveň je považován za jeden z prvních kroků metastatické kaskády. Tento proces je reverzibilní, dochází tedy i k tzv. mezenchymálně-epiteliálnímu přechodu (MET; z anglického *Mesenchymal-to-Epithelial Transition*), který však nebude dále diskutován. Během EMT apikobazálně polarizované a obvykle pevně přimknuté buňky epitelu ztrácejí svou typickou morfologii a získávají morfologii mezenchymálně migrující buňky. Typickými znaky provázejícími EMT je snížení exprese E-kadherinů, klaudinů a okludinů (strukturní základ těsných spojů) a $\alpha\beta4$ integrinů a zvýšení exprese N-kadherinu, vimentinu, fibronektinu $\beta1$ a $\beta3$ integrinů a MMP. Transkripční faktory ZEB1, ZEB2, SNAIL, SLUG a TWIST1 jsou zodpovědné za potlačování epiteliálního programu a indukci programu mezenchymálního [52]. Obvykle nedochází k úplnému přechodu, ale k tzv. částečnému EMT – tento částečný přechod je základem kolektivní invazivity nádorových buněk [42].

Jednou z typických drah zapojených v EMT je TGF β dráha. Receptory TGF β rodiny aktivují transkripční faktory Smad2/3, které následně spouštějí expresi EMT transkripčních faktorů. Při výzkumu rakoviny prsu bylo ke studovaným buněčným liniím přidáno TGF β , což vyvolalo EMT. Výsledný fenotyp však nebyl uniformní – některé buňky migrovaly kolektivně, některé individuálně. Zajímavé je, že buňky migrující individuálně měly značený Smad2 lokalizován v jádře, zatímco kolektivně migrující a nemigrující buňky v cytoplazmě [53]. Tento experiment názorně dokládá, že v plasticitě invazivity nádorových buněk je třeba sledovat širší kontext, protože efekty na buňky nejsou často uniformní.

Další signální dráhy spouštějící EMT zahrnují dráhy WNT, NOTCH či MAPK. EMT mohou spustit buňky nádorového stromatu produkcí např. TGF β , IL6 (interleukin 6; prozánětlivý cytokin), EGF (epidermální růstový faktor; mj. stimulátor buněčného dělení), VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor; mj. klíčový mediátor angiogeneze) či HGF (hepatocytární růstový faktor; mj. regulátor buněčného růstu, morfogeneze a invazivity) [52].

3.3.4. Mezenchymálně-améboidní přechod (MAT)

Pro vyvolání MAT (z anglického originálu *Mesenchymal-to-Amoeboid Transition*) je obecně třeba potlačit mezenchymální znaky či indukovat typické znaky améboidní invazivity.

Při hledání klinicky využitelných látek pro léčbu a prevenci metastazování byly velmi slibnou skupinou látek inhibitory proteináz štěpicích ECM při mezenchymální migraci, která byla dlouhou dobu považována za univerzální migrační mód. Při výzkumu těchto inhibitorů však bylo pozorováno, že invazivita nádorových buněk se nečekaně příliš nesnížila. Důvodem bylo přepnutí buněk na améboidní způsob invazivity podstoupením MAT [54]. V buněčných

liniích je dále možné zasáhnout proces formování fokálních adhezí, které jsou pro mezenchymální invazivitu klíčové. Jednou ze zásadních kináz působících při tvorbě fokálních adhezí je kináza Src. Po inhibici proteinu Src byl opět pozorován naprosto jednoznačný přechod z mezenchymální na améboidní invazivitu [55,56].

V předchozím textu bylo zmíněno, že nejvíce experimentálních zásahů při výzkumu MAT/AMT je cíleno na poměr aktivity Rho GTPáz. Exprese konstitutivně aktivního RhoA (RhoA^{G14V}) vyvolalo v mezenchymálních buňkách MAT, avšak přechod byl blokován přidáním ROCK inhibitoru Y27632. Stejně tak ztrátu znaků mezenchymální invazivity ve prospěch invazivity améboidní vykazovaly buňky s expresí aktivní mutanty proteinu ROCK – ROCK-Δ3 [57]. Zároveň MAT vyvolala inhibice aktivity Rac1 (jakožto klíčové GTPázy pro mezenchymální mód invazivity) expresí konstitutivně negativního analogu (Rac1^{T17N}) [57,58].

MAT je možné dosáhnout nejenom přímým zásahem Rho GTPáz klíčových pro daný typ invazivity, ale také jejich regulátorů. Typické regulátory GTPáz jsou dvě skupiny molekul – GEF (z anglického *Guanine nucleotide Exchange Factor*) a GAP (z anglického *GTPase-Activating Protein*). Obecně jsou GTPázy aktivní, pokud mají navázáno GTP (guanosintrifosfát) a neaktivní s navázaným GDP (guanosindifosfát). Po navázání GTP jsou GTPázy v aktivním stavu, ale po (obvykle krátkém) čase GTP samy štěpí na GDP a volný fosfát, čímž se deaktivují. Proteiny s funkcí GEF urychlují výměnu GDP za GTP, a působí tak jako aktivátory. Naopak proteiny s funkcí GAP potencují GTPázou aktivitu, a působí tak jako inhibitory akce GTPáz [59]. Po snížení exprese DOCK3 (GEF protein pro Rac) a NEDD9 (protein zprostředkovávající aktivitu DOCK3 [55]) pomocí siRNA bylo v melanomové buněčné linii A375m2 vyvoláno MAT [58].

Další možností je zásah do procesu degradace klíčových proteinů. MAT tak bylo dosaženo pomocí snížení exprese Smurf1 (E3-ubiquitin ligáza), což vedlo ke snížení degradace RhoA v proteozomu, a tedy zesílení a převládnutí jeho aktivity [60].

MAT je možné dosáhnout také zacílením složek cytoskeletárního systému, který je v invazivitě naprosto zásadní. Pokud byl inhibován komplex Arp2/3 klíčový pro vytváření topografie aktinu vedoucí k tvorbě lamellipodií (což je typický znak mezenchymálních buněk), došlo k MAT [61]. Dalším testovaným experimentálním zásahem bylo zacílení DIAPH3 (Diaphanous-related formin-3). Tento protein patří do skupiny forminů, které podporují polymeraci aktinových vláken a dynamiku mikrotubulů. Při snížení exprese pomocí siRNA a shRNA bylo pozorováno zakulacení buněk a tvorba membránových blebů [62]. Jako třetí příklad cílení na cytoskeletární systém lze uvést destabilizaci systému mikrotubulů pomocí deregulace funkce stathminu [63].

Jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách, výsledný mód invazivity je hodně závislý také na vlastnostech prostředí, ve kterém se buňka pohybuje. Pokud byly mezenchymálně migrující buňky umístěny do prostředí, které nebylo příliš adhezivní [61,64] či byly stlačovány (byl aplikován tzv. *confinement*), došlo k MAT [64].

MAT bylo rovněž dosaženo snížením exprese inhibitoru buněčného cyklu p27^{Kip1} [65] či aktivací PKC α (proteinkináza C α) v mezenchymálních buňkách [66].

3.3.5. Améboidně-mezenchymální přechod (AMT)

Oproti MAT není v literatuře popsáno příliš mnoho studií týkajících se opačného procesu, tedy améboidně-mezenchymálního přechodu (AMT; z anglického *Ameboid-to-Mesenchymal Transition*). Často se však v tomto případě jedná o procesy opačné k těm, které vyvolávají MAT (pokud např. MAT vyvolává inhibice nějakého proteinu, jeho aktivace často vyvolává AMT).

Asi nejznámějším způsobem vyvolání AMT je využití inhibitorů dráhy Rho/ROCK. Takto byl vyvolán AMT u buněk lidského glioblastomu pomocí inhibitoru Y27632 [47], u melanomových buněk A375m2 se to pak podařilo za pomoci inhibitorů kinázy ROCK Y27632 a H1152 [58].

Pokud byla snížena exprese proteinu ARHGAP22, což je GAP GTPázy Rac, byla u buněk A375m2 pozorována protažená morfologie a snížená kontraktilita analyzovaná jako snížení hladiny fosforylovaného MLC (p-MLC; lehký řetězec myosinu; z anglického *Myosin Light Chain*). AMT bylo vyvoláno rovněž aktivací DOCK3 (GEF proteinu Rac), čímž byla aktivována GTPáza Rac klíčová v mezenchymálním módu invazivity [58].

Antagonisticky k dříve popsanému vyvolání MAT pomocí aktivace PKC α , vedla v buňkách A375m2 inhibice této kinázy k AMT [66].

3.3.6. Kolektivně-améboidní přechod (CAT)

Již výše popsaný EMT (epiteliálně-mezenchymální přechod) je v literatuře velice dobře dokumentován a často je tento přechod vnímán jako první tranzice, která může následně pokračovat přechodem mezenchymálně-améboidním [42]. V pracích některých skupin však byl popsán i přechod buněk z kolektivní invazivity přímo na améboidní – tedy kolektivně-améboidní přechod (CAT; z anglického *Collective-to-Amoeboid Transition*).

Tento přechod byl pozorován u melanomových linií po inhibici integrinů β 1 [67]. Dále pak v buňkách 4T1 a SCC38 po indukci hypoxie (tedy snížené dostupnosti kyslíku). Přechod byl závislý na faktoru HIF-1 [68]. Třetí práce popisující CAT dokumentuje tento přechod po naštěpení receptorové tyrozinkinázy EphA2, což výrazně zvyšuje aktivitu RhoA [69].

3.4. Dlouhé nekódující RNA ve výzkumu rakoviny

Současné vědecké trendy ukazují, že v biologickém výzkumu je třeba počítat s novou významnou skupinou regulačních molekul – s tzv. nekódujícími RNA. Tyto RNA, které nejsou překládány, a tudíž neprodukují žádný konkrétní protein, se zdají být zapojené ve velkém množství buněčných procesů, jako je např. růst, regulace genové exprese, programovaná buněčná smrt nebo regulace buněčného cyklu [70]. LncRNA molekuly rovněž

hrají roli v regulaci rezistence rakoviny k léčebným přípravkům [71]. Tyto RNA se dále dělí dle počtu nukleotidů (nt) na ncRNA (z anglického *non-coding RNA*; nekódující RNA; < 200 nt) a lncRNA (z anglického *long non-coding RNA*; dlouhé nekódující RNA; > 200 nt) [70].

Mezi ncRNA patří velmi dobře známé transferové RNA (tRNA) zapojené v translaci proteinů, ribozomální RNA (rRNA) tvořící strukturní a funkční základ ribozomálních podjednotek, malé jaderné RNA (snRNA) podílející se na sestřihu pre-mRNA či malé jadérové RNA (snoRNA) modifikující celou řadu RNA molekul. Všechny zmíněné ncRNA jsou konstitutivně exprimovány a hrají klíčovou úlohu v přežívání buněk [70].

Ač jsou dlouhé nekódující RNA známy už relativně dlouhou dobu, jejich funkce často nejsou přesně popsány. Existují samozřejmě výjimky – např. lncRNA Xist, která hraje roli v inaktivaci chromozomu X [72] nebo lncRNA Kcnq1ot1 a lncRNA Air, které se podílejí na genomickém imprintingu [73]. Dle aktuálních informací projektu GENCODE existuje v lidském genomu téměř 18 000 genů pro lncRNA [74].

O vzrůstajícím zájmu o lncRNA ve výzkumu rakoviny svědčí i fakt, že při zadání klíčových slov „long non coding RNA cancer“ do databáze odborných článků PubMed v časovém rozmezí let 1981-2010 se zobrazí celkem 516 prací. V následující dekádě však počet článků na toto téma vzrostl více než dvacetinásobně [75]. Role dlouhých nekódujících RNA byly popsány v téměř všech klíčových aspektech nádorového onemocnění – jmenovitě např. v detekci a opravách poškození DNA, v úniku nádorových buněk před imunitním systémem, regulaci nádorového metabolismu (včetně reakce na hypoxické prostředí či regulaci Warburgova efektu) [76]. Výjimkou není ani invazivita nádorových buněk a metastazování. Pro téma této práce je důležité, že byly publikovány práce popisující roli dlouhých nekódujících RNA i v plasticitě invazivity nádorových buněk – jmenovitě v EMT [76,77].

Vzhledem k faktu, že v rámci řešení předkládané práce bylo objeveno zapojení dlouhé nekódující RNA MALAT1 (Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transkript 1) v plasticitě invazivity nádorových buněk, představuje následující kapitola aktuální informace o tomto vybraném transkriptu.

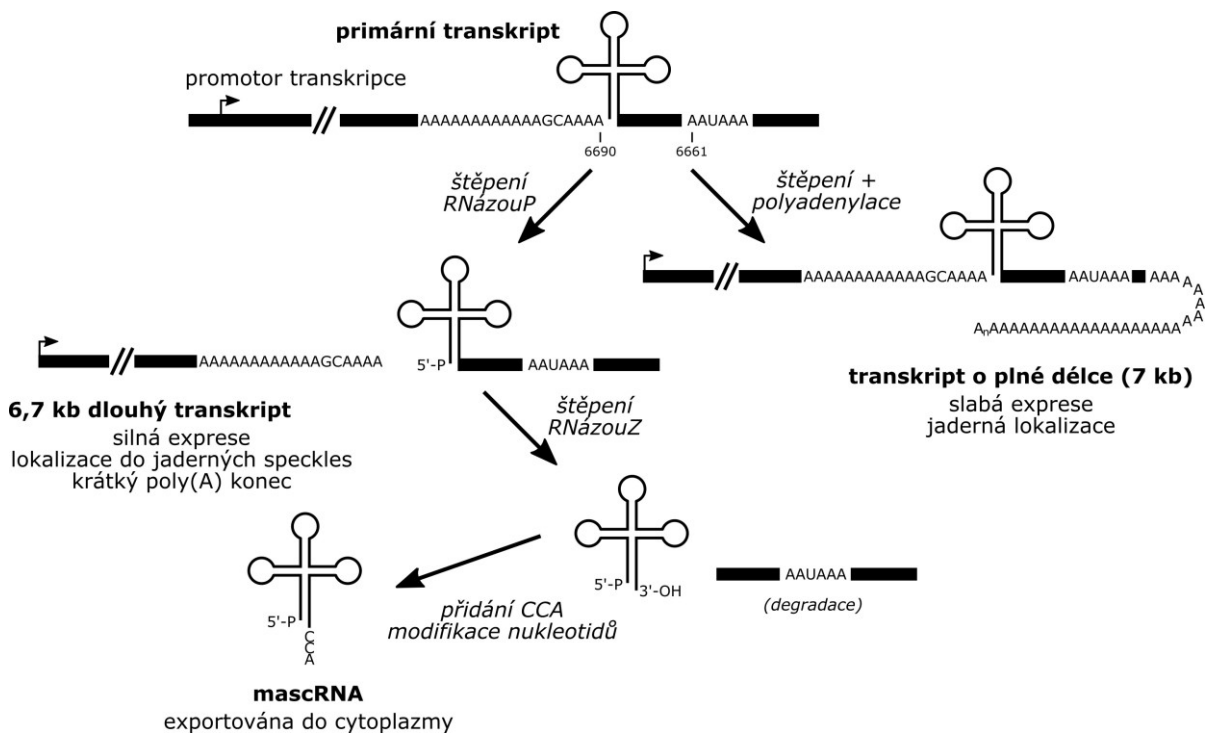
3.5. Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1)

3.5.1. Objev

Dlouhá nekódující RNA MALAT1 (Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1) nebo též NEAT2 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 2) byla původně objevena jako prognostický marker metastazování v průběhu rakoviny plic. Hladina MALAT1 byla zvýšena v nádorech, které v pozdějších stádiích začaly metastazovat. Rovněž byla zvýšená hladina MALAT1 asociována s horší prognózou pacientů [78]. Velice pozoruhodnou charakteristikou MALAT1 je vysoká konzervovanost primární struktury tohoto transkriptu napříč třídou savců [79].

3.5.2. Lokalizace a struktura MALAT1

Gen pro lidskou lncRNA MALAT1 je lokalizován na chromozomu 11 (přesněji v pozici 11q13.1) [79] a je tvořen cca 7 000 páry bazí. Ihned po transkripci RNA polymerázou II je MALAT1 obvykle sestřižen RNázouP a RNázouZ na 2 části – dlouhou (cca 6 700 nt) a krátkou (61 nt). Krátká část vzniká z 3' konce transkriptu a nazývá se mascRNA (MALAT1-associated small cytoplasmic RNA), svým tvarem připomíná molekulu tRNA a jak již název napovídá, je lokalizována do cytoplazmy buněk. Dlouhá část je lokalizována v jádře buňky [80] a není-li uvedeno jinak, je pojmem MALAT1 v této práci myšlena právě tato forma. Schéma úprav primárního transkriptu MALAT1 je zobrazeno na Obrázku 15. Vzhledem k odstřihnutí 3' části transkriptu, postrádá dlouhá verze MALAT1 klasický polyA konec, a měla by být tudíž velice nestabilní. Oproti očekávání je však dlouhá část MALAT1 velice stabilní, protože součástí je 3' koncová sekvence bohatá na adenin, která vytváří trojitou šroubovici, ve které se kombinuje Watson-Crickovské a Hoogsteenovo párování dusíkatých bází [81].



Obrázek 15 | Úpravy transkriptu lncRNA MALAT1

MALAT1 je transkribován RNA polymerázou II. Pokud je primární transkript polyadenylován stejně jako klasické transkripty RNA polymerázy II, je vytvořen transkript MALAT1 o plné délce. Ve většině případů je však primární transkript štěpen RNázou P a RNázou Z a výsledkem je dlouhý transkript MALAT1 (6,7 kb) lokalizovaný v jádře a krátká (61 nt) molekula mascRNA lokalizovaná v cytoplazmě buněk.

Upraveno podle [80]

3.5.3. Exprese MALAT1 v lidském těle

MALAT1 je v lidském těle za fyziologických podmínek exprimován v širokém spektru tkání. Nejvyšší úroveň exprese byla popsána v plicích a slinivce břišní. Střední úroveň pak byla popsána v prostatě, vaječnících, tlustém a tenkém střevu, placentě, slezině, ledvinách, srdci, varlatech a v mozku [78]. Hladina MALAT1 je oproti zdravým tkáním signifikantně zvýšena v nádorových buňkách. Tento jev byl popsán v nejrůznějších typech rakoviny a nádorových buněčných liniích odvozených z různých typů tkání (mj. slinivka břišní, plíce, tlusté střevo, prostata či prsní tkáň) [82,83].

3.5.4. Funkce MALAT1

V rámci buněčného jádra je MALAT1 lokalizován do oblastí, které jsou nazývány *speckles*. Jedná se o zásobárnu sestřihových faktorů pre-mRNA molekul [79,84]. Nedávné studie ukázaly, že vazebná místa pro MALAT1 se nenacházejí pouze ve *speckles*, ale také přímo na chromatinu, a to i v oblastech s aktivní genovou expresí. MALAT1 zde tedy může působit jako pojítka mezi místy aktivní genové exprese a jaderných subdomén zajišťujících sestřih pre-mRNA. MALAT1 však také může působit jako „lešení“, které koncentruje DNA vazebné proteiny [85,86].

In vivo experimenty využívající myší modely neodhalily žádné abnormální fenotypy po knock-outu MALAT1. Nebyly popsány žádné změny v morfologii orgánů, vliv na vývoj organismu, viabilitu ani plodnost za standardních fyziologických podmínek [87,88]. Zajímavé však bylo, že v některých tkáních (nejvíce v tlustém a tenkém střevu) byla po knock-outu MALAT1 zvýšena hladina jiné lncRNA – NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1), která je zásadní pro formování další jaderné subdomény – tzv. *paraspeckles* [89].

MALAT1 se podílí na regulaci genové exprese například interakcí s Polycomb2, který patří do skupiny proteinů remodelujících chromatin [90]. Rovněž bylo popsáno zapojení MALAT1 v tak složitém procesu, jakým je formování synapsí v mozku [91]. Na základě nedávného výzkumu je však třeba zdůraznit, že role MALAT1 v regulaci genové exprese nemůže být snadno generalizována a bude s velkou pravděpodobností specifická v různých tkáních [92].

I přesto, že je MALAT1 transkript znám již déle než 10 let, jeho přesné funkce stále nebyly přesvědčivě dokázány a stále jsou různými výzkumnými skupinami publikovány kontroverzní, občas i kompletně protichůdné, výsledky. Tyto kontroverze jsou blíže diskutovány v následujících sekcích této disertační práce a v závěru práce.

3.5.4.1. Alternativní sestřih

Role MALAT1 v alternativním sestřihu pre-mRNA zůstává stále nejasná. S využitím buněčných linií HeLa a HUVEC bylo popsáno, že MALAT1 je zapojen do alternativního sestřihu mRNA skrze regulaci distribuce, fosforylace či sestřihu mRNA serin/argininových sestřihových faktorů [93,94]. Na druhou stranu plicní nádorové buňky s oběma umlčenými alelami pro MALAT1 nevykazovaly žádné signifikantní rozdíly v alternativním sestřihu

mRNA [92] a myší modely s knock-outem MALAT1 nevykazovaly žádný rozdíl v lokalizaci či fosforylaci sestřihových faktorů oproti kontrolním buňkám [87–89].

3.5.4.2. Buněčná proliferace

Protichůdné výsledky jsou rovněž publikovány pro roli MALAT1 v proliferaci rakovinných buněk. Proliferační potenciál buněk nádoru děložního čípku byl snížen, když byla experimentálně hladina MALAT1 rovněž snížena [95,96], ovšem knock-out genu pro MALAT1 neměl žádný vliv na růst plicního adenokarcinomu a hepatocelulárních nádorových buněk [87]. V jiných pracích buňky se sníženou hladinou MALAT1 vykazovaly dokonce vyšší proliferaci, takže autoři označili tento transkript jako nádorový supresor [97,98].

Experimenty na myších modech ukázaly, že díky snížení hladiny MALAT1 se *in vivo* vytvořilo méně nádorů a tyto nádory byly navíc obecně menší [95,99,100].

3.5.4.3. Migrace nádorových buněk

I při migraci nádorových buněk bylo popsáno zapojení MALAT1. V několika nezávislých experimentech bylo ukázáno, že snížení hladiny MALAT1 vede ke snížení migračního potenciálu nádorových buněk [95,99–101] a navíc bylo ukázáno, že zvýšení exprese MALAT1 nad obvyklou hladinu migraci nádorových buněk zesiluje [100]. Nedávno publikovaná práce je však v ostrém kontrastu k předchozím studiím a ukazuje výrazné zvýšení invazivity a metastatické aktivity po knock-outu MALAT1 [102].

3.5.5. Interakční partneři MALAT1

V současné době je interakce dlouhých nekódujících RNA a dalších molekul – proteinů, ale obzvláště microRNA (miRNA nebo ještě více zkráceně miR) – v centru zájmu mnoha výzkumných skupin. Molekuly miRNA vytvářejí společně s rodinou proteinů Argonaut (Ago) RISC komplex (RNA-Induced Silencing Complex), který vyhledává sekvence (obvykle sekvence mRNA molekul) komplementární k miRNA obsažené v RISC komplexu a tuto cílovou sekvenci štěpí, čímž transkript ničí. Současné studie poukazují na celkem čtyři různé scénáře interakce lncRNA a miRNA. První možností je, že miRNA snižuje stabilitu lncRNA pomocí RISC. Další možností je, že lncRNA funguje jako koncentrátor miRNA molekul tím, že je na sebe váže, čímž snižuje jejich dostupnost v jiných procesech. Zatřetí mohou lncRNA kompetovat s miRNA o vazbu k mRNA a začtvrté jsou některé miRNA vytvářeny přímo štěpením z lncRNA transkriptů [103].

Velice dlouho se předpokládalo, že se aktivita RISC komplexu omezuje pouze na cytoplazmu buněk, a miRNA tedy nemohou přímo ovlivňovat stabilitu transkriptu MALAT1 (pouze skrze regulaci jiných molekul). V literatuře se nicméně setkáváme s celou řadou prací, které interakci mezi MALAT1 a nejrůznějšími miRNA popisují (obvykle vzájemnou negativní zpětnou vazbu). Seznam těchto miRNA zahrnuje např. miR-1 [104,105], miR-9 [106], miR-22-3p [107], miR-99a, miR-100 [108], miR-101 [109], miR-124 [110], miR-125b

[108,111], miR-133 [112], miR-145 [113], miR-205 [114] či miR-217 [109,115]. Ve většině zmíněných studií vystupoval MALAT1 jako pronádorový faktor podporující buněčnou proliferaci a migraci. Zmíněné miRNA snižovaly hladinu MALAT1, a potlačovaly tak buněčné dělení a invazi.

4. Metody a výsledky

Hlavním přehledem výsledků této disertační práce jsou tři publikace, na kterých se autor předkládané disertační práce podílel. Tyto publikace jsou obsaženy jako přílohy na konci disertační práce (sekce „Přílohy“ začínající na straně 85). Publikace jsou řazeny dle data publikování, protože na sebe logicky navazují. Podíl autora je uveden v kapitole „7. Publikace a podíl na jejich přípravě“ na straně 73. Další autorem nashromážděné výsledky rozvíjející publikované práce, které však v publikacích nebyly použity, jsou uvedeny v následujících podkapitolách. Součástí jsou samozřejmě také metody využití k získání těchto výsledků.

Vzhledem k tomu, že výsledky uvedené nad rámec publikovaných výstupů jsou často doplňkem a rozšířením výsledků v těchto publikacích, je namísto krátce čtenáře seznámit se strukturou projektu řešeného v Laboratoři invazivity nádorových buněk, v jehož rámci tato práce vznikala. Jedná se totiž o společný projekt hned několika pracovníků. Společným záměrem bylo vytvořit experimentální modely MAT/AMT a následně analyzovat buňky podstupující tyto přechody na transkriptomické a proteomické úrovni, což vytvořilo jakousi základnu pro navazující práci. Dalším krokem bylo v rámci takto získaných dat hledat dílčí části většího obrazu. Invazivní mód nádorových (ale i nenádorových) buněk totiž není jednoduchá signalizační dráha, ale celý buněčný program, který je tvořen mnoha drahami, které musejí fungovat synchronizovaně. Aktivita některých drah je příčinou invazivního módu, aktivita drah jiných jeho následkem. V rámci tohoto spleťového systému se v Laboratoři invazivity nádorových buněk snažíme objevit a popsat jednotlivé součásti celku. Na základě získaných „omických“ dat tedy byly vytipovány jednotlivé oblasti, které jednotliví výzkumníci dále charakterizují. Autor této disertační práce se podílel na vývoji a popisu experimentálních systémů a ověřování omických výsledků (tedy nastavení oné hledané základny pro navazující projekty) a následně se zaměřil na úlohu dlouhé nekódující RNA MALAT1 v plasticitě invazivity nádorových buněk.

Jelikož jsou níže prezentované výsledky doplňkem publikací, které jsou hlavním přehledem výsledků autora, může být orientace v nich pro čtenáře bez dalších poznámek náročná. Podkapitola 4.2.1. je samostatným krátkým sdělením o důležitosti výzkumu invazivity nádorových buněk ve 3D prostředí. Podkapitola 4.2.2. je doplněním biologických pozorování pro publikaci [116] (Příloha 2). Podkapitola 4.2.3. pak přináší doplňkovou informaci k publikaci [117] (Příloha 3) a podkapitola 4.2.4. zachycuje slibné výsledky pro budoucí výzkum procesu AMT. Všechny výsledky pak jsou diskutovány v logickém sledu v kapitole „5. Diskuze“ této disertační práce.

4.1. Metody

4.1.1. Materiál a chemikálie

Pro přehlednost jsou všechny chemikálie (Tabulka 2 na stranách 39-40) a speciální materiál (Tabulka 3 na straně 41) použité v pokusech uvedených v této disertační práci shrnuty ve formě tabulek, které obsahují rovněž výrobce a katalogová čísla konkrétních položek.

Tabulka 2 | Seznam chemikálií použitých pro pokusy prezentované v předkládané disertační práci

Tabulka obsahuje seznam chemikálií společně s názvem výrobce a katalogovým číslem. Názvy jednotlivých položek jsou pro přehlednost a snazší dohledatelnost v katalogu výrobců ponechány v anglickém jazyce.

Chemikálie	Výrobce	Katalogové číslo
10x Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma	D2429-100ML
10X M-MuLV Reverse Transcriptase Buffer	NEB	B0253S
10X Standard Taq Reaction Buffer	NEB	B9014S
2-mercaptoethanol	Sigma	M-3148
2x RPMI-1640 Medium	Media prep. BIOCEV	N/A
Acetic acid 99% p.a.	Lach-Ner	10047-A99
Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution	Sigma	A3699-100ML
BIRB796 (Doramapimod)	LC Laboratories	D-2744
Bromophenol Blue	Lachema	N/A
Chloroform p.a	Lach-Ner	30450
Ciprofloxacin	Sigma	17850
Collagen R 0.4 % solution sterile	Serva	47256.01
Dasatinib	LC Laboratories	D-3307
DC™ Protein Assay	Bio-Rad	5000112
Deoxynucleotide Set, 100 mM	Sigma	DNTP-100-1KT
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma	D2650-100ML
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma	D5545-1G
Doxycycline hyclate	Sigma	D9891
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – high glucose	Sigma	D6429-500ML
Ethylalcohol 96% p.a.	Lach-Ner	20025-A96
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma	F7524
Folic acid	Sigma	F8758
Gentamicin solution	Sigma	G1272-100ML
Glycerol	Carl Roth	7530.1
Glycine electrophoresis grade	Serva	23391.03
GSK429286A Selective ROCK1/ROCK2 inhibitor	ApexBio Tech	A5611
Guanidium thiocyanate	AppliChem	A4335-0500
HEPES	Carl Roth	9105.2
Hot Start Taq DNA Polymerase	NEB	M0495L
Isopropylalcohol p.a.	Lach-Ner	20037-AT0

Magnesium chloride hexahydrate (MgCl ₂ .6H ₂ O)	Sigma	M2670-500G
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega	M170B
M-MuLV Reverse Transcriptase	NEB	M0253L
N-Lauroylsarcosine sodium salt Molecular biology grade	AppliChem	A7402
Phenol	Sigma	P1037-500G
Ponceau S	Sigma	P3504
PS-1145 hydrochloride	Santa Cruz Biotechnology	sc-301621
Recombinant Human IFN γ	PeprTech	300-02
Recombinant Human IFN ω	PeprTech	300-02J
RPMI–1640 Medium	Sigma	R8758-500ML
SB202190	Santa Cruz Biotechnology	sc-202334A
Sodium acetate trihydrate Molecular biology grade	AppliChem	A5268
Sodium bicarbonate solution (NaHCO ₃ ; 7.5%)	Sigma	S8761-100ML
Sodium chloride (NaCl)	Sigma	S3014-500G
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma	L3771-1KG
Sodium hydroxide solution (NaOH; 1.0 N)	Sigma	S2770
Sodium hydroxide	Penta	011-002-00-6
SP600125	Santa Cruz Biotechnology	sc-200635
SuperSignal [®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific	34095
SYBR [®] Green I Nucleic Acid Stain	Lonza	50513
Trizma [®] base (Tris)	Sigma	T6066-500G
Tris-EDTA buffer solution	Sigma	T9285-100ML
Triton [®] X-100 Molecular biology grade	AppliChem	A4975
Trypsin–EDTA Solution	Sigma	T4049-100ML
Tween-20	Carl Roth	9127.1
UltraPure [™] Agarose	Invitrogen	16500-500
UtraPure [™] Distilled Water DNase/RNase free	Invitrogen	10977-035
Y-27632	Sigma	SCM075
Western Bright [™] ECL	Advansta	K-12045-D50

Tabulka 3 | Seznam speciálního plastiku a dalších pomůcek

Tabulka obsahuje seznam speciálního plastiku a dalších pomůcek společně s názvem výrobce a katalogovým číslem. Názvy jednotlivých položek jsou pro přehlednost a snazší dohledatelnost v katalogu výrobců ponechány v anglickém jazyce.

Položka	Výrobce	Katalogové číslo
FrameStar® 384 Well Skirted PCR Plate, Roche Style	4titude	4ti-0382
EU Skirted Thin-wall Plate 96 x 0.2ml	BIOplastics	B70679
Neubauer Improved Hemacytometer	Marienfeld	0640010

4.1.2. Kultivace buněčných linií

Buněčné linie byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM či RPMI-1640 s 10% FBS a antibiotiky (gentamicin nebo ciprofloxacin) v inkubátoru pro buněčné kultury (37 °C, vlhčená atmosféra, 5% CO₂). Buněčné linie byly pravidelně pasážovány s využitím roztoku Trypsin/EDTA. Buněčné linie nebyly v kultuře kultivovány déle než 6 týdnů. Tabulka 4 obsahuje seznam použitých buněčných linií a informaci, z jakého typu nádoru byly původně ustanoveny.

Tabulka 4 | Seznam buněčných linií využitých v této disertační práci

Všechny buněčné linie byly odvozeny od lidských tkání (není-li uvedeno jinak).

Buněčná linie	Typ nádoru	Kultivační médium
A2058	melanom	DMEM
A375m2	melanom	DMEM
A375P	melanom	DMEM
BLM	melanom	DMEM
G361	melanom	DMEM
H1299	plicní karcinom	RPMI-1640
HT1080	fibrosarkom	DMEM
MDA-MB-231	prsní adenokarcinom	DMEM
WM3629	melanom	DMEM

4.1.3. Mikroskopie buněk ve 2D prostředí

Morfologie buněčných linií ve 2D prostředí (Petriho misky) byla dokumentována s využitím mikroskopie ve světelném poli (Nikon Eclipse TE2000-S microscope).

4.1.4. Morfologie buněk ve 3D kolagenové matrix

4.1.4.1. Vysazování buněk do kolagenové matrix

Buněčné linie byly převedeny do suspenze a s využitím počítačí komůrky (Neubauer Improved Hemocytometr) byla určena jejich koncentrace na mililitr suspenze. Vzorčky byly centrifugovány (4 minuty, 200 rcf, 25 °C), supernatant byl odlit a pelet byl resuspendován ve vypočítaném množství kultivačního média (s 10% FBS) tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace buněčné suspenze. Všechny následné kroky pro přípravu kolagenové matrix byly prováděny na ledu, aby bylo předejito předčasné polymerizaci matrice. Finální koncentrace kolagenu v gelu činila 1 mg/ml. Kolagenový „premix“ (složení je uvedeno v Tabulce 5) byl smíchán s kolagenem (kolagen I z potkaních ocasů) a suspenzí buněčné linie (detaily poměrů jsou uvedeny v Tabulce 6). Směs byla opatrně, ale důkladně promíchána a přidána do jamek destičky. Destička byla inkubována 15 minut ve 37 °C (aby gel zpolymeroval). Následně byly ztuhlé kolagenové gely převrstveny kultivačním médiem obsahujícím 1% FBS. Detaily ohledně velikosti jamek a množství matrice jsou uvedeny u každého příslušného typu pokusu.

V případě přidávání inhibitorů nebo indukčních látek k buňkám, bylo příslušné množství dané látky přidáno do převrstvovacího média. Pro indukci icaRhoA byla využita výsledná koncentrace doxycyklinu 250 nM. Dasatinib byl pro indukci MAT použit v koncentraci 1 μM.

Tabulka 5 | Složení kolagenových „premixů“

Složky	Objem (ml)	
	„DMEM premix“	„RPMI premix“
10x DMEM/2x RPMI	4,50	18,00
NaHCO ₃ (7,5%)	2,50	1,07
HEPES (750 mM)	1,00	0,80
NaOH (1,0 N)	0,42	0,02
gentamicin	0,25	0,20
kyselina folová (100 mg/l)	0,26	-
voda	17,31	6,00
celkem	26,24	26,09

Tabulka 6 | Složení kolagenové matrix

Složky	Objem (μl)	
	„DMEM matrix“	„RPMI matrix“
premix	263	325
kolagen (4 mg/ml)	125	125
voda	62	-
buněčná suspenze	50	50
celkem	500	500

4.1.4.2. Analýza buněčné morfologie v 3D kolagenu

Buňky byly vysazeny do kolagenové matrix (100000 buněk/250 μ kolagenové matrix) v jamkách 48-jamkové destičky a kultivovány v inkubátoru 48 hodin. Obrázky buněk v kolagenu byly snímány s využitím mikroskopie ve světelném poli (Nikon Eclipse TE2000-S microscope) s Hoffmanovým modulačním kontrastem jako série obrázků v ose Z ze dvou míst v rámci jamky. Morfologie buněk byla analyzována s využitím pluginu „cell counter“ v programu FiJi. Buňky byly označeny jako mezenchymální, pokud byl poměr jejich délky a šířky vyšší než 2, v ostatních případech byly buňky označeny jako améboidní. Minimální počet počítaných buněk v každém vzorku byl 200 (obvykle však 400). Výsledky byly statisticky hodnoceny v programu GraphPad Prism 8.

4.1.5. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce na vzorcích připravených reverzní transkripcí (RT-qPCR)

4.1.5.1. Příprava RNA lyzátů z buněk ve 3D kolagenové matrix

Vzorky byly kultivovány ve 24-jamkových destičkách s 500 μ l 3D kolagenové matrix na jamku (do každé jamky byl nasazen jeden milion buněk) 48 hodin. Gely ze dvou jamek byly přeneseny do 2ml mikrozkuvek s 600 μ l roztoku pro izolaci RNA ze 3D prostředí (60% vodou saturovaný fenol; 3,25 M guanidium thiokyanát; 400 mM octan sodný o pH = 4,0; 0,4% N-lauroylsarcosine; 160 mM 2-mercaptoethanol) a 100 μ l 6,1 M roztoku NaCl a zhomogenizovány mechanickým homogenizátorem (Tissue Tearor; BioSpec Products). Vzorky byly následně skladovány při teplotě -80 °C až do izolace RNA.

4.1.5.2. Izolace RNA

K RNA lyzátům bylo přidáno 200 μ l chloroformu. Vzorky byly důkladně vortexovány 10 sekund a následně inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě. Po 25-minutové centrifugaci (18000 rcf, 4 °C) byla horní polární fáze (cca 600 μ l) přenesena do nové zkuševky a doplněna vodou (certifikovaná voda bez RNáz) na výsledný objem 800 μ l. Vzorky byly dále sráženy 600 μ l izopropanolu a vysrážená RNA byla oddělena centrifugací (18000 rcf, 10 min, 4 °C). Pelety RNA byly třikrát promyty 800 μ l 75% etanolu a vysušeny na vzduchu. Pelety byly resuspendovány ve vodě bez RNáz. Koncentrace a čistota izolovaných vzorků RNA byly stanovovány spektroskopicky s využitím přístroje UV-1650 PC UV-VIS (Shimadzu). Všechny vzorky byly naředěny vodou bez RNáz na výslednou koncentraci 0,5 μ g/ μ l a uchovávány při teplotě -80 °C do dalšího použití.

4.1.5.3. Reverzní transkripce

Pro reverzní transkripci RNA byla využita M-MuLV reverzní transkriptáza s dvojicí primerů (1 μ M oligo dT a 0,2 μ M specifický primer pro MALAT1_rt2) a 1,5 μ g vzorku RNA v celkovém reakčním objemu 15 μ l. Vzorky byly inkubovány 60 minut při 42 °C a následně 10 minut při 55 °C. Získané vzorky cDNA byly následně zchlazeny na ledu a naředěny 55 μ l

TE pufru. V případě plánované analýzy velkého množství genů byla reverzní transkripce provedena ve dvojnásobném objemu všech reagentů. Sekvence primerů použitých pro reverzní transkripci jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7 | Sekvence primerů použitých pro reverzní transkripci

Jednotlivé nukleotidy jsou zapsány dle oborových konvencí. Některá písmena reprezentují více možných nukleotidů (V = G, C či A; N = A, G, C či T).

Primer	Sekvence
MALAT1_rt2	GCT TTT TTT TTT TTT AAG C
oligo dT	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN

4.1.5.4. RT-qPCR

RT-qPCR experimenty byly prováděny dle tzv. *MIQE guidelines* z roku 2009 [118]. RT-qPCR analýza byla provedena s autorem vytvořeným a optimalizovaným reakčním mixem založeným na interkalační látce SYBR green – „qPCR mix” (1x Standard Taq pufr s 3,0 mM MgCl₂; 2 U/100 μl Hot Start Taq DNA Polymeráza; 10% glycerol; 6% DMSO; 200 μM dNTP; 0,05% Triton X-100; 1x SYBR® Green I Nucleic Acid Stain; Ultrapure Water). Reakce byly provedeny s využitím přístroje CFX384 Real Time PCR Instrument (Bio-Rad). Konkrétní PCR program optimalizovaný pro všechny páry primerů je uveden níže. Reakční objem byl 10 μl, množství cDNA bylo 0,5 μl a primery byly v koncentraci 200 nM (v Příloze 4 jsou shrnuty všechny zásadní informace o použitých primerech ve formě Tabulky P1). Vzorky byly analyzovány v technickém kvadruplikátu ve 384-jamkových destičkách FrameStar® 480/384 s RT-qPCR adhezivní vrchní fólií. C_q hodnoty byly vypočítány z amplifikačních křivek po nastavení prahové hodnoty pro každý gen v programu Bio-Rad CFX Manager 3.1. Následně byly C_q hodnoty exportovány a hodnoty relativní exprese byly vypočítány s využitím programu qBase+ 3.1 (Biogazelle) [119]. Indexy referenčních genů (vždy minimálně dva) pro danou buněčnou linii a experimentální podmínky byly určeny na základě geNORM analýzy stability referenčních genů [120] (seznam referenčních genů pro dané buněčné linie a experimentální podmínky je uveden v Tabulce 8 na následující straně). Účinnost amplifikace pro jednotlivé páry primerů byla stanovena metodou standardních křivek (viz oddíl 4.1.5.5).

qPCR program (přesný přepis z nastavení přístroje):

- 1 95,0 °C for 2:00
- 2 95,0 °C for 0:10
- 3 63,0 °C for 0:20
- 4 68,0 °C for 0:20 + plate read
- 5 GO TO 2, 39 more times
- 6 68,0 °C for 2:00
- 7 Melt Curve (65,0 °C to 95,0 °C, increment 0,5 °C, for 0:05 + Plate Read)

Tabulka 8 | Seznam referenčních genů použitých pro analýzu konkrétních buněčných linií v daném experimentálním uspořádání

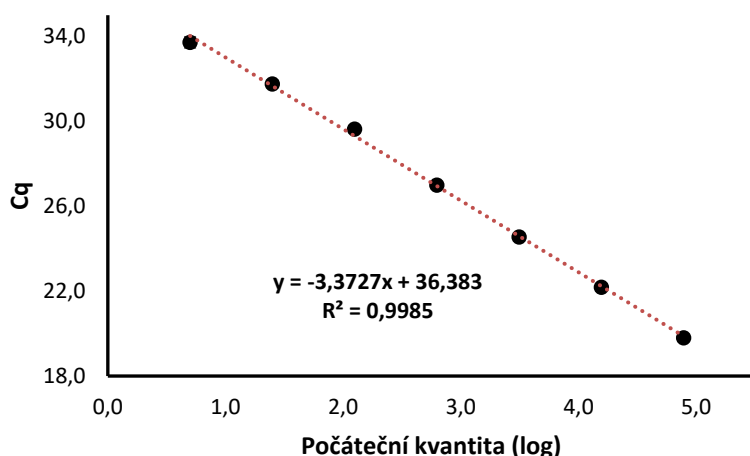
Buněčná linie	Experimentální podmínka	Referenční geny
BLM	DMSO/DAS	EIF4H, GAPDH
BLM icaRhoA	-dox/+dox	EIF4H, HNRNPL
HT1080	DMSO/DAS	EIF4H, GAPDH
HT1080 icaRhoA	-dox/+dox	EIF4H, GAPDH
MDA-MB-231	DMSO/DAS	HNRNPL, PSMA1
MDA-MB-231 icaRhoA	-dox/+dox	EIF4H, HNRNPL
Paleta linií pro korelaci morfologie a exprese MALAT1	-	EIF4H, HNRNPL, PPIA
BLM, HT1080 a MDA-MB-231 + IFN γ	0/6h/48h	EIF4H, POLR2A
BLM, HT1080 a MDA-MB-231 + IFN ω	0/6h/48h	EIF4H, PPIA

4.1.5.5. Testování primerů a analýza standardních křivek

Nové primery byly vždy nejprve testovány, zda amplifikují požadovanou cílovou sekvenci bez kontaminace výsledků tvorbou primer-dimerů. Postup byl stejný jako při RT-qPCR metodice popsané výše, ovšem s několika modifikacemi – objem reakce byl 20 μ l (s 1 μ l testovací cDNA) a analýza byla provedena na přístroji pro 96-jamkové destičky CFX96 Real Time PCR Instrument (Bio-Rad). Po kontrole amplifikačních křivek a křivek tání bylo 1 μ l a 5 μ l reakcí puštěno na 2% agarózovou elektroforézu, aby bylo možno zkontrolovat délku amplifikovaných produktů reakce. Pokud délka PCR produktů odpovídala teoretické délce, byl 1 μ l vzorku RT-qPCR reakce naředěn 10000x vodou a tento vzorek byl dále naředěn osmkrát s ředicím krokem 5-10x. Těchto 8 ředění posloužilo jako templáty pro druhé kolo qPCR (prováděno v technickém kvadruplikátu) a získané hodnoty C_q byly vyneseny proti logaritmu množství vstupního množství templátu. Z výsledného grafu byla vypočítána směrnice standardní přímky pomocí lineární regrese a výsledná účinnost PCR amplifikace byla vypočítána dle Rovnice 1. Příklad této analýzy je uveden na Obrázku 16 na následující straně.

$$E = 10^{\frac{-1}{slope}} \quad (\text{Rovnice 1})$$

MALAT1_3 standardní křivka



Obrázek 16 | Příklad analýzy standardní křivky pro určení účinnosti PCR amplifikace. Cq hodnoty jsou vyneseny proti logaritmu počáteční kvantity templátu. Směrnice přímky je určena lineární regresí a využita ve výpočtu účinnosti PCR amplifikace (Rovnice 1).

4.1.6. Imunobloty

Vzorky byly kultivovány ve 24-jamkových destičkách s 500 μ l 3D kolagenové matrix na jamku (do každé jamky byl nasazen jeden milion buněk) 48 hodin. Gely ze dvou jamek byly přeneseny do zkumavek obsahujících 500 μ l 2x SDS lyzačního pufru (2% SDS; 20% glycerol; 120 mM Tris; pH = 6,8) a zhomogenizovány mechanickým homogenizátorem (Tissue Tearor; BioSpec Products). Po 10-minutové centrifugaci (18000 rcf, 10 °C) bylo 900 μ l vzorku přeneseno do nové zkumavky a koncentrace takto připraveného lyzátu byla stanovena s využitím kitu DCTM Protein Assay (Bio-Rad). Proteinové lyzáty v dané sérii byly naředěny na stejnou koncentraci pomocí 1x SDS lyzačního pufru s DTT (1% SDS; 10% glycerol; 60 mM Tris; pH = 6,8; 50 mM DTT) a byla přidána bromfenolová modř (finální koncentrace ve vzorku 30 μ M). Vzorky byly 10 minut inkubovány při teplotě 95 °C. Vzorky byly rozděleny na 10% či 12% SDS-polyakrylamidových gelech a přebíly na nitrocelulózovou membránu s využitím transferového pufru (20% ethanol; 0,025% SDS; 300 mM Tris; 300 mM glycin) a přístroje Trans-Blot[®] TurboTM Transfer System (Bio-Rad). Z důvodu ověření nanášky na gely a transferu vzorku na membránu byly membrány po blotování inkubovány 5 minut v roztoku Ponceau S (0,001% Ponceau S; 5% kyselina octová), opláchnuty vodou a naskenovány. Ponceau S bylo z membrán vymyto pomocí 5-minutové inkubace v roztoku TBS (50 mM Tris o pH = 7,5; 150 mM NaCl). Membrány byly inkubovány 60 minut při laboratorní teplotě v TBS obsahujícím 4% BSA či 5% odtučněné mléko, aby bylo předejito nespecifickým vazbám látek na membrány. Membrány byly inkubovány s primární protilátkou ve 4 °C přes noc, třikrát promyty roztokem TBST (50 mM Tris o pH = 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20) a inkubovány v příslušné sekundární protilátce konjugované s křenovou peroxidázou (HRP) 75 minut při laboratorní teplotě. Následně byly membrány dvakrát promyty TBST, jednou v TBS a následně byly vyvolány s použitím příslušného

substrátu křenové peroxidázy (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate nebo Western Bright™ ECL) a přístroje Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare). Aby bylo možné stanovit množství celkového proteinu v případě fosfoprotilátek a aby bylo možné ověřit shodnost nanášek (pomocí kontrolní protilátky proti GAPDH), byly primární protilátky z membrán smyty pomocí 10-minutové inkubace v 200 mM roztoku NaOH při teplotě 42 °C a membrány byly znovu inkubovány s odpovídající primární protilátkou. Informace o použitých protilátkách jsou shrnuty v Tabulce 9 a 10.

Tabulka 9 | Seznam použitých primárních protilátek

Tabulka obsahuje seznam protilátek společně se jménem výrobce, katalogové číslo a informace o jejich konkrétním použití v experimentech.

Primární protilátky	Výrobce	Katalogové číslo	Mono- /Polyklonální	Blokování	Ředění
c-Fos	Cell Signaling Technology	#4384	polyklonální	5% mléko	1:1000
c-Jun	Thermo Scientific	MA5-15172	monoklonální	5% mléko	1:1000
CEBPB	Abcam	Ab32358	monoklonální	5% mléko	1:750
Fra1	Developmental Studies Hybridoma Bank	PCRP-FOSL1-1E3	monoklonální	5% mléko	1:200
GAPDH	Thermo Scientific	MA5-15738	monoklonální	5% mléko	1:5000
P-c-Jun (Ser63)	Thermo Scientific	MA5-15115	monoklonální	4% BSA	1:1000

Tabulka 10 | Seznam použitých sekundárních protilátek

Tabulka obsahuje seznam protilátek společně se jménem výrobce, katalogové číslo a informace o jejich konkrétním použití v experimentech. GAR = Goat-Anti-Rabbit; HRP = křenová peroxidáza (Horseradish peroxidase).

Sekundární protilátky	Výrobce	Katalogové číslo	Rozpouštěcí roztok	Ředění
GAR-HRP	Thermo Scientific	32460	2% mléko	1:700
Anti-mouse HRP	Cell Signaling Technology	#7076	5% mléko	1:5000

4.1.7. Bioinformatické analýzy

4.1.7.1. Určení překryvů mezi datasey

Překryvy mezi analyzovanými datasey byly určeny pomocí online nástroje Venny 2.1 [121]. Pro tuto analýzu byly využity seznamy názvů genů. Využité seznamy genů se sníženou i zvýšenou expresí v améboidní formě buněk jsou uvedeny v Tabulkách P2, P3 a P4 v Příloze 5.

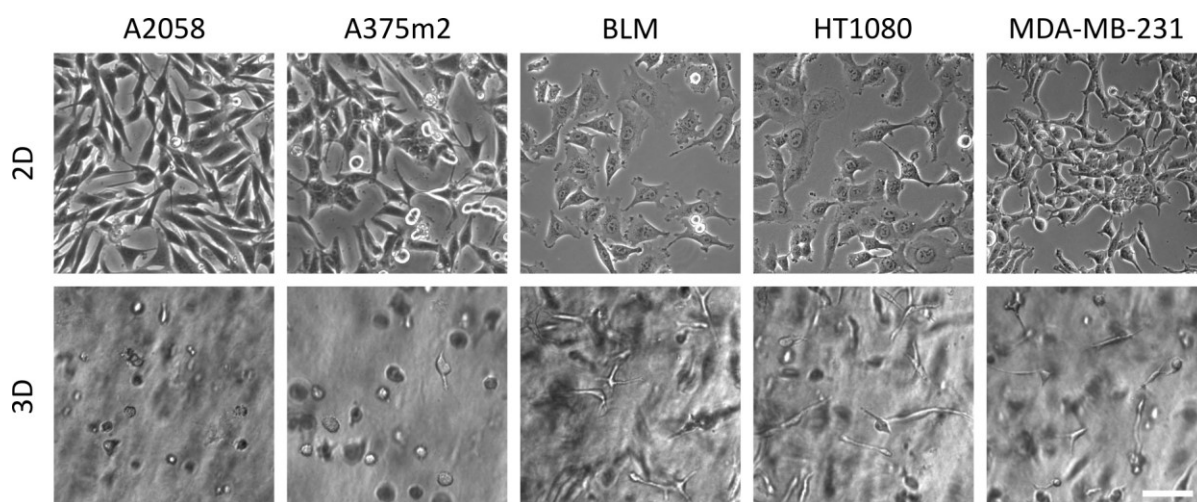
4.1.7.2. *Enrichment* analýzy

Enrichment analýzy byly provedeny s využitím online nástroje WebGestalt 2019 [122]. Využité genové seznamy byly mapovány na druh *Homo sapiens* metodou Over-Representation Analysis (ORA) z databáze Gene Ontology (GO) Biological Process. Jako referenční sada genů byla použita možnost „genome“ (v případě výsledků RNA-seq) či „genome protein-coding“ (v případě výsledků získaných hmotnostním spektrometrem) a analýza byla provedena s požadavkem identifikace 15 nejsignifikantnějších kategorií. Pro analýzu byly využity seznamy genů/proteinů se signifikantně zvýšenou a sníženou genovou expresí v buňkách HT1080 či améboidní formě M2 makrofágů (byly využity seznamy genů z publikací [117] (Příloha 3) a [116] (Příloha 2)). V případě dat získaných z buněčné linie HT1080 byly použity geny se signifikantně zvýšenou/sníženou expresí při obou způsobech indukce MAT (tedy icaRhoA a DAS) – tedy překryv seznamu genů/proteinů.

4.2. Výsledky

4.2.1. Důležitost studia invazivity nádorových buněk ve 3D prostředí

Ve výzkumu invazivity nádorových buněk je třeba co nejdříve simulovat podmínky pro invazi v živých tělech. Analýza migrace buněčných linií na laboratorním plastiku či skle (potaženým např. fibronektinem) je metodou první volby na většině pracovišť. Obrázek 17 ilustruje, jak rozdílnou morfologii vykazují některé buněčné linie ve 2D prostředí tkáňových kultur (na Petriho misce) a ve 3D prostředí kolagenové matrix, která byla zvolena jako experimentální model pro všechny naše následné pokusy. Toto porovnání bylo připraveno pro všechny buněčné linie použité v publikacích, které jsou hlavní osou předkládané disertační práce (Přílohy 1-3). Např. melanomové linie A2058 a A375m2 mají ve 2D prostředí výrazně protaženou morfologii, ač je jejich výchozí migrační mód ve 3D prostředí přesvědčivě améboidní.



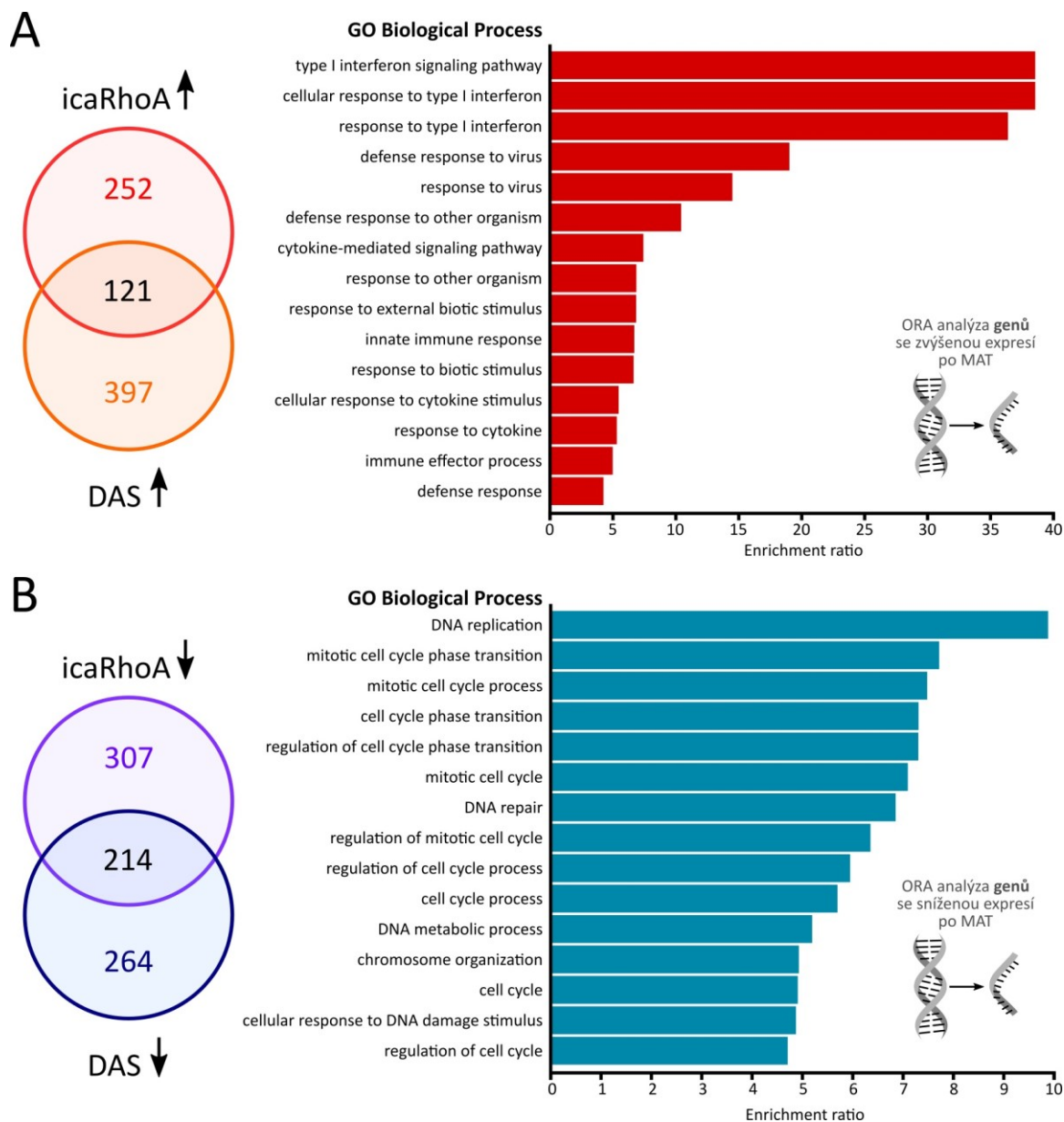
Obrázek 17 | Morfologie buněčných linií ve 2D a ve 3D prostředí

Reprezentativní obrázky morfologie buněčných linií, které byly využity v navazujících experimentech, ve 2D (Petriho miska) a 3D prostředí (kolagenová matrix). Měřítka reprezentuje 75 μm .

4.2.2. Améboidní fenotyp je spjat s prozánětlivou signalizací a potlačením buněčného cyklu

Transkriptomickou analýzou (metodou RNA-seq) byla na linii HT1080 podstupující MAT pomocí exprese indukibilního RhoA (icaRhoA) či farmakologicky přidáním inhibitoru Src kinázy dasatinibu (DAS) získána rozsáhlá data, která jsou nyní veřejně přístupná v databázi ArrayExpress pod kódem E-MTAB-6823 [116]. Při vyvolání MAT pomocí indukce exprese icaRhoA mělo 894 z 12030 genů signifikantně pozměněnou hladinu exprese, v případě indukce dasatinibem to pak bylo 996 genů z 12637.

Analýza genové exprese odhalila, že při obou způsobech vyvolání MAT je zvýšena exprese 121 genů (Obrázek 18A; Příloha 5 – Tabulka P2) a snížena exprese 214 genů (Obrázek 18B; Příloha 5 – Tabulka P3). Pomocí enrichment analýzy těchto překryvů (na GO Biological Process kategorie) pak bylo zjištěno, že geny se zvýšenou genovou expresí vykazují silnou asociaci s drahami odpovědi na interferon typu I (JAK/STAT dráhy) a geny se sníženou genovou expresí výrazně souvisí s regulací buněčného cyklu (Obrázek 18).



Obrázek 18 | ORA analýza genů se zvýšenou a sníženou expresí po MAT v buněčné linii HT1080

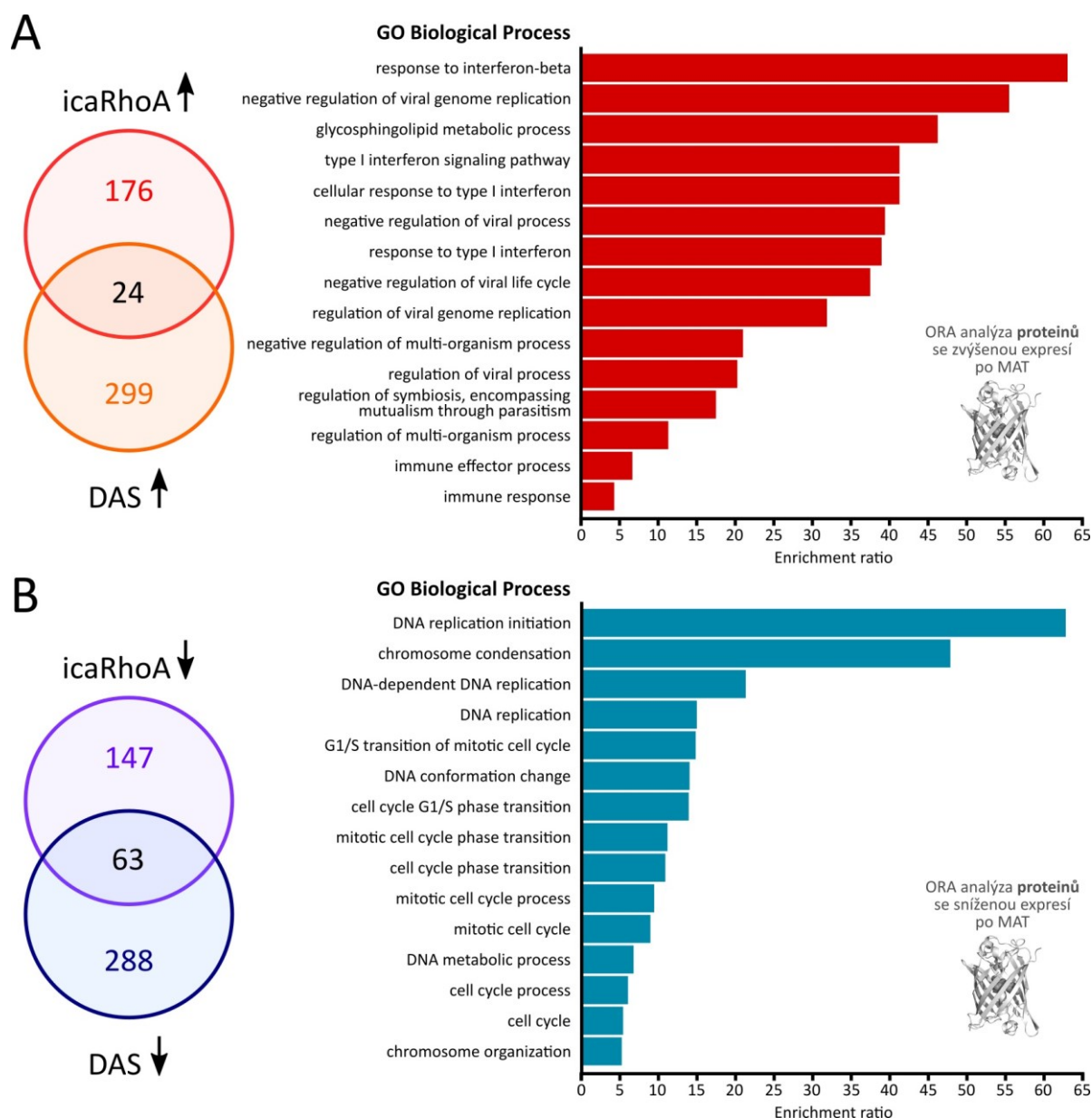
(A) Diagram počtu genů se zvýšenou expresí v buněčné linii HT1080 podstupující MAT (vlevo) a ORA analýza zapojení těchto genů v různých biologických procesech (vpravo). (B) Diagram počtu genů se sníženou expresí v buněčné linii HT1080 podstupující MAT (vlevo) a ORA analýza zapojení těchto genů v různých biologických procesech (vpravo). Oba seznamy genů jsou k dispozici v Příloze 5 (Tabulky P2 a P3). Jelikož by překladem kategorií biologických procesů z GO databáze mohlo dojít ke zkreslení dat, nejsou tyto diagramy přeloženy do českého jazyka.

Aby byly výsledky komplexnější, provedli jsme rovněž proteomickou analýzu stejných vzorků (ovšem z jiných biologických opakování) [116]. Získaná data jsou k dispozici v databázi PRIDE [123] pod kódem PXD010425. Proteomická data získaná z našich modelů MAT odhalila stejné trendy na úrovni proteinů jako v případě transkriptů, a potvrdila tak analýzu provedenou na transkriptomických datech. Při vyvolání MAT pomocí exprese icaRhoA byla detekována signifikantní změna v hladině 410 proteinů z 4637 detekovaných, pro indukci dasatinibem to pak činilo 674 proteinů z 5880 detekovaných. Oba způsoby vyvolání MAT zvýšily v améboidní formě buněk HT1080 hladinu stejných 24 proteinů a snížily hladinu 63 proteinů. Enrichment analýza těchto proteinových překryvů (opět GO Biological Process kategorie) potvrdila v našich datech nabohacení proteinů asociovaných se zánětlivou odpovědí na interferon typu I (proteiny se zvýšenou expresí) a proteinů souvisejících s regulací buněčného cyklu (proteiny se sníženou expresí) – viz Obrázek 19 na následující straně.

Pomocí metody RNA-seq byl rovněž analyzován nenádorový model plasticity individuální buněčné invazivity, a to M2 makrofágy v řídkém (améboidní forma) a hustém (mezenchymální forma) kolagenu [124]. Tato data jsou veřejně přístupná v databázi ArrayExpress pod kódem E-MTAB-6643. Pomocí enrichment analýzy genů se signifikantně zvýšenou a sníženou expresí (tyto seznamy jsou součástí publikace [117]) na GO Biological Process kategorie bylo zjištěno, že geny se zvýšenou genovou expresí spadají do kategorií jako jsou organizace extracelulární matrix, buněčná invazivita či morfogeneze, tedy do jiných kategorií než geny v případě proteomické a transkriptomické analýzy MAT v nádorových buňkách HT1080). Naopak geny se signifikantně sníženou genovou expresí výrazně souvisely s regulací buněčného cyklu stejně jako v případě nádorového modelu (Obrázek 20 na straně 53). Vzhledem k těmto shodujícím se výsledkům byl stanoven překryv genů se sníženou expresí jak v obou nádorových modelech, tak v modelu využívajícím makrofágy (seznam těchto celkem 73 genů je uveden v Příloze 5 – Tabulka P4). Získaný seznam překryvu genů byl podroben enrichment analýze v GO Biological Process kategoriích a potvrdilo se, že tyto geny jsou nabohacené v kategoriích týkajících se DNA a regulace buněčného cyklu. Snížení exprese genů souvisejících s buněčným cyklem se tak zdá být potencialem univerzálním znakem souvisejícím s améboidní migrací (Obrázek 21 na straně 54)

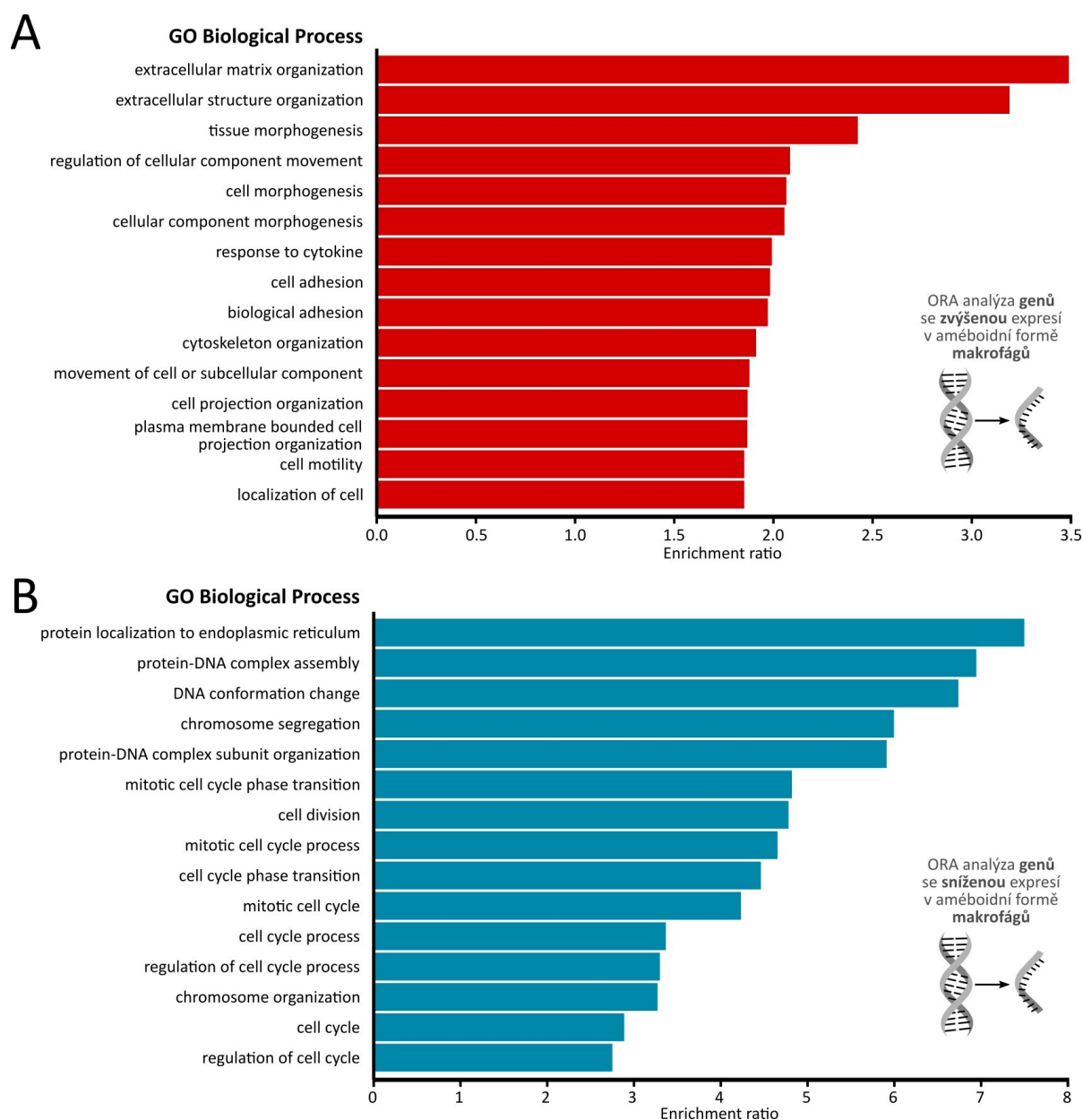
V následných ověřovacích pokusech jsme se zaměřili hlavně na výrazný znak améboidní migrace nádorových buněk, který se objevil v našich datech – zvýšenou prozánětlivou odpověď, jelikož se může jednat o znak specifický pro nádorové buňky (v porovnání s bílými krvinkami).

Aby bylo možné získaná transkriptomická a proteomická data ověřit na více buněčných liniích, a co nejvíce tak odfiltrovat efekt specifity změny genové exprese během MAT pouze pro linii HT1080, byly připraveny stejné experimentální systémy pro výzkum MAT založené na dalších predominantně mezenchymálních buněčných liniích – BLM (melanom) a MDA-MB-231 (prsň adenokarcinom). Všechny tyto linie byly schopné podstupovat spolehlivě MAT [117] (viz Obrázek 22 na straně 54).



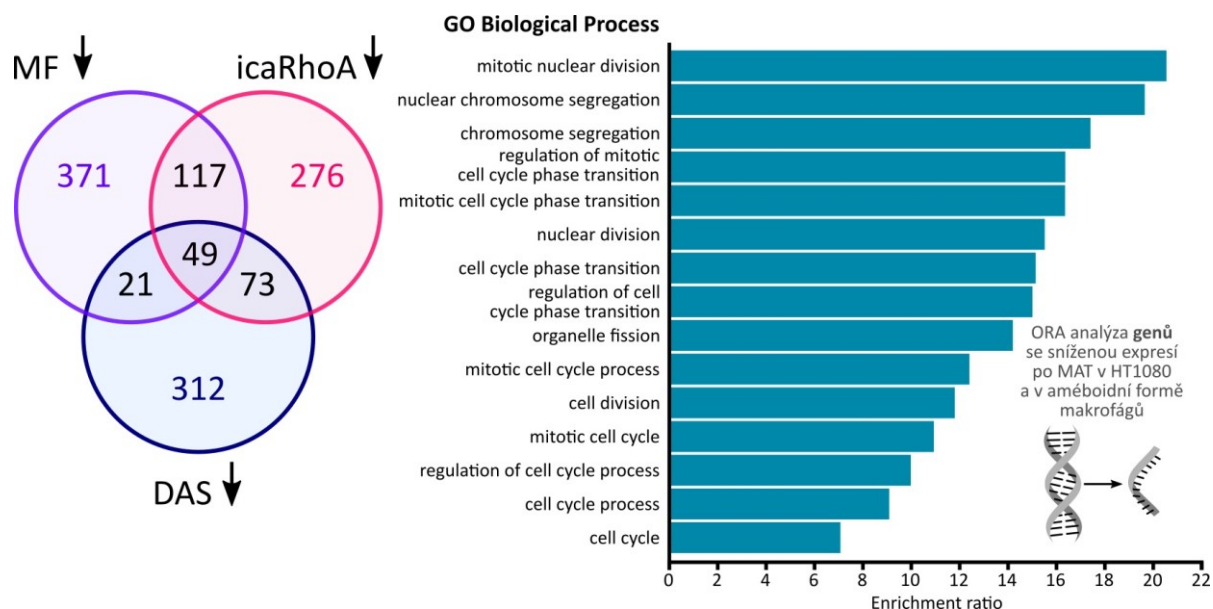
Obrázek 19 | ORA analýza proteinů se zvýšenou a sníženou expresí po MAT v buněčné linii HT1080

(A) Diagram počtu proteinů se zvýšeným zastoupením v buněčné linii HT1080 podstupující MAT (vlevo) a ORA analýza zapojení těchto proteinů v různých biologických procesech (vpravo). (B) Diagram počtu proteinů se sníženým zastoupením v buněčné linii HT1080 podstupující MAT (vlevo) a ORA analýza zapojení těchto proteinů v různých biologických procesech (vpravo). Oba seznamy genů jsou k dispozici v Supplementary materials – „Differential expression analyses“ k publikaci [116]. Jelikož by překladem kategorií biologických procesů z GO databáze mohlo dojít ke zkreslení dat, nejsou tyto diagramy přeloženy do českého jazyka.



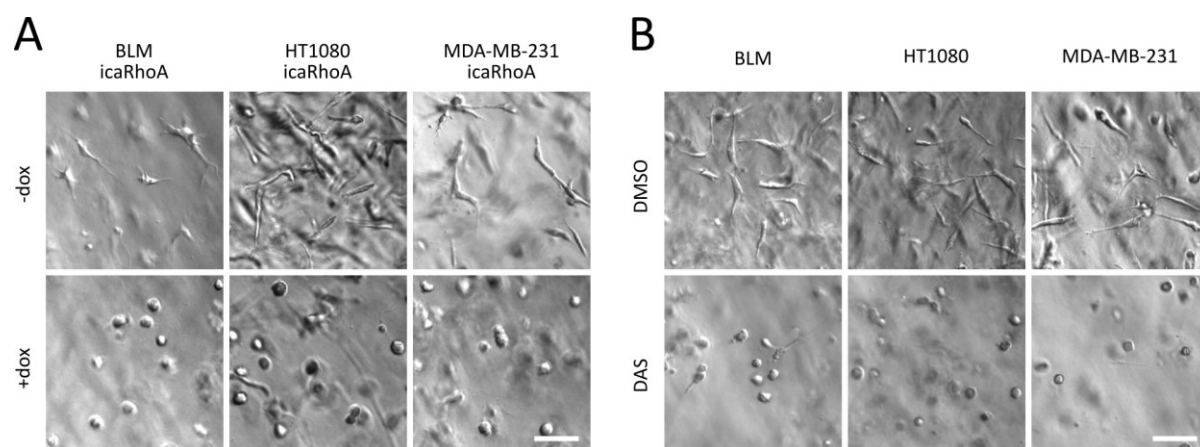
Obrázek 20 | ORA analýza proteinů se zvýšenou a sníženou expresí v améboidní formě M2 makrofágů

(A) ORA analýza zapojení genů se zvýšenou expresí v améboidní formě makrofágů v různých biologických procesech. (B) ORA analýza zapojení genů se sníženou expresí v améboidní formě makrofágů v různých biologických procesech. Oba kompletní seznamy genů jsou součástí Supplementary File 1 v publikaci [117]. Jelikož by překladem kategorií biologických procesů z GO databáze mohlo dojít ke zkreslení dat, nejsou tyto diagramy přeloženy do českého jazyka.



Obrázek 21 | ORA analýza překryvu genů se sníženou expresí v améboidní formě buněk HT1080 a M2 makrofágů

Diagram počtu genů se sníženou expresí v buněčné linii HT1080 po indukci MAT pomocí exprese icaRhoA a přidání dasatinibu a zároveň se sníženou expresí v améboidní formě M2 makrofágů (vlevo) a ORA analýza zapojení 49 genů, které mají sníženou expresi ve všech třech experimentálních modelech v různých biologických procesech (vpravo). Seznamy genového překryvu všech tří modelů je k dispozici v Příloze 5 (Tabulka P4). Jelikož by překladem kategorií biologických procesů z GO databáze mohlo dojít ke zkreslení dat, nejsou tyto diagramy přeloženy do českého jazyka.



Obrázek 22 | Buněčné modely využité ke studiu MAT

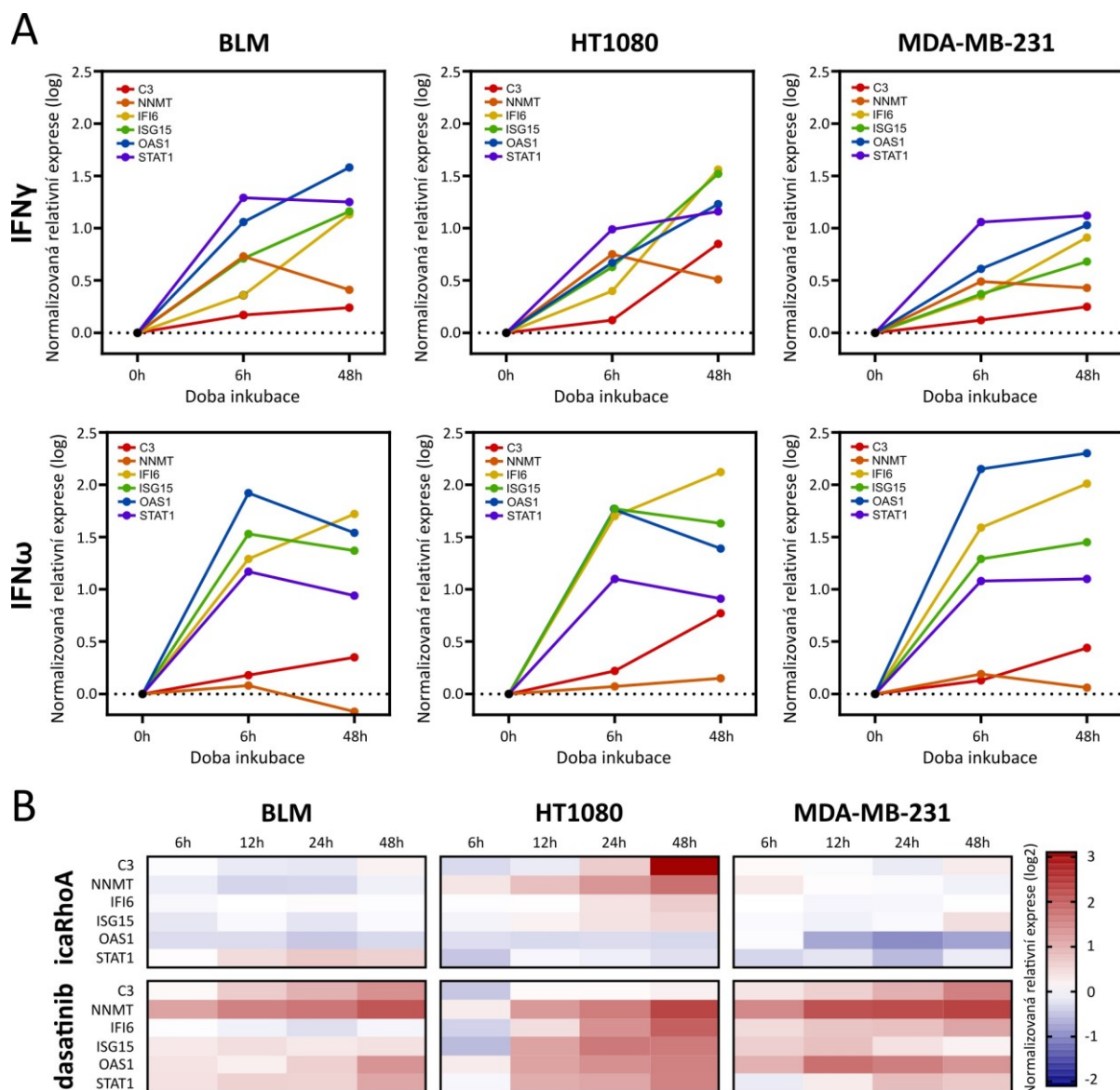
(A) Reprezentativní morfologie buněčných linií podstupujících MAT inducibilní expresí konstitutivně aktivního RhoA (icaRhoA). (B) Reprezentativní morfologie buněčných linií podstupujících MAT přidáním Src inhibitoru dasatinibu (DAS). Měřítka je v obou částech obrázku 75 μ m.

Převzato z [117].

Při zkoumání indukce vybraných interferon responzivních genů po MAT byla nejprve ověřena odpověď všech tří buněčných linií na IFN ω (interferon typu I) a IFN γ (interferon typu II) v krátkodobém (6 hodin) a dlouhodobém (48 hodin) měřítku. Z Obrázku 23A (strana 56) vyplývá, že všechny tři buněčné linie si zachovaly schopnost indukce interferon responzivních genů, a jsou tudíž vhodným modelem pro analýzu těchto genů během MAT. RT-qPCR analýza vzorků buněčných linií podstupující MAT s indukcí v různých časových intervalech (6, 12, 24 a 48 hodin) následně ukázala, že interferon responzivní geny mají zvýšenou hladinu exprese ve všech liniích při indukci MAT dasatinibem. V případě indukce MAT pomocí icaRhoA byla zaznamenána zvýšená exprese většího množství zkoumaných genů pouze v buněčné linii HT1080 (Obrázek 23B na následující straně). Dále byla stejným způsobem analyzována hladina vybraných cytokinů (IL6, IL11 a IL24), jakožto molekul, které jsou potenciálně využitelné pro komunikaci nádorových buněk s buňkami okolními. Hladina exprese vybraných cytokinů byla zvýšena ve všech třech buněčných liniích při obou způsobech indukce MAT (Obrázek 24A na straně 57). Dalšími kandidátními molekulami byly transkripční faktory z rodiny C/EBP, které často spouštějí prozánětlivé geny. Vybrané transkripční faktory (CEBPB, CEBPG a CEBPD) vykazovaly podobný vzorec exprese jako interferon responzivní geny (Obrázek 24A na straně 57). Analýza buněčných linií na proteinové úrovni pomocí imunoblotů pak potvrdila zvýšenou hladinu proteinu C/EBP β ve všech šesti modelech po 48 hodinách od indukce MAT (Obrázek 24B na straně 57).

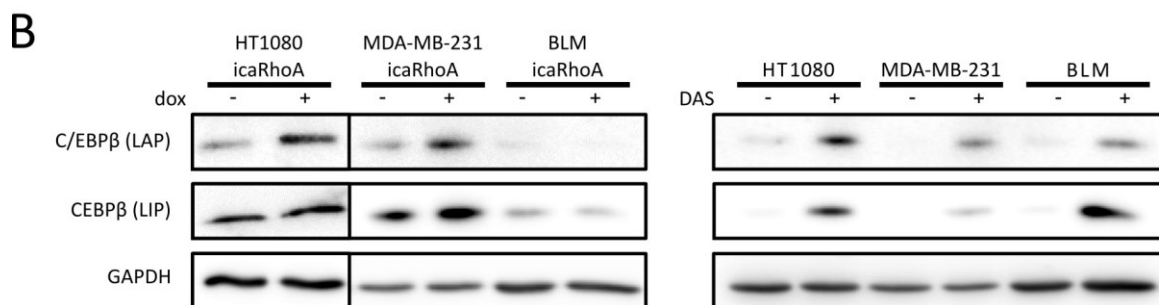
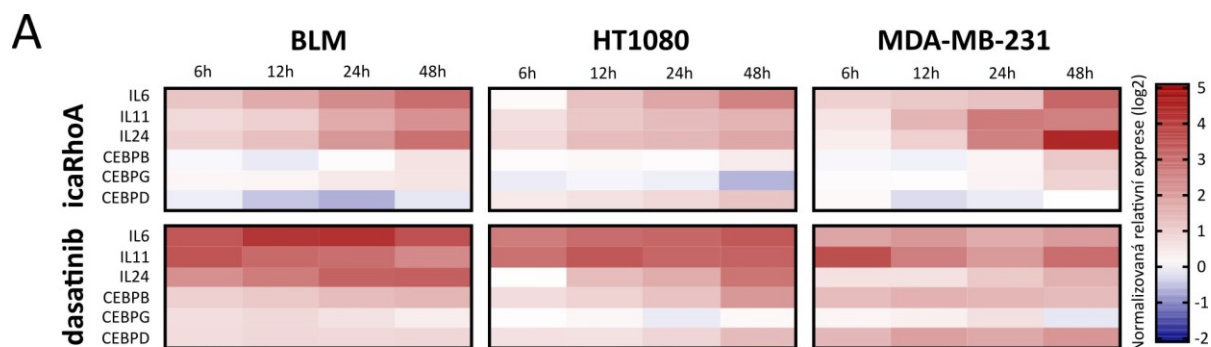
Předposlední kategorií analyzovaných molekul byly dlouhé nekódující RNA. Jak lncRNA MALAT1, tak NEAT1 vykazovaly po MAT zvýšení genové exprese (Obrázek 25A na straně 58). Následné analýze role lncRNA MALAT1 se věnovala celá jedna publikace, která je součástí předkládané disertační práce (Příloha 3; [117])

Z genů se sníženou expresí po MAT byly pro následnou analýzu exprese vybrány dva – DIAPH3 a FOSL1. DIAPH3 patří do rodiny forminů, které stabilizují mikrotubuly [62]. Protein Fra-1 (kódovaný genem FOSL1) patří mezi skupinu proteinů rodiny Fos, která společně se skupinou Jun, ATF a MAF patří do rodiny proteinů AP-1, které dimerizují a výsledné AP-1 komplexy regulují celou řadu buněčných procesů (včetně buněčné proliferace) [125]. U obou genů se potvrdilo snížení exprese i v časově rozlišených vzorcích ve všech buněčných liniích při obou způsobech indukce MAT (Obrázek 25A na straně 58). Tři vybrané proteiny z rodiny AP-1 byly dále analyzovány pomocí imunoblotů ve vzorcích modelových buněčných linií pro MAT bez indukce MAT a s indukcí přechodu po dobu 48 hodin. Zatímco protein Fra-1 vykazoval sníženou hladinu ve všech modelech, proteiny c-Jun a c-Fos měly sníženou úroveň exprese pouze ve vzorcích, kde bylo MAT vyvoláno dasatinibem. Při indukci MAT pomocí exprese icaRhoA byly výsledky specifické pro danou buněčnou linii (Obrázek 25B na straně 58).



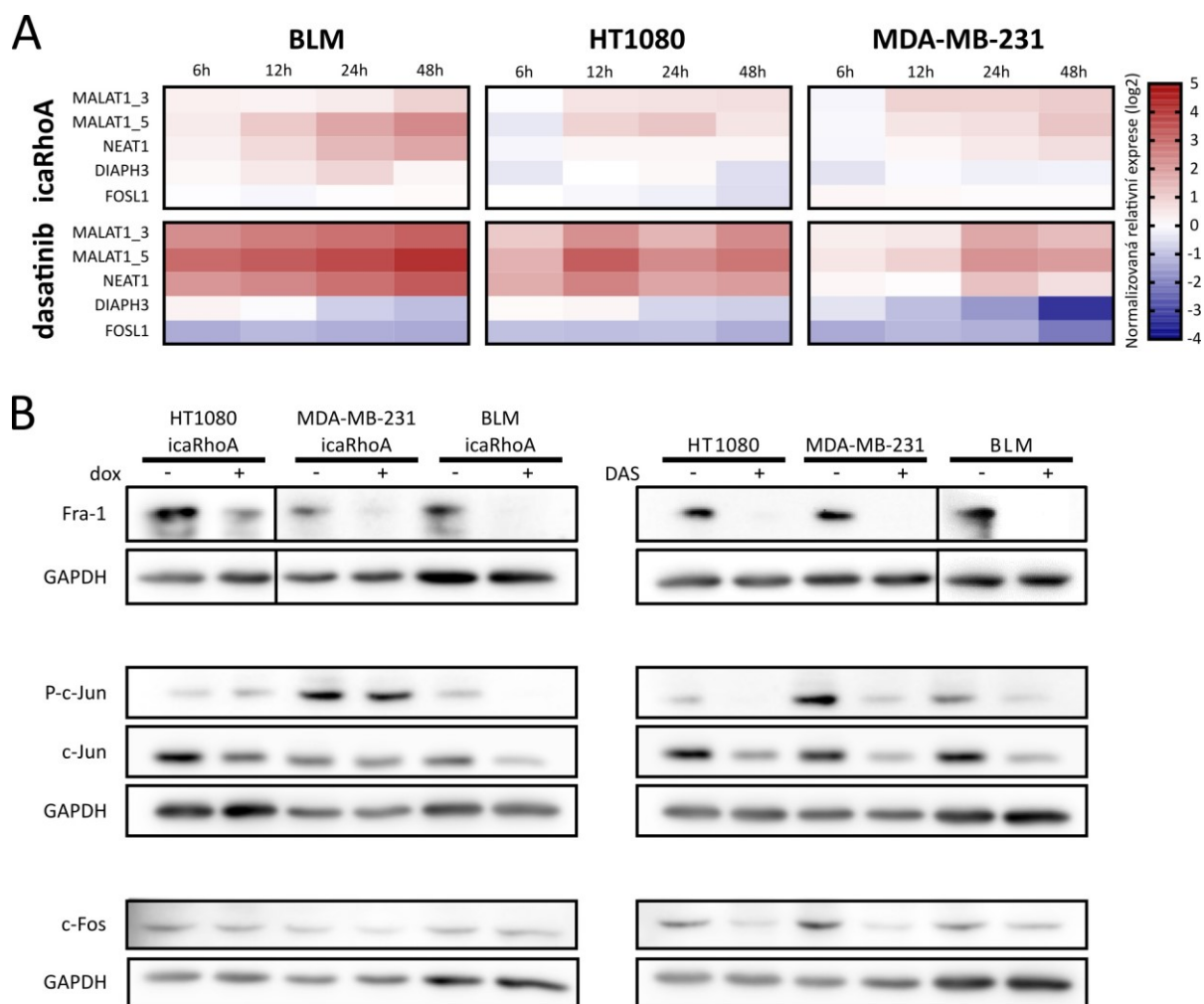
Obrázek 23 | RT-qPCR analýza odpovědi použitých buněčných linií na indukci interferonem a úroveň exprese genů interferon responzivních v průběhu MAT

(A) Analýza genové exprese vybraných interferon responzivních genů na indukci IFN. Buněčné linie byly indukovány IFN ω (interferon typu I) a IFN γ (interferon typu II) po dobu 6 nebo 48 hodin. Zobrazené výsledky reprezentují jedno biologické opakování. Každý vzorek byl analyzován v technickém kvadruplikátu a body reprezentují průměr \pm SE. (B) Heatmapy znázorňují úroveň genové exprese vybraných interferon responzivních genů v modelových liniích, ve kterých byl indukován MAT po různě dlouhou dobu v porovnání s kontrolním neindukovaným vzorkem (nezobrazen). Prezentované výsledky jsou průměrnými hodnotami ze třech nezávislých biologických opakování.



Obrázek 24 | Buňky podstupující MAT vykazují zvýšenou expresi prozánětlivých cytokinů a transkripčních faktorů z rodiny CEBP

(A) Heatmapy znázorňují úroveň genové exprese vybraných cytokinů a transkripčních faktorů z rodiny CEBP v modelových liniích, ve kterých byl indukován MAT po různě dlouhou dobu v porovnání s kontrolním neindukovaným vzorkem (nezobrazen). Prezentované výsledky jsou průměrnými hodnotami ze třech nezávislých biologických opakování. (B) Reprezentativní imunoblody buněčných linií modelujících MAT zobrazují zvýšenou expresi dlouhé (LAP) i krátké (LIP) formy proteinu C/EBP β ve všech modelech podstupujících MAT. Vybrané imunoblody jsou reprezentativní ukázkou ze tří nezávislých biologických opakování. DAS = dasatinib; dox = doxycyklin; „-“ = neindukovaný vzorek; „+“ = indukce MAT po dobu 48 hodin.

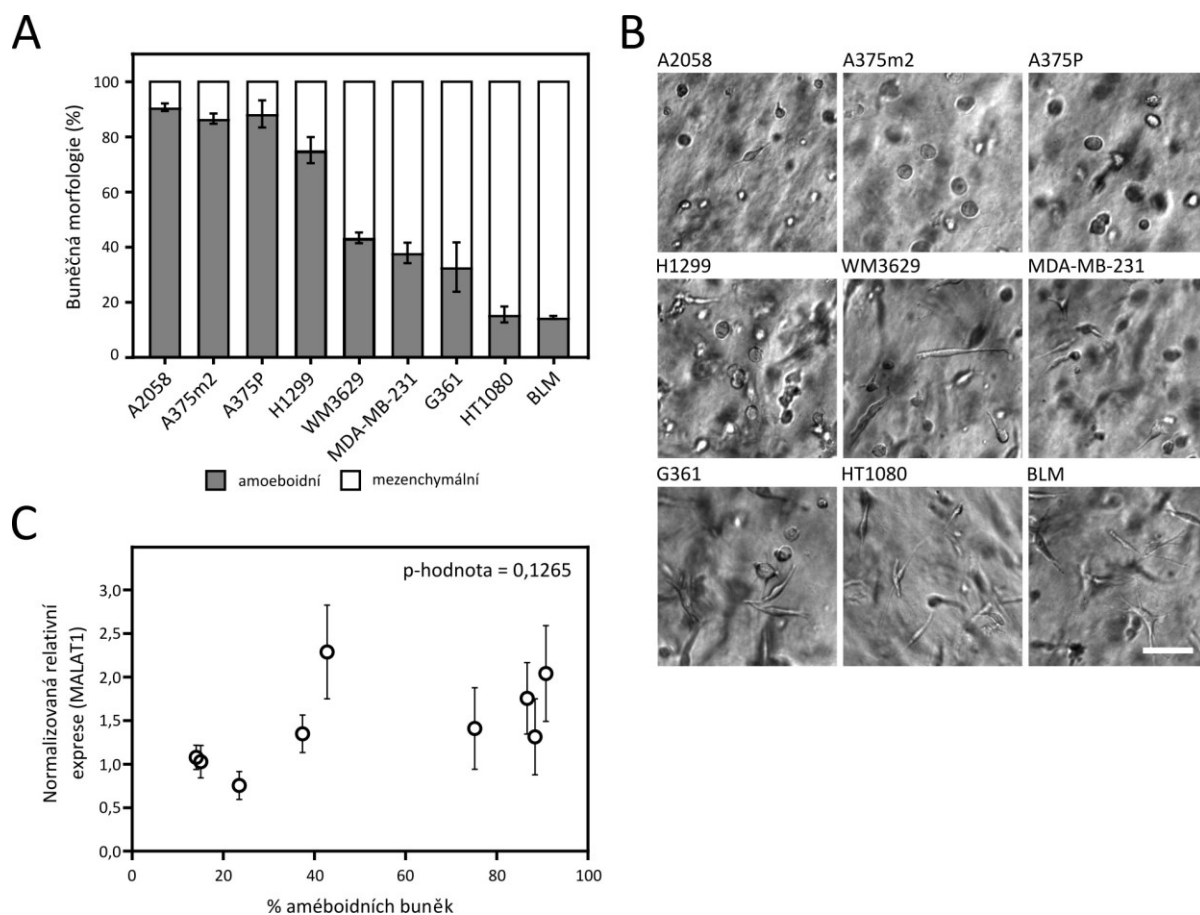


Obrázek 25 | Buňky podstupující MAT vykazují zvýšenou expresi některých dlouhých nekódujících RNA a sníženou expresi DIAPH3 a členů AP-1 rodiny transkripčních faktorů

(A) Heatmapy znázorňují úroveň genové exprese dlouhé nekódující RNA MALAT1 a NEAT1, genu pro DIAPH3 a FOSL1 v modelových liniích, ve kterých byl indukován MAT po různě dlouhou dobu v porovnání s kontrolním neindukovaným vzorkem (nezobrazen). Presentované výsledky jsou průměrnými hodnotami ze třech nezávislých biologických opakování. (B) Reprezentativní imunoblotty tří zástupců z rodiny transkripčních faktorů AP-1 (Fra-1, c-Jun, c-Fos) v buněčných liniích modelujících MAT. Vybrané imunoblotty jsou reprezentativní ukázkou ze tří nezávislých biologických opakování. DAS = dasatinib; dox = doxycyklin; „-“ = neindukovaný vzorek; „+“ = indukce MAT po dobu 48 hodin.

4.2.3. Korelace buněčné morfologie ve 3D prostředí a hladiny MALAT1

Při výzkumu role dlouhé nekódující RNA MALAT1 při MAT/AMT bylo analyzováno, zda existuje korelace mezi hladinou MALAT1 a buněčnou morfologií. Pro tento účel bylo použito 9 dostupných buněčných linií. Ač se v získaném korelačním grafu vyskytla jistá závislost (vyšší hladina MALAT1 u více améboidních buněk), nebyl výsledek statisticky signifikantní (Obrázek 26 na následující straně).

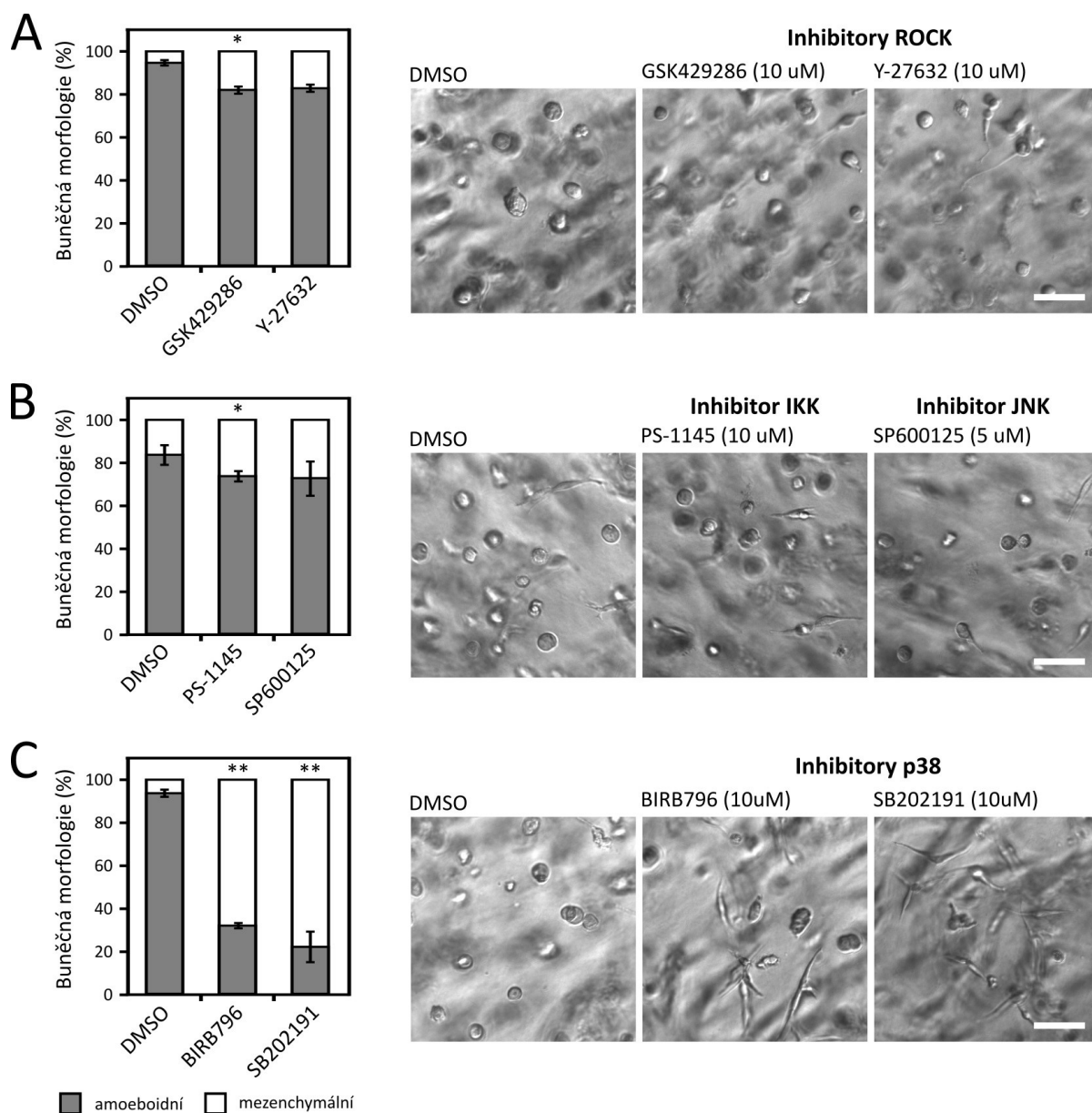


Obrázek 26 | Korelace buněčné morfologie a hladiny MALAT1 v buněčných liniích

(A) Kvantifikace buněčné morfologie vybraných buněčných linií ve 3D kolagenové matrix. Buněčné linie jsou seřazeny od nejvíce améboidních po nejvíce mezenchymální. Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM. (B) Reprezentativní obrázky morfologie analyzovaných buněčných linií. Měřítka reprezentuje 75 μ m. (C) Korelace buněčné morfologie a expresní hladiny lncRNA MALAT1. Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM. Prezentované výsledky jsou průměrnými hodnotami ze třech až šesti nezávislých biologických opakování.

4.2.4. Potenciální modely studia AMT

Jelikož je dosažení AMT výrazně složitější než dosažení MAT, bylo testováno několik různých inhibitorů, u nichž bylo důvodné podezření, že by mohly vyvolávat AMT. K testování byla využita silně améboidní buněčná linie A375m2. Inhibitory ROCK překvapivě k výraznému AMT v našich experimentálních podmínkách nevedly (ač jsou pro tyto účely některými výzkumnými skupinami běžně používány), stejně tak inhibitor IKK (součást komplexu NF- κ B) či JNK kinázy neměly zásadní efekt. Velice výrazného AMT se však podařilo dosáhnout s využitím inhibitorů kinázy p38. Tento efekt je v současné době dále analyzován v Laboratoři invazivity nádorových buněk. Výše uvedená data získaná na linii A375m2 s využitím různých inhibitorů jsou vizualizována na Obrázku 27 na následující straně.



Obrázek 27 | Inhibitory potenciálně vyvolávající AMT u predominantně améboidní buněčné linie A375m2

Kvantifikace buněčné morfologie buněčné linie A375m2 s inhibitory testovanými pro vyvolání AMT (levá část obrázků) a reprezentativní morfologie příslušných vzorků (pravá část obrázků). (A) Inhibitory ROCK. (B) Inhibitory kináz IKK a JNK. (C) Inhibitory kinázy p38. Data jsou prezentována jako průměr ± SD. Data byla hodnocena testem jednocestná ANOVA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Prezentované výsledky jsou průměrnými hodnotami ze dvou až třech nezávislých biologických opakování. Měřítko reprezentuje 75 μm .

5. Diskuze

Nádorové buňky využívají pro svou migraci nejrůznější strategie, mezi kterými dokážou dle aktuálních podmínek prostředí přepínat. To výrazně znesnadňuje vývoj migrastatické léčby [5]. Pro různé módy migrace existují určité markery, které je pomáhají rozpoznávat, ovšem nejsou vždy plně univerzální, protože řada z nich je specifická jen pro určité buněčné typy nebo má i řadu fyziologických funkcí. Proto se řada laboratoří snaží stále odhalit specifické markery daných módů nádorové invazivity [126]. Laboratoř invazivity nádorových buněk, ve které byla předkládaná disertační práce vypracována, se zabývá primárně dvěma módy individuální invazivity (mezenchymálním a améboidním) a přechody mezi nimi (AMT – améboidně-mezenchymální přechod; MAT – mezenchymálně-améboidní přechod). V těchto přechodech hraje úlohu celá řada faktorů – např. složení a architektura extracelulární matrix, aktivní buněčné signalizační dráhy, schopnost buněk štěpit ECM apod. [10]. Z tohoto důvodu je třeba na problematiku invazivních módů nahlížet komplexně.

Velkou výzvou v našem oboru je potřeba analyzovat buňky ve 3D prostředí, protože právě v něm se nádorové buňky při metastatickém šíření pohybují v těle. Základy oboru byly vybudovány výzkumem mechanismů migrace nádorových buněk ve 2D prostředí, ale v současné době je vyvíjeno nemalé úsilí ustanovit co nejvíce modelů invaze ve 3D, protože se ukazuje, že ač jsou klíčové dráhy pro daný typ invaze aktivní i ve 2D prostředí, buňky ve 3D vytvářejí např. jiné invazivní struktury (lamellipodia jsou například typická pro mezenchymální migraci ve 2D, ale ve 3D mezenchymální buňky vytvářejí tzv. pseudopodia (viz Obrázek 13 na straně 27) a invadopodia). 3D prostředí mezibuněčné hmoty je rovněž výrazně „měkčí“ než tuhé plastové dno Petriho misky či sklíčko využívané v klasickém 2D výzkumu [13]. Navíc bylo prokázáno, že migrace ve 3D je daleko podobnější migraci v 1D prostředí (např. podél kolagenového vlákna) než velmi dobře popsané migraci ve 2D [9]. Nápadný rozdíl v morfologii některých buněčných linií v rámci 2D (Petriho miska) a 3D prostředí (kolagenová matrix) je zachycen na Obrázku 17 na straně 49. Jelikož se invazivní plasticita plně manifestuje právě ve trojrozměrném prostředí, téměř všechny pokusy a analýzy jsme prováděli na vzorcích ve 3D prostředí.

Na tomto místě je však třeba zdůraznit, že ač se využitím kolagenové matrix přibližujeme situaci *in vivo* v porovnání s analýzou ve 2D prostředí, stále se jedná o zjednodušený model ECM, protože mezibuněčná hmota sestává mimo kolagenu také z mnoha dalších důležitých komponent (proteoglykany, fibronectin, laminin, faktory sekretované okolními buňkami apod.) [13]. Naše experimentální kolagenová matrix je založena na kolagenu I, jakožto v lidském těle nejvíce zastoupeném typu kolagenu [127].

Jak již bylo uvedeno v kapitole „4. Metody a výsledky“, projekt, v jehož rámci předkládaná disertační práce vznikala, byl společnou prací hned několika pracovníků. Společným záměrem bylo vytvořit experimentální modely MAT/AMT a následně analyzovat buňky podstupující tyto přechody na transkriptomické a proteomické úrovni, což vytvořilo jakousi základnu pro navazující práci. Následně jsme na základě „omických“ přístupů vytipovali a předběžně rozpracovali možné zásadní oblasti typické pro MAT/AMT. Autor této

disertační práce se v rámci svého navazujícího hlavního projektu zaměřil na úlohu dlouhé nekódující RNA MALAT1 v plasticitě invazivity nádorových buněk. Struktura diskuse disertační práce tedy bude toto schéma kopírovat. Nejprve budou diskutovány použité experimentální modely, následně výsledky transkriptomické a proteomické analýzy společně s jejich ověřením pomocí RT-qPCR a imunoblotů a ve finále budou shrnuty a diskutovány výsledky získané při analýze role lncRNA MALAT v plasticitě invazivity nádorových buněk.

5.1. Experimentální modely využité pro analýzu MAT

Pro vyvolání MAT v nádorových buněčných liniích jsme využili dva přístupy – genetickou modifikaci, pomocí níž byl do buněk vnesen konstrukt obsahující doxycyklinem indukovatelné konstitutivně aktivní RhoA (icaRhoA), či farmakologické opůsobení buněk dasatinibem (DAS).

Dráha RhoA/ROCK je zásadní pro améboidní invazivitu a bylo ukázáno, že exprese konstitutivně aktivního RhoA (RhoA^{G14V}) vede k MAT jak v glioblastomové buněčné linii, tak ve fibrosarkomové linii HT1080 [128,129]. Námi vytvořená buněčná linie HT1080 vykazovala po indukci doxycyklinem expresi proteinu, který byl detekovatelný protilátkou proti RhoA a svou velikostí odpovídal fúzi RhoA s GFP a rovněž tato linie podstupovala efektivní MAT ([116] – Fig. 2a-d).

Pro tvorbu fokálních adhezí, které jsou typickým znakem mezenchymální invazivity, je důležitá kináza Src. Po inhibici Src pomocí inhibitoru dasatinibu byl pozorován nápadný mezenchymálně-améboidní přechod v buněčné linii A375 [56]. V rámci přípravy modelu MAT využívajícího inhibitor kinázy Src jsme testovali několik různých látek (dasatinib, saracatinib a UM-164), ovšem dasatinib (DAS) v koncentraci 1 μ M se ukázal jako nejpotentnější induktor MAT ([116] – Fig. 2a-c; Suppl. Fig. „Src inhibitor comparison“). Rozdílná schopnost různých inhibitorů vyvolávat MAT může být dána jejich odlišným mechanismem účinku na strukturu a lokalizaci kinázy Src [130]. Aktivace RhoA v buňkách indukovaných dasatinibem byla ověřována pomocí pull-downu aktivního RhoA pomocí GST-Rhotekin 1 Rho vázající domény (RBD). Zajímavým zjištěním bylo, že celková hladina RhoA po přidání dasatinibu ke vzorkům buněk klesla, ovšem frakce aktivního RhoA byla signifikantně vyšší v buňkách, které podstoupily MAT ([116] – Fig. 2d).

Oba způsoby indukce MAT se ukázaly být velice efektivní ([116] – Fig. 2c) a zároveň byla takto navozená améboidní migrace neovlivněná proteázovým inhibitorem GM6001 ([116] – Fig. 3), což opět poukazuje na to, že buňky skutečně podstoupily plnohodnotný přechod na améboidní invazivitu, jelikož ta je na štěpení extracelulární matrix nezávislá [25]. Jelikož je buněčná morfologie zahrnující zakulacení a tvorbu váčkových struktur na povrchu buňky typická i pro proces programované buněčné smrti (apoptózy) [131], byla provedena analýza aktivace kaspázy 3, aby bylo možné jasně demonstrovat, že se v našem modelu nejedná o apoptózu, ale opravdovou améboidní morfologii. Neaktivní forma kaspázy 3 byla snadno detekována ve všech vzorcích, aktivní forma byla detekována ve velice malém množství na hraně detekce jak v kontrolních buňkách, tak v buňkách podstupujících MAT

([116] – Fig. 2e). Aby bylo možné dokázat, že kulaté améboidní buňky v kolagenu opravdu migrují byla natáčena časosběrná videa jejich pohybu ([116] – Movie 1-3). Na těchto videích je zachyceno nejen to, že buňky se v kolagenu pohybují, ale rovněž je možné pozorovat i jejich dělení.

V rámci rozšíření analýzy plasticity invazivity nádorových buněk podstupujících MAT byly využity modely odvozené od dalších buněčných linií (BLM a MDA-MB-231) využívající stejné metody vyvolání MAT jako v případě buněčné linie HT1080. Všechny tyto čtyři doplňkové modely vykazovaly stejně jako v případě buněčné linie HT1080 signifikantní tranzici po indukci MAT ([117] – Fig. 2A-D).

Leukocyty v živých tkáních migrují za pomoci améboidního typu migrace. Na rozdíl od rakovinných buněk nejsou obvykle schopné přechodu na mezenchymální mód migrace [132]. Výjimku ovšem tvoří M2 makrofágy. Makrofágy mohou diferencovat ve dva typy – M1 makrofágy (inhibují buněčnou proliferaci, způsobují zánět a poškození tkáně) a M2 makrofágy (podporují buněčnou proliferaci, potlačují zánět a podporují opravu tkání) [133]. Zmíněné M2 makrofágy vykazovaly v experimentech v kolagenové matrix migrační plasticitu v závislosti na koncentraci použitého kolagenu. V řídkém kolagenu (2 mg/ml) využívaly tyto buňky améboidní způsob invazivity, v hustém kolagenu (5,1 mg/ml) pak invazivitu mezenchymální [127]. Pro náš projekt byl tento systém velice zajímavý, protože představuje invazivní plasticitu nenádorových buněk, u kterých je možné MAT/AMT vyvolat bez genetické modifikace či farmakologického zásahu. Proto jsme tento systém využili v našich experimentech. Ve spolupráci s klinickou laboratoří jsme získali tři nezávislé vzorky lidských primárních M2 makrofágů, které jsme umístili do řídkého (1,7 mg/ml) a hustého (4,8 mg/ml) kolagenu. Ve shodě s prací Van Goethem et al. vykazovaly makrofágy v řídkém kolagenu funkční améboidní invazivitu a v hustém kolagenu pak funkční mezenchymální invazivitu. Tento model byl podroben transkriptomické analýze metodou RNA-seq stejně jako modely MAT odvozené od buněčné linie HT1080 (viz dále) [124].

5.2. Analýza modelů MAT

5.2.1. Transkriptomická a proteomická analýza buněk podstupujících MAT

V současné době jsou díky rozvoji sekvenačních technik k dispozici rozsáhlé genomické, transkriptomické, proteomické, epigenetické a další datasety, ve kterých je možné hledat bioinformatickými nástroji obecné vzorce v buněčné expresi. Mezi velice zajímavé nástroje v tomto ohledu patří např. GEPIA. V tomto webovém rozhraní je možné velice rychle ověřit např. korelaci dvou genů či zobrazit expresní profil daného genu v různých rakovinných typech [134]. V oboru plasticity invazivity nádorových buněk ve 3D prostředí je však počet podobných datasetů značně omezen. Podařilo se nám najít pouze dva transkriptomické datasety zabývající se přímo přechody mezi améboidním a mezenchymálním invazivním módem. Prvním z nich je transkripční profilování pomocí expresních mikročipů u melanomové buněčné linie A375m2, která podstupuje AMT pomocí inhibitorů kinázy ROCK, které je provedeno na vzorcích buněk na tlusté vrstvě kolagenu [135]. Druhá práce

pak zkoumá expresní profil melanomové buněčné linie Hs294T podstupující MAT s využitím Ilomastatu, aktivátoru RhoA Calpeptinu či overexprese proteinu EphA2 ovšem nikoli ve 3D prostředí [136]. Vzhledem k nedostatku vhodných datasetů ze 3D prostředí, jsme se rozhodli pro vlastní transkriptomickou a proteomickou analýzu buněk podstupujících MAT (experimentální systém byl popsán v předchozí podkapitole) – konkrétně jsme takto analyzovali buněčnou linii HT1080, kde byl MAT indukován pomocí icaRhoA či dasatinibu a ve vzorcích M2 makrofágů v různě hustých kolagenových maticích.

Aby bylo možné odfiltrovat co nejvíce výsledků, které jsou specifické pro daný typ vyvolání MAT, z dat získaných na buněčné linii HT1080 podstupující MAT byly určeny překryvy genů se zvýšenou (121 genů) a sníženou (214) expresí pro oba způsoby vyvolání MAT (icaRhoA a DAS). Geny se zvýšenou expresí byly silně asociovány s interferonovou signalizací typu I (tedy kanonickou dráhou JAK/STAT) a geny se sníženou expresí s regulací buněčného cyklu (Obrázek 18 na straně 50). Stejný vzorec se pak projevil i v analýze proteomických dat stejného modelu MAT (Obrázek 19 na straně 52). Při analýze transkriptomických dat modelu využívajícího M2 makrofágy v různě hustém kolagenu se pak rovněž projevilo zapojení genů se sníženou genovou expresí v regulaci buněčného cyklu, ovšem nebylo zde detekováno významné nabohacení zapojení genů se zvýšenou expresí v interferonové signalizaci (Obrázek 20 na straně 53).

Ač se v případě M2 makrofágů nejedná o model invazivity nádorových buněk, analýza jejich AMT/MAT je velice cenná z hlediska hledání klíčových molekul zapojených v invazivních přechodech v širokém spektru buněčných typů. Je třeba mít stále na paměti, že nádorové buňky nevytvářejí žádné nové invazivní programy, ale využívají programy, které již vznikly velmi dávno v evoluci, a jsou tak v genomu kódovány [137]. Invazivní módy již dlouho nejsou chápány jako pevně dané kategorické programy, ale spíše jako určité spektrum znaků, jejichž kombinaci migrující buňky volí pro optimální pohyb v reakci na aktuální podmínky prostředí [41]. Je tudíž nanejvýš žádoucí pokusit se najít takovou kombinaci, která je typická pro migraci nádorových buněk, ale zároveň nepoškodí migrační potenciál tělních buněk pacienta (např. migraci bílých krvinek, která je klíčová pro obranyschopnost organismu). Z tohoto pohledu je zvýšení exprese genů odpovídajících na prozánětlivou odpověď na interferon v rakovinné buněčné linii HT1080 po MAT, ale nikoli v améboidních M2 makrofázích, důležitý výsledek, protože by to mohl být jeden z klíčových znaků améboidní invazivity nádorových buněk. Jedná se však stále jen o pracovní hypotézu, protože na přesvědčivý závěr by bylo třeba analyzovat celé spektrum rakovinných buněk a rovněž améboidně migrujících bílých krvinek.

5.2.2. Ověření vybraných cílů se zvýšenou expresí v améboidních buňkách identifikovaných „omickými“ přístupy

Velmi výrazným výsledkem „omických“ pokusů bylo zvýšení exprese genů odpovědi na interferonovou signalizaci. Interferony (IFN) patří mezi cytokiny a byly poprvé objeveny díky své úloze v antivirové odpovědi imunitního systému. Rodina interferonů je dělena na tři

skupiny – typ I ($IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IFN\epsilon$, $IFN\kappa$, $IFN\omega$), typ II ($IFN\gamma$) a typ III ($IFN\lambda_{1-3}$) [138]. Kanonický způsob signalizace odpovědi na interferony typu I zahrnuje aktivaci dráhy JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) prostřednictvím příslušného cytokinového receptoru. Receptorem aktivované receptorové tyrozinkinázy JAK1 nebo TYK2 fosforylují cytoplazmatické transkripční faktory STAT1, STAT2 či STAT3, které dimerizují a translokují do jádra, kde spouštějí transkripci příslušných IFN responzivních genů. Typ výsledné odpovědi je dán konkrétními proteiny z rodiny STAT, které dimerizují. Při tvorbě heterodimeru STAT1-STAT2 dochází ke spuštění antivirové odpovědi, pokud je vytvořen homodimer STAT1-STAT1, je spuštěna zánětlivá odpověď a pokud je vytvořen homodimer STAT3-STAT3, jsou nepřímým mechanismem aktivovány dráhy tlumící zánětlivou odpověď [139].

Pro ověření zvýšení exprese genů interferonové odpovědi po MAT bylo vybráno celkem šest genů, které se objevily v transkriptomických datech – C3, NNMT, IFI6, ISG15, OAS1 a STAT1 („IFN responzivní geny“). C3 (Complement component 3) je protein, který hraje klíčovou úlohu ve formování komplementového systému, který je součástí imunitní odpovědi na bakteriální infekci [140]. NNMT (Nicotinamide N-Methyltransferase) je enzym zásadní v regulaci metabolických drah. Byla prokázána jeho zvýšená exprese v reakci na prozánětlivou stimulaci, kdy působí nejspíše jako ochranný kompenzační mechanismus snižující poškození tkáně [141]. IFI6 (Interferon alpha-inducible protein 6) funguje jako anti-apoptotický faktor a rovněž byla popsána jeho role v protivirové odpovědi [142]. ISG15 (Interferon Stimulated Gene 15) působí jako extracelulární cytokin, ale i jako intracelulární modifikace proteinů, protože podobně jako ubiquitin může být konjugován s nejrůznějšími proteiny (pak hovoříme o tzv. isgylaci) [143]. OAS1 (2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1) funguje jako senzor virové přítomnosti v buňce – po navázání na dvojvláknovou RNA viru, aktivuje RNázu L, která degraduje virovou nukleovou kyselinu [144]. STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1) je aktivován proteinem JAK a následně dimerizuje a spouští transkripci interferon responzivních genů [145].

Jelikož bylo ověřování omických výsledků prováděno na rozšířeném vzorku modelů MAT (icaRhoA a DAS v liniích BLM, HT1080 a MDA-MB-231), byla nejprve ověřena schopnost všech buněčných linií odpovídat na interferony ze skupiny I (použit $IFN\omega$) a II ($IFN\gamma$) (Obrázek 23A na straně 56). Následně byl analyzován expresní profil vybraných IFN responzivních genů v časově rozlišených vzorcích buněčných linií podstupujících MAT. Zatímco všechny modely, kde bylo indukováno MAT dasatinibem vykazovaly zvýšenou expresi IFN responzivních genů, v případě indukce MAT pomocí icaRhoA byly tyto geny indukovány ve větším množství pouze v linii HT1080 (Obrázek 23B na straně 56). Tento rozdílný efekt by mohl být způsoben antagonismem STAT1 a STAT3 proteinu [146]. Bylo popsáno, že dasatinib aktivuje STAT1 (prostřednictvím fosforylace dráhou MAP/ERK) a zároveň snižuje fosforylaci (tedy aktivitu) STAT3 [147]. To by mohlo vysvětlovat, proč je v odpovědi na dasatinib tak silně spuštěna exprese genů odpovídajících na STAT1 oproti indukci MAT pomocí exprese icaRhoA.

Jelikož se aktivace dráhy JAK/STAT1 během MAT ukázala být spíše specifická pro určité buněčné linie, hledali jsme další změny ve zvýšené transkripci, které by však byly patrné ve všech modelech MAT. Protože byl prokázán vliv sekretovaných faktorů v améboidní invazivitě [135], zaměřili jsme se na přítomnost prozánětlivých cytokinů v našich transkriptomických datech a odhalili zvýšenou hladinu prozánětlivých cytokinů IL6, IL11 a IL24 po MAT. Tyto cytokiny bylo rovněž identifikovány proteomickým přístupem v buněčné linii HT1080 po indukci MAT dasatinibem. RT-qPCR analýza ukázala, že všechny tři cytokiny měly po MAT ve všech systémech zvýšenou genovou expresi (Obrázek 24A na straně 57). Všechny tři analyzované cytokiny byly spojeny s rolí v zánětlivé odpovědi [148–150]. U IL24 byla dokonce prokázána přímá spojitost s hladinou RhoA, jelikož po inhibici RhoA C3 transferázou byla rovněž výrazně snížena exprese IL24 na úrovni proteinu i mRNA [151].

Faktory z rodiny C/EBP se váží do promotorů prozánětlivých cytokinů ve spolupráci s dráhou NF- κ B či faktory rodiny AP-1 a aktivují transkripci genů zapojených v zánětlivé odpovědi. Faktory C/EBP β a C/EBP δ se např. vážou do promotoru IL6 a ve spolupráci s NF- κ B plně aktivují jeho transkripci [149,152]. C/EBP γ vykazuje naopak funkci negativního regulátoru aktivace genů pomocí C/EBP faktorů, díky čemuž hraje zásadní roli v modulaci aktivity C/EBP transkripčních faktorů [153]. RT-qPCR analýza odhalila zvýšení exprese CEBPB ve všech modelech MAT (Obrázek 24A na straně 57). Zvýšení hladiny C/EBP β bylo rovněž prokázáno na proteinové úrovni s výjimkou buněčné linie BLM icaRhoA, kde byl signál velice slabý, a výsledek tak nebyl jednoznačný (Obrázek 24B na straně 57). Úroveň exprese CEBPD a CEBPG již tak jednoznačná nebyla a lišila se dle konkrétní linie a/či způsobu vyvolání MAT (Obrázek 24A na straně 57), přičemž expresní profil CEBPD byl podobný expresnímu profilu IFN responzivních genů (Obrázek 23B na straně 56).

Výsledky naznačují, že v améboidních buňkách je pozměněna exprese genů související se zánětlivou odpovědí. Tato prozánětlivá signalizace v améboidních buňkách je aktuálně předmětem analýzy jednoho z projektů vypracovávaných v Laboratoři invazivity nádorových buněk.

5.2.3. Ověření vybraných cílů se sníženou expresí v améboidních buňkách identifikovaných „omickými“ přístupy

Ve všech analyzovaných datasetech (včetně M2 makrofágů) byla zaznamenána snížená exprese genů a snížená hladina proteinů zapojených v regulaci buněčného cyklu. Vzhledem k přítomnosti této změny u velice různorodých datasetů se zdá, že by tento znak mohl být velice silně spjat s améboidním módem invazivity, který není typický pouze pro nádorové buňky. Jak v transkriptomických, tak proteomických datech se mezi geny se sníženou expresí objevil člen rodiny AP-1 (Activator Protein 1) – gen FOSL1, který kóduje protein Fra-1 [116]. Snížení exprese genu FOSL1 v améboidních buňkách bylo z RT-qPCR analýzy jasně patrné a tento výsledek byl ověřen i pomocí imunoblotů (Obrázek 25 na straně 58). Je tedy velice pravděpodobné, že protein Fra-1 je zapojen do snížení proliferace

améboidních buněk. Tento náš předpoklad je ve shodě s daty jiných skupiny, které popsaly, že zvýšená hladina Fra-1 výrazně zvyšovala proliferaci v buněčné linii MDA-MB-231 [154] či melanomových liniích [155]. Ve vzorcích, kdy bylo MAT vyvoláno dasatinibem bylo rovněž imunoblotem detekováno snížení exprese dalších členů AP-1 rodiny – c-FOS a c-JUN (Obrázek 25B na straně 58). Snížená exprese genu c-JUN byla rovněž detekována metodou RNA-seq v buněčné linii HT1080 po MAT [116].

Jak již bylo popsáno v teoretickém úvodu, limitujícím faktorem pro améboidní migraci skrze póry ECM je velikost jádra, které je relativně rigidní. Ukázalo se však, že některé buňky jsou schopné tuto rigiditu snížit, a učinit tak své jádro více deformovatelné [38]. Snížením rigidity jaderného obalu se však zvyšuje pravděpodobnost prasknutí jaderného obalu a poškození DNA [156]. Proto se nabízí vysvětlení, že v améboidních buňkách je buněčný cyklus pozastaven nebo zpomalen, aby se při rychlém protlačování skrze póry v ECM minimalizovala pravděpodobnost smrti buňky v důsledku narušení procesu mitózy.

Zajímavým propojením detekované zvýšené hladiny C/EBP β a snížení buněčné proliferace améboidních buněk je článek z roku 2007, kdy autoři popisují, že C/EBP β je schopno snižovat buněčnou proliferaci prostřednictvím represe cílových genů proteinů E2F [157]. S našimi pozorováními rovněž korelují výsledky práce, ve které autoři využívali různě tuhous invazivní matici, aby vyvolali AMT. Během pokusů zaznamenali, že buňky s améboidní morfologií vykazovaly výrazně nižší proliferaci [47].

V rámci genů se sníženou expresí byl analyzován rovněž gen DIAPH3. Tento protein patří mezi forminy, které podporují polymeraci aktinu a dynamiku mikrotubulů. Při snížení jeho exprese v buněčné linii rakoviny prsu HMEC bylo pozorováno zakulacení buněk a tvorba membránových blebů, tedy znaky typické pro améboidní invazivitu [62]. Hladina exprese genu pro tento protein byla po MAT rovněž snížena ve většině použitých experimentálních systémů (Obrázek 25A na straně 58).

5.3. Úloha dlouhé nekódující RNA MALAT1 v plasticitě invazivity nádorových buněk

V rámci třetí publikace, která tvoří předkládanou disertační práci [117] (Příloha 3), bylo nejprve provedeno srovnání všech dostupných transkriptomických datasetů, které se zabývaly MAT/AMT ve 3D prostředí. Množství vhodných dat k analýze však nebylo příliš velké – k našim dvěma datasetům získaným z buněčné linie HT1080 a M2 makrofágů [116,124] byla přidána data z transkripčního profilování pomocí expresních mikročipů získané analýzou melanomové buněčné linie A375m2, která podstupuje AMT pomocí inhibitorů kinázy ROCK („ROCKi“), které bylo provedeno na vzorcích buněk na tlusté vrstvě kolagenu [135]. Celkem tedy byla porovnávána data ze tří velice rozlišných buněčných typů (M2 makrofágy, melanomová linie A375m2 a fibrosarkomová linie HT1080) a čtyř rozdílných způsobů vyvolání přechodu mezi mezenchymálním a améboidním invazivním módem (různě hustý kolagen, inhibitory ROCK, indukce icaRhoA, dasatinib). Bylo velice překvapivé, že i přes značnou různorodost porovnávaných vzorků byl objeven překryv tří genů, jejichž

exprese byla signifikantně zvýšena v améboidní formě všech buněk – dlouhé nekódující RNA MALAT1 a NEAT1 a gen pro protein CEMIP. Zdá se tedy, že tyto geny jsou pevně spjaty s améboidní migrací.

CEMIP (Cell Migration Inducing Protein) je protein, který je indukován hypoxií a tato zvýšená exprese vede k posílení buněčné invazivity [158]. Zajímavé je, že i úroveň exprese MALAT1 je zvýšena při vystavení buněk hypoxii [159], přičemž hypoxické podmínky jsou schopné vyvolat indukci améboidního fenotypu [68]. Úloha proteinu CEMIP však nebyla dále analyzována a bude nejspíše předmětem navazujících projektů v Laboratoři invazivity nádorových buněk. Naopak jsme se v aktuálním projektu zaměřili na identifikované dlouhé nekódující RNA MALAT1 a NEAT1, které vykazovaly v améboidní formě buněk zvýšenou expresi. V minulosti bylo prokázáno, že genová exprese lncRNA MALAT1 a NEAT1 dobře koreluje a že tyto dlouhé nekódující RNA dokonce v některých případech interagují se stejnými geny. Tato společná interakce však není totožná, protože se vážou do jiných míst genu. Mají tudíž nejspíše synergickou ovšem nikoliv kompenzační funkci v regulaci těchto genů [86].

Pomocí RT-qPCR byly analyzovány hladiny MALAT1 a NEAT1 v našich modelech MAT (HT1080, BLM, MDA-MB-231; icaRhoA/DAS). Ve všech modelech bylo detekováno zvýšení hladiny obou dlouhých nekódujících RNA a ve většině modelů bylo zvýšení jejich exprese signifikantní. Vzhledem k větší konzistenci získaných výsledků pro MALAT1 byla veškerá další analýza zaměřena již pouze na tento transkript. Zajímavé bylo, že v případě využití dasatinibu k indukci MAT došlo k většímu zvýšení exprese MALAT1 (2,3-3,2x) než v případě indukce pomocí icaRhoA (1,4-1,9x). Vzhledem k vysoké bazální hladině MALAT1 [78] je však i tato, na první pohled nižší, změna významná.

Vzhledem k tomu, že výsledky prokázaly zvýšení hladiny MALAT1 po MAT, nabízela se logická otázka – bylo by možné snížením hladiny MALAT1 vyvolat proces opačný – tedy AMT? Technikou první volby bylo snížení exprese pomocí siRNA. Tento přístup se v našich podmínkách ukázal jako neúčinný, ač některé práce tento postup s úspěchem využily [83,160,161]. Důvodem pro neúčinnost tohoto přístupu mohlo být, že MALAT1 má velice vysokou bazální expresi a zároveň je provedení siRNA knockdownu ve 3D prostředí kolagenu technicky velmi náročné oproti stejnému postupu ve 2D prostředí. Využití siRNA pro snížení exprese jaderných RNA je rovněž stále poměrně kontroverzním tématem, jelikož RISC (RNA-Induced Silencing Complex), který je za fyzické zničení transkriptu zodpovědný, se vyskytuje převážně v cytoplazmě buněk [162]. Vzhledem k neúspěchu tohoto přístupu byla zvolena technika zavedení transkripčního terminátoru do promotoru MALAT1 pomocí homologní rekombinace s využitím nukleáz se zinkovými prsty (ZFN – Zinc-Finger Nucleases) [162] a následná izolace klonů z melanomových buněčných linií A375m2 a A2058. Buněčná linie A375m2 byla zvolena, protože v kolagenu vykazuje více než 90% améboidní morfologii a je rovněž standardním modelem améboidní invazivity [135], buněčná linie A2058 pak proto, že je to jediná další buněčná linie, kterou jsme měli k dispozici, jenž ve 3D kolagenové matrix vykazuje většinovou améboidní morfologii (kolem 90 %). V případě buněčné linie A375m2

se podařilo připravit klony se sníženou expresí MALAT1, které vykazovaly signifikantní posun k mezenchymální morfologii, přičemž všechny tyto klony byly heterozygotní (MALAT1+/-; tedy jedna kopie genu pro MALAT1 byla vyřazena a druhá zůstala intaktní). Zajímavé bylo, že klony se sníženou expresí MALAT1 připravené z buněčné linie A2058 neměly pozměněnou morfologii a byly pro gen MALAT1 homozygotní (MALAT1-/-; tedy byly vyřazeny obě kopie genu pro MALAT1). Z tohoto pozorování lze usuzovat, že MALAT1 může být postradatelný pro buněčnou linii A2058, ale ne pro linii A375m2, u které se nepodařilo i přes značné úsilí získat žádný MALAT1-/- klon. Tento rozdíl si vysvětlujeme tím, že klony A2058 MALAT1-/- nezměnily svůj fenotyp ve 3D prostředí a nejspíše jsou schopné fungovat bez MALAT1, zatímco buňky A375m2 se sníženou hladinou MALAT1 podstupují AMT, ale kompletně bez tohoto transkriptu nejspíše nepřežívají. Další možností je, že účinnost homologní rekombinace je v buněčné linii A2058 neobvykle vysoká. V neposlední řadě by tento rozdíl mohl být dán nějakým kompenzačním mechanismem či nepřímým efektem MALAT1 na viabilitu buněčné linie A375m2 (MALAT1 na sobě koncentruje nejrůznější miR a proteiny).

Jak již bylo řečeno, klony A375m2 MALAT1+/- vykazovaly výrazně protaženější morfologii ve 3D prostředí. Funkční AMT rovněž dokládá snížená hladina aktivního RhoA stanovená pomocí metody pull-downu s využitím GST-Rhotekin 1 Rho vázající domény. Ač bylo množství aktivního RhoA sníženo i v klonech A2058 MALAT1-/-, tyto klony měly všechny zachovanou výraznou améboidní morfologii ve 3D. Vzhledem k tomu, že tato buněčná linie nepodstupuje AMT ani při použití inhibitoru proteinu ROCK Y-27632, což je často využívaná metoda vyvolání AMT [57,58], domníváme se, že na rozdíl od buněk A375m2 nevykazuje buněčná linie A2058 invazivní plasticitu.

Klony A375m2 MALAT+/- rovněž vykazovaly vyšší invazivitu ze sferoidů ve 3D v porovnání s kontrolními klony. Tento efekt však nebyl pozorován u klonů A2058 MALAT1-/. Tento rozdílný efekt může být dán rovněž neschopností klonů A2058 MALAT1-/- podstupovat AMT, jelikož námi využívaný kolagen I z potkaních ocasů vytváří hustou síť tenkých kolagenových vláken, která v migraci favorizuje mezenchymální buňky, které jsou schopny tuto síť štěpit na rozdíl od buněk améboidních, pro které se mohou stát malé póry v matici limitujícím faktorem pro migraci [37].

Jak klony A375m2 MALAT1+/-, tak A2058 MALAT1-/- vykazovaly ve 3D kolagenu signifikantní zvýšení proliferace oproti kontrolním klonům. Jedná se tedy o nejvýraznější charakteristiku klonů se sníženou expresí MALAT1, jelikož se projevila v obou buněčných liniích. Toto zjištění (tedy zvýšená proliferace v mezenchymálním stavu oproti améboidnímu) je v dobré shodě s našimi transkriptomickými a proteomickými výsledky, které naznačují zpomalení buněčného cyklu po MAT. Získané výsledky jsou rovněž v dobré shodě se studii, které ukazují, že snížená hladina MALAT1 zvyšuje invazivitu a proliferaci [97,98,102]. Na druhou stranu jiné studie popsaly naprosto opačný efekt [95,96,100,101]. Protichůdné výsledky získané různými skupinami je možné vysvětlit několika způsoby.

Prvním možným vysvětlením je rozdílná genová exprese a funkce různých tkání a buněčných linií. Je tedy možné, že funkce MALAT1 jsou specifické v různých buněčných typech nebo buněčných liniích [92].

Druhým možným vysvětlením je rozdílný experimentální design různých studií. Aktuálně se nejvíce používají tři způsoby, jak snížit hladinu MALAT1 (nebo jakékoli jiné lncRNA) – použití tzv. ASO (antisense oligonukleotidů), delece genu (nebo jeho částí) nebo naopak vložení transkripčního terminátoru na začátek transkriptu [102].

Využití ASO pro knock-out MALAT1, který je lokalizován v buněčném jádře, je stále kontroverzním tématem, jelikož RISC (RNA-Induced Silencing Complex), který je za následné zničení transkriptu zodpovědný, se vyskytuje převážně v cytoplazmě buněk. Na druhou stranu se v roce 2013 objevila práce popisující RICS v jádře buňky [106]. O tři roky později bylo publikováno, že protein Argonaute-2 (Ago2), klíčová součást komplexu RISC, se může vyskytovat v buněčném jádře, avšak tato možnost je spíše specifická jen pro některé tkáně [163]. Dalším faktorem je fakt, že často používané siRNA či shRNA jsou známé tím, že mají řadu nespecifických efektů. Aby bylo možné tyto nespecifické efekty odlišit od těch specifických, je třeba provést tzv. „rescue“ experimenty (kdy je vyřazený transkript vrácen do buněk), které však obvykle nejsou součástí publikovaných prací s ASO [164].

Na úrovni delecí či inzerce genových úseků byly získány protichůdné výsledky na myším modelu rakoviny prsu. V první studii byla popsána role MALAT1 jakožto zesilovače růstu nádorových buněk a tvorby nádorových metastáz [165]. Oproti tomu byl v další studii MALAT1 označen za supresor metastazování a tento závěr byl navíc podpořen rescue experimenty [102]. Tyto dvě práce však použily dva odlišné experimentální přístupy ke snížení hladiny MALAT1. Zatímco v první práci byla využita delece genu, ve druhé bylo využito cílené inzerce transkripčního terminátoru (tedy stejný přístup, který byl použit v našich experimentech). Při výzkumu lncRNA Haunt bylo ukázáno, že samotná lncRNA a genový lokus tohoto transkriptu mají dokonce opačné role v regulaci dalších molekul. Je to dáno tím, že DNA lokus tohoto genu obsahuje regulační sekvence, které jsou při genovém knock-outu Haunt lncRNAs rovněž deletovány z genomu [166]. Naše výsledky společně s prací [102] tedy podporují hypotézu, že MALAT1 může fungovat jako nádorový supresor. Oproti citované práci jsme však nebyli schopni provést rescue experimenty, které by poskytly přímé propojení lncRNA MALAT1 a pozorovaných fenotypů. Připravili jsme sice expresní konstrukt s MALAT1 a pokusili se o jeho stabilní expresi v klonech A375m2 MALAT+/-, ovšem nepodařilo se nám získat linie, které by stabilně re-exprimovaly plnodélkový MALAT1. Důvodem mohla být genetická nestabilita relativně velkého konstruktů, rekombinace, přednostní integrace krátkých fragmentů plazmidu nebo negativní selekční tlak spojený s nižší schopností proliferace u buněk s vyšší hladinou MALAT1 pozorované u analyzovaných buněčných linií. Další limitací je fakt, že pro studium invazivní plasticity ve 3D není možné využít transientní transfekci, protože samotný proces transfekce mění morfologii buněk ve 3D prostředí.

Přesná role a mechanismus účinku MALAT1 v invazivní plasticitě a améboidní stálosti nejsou spolehlivě popsány. Ovšem některé signalizační dráhy, které byly spojeny s améboidním fenotypem byly rovněž korelovány s hladinou MALAT1. Úroveň exprese MALAT1 je zvýšena při hypoxii [159], přičemž hypoxické podmínky jsou schopné vyvolat indukci améboidního fenotypu [68]. Rovněž byla popsána úloha MALAT1 v regulaci časné imunitní odpovědi zapojením MALAT1 do indukce prozánětlivých genů [84,167] (což opět souhlasí s našimi výsledky získanými na modelech MAT, kdy byly prozánětlivé geny aktivovány po MAT) a v modulaci NF- κ B dráhy [167,168], která se rovněž podílí na regulaci améboidní invazivity [169]. Navíc byla prokázána korelace hladiny MALAT1 se signalizační dráhou Rho/ROCK [170], které jsou klíčovými regulátory améboidního fenotypu [58].

V rámci analýzy role MALAT1 v plasticitě invazivity nádorových buněk jsme se rovněž pokusili korelovat hladinu MALAT1 s morfologií nejrůznějších buněčných linií ve 3D prostředí (Obrázek 26 na straně 59). V získaném korelačním grafu se sice vyskytla jistá závislost (vyšší hladina MALAT1 u více améboidních buněk), ovšem výsledek nebyl statisticky signifikantní. Aby bylo možné hypotézu, že zvýšená hladina MALAT1 koreluje s améboidním fenotypem, spolehlivě ověřit, bylo by však třeba provést tuto analýzu na výrazně rozsáhlejší vzorku buněčných linií s charakterizovanou morfologií ve 3D prostředí, jelikož v podobných analýzách hraje obrovskou roli heterogenita použitých vzorků. V tomto ohledu by rovněž velice pomohlo, kdyby se začala hromadit expresní data vzorků získaných ze 3D prostředí, protože pak by bylo možné snadno hledat korelace buněčné morfologie a exprese vybraných genů. V tomto ohledu jsme podnikli ještě jeden krok kupředu, když jsme testovali různé inhibitory, které by potencionálně mohly vyvolávat AMT (Obrázek 27 na straně 60). Jako nejslibnější z použitých inhibitorů se ukázaly inhibitory kinázy p38, které vyvolávaly jednoznačný améboidně-mezenchymální přechod v buňkách A375m2. Z tohoto modelu AMT již byly připraveny vzorky na transkriptomickou analýzu pomocí metody RNA-seq. Analýzou tohoto nového datasetu zabývajícího se plasticitou invazivity nádorových buněk ze 3D bychom v budoucnu mohli získat další zajímavé informace o roli (nejenom) MALAT1 v invazivní plasticitě.

6. Shrnutí

- Podařilo se nám připravit několik modelů pro studium MAT ve 3D prostředí kolagenové matrix odvozených od různých nádorových buněčných linií (BLM, HT1080, MDA-MB-231) a s různým způsobem vyvolání přechodu (exprese konstitutivně aktivního RhoA nebo farmakologické vyvolání pomocí Src inhibitoru dasatinibu).
- Podařilo se nám připravit nenádorový model MAT/AMT využívající umístění M2 makrofágů do různě hustého kolagenu. V řídkém kolagenu makrofágy vykazovaly améboidní invazivitu, v hustém naopak invazivitu mezenchymální.
- Je důležité zdůraznit, že veškeré klíčové analýzy byly provedeny ve 3D prostředí, což je zásadní podmínka pro studium invazivity nádorových buněk.
- Modely MAT založené na buněčné linii HT1080 byly podrobeny transkriptomické a proteomické analýze, jejíž výsledky ukázaly nabohacení genů souvisejících s interferonovou zánětlivou odpovědí v améboidních buňkách, a naopak pokles hladiny genů a proteinů regulujících průběh buněčného cyklu. Metodou RNA-seq byl analyzován i model MAT založený na M2 makrofázích, kde došlo k potvrzení snížení exprese genů regulujících buněčný cyklus.
- Následné ověření omických dat potvrdilo zvýšenou expresi prozánětlivých genů i ve zbytku modelových buněčných systémů pro indukci MAT.
- LncRNA MALAT1 byla bioinformatickou analýzou všech aktuálně dostupných transkriptomických dat získaných při výzkumu MAT/AMT ze 3D prostředí identifikována jako gen se zvýšenou expresí v améboidních buňkách ve všech použitých datasetech. Toto zvýšení exprese bylo následně potvrzeno i experimentálně ve většině našich modelů MAT.
- Klony odvozené od vysoce améboidní melanomové buněčné linie A375m2 se sníženou expresí MALAT1 vykazovaly signifikantní posun k mezenchymální morfologii, stejně jako zvýšenou invazivitu ze sferoidů.
- Společným znakem klonů se sníženou hladinou MALAT1 odvozených z vysoce améboidních buněčných linií A375m2 a A2058 byla zvýšená proliferace ve 3D prostředí. Tento výsledek překvapivě naznačuje, že by MALAT1 mohl fungovat jako nádorový supresor.
- S využitím inhibitorů kinázy p38 aplikovaných na améboidní buněčnou linii A375m2 se podařilo ustanovit nový model AMT ve 3D prostředí, jehož transkriptomická analýza může společně s dalšími našimi datasety přinést nový důležitý vhled do komplexní problematiky plasticity invazivity nádorových buněk.

7. Publikace a podíl na jejich přípravě

Předkládaná práce je tvořena jednou prvoautorskou, jednou ko-prvoautorskou a jednou spoluautorskou publikací. Níže jsou tyto publikace citovány chronologicky dle data publikování a je uveden příspěvek autora této disertační práce na jejich tvorbě.

Čermák, V.; Gandalovičová, A.; Merta, L.; Fučíková, J.; Špišek, R.; Rösel, D.; Brábek, J. RNA-seq of macrophages of amoeboid or mesenchymal migratory phenotype due to specific structure of environment. *Sci. Data* **2018**, *5*, 180198.

- spoluautorství publikace
- RT-qPCR ověření exprese vybraných cílů (ITGB3, CD74 a MALAT1)

Čermák, V.*; Gandalovičová, A.*; Merta, L.*; Harant, K.; Rösel, D.; Brábek, J. High-throughput Transcriptomic and Proteomic Profiling of Mesenchymal-Amoeboid Transition in 3D Collagen. *Sci. Data* **2020**, *7*, 160.

* takto označení autoři přispěli stejným dílem k práci na článku

- ko-prvoautorství publikace
- charakterizace experimentálního systému – morfologické analýzy, konfokální mikroskopie, pull-down aktivního RhoA, analýza vlivu různých Src inhibitorů na morfologii buněk
- některé imunoblotty k ověření proteomických výsledků
- pro původní verzi této publikace bylo autorem disertační práce připraveno velké množství nepoužitých výsledků – část z nich je prezentována ve výsledkové části předkládané disertační práce
- metodické části textu, obrazové části, revize manuskriptu

Merta, L.; Gandalovičová, A.; Čermák, V.; Dibus, M.; Gutschner, T.; Diederichs, S.; Rösel, D.; Brábek, J. Increased Level of Long Non-Coding RNA MALAT1 Is a Common Feature of Amoeboid Invasion. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 1136.

- prvoautorství publikace
- většina experimentů, sepsání a revize manuskriptu, příprava grafiky

V disertační práci nejsou zahrnuty níže uvedené práce publikované / připravované v době doktorského studia autora.

Brejchová, J.; Sýkora, J.; Ostašov, P.; Merta, L.; Roubalová, L.; Janáček, J.; Hof, M.; Svoboda, P. TRH-receptor mobility and function in intact and cholesterol-depleted plasma membrane of HEK293 cells stably expressing TRH-R-eGFP. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2015**, *1848*, 781–796.

Merta, L.; Pinkr, T.; Janštová, V. A Hands-On Set for Understanding DNA Replication, Transcription & Polymerase Chain Reaction (PCR). *Am. Biol. Teach.* **2020**, *82*, 49–51.

Gandalovičová, A.; Šúchová, A.-M.; Čermák, V.; Merta, L.; Rösel, D.; Brábek, J. Sustained inflammatory signalling through Stat1/Stat2/IRF9 is associated with the amoeboid phenotype of melanoma cells. *Cancers.* **2020**, *12*, 2450.

Sandoval-Acuna, C.; Torrealba, N.; Tomkova, V.; Jadhav, S.; Blazkova, K.; Merta, L.; Lettlova, S.; Adamcová, M.; Rosel, D.; Brabek, J.; et al. Mitochondrially targeted DFO impairs mitochondrial respiration and biogenesis of [FeS] clusters, induces mitophagy and exhibits potent anti-cancer properties. *V Revizi v Cancer Research*

8. Seznam použité literatury

1. National Cancer Institute Definition of cancer - NCI Dictionary of Cancer Terms Available online: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cancer> (accessed on Jun 29, 2020).
2. Cancer Research UK Worldwide cancer statistics Available online: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-One> (accessed on Jun 29, 2020).
3. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–74.
4. Sleeman, J.; Steeg, P.S. Cancer metastasis as a therapeutic target. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 1177–1180.
5. Gandalovičová, A.; Rosel, D.; Fernandes, M.; Veselý, P.; Heneberg, P.; Čermák, V.; Petruželka, L.; Kumar, S.; Sanz-Moreno, V.; Brábek, J. Migrastatics—Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges. *Trends in Cancer* **2017**, *3*, 391–406.
6. Kopfstein, L.; Christofori, G. Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 449–468.
7. Welch, D.R.; Hurst, D.R. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 3011–3027.
8. Trepát, X.; Chen, Z.; Jacobson, K. Cell Migration. *Compr. Physiol.* **2012**, *2*, 2369–2392.
9. Doyle, A.D.; Wang, F.W.; Matsumoto, K.; Yamada, K.M. One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. *J. Cell Biol.* **2009**, *184*, 481–490.
10. Yamada, K.M.; Sixt, M. Mechanisms of 3D cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 738–752.
11. Brábek, J.; Mierke, C.T.; Rösel, D.; Veselý, P.; Fabry, B. The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell Commun. Signal.* **2010**, *8*, 22.
12. Mouw, J.K.; Ou, G.; Weaver, V.M. Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 771–785.
13. Sapudom, J.; Pompe, T. Biomimetic tumor microenvironments based on collagen matrices. *Biomater. Sci.* **2018**, *6*, 2009–2024.
14. Kai, F.B.; Drain, A.P.; Weaver, V.M. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. *Dev. Cell* **2019**, *49*, 332–346.
15. Acerbi, I.; Cassereau, L.; Dean, I.; Shi, Q.; Au, A.; Park, C.; Chen, Y.Y.; Liphardt, J.; Hwang, E.S.; Weaver, V.M. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr. Biol.* **2015**, *7*, 1120–1134.
16. Miroshnikova, Y.A.; Rozenberg, G.I.; Cassereau, L.; Pickup, M.; Mouw, J.K.; Ou, G.; Templeman, K.L.; Hannachi, E.-I.; Gooch, K.J.; Sarang-Sieminski, A.L.; et al. $\alpha 5\beta 1$ -Integrin promotes tension-dependent mammary epithelial cell invasion by engaging the fibronectin synergy site. *Mol. Biol. Cell* **2017**, *28*, 2958–2977.
17. Enterline, H.T.; Coman, D.R. The ameboid motility of human and animal neoplastic cells. *Cancer* **1950**, *3*, 1033–1038.
18. Friedl, P.; Gilmour, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 445–57.
19. Friedl, P.; Locker, J.; Sahai, E.; Segall, J.E. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 777–783.
20. Carey, S.P.; Starchenko, A.; McGregor, A.L.; Reinhart-King, C.A. Leading malignant cells initiate collective epithelial cell invasion in a three-dimensional heterotypic tumor spheroid model. *Clin. Exp. Metastasis* **2013**, *30*, 615–630.

21. Labernadie, A.; Kato, T.; Brugués, A.; Serra-Picamal, X.; Derzsi, S.; Arwert, E.; Weston, A.; González-Tarragó, V.; Elosegui-Artola, A.; Albertazzi, L.; et al. A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 224–237.
22. Zhang, J.; Goliwas, K.F.; Wang, W.; Taufalele, P. V.; Bordeleau, F.; Reinhart-King, C.A. Energetic regulation of coordinated leader–follower dynamics during collective invasion of breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116*, 7867–7872.
23. Aceto, N.; Bardia, A.; Miyamoto, D.T.; Donaldson, M.C.; Wittner, B.S.; Spencer, J.A.; Yu, M.; Pely, A.; Engstrom, A.; Zhu, H.; et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* **2014**, *158*, 1110–1122.
24. Cheung, K.J.; Padmanaban, V.; Silvestri, V.; Schipper, K.; Cohen, J.D.; Fairchild, A.N.; Gorin, M.A.; Verdone, J.E.; Pienta, K.J.; Bader, J.S.; et al. Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, E854–E863.
25. Paňková, K.; Rösel, D.; Novotný, M.; Brábek, J. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 63–71.
26. Paterson, E.K.; Courtneidge, S.A. Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *FEBS J.* **2018**, *285*, 8–27.
27. Svitkina, T. The actin cytoskeleton and actin-based motility. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a018267.
28. Ridley, A.J.; Schwartz, M. a; Burridge, K.; Firtel, R. a; Ginsberg, M.H.; Borisy, G.; Parsons, J.T.; Horwitz, A.R. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science (80-.).* **2003**, *302*, 1704–1709.
29. Case, L.B.; Waterman, C.M. Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 955–963.
30. Caswell, P.T.; Zech, T. Actin-Based Cell Protrusion in a 3D Matrix. *Trends Cell Biol.* **2018**, *28*, 823–834.
31. Kosla, J.; Paňková, D.; Plachý, J.; Tolde, O.; Bicanová, K.; Dvořák, M.; Rösel, D.; Brábek, J. Metastasis of aggressive amoeboid sarcoma cells is dependent on Rho/ROCK/MLC signaling. *Cell Commun. Signal.* **2013**, *11*, 51.
32. Fritz-Laylin, L.K.; Lord, S.J.; Mullins, R.D. WASP and SCAR are evolutionarily conserved in actin-filled pseudopod-based motility. *J. Cell Biol.* **2017**, *216*, 1673–1688.
33. Pandya, P.; Orgaz, J.L.; Sanz-Moreno, V. Modes of invasion during tumour dissemination. *Mol. Oncol.* **2017**, *11*, 5–27.
34. Orgaz, J.L.; Pandya, P.; Dalmeida, R.; Karagiannis, P.; Sanchez-Laorden, B.; Viros, A.; Albregues, J.; Nestle, F.O.; Ridley, A.J.; Gaggioli, C.; et al. Diverse matrix metalloproteinase functions regulate cancer amoeboid migration. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4255.
35. O’Neill, P.R.; Castillo-Badillo, J.A.; Meshik, X.; Kalyanaraman, V.; Melgarejo, K.; Gautam, N. Membrane Flow Drives an Adhesion-Independent Amoeboid Cell Migration Mode. *Dev. Cell* **2018**, *46*, 9-22.e4.
36. Tanaka, M.; Kikuchi, T.; Uno, H.; Okita, K.; Kitanishi-Yumura, T.; Yumura, S. Turnover and flow of the cell membrane for cell migration. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–13.
37. Wolf, K.; Te Lindert, M.; Krause, M.; Alexander, S.; Te Riet, J.; Willis, A.L.; Hoffman, R.M.; Figdor, C.G.; Weiss, S.J.; Friedl, P. Physical limits of cell migration: Control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 1069–1084.
38. Harada, T.; Swift, J.; Irianto, J.; Shin, J.W.; Spinler, K.R.; Athirasala, A.; Diegmiller, R.; Dingal, P.C.D.P.; Ivanovska, I.L.; Discher, D.E. Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. *J. Cell Biol.* **2014**, *204*, 669–682.
39. Renkawitz, J.; Kopf, A.; Stopp, J.; de Vries, I.; Driscoll, M.K.; Merrin, J.; Hauschild,

- R.; Welf, E.S.; Danuser, G.; Fiolka, R.; et al. Nuclear positioning facilitates amoeboid migration along the path of least resistance. *Nature* **2019**, *568*, 546–550.
40. Alexandrova, A.Y. Plasticity of tumor cell Migration: acquisition of new properties or return to the Past? *Biochem.* **2014**, *79*, 947–963.
 41. Friedl, P.; Wolf, K. Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* **2010**, *188*, 11–19.
 42. Gandalovičová, A.; Vomastek, T.; Rosel, D.; Brábek, J. Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness. *Oncotarget* **2016**, *7*, 25022–25049.
 43. Petrie, R.J.; Yamada, K.M. Multiple mechanisms of 3D migration: The origins of plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2016**, *42*, 7–12.
 44. Harley, B.A.C.; Kim, H.; Zaman, M.H.; Yannas, I. V; Lauffenburger, D.A.; Gibson, L.J. Microarchitecture of Three-Dimensional Scaffolds Influences Cell Migration Behavior via Junction Interactions. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 4013–4024.
 45. Sapudom, J.; Rubner, S.; Martin, S.; Kurth, T.; Riedel, S.; Mierke, C.T.; Pompe, T. The phenotype of cancer cell invasion controlled by fibril diameter and pore size of 3D collagen networks. *Biomaterials* **2015**, *52*, 367–375.
 46. Najafi, M.; Farhood, B.; Mortezaee, K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 2782–2790.
 47. Ulrich, T.A.; Pardo, E.M.D.J.; Kumar, S. The Mechanical Rigidity of the Extracellular Matrix Regulates the Structure , Motility , and Proliferation of Glioma Cells. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 4167–4174.
 48. Provenzano, P.P.; Inman, D.R.; Eliceiri, K.W.; Trier, S.M.; Keely, P.J. Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 5374–5384.
 49. Angst, B.D.; Marozzi, C.; Magee, A.I. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 629–641.
 50. Hamidi, H.; Ivaska, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 533–548.
 51. Huang, B.; Lu, M.; Jolly, M.K.; Tsarfaty, I.; Onuchic, J.; Ben-Jacob, E. The three-way switch operation of Rac1/RhoA GTPase-based circuit controlling amoeboid-hybrid-mesenchymal transition. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 6449.
 52. Dongre, A.; Weinberg, R.A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 69–84.
 53. Giampieri, S.; Manning, C.; Hooper, S.; Jones, L.; Hill, C.S.; Sahai, E. Localized and reversible TGF β signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 1287–1296.
 54. Wolf, K.; Mazo, I.; Leung, H.; Engelke, K.; von Andrian, U.H.; Deryugina, E.I.; Strongin, A.Y.; Bröcker, E.-B.; Friedl, P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal–amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 267–277.
 55. Ahn, J.; Sanz-Moreno, V.; Marshall, C.J. The metastasis gene NEDD9 product acts through integrin β 3 and Src to promote mesenchymal motility and inhibit amoeboid motility. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 1814–26.
 56. Logue, J.S.; Cartagena-Rivera, A.X.; Chadwick, R.S. c-Src activity is differentially required by cancer cell motility modes. *Oncogene* **2018**, *37*, 2104–2121.
 57. Sahai, E.; Marshall, C.J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 711–719.
 58. Sanz-Moreno, V.; Gadea, G.; Ahn, J.; Paterson, H.; Marra, P.; Pinner, S.; Sahai, E.; Marshall, C.J. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* **2008**, *135*, 510–523.

59. Van Aelst, L.; Cline, H.T. Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004**, *14*, 297–304.
60. Sahai, E.; Garcia-Medina, R.; Pouysségur, J.; Vial, E. Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. *J. Cell Biol.* **2007**, *176*, 35–42.
61. Chikina, A.S.; Rubtsova, S.N.; Lomakina, M.E.; Potashnikova, D.M.; Vorobjev, I.A.; Alexandrova, A.Y. Transition from mesenchymal to bleb-based motility is predominantly exhibited by CD133-positive subpopulation of fibrosarcoma cells. *Biol. Cell* **2019**, *111*, 245–261.
62. Hager, M.H.; Morley, S.; Bielenberg, D.R.; Gao, S.; Morello, M.; Holcomb, I.N.; Liu, W.; Mouneimne, G.; Demichelis, F.; Kim, J.; et al. DIAPH3 governs the cellular transition to the amoeboid tumour phenotype. *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4*, 743–760.
63. Belletti, B.; Nicoloso, M.S.; Schiappacassi, M.; Berton, S.; Lovat, F.; Wolf, K.; Canzonieri, V.; Zucchetto, A.; Friedl, P.; Colombatti, A.; et al. Stathmin Activity Influences Sarcoma Cell Shape, Motility, and Metastatic Potential. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 2003–2013.
64. Liu, Y.-J.; Le Berre, M.; Lautenschlaeger, F.; Maiuri, P.; Callan-Jones, A.; Heuzé, M.; Takaki, T.; Voituriez, R.; Piel, M. Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. *Cell* **2015**, *160*, 659–672.
65. Berton, S.; Belletti, B.; Wolf, K.; Canzonieri, V.; Lovat, F.; Vecchione, A.; Colombatti, A.; Friedl, P.; Baldassarre, G. The Tumor Suppressor Functions of p27kip1 Include Control of the Mesenchymal/Amoeboid Transition. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 5031–5045.
66. Vaškovičová, K.; Szabadosová, E.; Čermák, V.; Gandalovičová, A.; Kasalová, L.; Rösel, D.; Brábek, J. PKC α promotes the mesenchymal to amoeboid transition and increases cancer cell invasiveness. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 326.
67. Hegerfeldt, Y.; Tusch, M.; Bröcker, E.-B.; Friedl, P. Collective Cell Movement in Primary Melanoma Explants: Plasticity of Cell-Cell Interaction, β 1-Integrin Function, and Migration Strategies. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 2125–2130.
68. Lehmann, S.; te Boekhorst, V.; Odenthal, J.; Bianchi, R.; van Helvert, S.; Ikenberg, K.; Ilina, O.; Stoma, S.; Xandry, J.; Jiang, L.; et al. Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells. *Curr. Biol.* **2017**, *27*, 392–400.
69. Sugiyama, N.; Gucciardo, E.; Tatti, O.; Varjosalo, M.; Hyytiäinen, M.; Gstaiger, M.; Lehti, K. EphA2 cleavage by MT1-MMP triggers single cancer cell invasion via homotypic cell repulsion. *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 467–484.
70. Gutschner, T.; Diederichs, S. The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* **2012**, *9*, 703–719.
71. Liu, K.; Gao, L.; Ma, X.; Huang, J.J.; Chen, J.; Zeng, L.; Ashby, C.R.; Zou, C.; Chen, Z.S. Long non-coding RNAs regulate drug resistance in cancer. *Mol. Cancer* **2020**, *19*, 54.
72. Marahrens, Y.; Panning, B.; Dausman, J.; Strauss, W.; Jaenisch, R. Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 156–166.
73. Mohammad, F.; Mondal, T.; Guseva, N.; Pandey, G.K.; Kanduri, C. Kcnq1ot1 noncoding RNA mediates transcriptional gene silencing by interacting with Dnmt1. *Development* **2010**, *137*, 2493–2499.
74. EMBL GENCODE - Human Release Statistics Available online: <https://www.encodegenes.org/human/stats.html> (accessed on Jun 29, 2020).
75. Long non coding RNA cancer - Search Results - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=long+non+coding+RNA+cancer> (accessed on Jul 11, 2020).

76. Jiang, M.-C.; Ni, J.-J.; Cui, W.-Y.; Wang, B.-Y.; Zhuo, W. Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities. *Am. J. Cancer Res.* **2019**, *9*, 1354–1366.
77. Weidle, U.H.; Birzele, F.; Kollmorgen, G.; Rüger, R. Long non-coding RNAs and their role in metastasis. *Cancer Genomics and Proteomics* **2017**, *14*, 143–160.
78. Ji, P.; Diederichs, S.; Wang, W.; Böing, S.; Metzger, R.; Schneider, P.M.; Tidow, N.; Brandt, B.; Buerger, H.; Bulk, E.; et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* **2003**, *22*, 8031–8041.
79. Hutchinson, J.N.; Ensminger, A.W.; Clemson, C.M.; Lynch, C.R.; Lawrence, J.B.; Chess, A. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics* **2007**, *8*, 39.
80. Wilusz, J.E.; Freier, S.M.; Spector, D.L. 3' End Processing of a Long Nuclear-Retained Noncoding RNA Yields a tRNA-like Cytoplasmic RNA. *Cell* **2008**, *135*, 919–932.
81. Brown, J. a; Valenstein, M.L.; Yario, T. a; Tycowski, K.T.; Steitz, J. a Formation of triple-helical structures by the 3'-end sequences of MALAT1 and MEN β noncoding RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 19202–7.
82. Lin, R.; Maeda, S.; Liu, C.; Karin, M.; Edgington, T.S. A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas. *Oncogene* **2007**, *26*, 851–858.
83. Ying, L.; Chen, Q.; Wang, Y.; Zhou, Z.; Huang, Y.; Qiu, F. Upregulated MALAT-1 contributes to bladder cancer cell migration by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 2289–2294.
84. Miyagawa, R.; Tano, K.; Mizuno, R.; Nakamura, Y.; Ijiri, K.; Rakwal, R.; Shibato, J.; Masuo, Y.; Mayeda, A.; Hirose, T.; et al. Identification of cis- and trans-acting factors involved in the localization of MALAT-1 noncoding RNA to nuclear speckles. *RNA* **2012**, *18*, 738–751.
85. Engreitz, J.M.; Sirokman, K.; McDonel, P.; Shishkin, A.A.; Surka, C.; Russell, P.; Grossman, S.R.; Chow, A.Y.; Guttman, M.; Lander, E.S. RNA-RNA Interactions Enable Specific Targeting of Noncoding RNAs to Nascent Pre-mRNAs and Chromatin Sites. *Cell* **2014**, *159*, 188–199.
86. West, J.A.; Davis, C.P.; Sunwoo, H.; Simon, M.D.; Sadreyev, R.I.; Wang, P.I.; Tolstorukov, M.Y.; Kingston, R.E. The Long Noncoding RNAs NEAT1 and MALAT1 Bind Active Chromatin Sites. *Mol. Cell* **2014**, *55*, 791–802.
87. Eißmann, M.; Gutschner, T.; Hämmerle, M.; Günther, S.; Caudron-Herger, M.; Groß, M.; Schirmacher, P.; Rippe, K.; Braun, T.; Zörnig, M.; et al. Loss of the abundant nuclear non-coding RNA MALAT1 is compatible with life and development. *RNA Biol.* **2012**, *9*, 1076–1087.
88. Zhang, B.; Arun, G.; Mao, Y.S.; Lazar, Z.; Hung, G.; Bhattacharjee, G.; Xiao, X.; Booth, C.J.; Wu, J.; Zhang, C.; et al. The lncRNA Malat1 Is Dispensable for Mouse Development but Its Transcription Plays a cis-Regulatory Role in the Adult. *Cell Rep.* **2012**, *2*, 111–123.
89. Nakagawa, S.; Ip, J.Y.; Shioi, G.; Tripathi, V.; Zong, X.; Hirose, T.; Prasanth, K. V Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice. *RNA* **2012**, *18*, 1487–99.
90. Yang, L.; Lin, C.; Liu, W.; Zhang, J.; Ohgi, K.A.; Grinstein, J.D.; Dorrestein, P.C.; Rosenfeld, M.G. NcRNA- and Pc2 Methylation-Dependent Gene Relocation between Nuclear Structures Mediates Gene Activation Programs. *Cell* **2011**, *147*, 773–788.
91. Bernard, D.; Prasanth, K. V; Tripathi, V.; Colasse, S.; Nakamura, T.; Xuan, Z.; Zhang, M.Q.; Sedel, F.; Jourden, L.; Culpier, F.; et al. A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression. *EMBO J.* **2010**, *29*, 3082–3093.
92. Gutschner, T.; Hämmerle, M.; Diederichs, S. MALAT1 - a paradigm for long

- noncoding RNA function in cancer. *J. Mol. Med.* **2013**, *91*, 791–801.
93. Lin, R.; Roychowdhury-Saha, M.; Black, C.; Watt, A.T.; Marcusson, E.G.; Freier, S.M.; Edgington, T.S. Control of RNA processing by a large non-coding RNA over-expressed in carcinomas. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 671–676.
 94. Tripathi, V.; Ellis, J.D.; Shen, Z.; Song, D.Y.; Pan, Q.; Watt, A.T.; Freier, S.M.; Bennett, C.F.; Sharma, A.; Bubulya, P.A.; et al. The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 Regulates Alternative Splicing by Modulating SR Splicing Factor Phosphorylation. *Mol. Cell* **2010**, *39*, 925–938.
 95. Guo, F.; Li, Y.; Liu, Y.; Wang, J.; Li, Y.; Li, G. Inhibition of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in CaSki human cervical cancer cells suppresses cell proliferation and invasion. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **2010**, *42*, 224–229.
 96. Michalik, K.M.; You, X.; Manavski, Y.; Doddaballapur, A.; Zörnig, M.; Braun, T.; John, D.; Ponomareva, Y.; Chen, W.; Uchida, S.; et al. Long Noncoding RNA MALAT1 Regulates Endothelial Cell Function and Vessel Growth. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 1389–1397.
 97. Han, Y.; Wu, Z.; Wu, T.; Huang, Y.; Cheng, Z.; Li, X.; Sun, T.; Xie, X.; Zhou, Y.; Du, Z. Tumor-suppressive function of long noncoding RNA MALAT1 in glioma cells by downregulation of MMP2 and inactivation of ERK/MAPK signaling. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2123.
 98. Kwok, Z.H.; Roche, V.; Chew, X.H.; Fadieieva, A.; Tay, Y. A non-canonical tumor suppressive role for the long non-coding RNA MALAT1 in colon and breast cancers. *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 668–678.
 99. Gutschner, T.; Hämmerle, M.; Eissmann, M.; Hsu, J.; Kim, Y.; Hung, G.; Revenko, A.; Arun, G.; Stenrup, M.; Gross, M.; et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1180–1189.
 100. Schmidt, L.H.; Spieker, T.; Koschmieder, S.; Humberg, J.; Jungen, D.; Bulk, E.; Hascher, A.; Wittmer, D.; Marra, A.; Hillejan, L.; et al. The Long Noncoding MALAT-1 RNA Indicates a Poor Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer and Induces Migration and Tumor Growth. *J. Thorac. Oncol.* **2011**, *6*, 1984–1992.
 101. Huang, J.; Ma, L.; Song, W.; Lu, B.; Huang, Y.; Dong, H.; Ma, X.; Zhu, Z.; Zhou, R. MALAT1 promotes the proliferation and invasion of thyroid cancer cells via regulating the expression of IQGAP1. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 1–7.
 102. Kim, J.; Piao, H.L.; Kim, B.J.; Yao, F.; Han, Z.; Wang, Y.; Xiao, Z.; Siverly, A.N.; Lawhon, S.E.; Ton, B.N.; et al. Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nat. Genet.* **2018**, *50*, 1705–1715.
 103. Yoon, J.-H.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M. Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *34*, 9–14.
 104. Jin, C.; Yan, B.; Lu, Q.; Lin, Y.; Ma, L. The role of MALAT1/miR-1/slug axis on radioresistance in nasopharyngeal carcinoma. *Tumor Biol.* **2015**.
 105. Liu, R.; Li, J.; Lai, Y.; Liao, Y.; Liu, R.; Qiu, W. Hsa-miR-1 suppresses breast cancer development by down-regulating K-ras and long non-coding RNA MALAT1. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *81*, 491–497.
 106. Leucci, E.; Patella, F.; Waage, J.; Holmstrøm, K.; Lindow, M.; Porse, B.; Kauppinen, S.; Lund, A.H. microRNA-9 targets the long non-coding RNA MALAT1 for degradation in the nucleus. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2535.
 107. Tang, Y.; Jin, X.; Xiang, Y.; Chen, Y.; Shen, C.-X.; Zhang, Y.-C.; Li, Y.-G. The lncRNA MALAT1 protects the endothelium against ox-LDL-induced dysfunction via upregulating the expression of the miR-22-3p target genes CXCR2 and AKT. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 3189–96.
 108. Akbari Moqadam, F.; Lange-Turenhout, E.A.M.; Ariës, I.M.; Pieters, R.; den Boer, M.L. MiR-125b, miR-100 and miR-99a co-regulate vincristine resistance in childhood

- acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* **2013**, *37*, 1315–21.
109. Wang, X.; Li, M.; Wang, Z.; Han, S.; Tang, X.; Ge, Y.; Zhou, L.; Zhou, C.; Yuan, Q.; Yang, M. Silencing of Long Noncoding RNA MALAT1 by miR-101 and miR-217 Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 3925–3935.
 110. Liu, S.; Song, L.; Zeng, S.; Zhang, L. MALAT1-miR-124-RBG2 axis is involved in growth and invasion of HR-HPV-positive cervical cancer cells. *Tumour Biol.* **2015**.
 111. Han, Y.; Liu, Y.; Zhang, H.; Wang, T.; Diao, R.; Jiang, Z.; Gui, Y.; Cai, Z. Hsa-miR-125b suppresses bladder cancer development by down-regulating oncogene SIRT7 and oncogenic long non-coding RNA MALAT1. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 3875–3882.
 112. Han, X.; Yang, F.; Cao, H.; Liang, Z. Malat1 regulates serum response factor through miR-133 as a competing endogenous RNA in myogenesis. *FASEB J.* **2015**, *29*, 3054–64.
 113. Lu, H.; He, Y.; Lin, L.; Qi, Z.; Ma, L.; Li, L.; Su, Y. Long non-coding RNA MALAT1 modulates radiosensitivity of HR-HPV+ cervical cancer via sponging miR-145. *Tumor Biol.* **2015**.
 114. Hirata, H.; Hinoda, Y.; Shahryari, V.; Deng, G.; Nakajima, K.; Tabatabai, Z.L.; Ishii, N.; Dahiya, R. Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Aggressive Renal Cell Carcinoma through Ezh2 and Interacts with miR-205. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 1322–31.
 115. Lu, L.; Luo, F.; Liu, Y.; Liu, X.; Shi, L.; Lu, X.; Liu, Q. Posttranscriptional silencing of the lncRNA MALAT1 by miR-217 inhibits the epithelial–mesenchymal transition via enhancer of zeste homolog 2 in the malignant transformation of HBE cells induced by cigarette smoke extract. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2015**, *2*, 1–10.
 116. Čermák, V.; Gandalovičová, A.; Merta, L.; Harant, K.; Rösel, D.; Brábek, J. High-throughput Transcriptomic and Proteomic Profiling of Mesenchymal-Amoeboid Transition in 3D Collagen. *Sci. Data* **2020**, *7*, 160.
 117. Merta, L.; Gandalovičová, A.; Čermák, V.; Dibus, M.; Gutschner, T.; Diederichs, S.; Rösel, D.; Brábek, J. Increased Level of Long Non-Coding RNA MALAT1 Is a Common Feature of Amoeboid Invasion. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 1136.
 118. Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 611–622.
 119. Hellemans, J.; Mortier, G.; De Paepe, A.; Speleman, F.; Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **2007**, *8*, R19.
 120. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, 1–12.
 121. Oliveros, J.C. Venny 2.1. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.
 122. Liao, Y.; Wang, J.; Jaehnig, E.J.; Shi, Z.; Zhang, B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W199–W205.
 123. Perez-Riverol, Y.; Csordas, A.; Bai, J.; Bernal-Llinares, M.; Hewapathirana, S.; Kundu, D.J.; Inuganti, A.; Griss, J.; Mayer, G.; Eisenacher, M.; et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D442–D450.
 124. Čermák, V.; Gandalovičová, A.; Merta, L.; Fučíková, J.; Špišek, R.; Rösel, D.; Brábek, J. RNA-seq of macrophages of amoeboid or mesenchymal migratory phenotype due to specific structure of environment. *Sci. Data* **2018**, *5*, 180198.
 125. Trop-Steinberg, S.; Azar, Y. AP-1 Expression and its Clinical Relevance in Immune Disorders and Cancer. *Am. J. Med. Sci.* **2017**, *353*, 474–483.
 126. Gerashchenko, T.S.; Novikov, N.M.; Krakhmal, N. V.; Zolotaryova, S.Y.; Zavyalova,

- M. V.; Cherdyntseva, N. V.; Denisov, E. V.; Perelmuter, V.M. Markers of Cancer Cell Invasion: Are They Good Enough? *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1092.
127. Van Goethem, E.; Poincloux, R.; Gauffre, F.; Maridonneau-Parini, I.; Le Cabec, V. Matrix Architecture Dictates Three-Dimensional Migration Modes of Human Macrophages: Differential Involvement of Proteases and Podosome-Like Structures. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 1049–1061.
 128. MacKay, J.L.; Kumar, S. Simultaneous and independent tuning of RhoA and Rac1 activity with orthogonally inducible promoters. *Integr. Biol.* **2014**, *6*, 885–894.
 129. Tolde, O.; Gandalovičová, A.; Křížová, A.; Veselý, P.; Chmelík, R.; Rosel, D.; Brábek, J. Quantitative phase imaging unravels new insight into dynamics of mesenchymal and amoeboid cancer cell invasion. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 12020.
 130. Koudelková, L.; Pataki, A.C.; Tolde, O.; Pavlik, V.; Nobis, M.; Gemperle, J.; Anderson, K.; Brábek, J.; Rosel, D. Novel FRET-Based Src Biosensor Reveals Mechanisms of Src Activation and Its Dynamics in Focal Adhesions. *Cell Chem. Biol.* **2019**, *26*, 255–268.e4.
 131. D'Arcy, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43*, 582–592.
 132. Cougoule, C.; Van Goethem, E.; Le Cabec, V.; Lafouresse, F.; Dupré, L.; Mehraj, V.; Mège, J.L.; Lastrucci, C.; Maridonneau-Parini, I. Blood leukocytes and macrophages of various phenotypes have distinct abilities to form podosomes and to migrate in 3D environments. *Eur. J. Cell Biol.* **2012**, *91*, 938–949.
 133. Mills, C.D. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. *Crit. Rev. Immunol.* **2012**, *32*, 463–488.
 134. Tang, Z.; Li, C.; Kang, B.; Gao, G.; Li, C.; Zhang, Z. GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W98–W102.
 135. Sanz-Moreno, V.; Gaggioli, C.; Yeo, M.; Albrengues, J.; Wallberg, F.; Viros, A.; Hooper, S.; Mitter, R.; Féral, C.C.; Cook, M.; et al. ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 229–245.
 136. Taddei, M.L.; Giannoni, E.; Morandi, A.; Ippolito, L.; Ramazzotti, M.; Callari, M.; Gandellini, P.; Chiarugi, P. Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells. *Cell Commun. Signal.* **2014**, *12*.
 137. Stuelten, C.H.; Parent, C.A.; Montell, D.J. Cell motility in cancer invasion and metastasis: Insights from simple model organisms. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 296–312.
 138. Kalliolias, G.D.; Ivashkiv, L.B. Overview of the biology of type I interferons. *Arthritis Res. Ther.* **2010**, *12*, S1.
 139. Ivashkiv, L.B.; Donlin, L.T. Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 36–49.
 140. Matsuyama, W.; Nakagawa, M.; Takashima, H.; Muranaga, F.; Sano, Y.; Osame, M. Molecular analysis of hereditary deficiency of the third component of complement (C3) in two sisters. *Intern. Med.* **2001**, *40*, 1254–1258.
 141. Pissios, P. Nicotinamide N-Methyltransferase: More Than a Vitamin B3 Clearance Enzyme. *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 340–353.
 142. Dukhovny, A.; Lamkiewicz, K.; Chen, Q.; Fricke, M.; Jabrane-Ferrat, N.; Marz, M.; Jung, J.U.; Sklan, E.H. A CRISPR Activation Screen Identifies Genes That Protect against Zika Virus Infection. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00211-19.
 143. Han, H.G.; Moon, H.W.; Jeon, Y.J. ISG15 in cancer: Beyond ubiquitin-like protein. *Cancer Lett.* **2018**, *438*, 52–62.
 144. Fish, I.; Boissinot, S. Functional evolution of the OAS1 viral sensor: Insights from old world primates. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *44*, 341–350.

145. Zhang, Y.; Zhaoyoung, L. STAT1 in Cancer: Friend or Foe? - Ying Zhang - Discovery Medicine. *Discov. Med.* **2017**, *24*, 19–29.
146. Ho, H.H.; Ivashkiv, L.B. Role of STAT3 in type I interferon responses: Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 14111–14118.
147. Fang, Y.; Zhong, L.; Lin, M.; Zhou, X.; Jing, H.; Ying, M.; Luo, P.; Yang, B.; He, Q. MEK/ERK Dependent Activation of STAT1 Mediates Dasatinib-Induced Differentiation of Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One* **2013**, *8*, e66915.
148. Putoczki, T.; Ernst, M. More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. *J. Leukoc. Biol.* **2010**, *88*, 1109–1117.
149. Luo, Y.; Zheng, S.G. Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: Interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 604.
150. Ouyang, W.; Rutz, S.; Crellin, N.K.; Valdez, P.A.; Hymowitz, S.G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **2011**, *29*, 71–109.
151. Epifano, C.; Megias, D.; Perez-Moreno, M. P120-catenin differentially regulates cell migration by Rho-dependent intracellular and secreted signals. *EMBO Rep.* **2014**, *15*, 592–600.
152. Litvak, V.; Ramsey, S.A.; Rust, A.G.; Zak, D.E.; Kennedy, K.A.; Lampano, A.E.; Nykter, M.; Shmulevich, I.; Aderem, A. Function of C/EBP δ in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 437–443.
153. Huggins, C.J.; Malik, R.; Lee, S.; Salotti, J.; Thomas, S.; Martin, N.; Quiñones, O.A.; Alvord, W.G.; Olanich, M.E.; Keller, J.R.; et al. C/EBP γ Suppresses Senescence and Inflammatory Gene Expression by Heterodimerizing with C/EBP β . *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 3242–3258.
154. Belguise, K.; Kersual, N.; Galtier, F.; Chalbos, D. FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene* **2005**, *24*, 1434–1444.
155. Maurus, K.; Hufnagel, A.; Geiger, F.; Graf, S.; Berking, C.; Heinemann, A.; Paschen, A.; Kneitz, S.; Stigloher, C.; Geissinger, E.; et al. The AP-1 transcription factor FOSL1 causes melanocyte reprogramming and transformation. *Oncogene* **2017**, *36*, 5110–5121.
156. Denais, C.M.; Gilbert, R.M.; Isermann, P.; McGregor, A.L.; Te Lindert, M.; Weigelin, B.; Davidson, P.M.; Friedl, P.; Wolf, K.; Lammerding, J. Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science (80-.)*. **2016**, *352*, 353–358.
157. Nerlov, C. The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol.* **2007**, *17*, 318–324.
158. Evensen, N.A.; Li, Y.; Kuscu, C.; Liu, J.; Cathcart, J.; Banach, A.; Zhang, Q.; Li, E.; Joshi, S.; Yang, J.; et al. Hypoxia promotes colon cancer dissemination through up-regulation of cell migration-inducing protein (CEMIP). *Oncotarget* **2015**, *6*, 20723–20739.
159. Kölling, M.; Genschel, C.; Kaucsar, T.; Hübner, A.; Rong, S.; Schmitt, R.; Sörensen-Zender, I.; Haddad, G.; Kistler, A.; Seeger, H.; et al. Hypoxia-induced long non-coding RNA Malat1 is dispensable for renal ischemia/reperfusion-injury. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3438.
160. Cai, X.; Liu, Y.; Yang, W.; Xia, Y.; Yang, C.; Yang, S.; Liu, X. Long noncoding RNA MALAT1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma. *J. Orthop. Res.* **2016**, *34*, 932–941.
161. Puthanveetil, P.; Chen, S.; Feng, B.; Gautam, A.; Chakrabarti, S. Long non-coding RNA MALAT1 regulates hyperglycaemia induced inflammatory process in the endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* **2015**.

162. Gutschner, T.; Baas, M.; Diederichs, S. Noncoding RNA gene silencing through genomic integration of RNA destabilizing elements using zinc finger nucleases. *Genome Res.* **2011**, *21*, 1944–1954.
163. Sharma, N.R.; Wang, X.; Majerciak, V.; Ajiro, M.; Kruhlak, M.; Meyers, C.; Zheng, Z.M. Cell type- and tissue contextdependent nuclear distribution of human Ago2. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 2302–2309.
164. Sun, Y.; Ma, L. New Insights into Long Non-Coding RNA MALAT1 in Cancer and Metastasis. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*, 216.
165. Arun, G.; Diermeier, S.; Akerman, M.; Chang, K.-C.; Wilkinson, J.E.; Hearn, S.; Kim, Y.; MacLeod, A.R.; Krainer, A.R.; Norton, L.; et al. Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 LncRNA loss. *Genes Dev.* **2016**, *30*, 34–51.
166. Yin, Y.; Yan, P.; Lu, J.; Song, G.; Zhu, Y.; Li, Z.; Zhao, Y.; Shen, B.; Huang, X.; Zhu, H.; et al. Opposing roles for the lncRNA haunt and its genomic locus in regulating HOXA gene activation during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* **2015**, *16*, 504–516.
167. Zhou, H.-J.; Wang, L.-Q.; Wang, D.-B.; Yu, J.-B.; Zhu, Y.; Xu, Q.-S.; Zheng, X.-J.; Zhan, R.-Y. Long noncoding RNA MALAT1 contributes to inflammatory response of microglia following spinal cord injury via the modulation of a miR-199b/IKK β /NF- κ B signaling pathway. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2018**, *315*, C52–C61.
168. Li, J.; Wei, L.; Han, Z.; Chen, Z.; Zhang, Q. Silencing of Long Non-Coding RNA MALAT1 Prevents Inflammatory Injury after Lung Transplant Ischemia-Reperfusion by Downregulation of IL8 through Recruiting p300. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *18*, 285–297.
169. Georgouli, M.; Herraiz, C.; Crosas-Molist, E.; Fanshawe, B.; Maiques, O.; Perdrix, A.; Pandya, P.; Rodriguez-Hernandez, I.; Ilieva, K.M.; Cantelli, G.; et al. Regional Activation of Myosin II in Cancer Cells Drives Tumor Progression via a Secretory Cross-Talk with the Immune Microenvironment. *Cell* **2019**, *176*, 757–774.
170. Tang, Y.; He, Y.; Zhang, P.; Wang, J.; Fan, C.; Yang, L.; Xiong, F.; Zhang, S.; Gong, Z.; Nie, S.; et al. LncRNAs regulate the cytoskeleton and related Rho/ROCK signaling in cancer metastasis. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 77.

9. Přílohy

Seznam příloh:

- Příloha č. 1 – Spoluautorská publikace
- Příloha č. 2 – Ko-prvoautorská publikace
- Příloha č. 3 – Prvoautorská publikace
- Příloha č. 4 – Primery použité v RT-qPCR experimentech
- Příloha č. 5 – Geny se zvýšenou/sníženou expresí v buňkách podstupujících mezenchymálně-améboidní přechod