

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie**

Molekulární a buněčná biologie, genetiky a virologie

Autoreferát disertační práce



**Od hledání nových onkogenů k pokusu předefinovat fenomén  
kancerogeneze**

**Petr Pajer**

Školitel: RNDr. Michal Dvořák, CSc.

Ústav Molekulární Genetiky

Akademie Věd České republiky

Praha, březen 2012



16. Bartunek, P., **P. Pajér**, V. Karafiat, G. Blendinger, M. Dvorak, and M. Zenke, *bFGF signaling and v-Myb cooperate in sustained growth of primitive erythroid progenitors*. *Oncogene*, 2002. **21**(3): p. 400-10.
17. Karafiat, V., M. Dvorakova, **P. Pajér**, J. Kralova, Z. Horejsi, V. Cermak, P. Bartunek, M. Zenke, and M. Dvorak, *The leucine zipper region of Myb oncoprotein regulates the commitment of hematopoietic progenitors*. *Blood*, 2001. **98**(13): p. 3668-76.
18. Heikenwalder, M.F., N.P. Koritschoner, **P. Pajér**, M.C. Chaboissier, S.M. Kurz, K.J. Briegel, P. Bartunek, and M. Zenke, *Molecular cloning, expression and regulation of the avian tubby-like protein 1 (tulp1) gene*. *Gene*, 2001. **273**(1): p. 131-9.
19. **Pajér, P.**, J. Riman, and M. Dvorak, *The "small" polydisperse cytoplasmic extrachromosomal DNA of chicken leukaemic myeloblasts and the avian myeloblastosis virus core-bound DNA seem to descend from origin regions of chromosomal DNA replication*. *Acta Virol*, 1999. **43**(1): p. 5-18.
20. Kaspar, P., M. Dvorakova, J. Kralova, **P. Pajér**, Z. Kozmik, and M. Dvorak, *Myb-interacting protein, ATBF1, represses transcriptional activity of Myb oncoprotein*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(20): p. 14422-8.

## 1. Úvod

Koncept využití transposonů a jimi vyvolané inzerční mutagenese pro identifikaci genů spojených s určitým fenotypem se objevil již počátkem 80. let 20. století. Přírozeným a efektivním využitím této experimentální strategie bylo studium genetického základu tumorigeneze za použití retrovirů, jejichž unikátní vlastnosti stály u revolučních objevů na poli onkogeneze. Retroviry mohou vyvolávat vznik nádorů dvěma způsoby. Akutně, přímou transdukcí onkogenů (tj. mutantních forem normálních hostitelských genů s onkogenním potenciálem) nebo latentně, inzerční mutagenézí (tj. inzercí svého provirového genomu do genomu hostitele, což způsobí onkogenní aktivaci postiženého genu).

Akutně transformující retroviry aktivně přenášejí onkogeny a jsou tedy ideálním nástrojem pro detailní studium funkcí jednotlivých onkogenů. Oproti tomu jejich latentní protějšky svojí integrací do hostitelského genomu mimikují somatickou mutace. Pokud následkem provirové integrace dojde k onkogenní aktivaci postiženého genu, hostitelská buňka začne proliferovat a vzniká makroskopický klonální nádor (klonální selekci). Latentně onkogenní retroviry tak zároveň svojí přítomností v klonálně expandovaných populacích buněk označují v hostitelském genomu nové onkogenní lokusy a jsou proto účinným nástrojem jejich *de novo* identifikace.

Rozvoj molekulárně biologických technik umožnil identifikaci jednotlivých klonálních míst integrace provirových sekvencí (VIS) paralelně v mnoha nádorových vzorcích. Pokud je integrován provirus opakovaně nalézán ve stejném genomovém lokusu, je tento lokus nazýván obecné místo provirové integrace (CIS) a jeho mutace nebo postižení přilehlého genu je velmi pravděpodobně zodpovědné za formování zkoumaného nádoru. Identifikace obecných míst

provirové integrace je tedy prvním krokem při hledání nových onkogenů a onkogenních lokusů.

## 2. Cíle práce

Cílem práce bylo vysvětlit obecné důvody a příčiny nádorové transformace buňky. Jako nástroj jsme zvolili identifikování a mapování obecných míst provirové integrace v kuřecích modelových nádorech, vyvolávaných inzerční mutagenezí retrovirem ptačí myeloblastózy 2 (MAV-2).

V první fázi jsme shromáždili vzorky kuřecích nádorů indukovaných retrovirovou integrací do hostitelského genomu (ledvinné, plicní, jaterní) a ověřovali jejich buněčnou klonalitu a histologické charakteristiky. Ve druhé fázi jsme hledali obecná místa provirových integrací a identifikovali kandidátní geny, jejichž deregulace/mutace je zodpovědná za transformaci postižené hostitelské buňky. U vytipovaných genů jsme ověřovali změny v expresi jejich mRNA, případně proteinu.

- integration sites in avian nephroblastoma*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 78-86.
10. Matouskova, M., J. Blazkova, **P. Pajér**, A. Pavlicek, and J. Hejnar, *CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues*. Exp Cell Res, 2006. **312**(7): p. 1011-20.
  11. Pekova, S., J. Markova, **P. Pajér**, M. Dvorak, P. Cetkovsky, and J. Schwarz, *Touch-down reverse transcriptase-PCR detection of IgV(H) rearrangement and Sybr-Green-based real-time RT-PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Mol Diagn, 2005. **9**(1): p. 23-34.
  12. Kaspar, P., **P. Pajér**, D. Sedlak, T. Tamaoki, and M. Dvorak, *c-Myb inhibits myogenic differentiation through repression of MyoD*. Exp Cell Res, 2005. **309**(2): p. 419-28.
  13. Karafiat, V., M. Dvorakova, E. Krejci, J. Kralova, **P. Pajér**, P. Snajdr, S. Mandikova, P. Bartunek, M. Grim, and M. Dvorak, *Transcription factor c-Myb is involved in the regulation of the epithelial-mesenchymal transition in the avian neural crest*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(21): p. 2516-25.
  14. Elleder, D., V. Stepanets, D.C. Melder, F. Senigl, J. Geryk, **P. Pajér**, J. Plachy, J. Hejnar, J. Svoboda, and M.J. Federspiel, *The receptor for the subgroup C avian sarcoma and leukosis viruses, Tvc, is related to mammalian butyrophilins, members of the immunoglobulin superfamily*. J Virol, 2005. **79**(16): p. 10408-19.
  15. **Pajér, P.**, V. Pecenka, V. Karafiat, J. Kralova, Z. Horejsi, and M. Dvorak, *The twist gene is a common target of retroviral integration and transcriptional deregulation in experimental nephroblastoma*. Oncogene, 2003. **22**(5): p. 665-73.

2. Pecenka V., **P. Pajér**, V. Karafiat, and M. Dvorak, *Chicken Models of Retroviral Insertional Mutagenesis*. In: Dupuy AJ, D.A. L, eds. Insertional Mutagenesis Strategies in Cancer Genetics. New York: Springer, 2011; 77-112.
3. Zikova, M., A. Corlett, Z. Bendova, **P. Pajér**, and P. Bartunek, *DISP3, a sterol-sensing domain-containing protein that links thyroid hormone action and cholesterol metabolism*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(4): p. 520-8.
4. **Pajér, P.**, V. Karafiat, V. Pecenka, D. Prukova, J. Dudlova, J. Plachy, P. Kasparova, and M. Dvorak, *Industasis, a promotion of tumor formation by nontumorigenic stray cells*. Cancer Res, 2009. **69**(11): p. 4605-12.
5. Kucera, A., R. Skaba, R. Spisek, **P. Pajér**, and M. Cervinkova, [*Experimental tumor therapy using intratumoral injection of dendritic cells*]. Rozhl Chir, 2009. **88**(7): p. 368-72.
6. Kucera, A., K. Pycha, **P. Pajér**, R. Spisek, and R. Skaba, *Dendritic cell-based immunotherapy induces transient clinical response in advanced rat fibrosarcoma - comparison with preventive anti-tumour vaccination*. Folia Biol (Praha), 2009. **55**(4): p. 119-25.
7. Bartunek, P., V. Karafiat, J. Bartunkova, **P. Pajér**, M. Dvorakova, J. Kralova, M. Zenke, and M. Dvorak, *Impact of chicken thrombopoietin and its receptor c-Mpl on hematopoietic cell development*. Exp Hematol, 2008. **36**(4): p. 495-505.
8. Karafiat, V., M. Dvorakova, **P. Pajér**, V. Cermak, and M. Dvorak, *Melanocyte fate in neural crest is triggered by Myb proteins through activation of c-kit*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(22): p. 2975-84.
9. **Pajér, P.**, V. Pecenka, J. Kralova, V. Karafiat, D. Prukova, Z. Zemanova, R. Kodet, and M. Dvorak, *Identification of potential human oncogenes by mapping the common viral*

### 3. Materiál a metodika

V práci jsme použili materiál jak z inbredních kuřat (White leghorn CB, CC), tak i z outbrední linie (Brown leghorn) pro minimalizaci efektů genetické predispozice. K infekci byl použit retrovirus MAV-2(N), který byl do pokusných zvířat injikován buď ve 12 dni embryonálního vývoje (E12) nebo první den po vylíhnutí (K1). Nádorové vzorky byly odebrány při pitvě 25 - 110 dní po infekci a byly zpracovány na DNA, RNA a fixovány v paraformaldehydu. Vybrané nádorové vzorky byly experimentálně kultivovány *in vitro*.

Místa klonálních integrací provirové DNA byla identifikována metodami inverzního PCR (iPCR, výchozí materiálem byla genomová DNA nádorové tkáně) a LTR RACE (výchozím materiálem byla celková RNA z nádorové tkáně). Jednotlivá VIS byla mapována v kuřecím genomu pomocí algoritmu BLAST a z nich vytipovány kandidátní CIS a odpovídající kandidátní onkogeny. Deregulace těchto kandidátních onkogenů byla studována pomocí hybridizace Northern blotů, RT PCR a imunohistochemicky.

### 4. Výsledky a diskuse

Zjistili jsme, že kuřecí nádory indukované inzerční mutagenezí retrovirem MAV-2 v různých tkáních jsou molekulárně i histologicky odlišného původu. Pokud je experimentální zvíře postiženo vícečetnými lézemi, nejedná se o metastáze.

Identifikovali a mapovali jsme obecná místa integrace a kandidátní geny v nefroblastomech (ledvinné nádory embryonálního typu) a

ukázali jejich histologickou podobnost s lidským Wilmsovým tumorem avšak jejich výrazně odlišné spektrum mutovaných genů.

Popsali jsme plicní angiosarkom, jehož vzorky nesou téměř uniformě integrovaný MAV-2 provirus v lokusu kódujícím kinázu *frk*, jejíž role v lidské onkogenezi nebyla dosud prozkoumána. Zkoumání vzniku kuřecích angiosarkomů vedlo k objevu promotivního působení volných buněk v krevním řečišti hostitele - zcela nový fenomén, který jsme nazvali *industáze*.

Analyzovali jsme jaterní nádory, histologicky rozlišitelné na kuřecí obdoby lidských hepatocelulárních karcinomů, cholangiokarcinomů a angiosarkomů. Tyto nádory jsou nečekaně podobné jak histologicky, tak molekulárně svým spontánně vzniklým lidským protějškům nebo myším experimentálním modelům.

Nečekaným objevem bylo mapování obecného místa integrace v buňkách tkáňových kultur odvozených od jednotlivých nádorů nebo infekcí primárních kuřecích buněk *in vitro*. Zhruba v polovině zkoumaných kultur neodpovídal „pattern“ vestavěných provirů původnímu nádorovému izolátu. Naopak tyto kultury sdílely CIS, které se nevyskytuje v nádorech *in vivo*. Popsali jsme tak velmi silnou selekci probíhající *in vitro* ve tkáňových kulturách. Tento výsledek představuje silné varování k obezřetnosti při kultivaci buněk *in vitro*.

Současně jsme se také věnovali mapování struktury a přestavěb MAV-2 provirů, integrovaných v jednotlivých CIS lokusech. Tyto experimenty potvrdily takřka exkluzivní přítomnost přestavěných provirů v kandidátních CIS lokusech. Toto zjištění představuje dobrou indicii pro analýzy nádorů vzniklých inzerční mutagenezí, zvláště v případě vzácně se vyskytujících vzorků, kterých není dostatek pro statistickou analýzu.

## 5. Závěry

Zvolený experimentální model se ukázal jako velmi cenný a bohatý zdroj informací o procesu transformace normální buňky v buňku nádorovou v důsledku inzerční mutageneze. V souhrnu bylo mapováno více než 2000 individuálních klonálních VIS z několika set nádorových vzorků. Bylo molekulárně analyzováno 5 tkáňově a histologicky odlišných nádorových typů a od nich odvozených tkáňových kultur. Při studiu byl objeven a popsán fenomén *industáze*.

Hlavním cílem této práce však bylo pochopit obecné důvody a příčiny nádorové transformace buňky. Výsledky studia vedly autora k poněkud paradoxnímu tvrzení, že význam genetických změn v transformované buňce je přeceňován. Přestože popisování funkce jednotlivých genů, hledání nádorových markerů a molekulárních cílů pro terapii je stále velmi přínosné, domnívá se, že tradiční představa vzniku nádoru jako funkce hromadění mutací a jejich selekce je v současnosti významnou brzdou dalšího výzkumu. Úvahy na toto téma jsou shrnuty v závěrečné části předkládané disertační práce.

### Seznam publikací autora:

1. Pecenka, V., V. Karafiát, P. Kasparová, J. Dudlova, M. Dvorak, and **P. Pajer**, *Distinct cancer genes are activated in different liver tumor types in a new chicken model of liver cancerogenesis*. submitted 03-2012

**Charles University in Prague, Faculty of Science**  
**Department of Molecular Biology**

Molecular and cellular biology, genetics and virology

Summary of the Ph.D. Thesis



**From the search for new oncogenes to the effort of redefining  
the cancerogenesis phenomenon**

**Petr Pajer**

Supervisor: RNDr. Michal Dvořák, CSc.

Institute of Molecular Genetics

Academy of Science CR

Prague, March 2012





- butyrophilins, members of the immunoglobulin superfamily.* J Virol, 2005. **79**(16): p. 10408-19.
15. **Pajer, P.**, V. Pecenka, V. Karafiat, J. Kralova, Z. Horejsi, and M. Dvorak, *The twist gene is a common target of retroviral integration and transcriptional deregulation in experimental nephroblastoma.* Oncogene, 2003. **22**(5): p. 665-73.
16. Bartunek, P., **P. Pajer**, V. Karafiat, G. Blendinger, M. Dvorak, and M. Zenke, *bFGF signaling and v-Myb cooperate in sustained growth of primitive erythroid progenitors.* Oncogene, 2002. **21**(3): p. 400-10.
17. Karafiat, V., M. Dvorakova, **P. Pajer**, J. Kralova, Z. Horejsi, V. Cermak, P. Bartunek, M. Zenke, and M. Dvorak, *The leucine zipper region of Myb oncoprotein regulates the commitment of hematopoietic progenitors.* Blood, 2001. **98**(13): p. 3668-76.
18. Heikenwalder, M.F., N.P. Koritschoner, **P. Pajer**, M.C. Chaboissier, S.M. Kurz, K.J. Briegel, P. Bartunek, and M. Zenke, *Molecular cloning, expression and regulation of the avian tubby-like protein 1 (tulp1) gene.* Gene, 2001. **273**(1): p. 131-9.
19. **Pajer, P.**, J. Riman, and M. Dvorak, *The "small" polydisperse cytoplasmic extrachromosomal DNA of chicken leukaemic myeloblasts and the avian myeloblastosis virus core-bound DNA seem to descend from origin regions of chromosomal DNA replication.* Acta Virol, 1999. **43**(1): p. 5-18.
20. Kaspar, P., M. Dvorakova, J. Kralova, **P. Pajer**, Z. Kozmik, and M. Dvorak, *Myb-interacting protein, ATBF1, represses transcriptional activity of Myb oncoprotein.* J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14422-8.

## 1. Introduction

The concept of identification of genes responsible for a specific phenotype based on the transposon insertional mutagenesis was developed at the beginning of the 1980s. The use of retroviruses with their unique properties was a simple and effective tool behind many revolutionary discoveries in the field of oncogenesis. Retroviruses could induce tumorigenesis by two mechanisms – acute, through the direct transduction of oncogenes (i.e. mutant forms of normal host genes with oncogenic potential) or latent, through the insertional mutagenesis (i.e. by insertion of their own proviral genome into the host genome inducing oncogenic activation of the affected gene).

Acute transforming retroviruses represent an ideal tool for detailed study of the functions of individual oncogenes as they transduce them directly. In contrast, their latent counterparts mimic somatic mutagenesis through their almost random integrations into the host genome. The affected cell starts to proliferate in those cases where proviral integration leads to oncogenic activation of the affected protooncogene and subsequent formation of macroscopic clonal tumor (through clonal selection). Latent oncogenic retroviruses label oncogenic loci with their proviral genomes in clonally expanded cellular populations, and therefore prove to be an effective tool for identification of new oncogenes.

Parallel identification of individual proviral integration sites (VISs) in many tumor samples has been enabled by the recent advances in molecular biological techniques.

The genomic loci with recurrent presence of clonally integrated provirus in independent samples are called common sites of proviral integrations (CISs). Mutations in CISs or deregulation of the adjacent gene(s) are likely to contribute to the formation of the respective tumor. Thus, identification of novel CISs makes the first step on the way to find novel oncogenes and oncogenic loci.

## 2. Aims of the study

The aim of the study was to reveal causes of and reasons for neoplastic transformation of the cell. We have decided to identify and map the CISs in the chicken model tumors induced by insertional mutagenesis using myeloblastosis-associated retrovirus 2 (MAV-2).

We first collected and characterized chicken tumor samples. These were tumors of kidney, lungs and liver. We verified their clonality and determined their histopathological characteristics. Subsequently, we mapped individual VISs and searched for CISs and candidate tumor-associated genes whose deregulation should be responsible for the oncogenic transformation of the host cell. We measured the changes in expression (mRNA or proteins) of the selected genes.

8. Karafiat, V., M. Dvorakova, **P. Pajer**, V. Cermak, and M. Dvorak, *Melanocyte fate in neural crest is triggered by Myb proteins through activation of c-kit*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(22): p. 2975-84.
9. **Pajer, P.**, V. Pecenka, J. Kralova, V. Karafiat, D. Prukova, Z. Zemanova, R. Kodet, and M. Dvorak, *Identification of potential human oncogenes by mapping the common viral integration sites in avian nephroblastoma*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 78-86.
10. Matouskova, M., J. Blazkova, **P. Pajer**, A. Pavlicek, and J. Hejnar, *CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues*. Exp Cell Res, 2006. **312**(7): p. 1011-20.
11. Pekova, S., J. Markova, **P. Pajer**, M. Dvorak, P. Cetkovsky, and J. Schwarz, *Touch-down reverse transcriptase-PCR detection of IgV(H) rearrangement and Sybr-Green-based real-time RT-PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Mol Diagn, 2005. **9**(1): p. 23-34.
12. Kaspar, P., **P. Pajer**, D. Sedlak, T. Tamaoki, and M. Dvorak, *c-Myb inhibits myogenic differentiation through repression of MyoD*. Exp Cell Res, 2005. **309**(2): p. 419-28.
13. Karafiat, V., M. Dvorakova, E. Krejci, J. Kralova, **P. Pajer**, P. Snajdr, S. Mandikova, P. Bartunek, M. Grim, and M. Dvorak, *Transcription factor c-Myb is involved in the regulation of the epithelial-mesenchymal transition in the avian neural crest*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(21): p. 2516-25.
14. Elleder, D., V. Stepanets, D.C. Melder, F. Senigl, J. Geryk, **P. Pajer**, J. Plachy, J. Hejnar, J. Svoboda, and M.J. Federspiel, *The receptor for the subgroup C avian sarcoma and leukosis viruses, Tvc, is related to mammalian*

### **Selected publications:**

1. Pecenka, V., V. Karafiát, P. Kasparová, J. Dudlova, M. Dvorak, and **P. Pajer**, *Distinct cancer genes are activated in different liver tumor types in a new chicken model of liver cancerogenesis*. submitted 03-2012
2. Pecenka V., **P. Pajer**, V. Karafiát, and M. Dvorak, *Chicken Models of Retroviral Insertional Mutagenesis*. In: Dupuy AJ, D.A. L, eds. Insertional Mutagenesis Strategies in Cancer Genetics. New York: Springer, 2011; 77-112.
3. Zikova, M., A. Corlett, Z. Bendova, **P. Pajer**, and P. Bartunek, *DISP3, a sterol-sensing domain-containing protein that links thyroid hormone action and cholesterol metabolism*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(4): p. 520-8.
4. **Pajer, P.**, V. Karafiát, V. Pecenka, D. Prukova, J. Dudlova, J. Plachy, P. Kasparova, and M. Dvorak, *Industasis, a promotion of tumor formation by nontumorigenic stray cells*. Cancer Res, 2009. **69**(11): p. 4605-12.
5. Kucera, A., R. Skaba, R. Spisek, **P. Pajer**, and M. Cervinkova, [*Experimental tumor therapy using intratumoral injection of dendritic cells*]. Rozhl Chir, 2009. **88**(7): p. 368-72.
6. Kucera, A., K. Pycha, **P. Pajer**, R. Spisek, and R. Skaba, *Dendritic cell-based immunotherapy induces transient clinical response in advanced rat fibrosarcoma - comparison with preventive anti-tumour vaccination*. Folia Biol (Praha), 2009. **55**(4): p. 119-25.
7. Bartunek, P., V. Karafiát, J. Bartunkova, **P. Pajer**, M. Dvorakova, J. Kralova, M. Zenke, and M. Dvorak, *Impact of chicken thrombopoietin and its receptor c-Mpl on hematopoietic cell development*. Exp Hematol, 2008. **36**(4): p. 495-505.

### **3. Material and methods**

We worked with both inbred (White leghorn CB, CC) and outbred (Brown leghorn) chickens to avoid the risk of bias due to genetic predisposition. Retroviral infections were accomplished with MAV-2(N) injected either on 12<sup>th</sup> embryonic day (E12) or on 1<sup>st</sup> day after hatching (K1). Experimental animals were sacrificed at the age ranging between 25 and 110 days and tissue samples were collected. Tumor samples were processed to isolate DNA or RNA, or fixed in paraformaldehyde. Selected samples were cultivated *in vitro*.

Individual clonal sites of proviral integrations in the chicken genome were identified by two methods – inverse PCR (iPCR, starting with the host genomic DNA) and LTR RACE (starting with the host total RNA). Individual VISs were localized to the chicken genome using the BLAST algorithm and the collected information was used to reveal candidate CISs and respective candidate oncogenes. Deregulations of candidate genes were studied through Northern blot hybridization, RT PCR and immunohistochemistry.

### **4. Results and discussion**

We have found that chicken tumors induced in different tissues by insertional mutagenesis using MAV-2 retrovirus are distinct histologically as well as molecularly. In case of multiple tumors detected in the experimental animals, these were not metastases.

We have identified and mapped CISs and candidate genes in nephroblastomas (renal tumors of embryonic origin). We have

shown histological similarity between chicken and human nephroblastoma and also unexpectedly different spectrum of mutated genes.

We have described histological and molecular characteristics of lung angiosarcomas harboring integrated MAV-2 provirus almost exclusively in the locus coding for *frk* kinase. The role of this gene in human oncogenesis has not yet been investigated. Furthermore, investigation of the promotional effect of free cells injected into the bloodstream of experimental animals led us to the description of a brand-new phenomenon – *industasis*.

We have further analyzed liver tumors and divided them histologically into hepatocellular carcinomas, cholangiocarcinomas and angiosarcomas. These tumors were similar to their human counterparts and mouse models regarding the histology as well as the spectrum of mutated genes.

Mapping the VISs in *in vitro* tissue cultures (established either from individual tumors or by the MAV-2 infection of primary chicken cells *in vitro*) led to an unexpected observation. A significant portion of these cultures displayed a different pattern of VISs than their parental counterpart. Furthermore, approximately one half of *in vitro* cultures harbored MAV-2 provirus integrated into the *sox6* gene – an abnormally broad CIS. This gene codes for a transcription factor and it has never been found hit in the tumor samples *in vivo*. Thus we have described a robust, fast and spontaneous selection process *in vitro* during cell cultivation in tissue culture. These results suggest caution while cultivating cells *in vitro*.

Finally, we mapped the structure of MAV-2 proviruses integrated within individual CIS loci. These experiments confirmed the almost exclusive presence of defective proviruses in the identified CIS loci. This observation could be useful for analyses of other tumors

induced by insertional mutagenesis, especially those whose rare occurrence excludes statistical analysis.

## 5. Conclusions

The described experimental model proved to be a valid and rich source of information describing the process of transformation of normal into tumor cell as a result of insertional mutagenesis. We have mapped more than 2000 individual clonal VISs from several hundreds of tumor tissue samples. We have analyzed five tumor types of different histology and tissue of origin along with their derivative tissue cultures. Furthermore, we have discovered the *industasis* phenomenon and described it during the course of the study.

The goal of my study was to uncover common reasons for neoplastic transformation of the cell. The results of my study led me to the paradoxical conclusion that the significance of genetic changes as the primary cause of induction of neoplastic transformation is being overestimated. Although studying the functions of individual genes and search for new tumor markers and therapeutic targets are still beneficial, I believe that the traditional perception of tumor formation as a function/result of mutation accumulation and selection is becoming a serious drawback in further investigations. These conclusions are further discussed in the last section of the presented Ph.D. thesis.