

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Bc. Lenka Vágnerová**

Využití testu CAM pro charakterizaci  
a studium invazivních vlastností rakovinných buněk

The use of CAM assay for characterization and study of cancer cell invasive properties

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Michal Dvořák, CSc.

Praha, 2011

### **Prohlášení**

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

V Praze, 28.8.2011

## **Poděkování**

Děkuji všem, kteří se podíleli na přípravě a realizaci této práce. Především svému školiteli RNDr. Michalu Dvořákovi, CSc. za všestrannou péči a ochotu, s jakou se věnoval mému vedení, dále Mgr. Janu Koslovi za zasvěcení do metod molekulární biologie, za jeho pomoc a rady, RNDr. Vítu Karafiátovi za pomoc při práci se živými zvířaty a pracovníkům Fingerlandova ústavu patologie v Hradci Králové za přípravu histologických preparátů. V neposlední řadě děkuji všem členům naší skupiny za milé a přátelské prostředí při práci.

## **Abstrakt**

Kuřecí chorioalantoidální membrána (CAM) je jedním z nejčastěji využívaných *in vivo* modelových systémů pro studium angiogeneze a buněčné invazivity. V rámci této práce byly na CAM testovány vybrané kuřecí sarkomové linie zkoumané v naší laboratoři, u nichž došlo ke změně angiogenních vlastností a schopnosti tvořit metastázy. Kromě CAM testu byl fenotyp těchto buněk charakterizován pomocí několika dalších metod. Vytipovali jsme několik proteinů, které by u zkoumaných buněk mohly ovlivnit změnu jejich angiogenních a invazivních vlastností, a vytvořili jsme stabilně transfekované buněčné linie, které jsme porovnávali s původními buňkami. Prokázali jsme, že geny kódující proteiny ISL1, ARNT2, PROM1, HOXA11 se v našem experimentálním modelu podílejí na aktivaci programů angiogeneze a buněčné invazivity.

**Klíčová slova:** kuřecí chorioalantoidální membrána, CAM test, angiogeneze, invazivita, metastáza, ISL1, ARNT2, PROM1, HOXA11

## **Abstract**

The chorioallantoic membrane (CAM) of chicken embryos belongs to the *in vivo* model systems frequently used for the study of angiogenesis and cell invasiveness. Using CAM assay we have tested selected chicken sarcoma cell lines characterized by different angiogenic properties and different ability to form metastasis. In addition to CAM assay, several other methods have been used to characterize the phenotype of these cell lines. We have selected a few proteins which could significantly influence the angiogenic and metastatic properties of investigated cell lines. We have established cell lines stably overexpressing these genes and compared their phenotypes with parental cell lines.

We have shown that genes encoding ISL1, ARNT2, PROM1, HOXA11 proteins participate, in our experimental model, in activation of programmes controlling angiogenesis and cell invasion.

**Key words:** chick chorioallantoic membrane, CAM assay, angiogenesis, invasiveness, metastasis, ISL1, ARNT2, PROM1, HOXA11

## OBSAH

<b>1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	8
<b>2. ÚVOD</b> .....	10
<b>3. STUČNÉ SHRNTÍ SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY</b> .....	12
<b>3.1 Význam angiogeneze a hypoxie pro růst nádorů a proces metastazování</b> .....	12
3.1.1 Hypoxie .....	12
3.1.2 Angiogeneze.....	13
3.1.2 Působení hypoxie na nádorové buňky.....	13
3.1.3 Význam angiogeneze a hypoxie v procesu metastázování .....	14
<b>3.2 Kuřecí chorioalantoidální membrána jako modelový systém pro studium angiogeneze a invazivního chování buněk</b> .....	15
3.2.1 Vznik a funkce chorioalantoidální membrány .....	15
3.2.2 CAM test .....	17
3.2.2.1 Makroskopické vyhodnocování angiogeneze pomocí semikvantitativních metod... ..	19
3.2.2.2 Mikroskopické vyhodnocování angiogeneze pomocí kvantitativních metod .....	19
3.2.2.3 Výhody a limitace CAM testu.....	19
<b>3.3 Proteiny vybrané ke zkoumání</b> .....	20
3.3.1 ARNT2 .....	20
3.3.2 ISL1/Islet-1.....	21
3.3.3 PROM1/Prominin-1/ CD131.....	22
3.3.4 HOXA11 .....	23
<b>4. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	24
<b>5. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	25
<b>5.1 Materiál a metody související s prací s buněčnými kulturami</b> .....	25
5.1.1 Kuřecí buněčné sarkomové linie PR9692 a PR9692-E9.....	25
5.1.2 Kuřecí buněčné sarkomové linie 1259 a 5967 .....	26
5.1.3 Kultivace buněk <i>in vitro</i> .....	27
5.1.4 Analýza transkripčního profilu buněk na expresním mikročipu a výběr genů pro další zkoumání .....	27
<b>5.2 Metody související s přípravou expresních plazmidů</b> .....	28
5.2.1 Štěpení restrikčními endonukleázami .....	28
5.2.2 Odstranění jednovláknového přesahu nukleázou Mung Bean .....	29
5.2.3 Extrakce DNA (fenol-chloroformová extrakce).....	29

5.2.4 Elektroforéza nukleových kyselin v agarozovém gelu.....	29
5.2.5 Extrakce DNA z agarozového gelu .....	30
5.2.6 Ligace DNA .....	30
5.2.7 Použité bakteriální kmeny .....	30
5.2.8 Kompletní bohatá půda pro bakteriální buňky .....	31
5.2.9 Transformace kompetentních bakterií.....	31
5.2.10 Inokulace bakteriálních kultur.....	31
5.2.11 Izolace plazmidové DNA alkalickou metodou .....	31
5.2.12 Plazmidy použité při molekulárním klonování .....	32
5.2.13 Sekvence DNA .....	33
5.2.14 Konstrukce expresních plazmidů .....	34
<b>5.3 Tranzientní transfekce s využitím pakážovacího systému AviPack .....</b>	<b>37</b>
<b>5.4 Metody spojené s analýzou transkripčního profilu buněk.....</b>	<b>37</b>
5.4.1 Izolace RNA.....	38
5.4.2 Reverzní transkripce.....	39
5.4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	40
<b>5.5 Metody používané při charakterizaci fenotypu buněčných linií .....</b>	<b>43</b>
5.5.1 Test adhezivních vlastností buněk.....	43
5.5.2 Počítání buněk a sestavení růstové křivky .....	44
5.5.3 CAM test .....	44
5.5.4 Izolace a fixace vzorků.....	46
5.5.5 Vizualní analýza angiogeneze z fotografií .....	47
5.5.6 Analýza nádorových ložisek na CAM z fotografií.....	47
<b>6. VÝSLEDKY.....</b>	<b>48</b>
<b>6.1 CAM test .....</b>	<b>48</b>
<b>6.2 Expresní plazmidy .....</b>	<b>51</b>
<b>6.3 Stabilně transfekované buněčné linie .....</b>	<b>51</b>
<b>6.4 Charakterizace studovaných buněčných linií.....</b>	<b>51</b>
6.4.1 Srovnání buněčných linií 1259 a 5967 vs. 1259-GFP a 5967-GFP .....	51
6.4.2 Růstové křivky .....	52
6.4.2.1 1259 a 5967 vs. 1259-GFP a 5967-GFP .....	52
6.4.2.2 1259-ISL1, 1259-ARNT2 a 1259-PROM1 .....	52
<b>6.4.3 Porovnání exprese vybraných genů pomocí metody sqRT PCR (semikvantitativní RT PCR).....</b>	<b>53</b>

6.4.3.1 Trankripční profil buněk 1259, 5967 a transfektantů.....	54
6.4.4 Adhezivní vlastnosti.....	57
6.4.5 Angiogenní vlastnosti.....	61
6.4.6 Tvorba nádorových ložisek na CAM .....	64
6.4.7 Invazivní vlastnosti .....	66
6.4.8 1259-ARNT2-FLAG .....	68
<b>7. DISKUZE</b> .....	<b>70</b>
<b>8. SHRUTÍ</b> .....	<b>76</b>
<b>9. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY</b> .....	<b>77</b>



## 1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AHR	Aryl hydrocarbon receptor
ANG-1	Angiopoietin-1
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ARNT2	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator2
bHLH	basic helix-loop-helix
pb	páry bazí (base pairs)
CA9	Carbonic anhydrase 9
CAM	chorioalantoidální membrána
DEPC	diethylpyrokarbonát
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
env	retrovirový gen pro obalové glykoproteiny
EPO	Erythropoietin
FGF	Hibroblast growth factor
Flk-1	Fetal liver kinase 1
Flt-1	Fms-like tyrosine kinase 1
FN1	Fibronektin-1
gag	gen kódující strukturní bílkoviny retroviru
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HOXA11	HomeoboxA11
HRE	hypoxic-response element
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
ISL1	Islet1
kDa	kilodalton
LacZ	gen pro $\beta$ -galaktosidasu
LOXL1	Lysyl oxidase-like-1
LTR	dlouhá terminální repetice (long terminal repeat)
MMP-2	Matrix metaloproteinase-2
NRP1	Neuropilin-1
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)

PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet-derived growth factor
pol	gen kódující retrovirové enzymy (reverzní transkriptázu, integrázu)
PROM1	Prominin1
RSPO3	R-spondin 3
sqRT PCR	semikvantitativní RT PCR (semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction)
TGF- $\beta$ 2	Transforming growth factor- $\beta$ 2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-1	VEGF receptor-1
VEGFR-2	VEGF receptor-2
VSV	vesicular stomatitis virus

## 2. ÚVOD

Vznik nádorových metastáz je velice komplexní proces, který zahrnuje mnoho kroků a klade vysoké nároky na přizpůsobivost a invazivní schopnosti rakovinných buněk. Nejčastější způsob šíření metastázujících nádorových buněk po těle je cestou přes krevní řečiště. Pouze buňky schopné migrace mohou opustit primární nádorové ložisko a prostupovat skrze extracelulární matrix až ke stěně cévy, skrze níž se dostanou do cévního řečiště (intravasace). Cévní řečiště umožní nádorovým buňkám doputovat do míst vzálených od primárního nádoru. Dříve, než budou moci dát vzniknout dalšímu nádorovému ložisku, musí se buňky přichytit ke stěně cévy poblíž místa budoucí metastázy a prostoupit skrze ni (extravasace). Odtud dále migrují opět přes extracelulární matrix až do místa, kde mohou založit další nádorové ložisko. Samotné invazivní vlastnosti nejsou pro tvorbu metastáz dostačující, buňky musí dokázat přežít a přizpůsobit se často ne příliš příznivému hostitelskému prostředí. Na druhou stranu nádorové buňky často přizpůsobují okolí svým aktuálním potřebám. Jedním z hlavních limitujících faktorů pro nádory je vaskularizace, neboť díky cévám jsou buňky zásobeny kyslíkem a živinami a bylo prokázáno, že bez dostatečného cévního zásobení mohou nádory dosahovat velikosti maximálně několika milimetrů (Folkman, 1971). Navíc, jsou-li v těsné blízkosti primárního ložiska cévy, je velmi usnadněn jeden z prvních kroků metastatického procesu - vstup invazivních buněk do cévního řečiště. Pro nádorové buňky je tedy velmi výhodné zvýšení hustoty cévního zásobení v jejich nejbližším okolí. V průběhu nádorového růstu často vznikají hypoxické oblasti, do nichž je potřeba přivést nové cévy. Právě hypoxie je jedním z hlavních iniciátorů angiogeneze, tedy vytváření nových cév odvětčováním z cév již přítomných (Folkman, 1992). Není výjimkou, že u pokročilejších agresivních stádií rakoviny je v buňkách zvýšena exprese mnoha genů souvisejících právě s hypoxií a angiogenezí. Tyto buňky potom vyvolávají angiogenní reakci za jakýchkoliv podmínek nezávisle na okolním prostředí, což zpětně podporuje jejich proliferaci. Patologicky vytvořené cévy navíc mívají často abnormální stavbu a jsou děravé (Algire and Chalkley, 1945), což ještě více usnadňuje proces intravasace.

Jedním z cílů této práce bylo zavedení a optimalizace *in vivo* testu pro studium angiogeneze a invazivních vlastností buněk, který by mohl být běžně používán v podmínkách naší laboratoře. Jako model pro testování těchto procesů jsem využila kuřecí chorioalantoidální membránu (CAM), která je již dlouho úspěšně využívána pro studium invazivních a angiogenních vlastností nejrůznějších typů buněk či jejich

produktů. CAM obsahuje bohatou cévní pletěň, její tloušťka dosahuje maximálně 100  $\mu\text{m}$  a manipulace s ní není příliš náročná, což z ní činí velmi vhodný modelový systém pro studium angiogeneze a buněčné invazivity. Díky tomu, že imunitní systém kuřecího embrya zůstává dlouhou dobu jen minimálně vyvinutý, je možné na CAM testovat buňky jiných živočišných druhů. CAM je již úspěšně využívána i pro testování angiogenních a invazivních vlastností lidských nádorových buněk.

V rámci této práce jsem se zabývala studiem vybraných kuřecích sarkomových buněčných linií, u nichž došlo ke změně právě angiogenních a invazivních vlastností. Aby byla charakterizace buněk zvolených ke zkoumání co nejpřesnější a nejkompaktnější, kromě testování na CAM jsem sledovala jejich adhezivitu k různým povrchům a zjišťovala rozdíly v hladině mRNA pro některé klíčové proteiny, jejichž změna by mohla ovlivnit celkový fenotyp a schopnost vytvářet metastázy.

### 3. STUČNÉ SHRnutí SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

#### 3.1 Význam angiogeneze a hypoxie pro růst nádorů a proces metastazování

##### 3.1.1 Hypoxie

Hypoxie je způsobena nedostatečným zásobením tkání kyslíkem. Koncentrace kyslíku se v živých organismech pohybuje od 21% po 1% (v retině) (Taylor, 2008). Ve většině tkání je hypoxická odpověď spuštěna, pokud koncentrace kyslíku klesne pod 6%, což odpovídá koncentraci kyslíku v žilách (Simon and Keith, 2008). Odpověď na chronickou hypoxii zahrnuje změny v genové expresi. Adaptace na chronickou hypoxii může probíhat dvěma způsoby: snížením spotřeby kyslíku přepnutím na anaerobní metabolismus, což vede k poklesu využívání energie (omezení proliferace apod.), nebo zvýšením dodávky kyslíku k buňkám díky zvýšení erythropoeze a tvorbě nových cév (Mole and Ratcliffe, 2008).

Transkripční faktor HIF-1, který spouští hypoxickou odpověď, byl objeven v souvislosti s aktivací transkripce erythropoetinu (EPO) (Semenza et al., 1991). Později bylo zjištěno, že většina buněk je schopna reagovat na sníženou koncentraci kyslíku transkripcí genů souvisejících s hypoxickou odpovědí (Maxwell et al., 1993).

Buněčná odpověď na hypoxii je komplexní proces, při němž proteinové komplexy HIF regulují transkripci řady genů. Transkripční faktory HIF jsou heterodimery tvořené HIF-1 $\alpha$  a HIF-1 $\beta$  podjednotkou, které obě patří do rodiny DNA vazebných proteinů s konzervovanými motivy bHLH (basic helix-loop-helix) a PAS (PER-ARNT-SIM) (Wang et al., 1995). HIF-1 $\beta$  je také znám pod názvem ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator).

Heterodimer HIF se váže na DNA sekvence označované jako HREs (hypoxic-response elements), což jsou vazebné motivy v oblastech promotorů či enhancerů cílových genů (Semenza and Wang, 1992). HIF-1 $\alpha$  podjednotka je regulována na úrovni transkripce, translace, ale primárně zejména na úrovni stabilizace proteinu, neboť HIF-1 $\alpha$  je za normoxických podmínek proteazomálně degradován (Wang et al., 1995). Stabilizace HIF-1 $\alpha$  při hypoxii může být regulována také proteiny elektron transportního řetězce mitochondrií (Chandel et al., 1998). Stabilizovaný HIF-1 $\alpha$  rychle translokuje do jádra, kde interaguje se svým vazebným partnerem ARNT, který je konstitutivně syntetizován a sám o sobě není citlivý na koncentraci kyslíku. Po navázání heterodimeru

HIF-1 na HRE sekvenci DNA interaguje koaktivátor CBP/p300 s C-TAD doménou podjednotky HIF-1 $\alpha$  a dochází k aktivaci transkripce cílových genů (Semenza, 2003).

### **3.1.2 Angiogeneze**

Angiogeneze (vyrůstání nových cév z již existujících cév) zajišťuje zvýšení cévního zásobení a tím i dostatečné zásobení kyslíkem a živinami do tkání, kde je potřeba. Na procesu angiogeneze se významně podílí hypoxie, neboť HIF komplex přímo reguluje transkripci řady faktorů nezbytných pro stimulaci migrace cévních buněk, zejména VEGF (vascular endothelial growth factor) (Forsythe et al., 1996). Další faktory, jako například FGF (fibroblast growth factor) či ANG-1 (angiopoietin-1) jsou při hypoxii zřejmě také přímo regulovány HIF, přestože u nich nebyly zjištěny HRE sekvence (Kelly et al., 2003).

Angiogeneze je nezbytná pro normální průběh vývoje a v dospělých organismech je aktivována například při hojení ran či zánětlivých reakcích (Fong, 2008; Frantz et al., 2005). Za hypoxických podmínek je angiogeneze v první řadě aktivována skrze VEGF, jehož transkripci spouští HIF. VEGF je regulován také na úrovni stabilizace mRNA (Levy et al., 1998). Hypoxická část tkáně vytváří gradient signalizace VEGF, jenž pomocí interakce ligand-receptor atrahuje okolní endoteliální buňky. VEGF má několik izoform, které interagují s různými receptory. Například pro-angiogenní VEGFA interaguje se dvěma receptorovými tyrosinovými kinázami VEGFR-1 (též Flt-1) a VEGFR-2 (též Flk-1) (Gerber et al., 1997). VEGF působí také jako chemoatraktant, když indukuje proliferaci endoteliálních buněk a jejich formování do trubcovitých útvarů, což vede k růstu nových cév směrem k hypoxické tkáni (Ferrara et al., 2003).

Kromě VEGF aktivuje HIF transkripci dalších pro-angiogenních genů jako je například angiopoietin-1, angiopoietin-2, matrixové metaloproteinázy 2 a 9 nebo PDGF- $\beta$  (Rankin and Giaccia, 2008).

### **3.1.2 Působení hypoxie na nádorové buňky**

Maligní nádory velmi často obsahují hypoxické nebo anoxické oblasti, neboť zásobení kyslíkem není dostatečné pro pokrytí nadměrné spotřeby kyslíku vysoce metabolicky aktivních nádorových buněk (Folkman, 1971). Za takovýchto obtížných podmínek přežijí pouze buňky, které projdou mnoha adaptacemi na hypoxii, čímž dochází k pozitivní selekci zvýšeně agresivních maligních buněk, které jsou schopné rychlé adaptace na měnící se prostředí (Folkman, 1992; Liao et al., 2007). Změny v buněčné

expresi u těchto buněk zabezpečují proliferaci a vedou ke zvýšení vaskularizace v jejich okolí, což vede ke zvětšování nádoru (Semenza). V důsledku mnoha mutací probíhá hypoxická regulace často i za normální koncentrace kyslíku (Baldewijns et al.). Za hypoxických podmínek mohou nádorové buňky neomezeně proliferovat nezávisle na klasické regulaci, neboť hypoxie vede k transkripci řady růstových faktorů jako je například TGF- $\beta$  nebo PDGF (Harris, 2002).

Zvýšená hladina proteinu HIF-1 $\alpha$  v nádorové tkáni koreluje s horší prognózou a agresivitou maligních nádorů. HIF-1 $\alpha$  může být u nádorových buněk stabilizován jak klasickou regulací při hypoxii tak díky mutacím v regulačních proteinech (Liao et al., 2007).

### **3.1.3 Význam angiogeneze a hypoxie v procesu metastázování**

Tvorba metastáz je složitý postupný proces, při němž má nezastupitelnou roli i hypoxická regulace. Transkripční faktor HIF je klíčovým regulátorem v procesech angiogeneze a invazivity, které jsou potřeba pro úspěšné vytvoření metastázy. Nové cévy pronikají do hypoxické tkáně a faktory, jako je například matrixová metaloproteináza-2 (MMP-2), sekretované hypoxickými buňkami pomáhají remodelovat extracelulární matrix v místech, kam migrují endoteliální nebo nádorové buňky. Hypoxie zvyšuje motilitu buněk také tím, že vede k parakrinní sekreci faktorů, jako je například TGF- $\alpha$  (Finger and Giaccia).

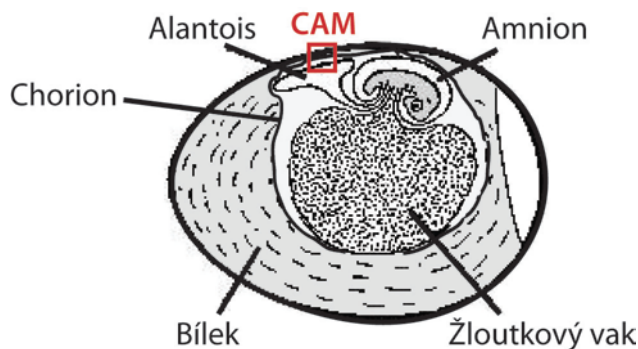
Šíření nádorových buněk do vzdálených míst výrazně napomáhá angiogeneze, neboť nové rychle vznikající cévy uvnitř nádorů, které mají zajistit jeho růst a zásobení kyslíkem a živinami, mají abnormální stavbu: jsou klikaté, neorganizované, děravé a ne úplně vyvinuté. Endoteliální buňky takovýchto cév nejsou tak těsně uspořádané, jak bývá obvyklé, a vzniklé mezery poskytují agresivním nádorovým buňkám vhodnou příležitost pro intravazaci do cévního řečiště. Takovéto uspořádání cév je způsobeno tím, že hypoxické nádorové buňky kontinuálně sekretují faktory vyvolávající angiogenezi (VEGF apod.), na což cévy reagují neustálým růstem a nemají šanci se pořádně zformovat (Chung et al.). Například pericyty, které obklopují nové cévy a mají jim být oporou, disociují pokud cévy přijímají růstové signály (Morikawa et al., 2002). Navíc děravé, nedovyvinuté cévy nedokážou zabezpečit dostatečný příjem kyslíku čímž hypoxický stav a s ním související signalizace tak dále přetrvává (Bristow and Hill, 2008).

### 3.2 Kuřecí chorioalantoidální membrána jako modelový systém pro studium angiogeneze a invazivního chování buněk

#### 3.2.1 Vznik a funkce chorioalantoidální membrány

Kuřecí embryonální vývoj trvá 21 dní. V oplozeném ptačím vejci se postupně během vývoje objevují čtyři extraembryonální membrány: žloutkový vak, amnion, chorion a alantois.

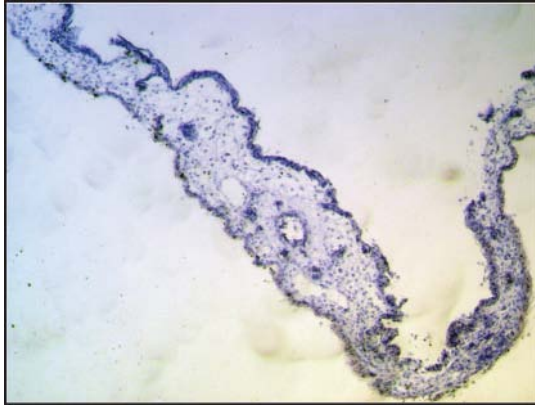
Po přibližně 3 dnech inkubace vzniká alantois vychlípáním z ventrální stěny střeva a již v této době se v ní začínají objevovat první cévy. Během čtvrtého dne vystupuje alantois z těla embrya do extraembryonálního coelomu. Proximální část alantois leží paralelně a kaudálně vzhledem ke žloutkovému vaku, zatímco distální část vyrůstá přímo u embrya. Úzká proximální část je označována jako alantoidální stopka, zatímco distální část je tzv. alantoidální vak. Akumulace tekutiny postupně roztahuje alantois. Od čtvrtého do desátého dne vývoje se alantoidální vak velmi rychle zvětšuje. Během tohoto procesu splývá mesodermální vrstva alantois s přiléhající mesodermální vrstvou chorionu a dává vzniknout chorioalantoidální membráně (CAM) (obr. 1). Vzniká tak vlastně dvojvrstva mesodermu, jejíž choriovou částí je somatický mesoderm a alantoidální částí je splachnický mesoderm (Romanoff, 1960).



Obr.1: Oplozené slepičí vejce 5. den embryonálního vývoje. Částečným splýváním chorionu a alantois začíná vznikat chorioalantoidální membrána.

CAM je velmi tenká struktura a jen zřídka přesáhne tloušťku 100  $\mu\text{m}$ . Z histologického hlediska je CAM tvořena třemi hlavními vrstvami, ektodermem, který je na straně přiléhající ke skořápce, bohatě cévně zásobeným mesodermem a endodermem ležícím směrem k alantoidální dutině (Obr.2).





Obr.2: Řez kuřecí chorioalantoidální membránou. Na snímku jsou patrné tři hlavní vrstvy CAM, na svrchní straně je ektoderm, prostřední je mesoderm s bohatým cévním systémem a na spodní straně se nachází endoderm. Zvětšeno 12,5x.

V dvojvrstvě CAM se postupně vyvíjí velmi bohatá cévní síť, která je spojena s embryonálním oběhovým systémem přes alantoidální tepny a žíly. Krevní cévy jsou zpočátku tvořeny jedinou vrstvou endoteliálních buněk a postrádají bazální laminu. Od 5. dne začínají být endoteliální buňky tlustší, mají několik plasmalematických váčků a obsahují velké vakuoly (Rizzo et al., 1995). Osmý den jsou pod choriovým epitelem CAM patrné malé tenkostěnné kapiláry o průměru 10 až 15  $\mu\text{m}$  a cévní síť má již stanoveno své základní uspořádání. Stěny cév si zachovávají jednoduchou strukturu, obsahují endoteliální buňky, několik plochých mesenchymálních buněk, které jsou přiložené blízko k endoteliálním buňkám, a bazální laminu. Do 10. dne embryonálního vývoje vzniká nejvíce nových cév, přičemž endoteliální buňky v CAM vykazují vysoký mitotický index okolo 23%. Během 11. dne vývoje proliferace endoteliálních buněk prudce zpomaluje a mitotický index klesá na 2% a zůstává takto nízký až do okamžiku vylíhnutí kuřete. Mezodermální cévy jsou již zřetelně rozlišitelné na arterioly a venuly. Kromě endotelia obsahují stěny arterioly (průměr 10 až 85  $\mu\text{m}$ ) také jednu či dvě vrstvy mesenchymálních buněk a jsou obklopeny větším množstvím pojivové tkáně. Venuly (průměr 10 až 115  $\mu\text{m}$ ) jsou obklopeny nekompletní vrstvou mesenchymálních buněk a uvnitř jejich stěn je také nahromaděna pojivová tkáň. V mesenchymálních buňkách se objevují a rychle přibývají mikrofilamenta. Z těchto buněk se později vyvinou buňky hladké svaloviny, ve stěnách arterioly v CAM se také vyvine zřetelná adventicie obsahující buňky podobné fibroblastům (Ausprunk et al., 1974).

Osmnáctého dne cévní systém dosahuje svého definitivního uspořádání, které si zachovává až do vylíhnutí kuřete. V buňkách hladké svaloviny přibývají mikrofilamenta a často se u nich objevuje schopnost kontrakce. Basální lamina endoteliálních buněk, pericytů a buněk hladké svaloviny se stává souvislou (Ausprunk et al., 1974).

Cévní systémy CAM a kuřecího embrya jsou propojeny alantoidální (umbilikální) arterií a žilou. Alantoidální arterie vystupuje z embryonální abdominální stěny a prochází podél alantoidálního stvolu až k vnitřní stěně alantoidálního vaku, kde se rozděluje ve dvě silné primární chorioalantoidální arterie, z nichž jedna běží cefalicky a druhá kaudálně k okrajům vaku. Krev je z CAM zpětně odváděna jedinou chorioalantoidální žilou, jež probíhá vnitřní stěnou a prochází přes CAM poblíž sero-amniového spojení (Fuchs and Lindenbaum, 1988).

Kromě cévního systému se také v průběhu vývoje mění složení extracelulární matrix v CAM, a to zejména exprese fibronektinu, lamininu, kolagenu typu IV a distribuce specifických glykosaminoglykanů, což významně ovlivňuje procesy angiogeneze, které se odehrávají v prostoru mezi choriovým epitelium a mesodermálními krevními cévami (Ausprunk, 1986).

Hlavními funkcemi CAM jsou zprostředkování výměny plynů mezi embryem a vnějším prostředím, transport živin, iontů, transport vápníku ze skořápky pro mineralizaci kostí a exkrece (Johnston and Comar, 1955; Maksimov et al., 2006; Moriarty and Terepka, 1969; Tuan, 1984; Wagner-Amos and Seymour, 2002).

### 3.2.2 CAM test

Kuřecí chorioalantoidální membrána je jedním z nejčastěji využívaných *in vivo* modelových systémů pro studium angiogenních a anti-angiogenních vlastností různých typů buněk či jejich produktů a také pro zkoumání metastatických procesů a invazivity nádorových buněk.

CAM byla poprvé využita jako modelový systém pro implantaci nádorových vzorků již téměř před 100 lety (Murphy, 1913). Od té doby našla další uplatnění při studiu mnoha angiogenních a anti-angiogenních faktorů, jako se například VEGF či PDGF (Wilting et al., 1992). Hypoxie, která je jedním z nejvýznamnějších regulátorů angiogeneze a je zdrojem mnoha angiogenních faktorů, byla také již testována na CAM (Dusseau and Hutchins, 1988).

Lymfoidní systém kuřecích embryí zůstává až do pozdních stádií vývoje velmi málo vyvinutý, díky čemuž je embryo přirozeně imunodeficientní (Leene et al., 1973) a

na CAM lze implantovat obrovskou škálu inzertů bez druhově specifických omezení. CAM je velmi příznivým prostředím pro růst xenogenních nádorových buněk (Murphy, 1913) a je proto často využívána i pro pozorování nádorových buněk od lidských pacientů. Na CAM byly testovány buňky různých typů nádorů včetně melanomu (Auerbach et al., 1976), glioblastomu (Klagsbrun et al., 1976), lymfomu (Ribatti et al., 1990) a mnoho dalších.

Angiogeneze je klíčovou podmínkou pro růst nádorů i pro tvorbu metastáz (Gasparini, 1994). Knighton a kol. jako první testovali na CAM angiogenezi vyvolanou implantací nádorového vzorku (Knighton et al., 1977). Bohaté prokrvení CAM umožňuje vznik nádorů po implantaci buněk již během několika dní. Bohatá cévní síť usnadňuje agresivním nádorovým buňkám, které opustily primární nádor, vstup do cévního řečiště, jímž buňky migrují do různých vzdálenějších míst na CAM i do orgánů embrya, kde mohou vytvořit mikro-metastatická ložiska. CAM test tedy umožňuje studovat komplexní proces metastázování během velmi krátké doby (Deryugina and Quigley, 2008).

Pro umístění zkoumaného vzorku na CAM byly testovány různé materiály jako inertní syntetické polymery Elvax 40 (etylen-vinyl acetátový kopolymer) či hydron (poly-2-hydroxyetyl-metylakrylátový polymer, Hydrmed Sciences) (Langer and Folkman, 1976), dále například kolagenový gel (Nguyen et al., 1994). Jako nosiče pro umístění vzorku se osvědčily želatinové houbičky, které jsou imunitním systémem velmi dobře tolerovány a jsou snadno zpracovatelné při histologické analýze a zkoumání nových cév vrůstajících dovnitř. Další výhodou užití želatinové houbičky je její vysoká přilnavost k povrchu CAM. Také dobře absorbuje vzorek, který už z houbičky dále neuniká, ale zároveň umožňuje nádorovým i jiným buňkám snadné vycestování z implantátu (Ribatti et al., 1997).

Velmi často je využívána možnost značení studovaných buněk (transfekce GFP,  $\beta$ -galaktosidázou apod.), díky čemuž jsou buňky snadno rozpoznatelné. Značené buňky mohou být dále detekovány na CAM i v orgánech embrya pomocí imunohistochemických barvení řezů (Deryugina and Quigley, 2008; Ribatti et al., 1997).

### 3.2.2.1 Makroskopické vyhodnocování angiogeneze pomocí semikvantitativních metod

Pro kvantitativní či semikvantitativní vyhodnocení vasoproliferativní reakce po vložení inzertu bylo vytvořeno několik metod.

Jedna z nich je založena na hodnocení změn distribuce a hustoty cév za určitou dobu po umístění vzorku. Bodové hodnocení 0 znamená, že nedošlo k žádné viditelné změně, skóre +1 odpovídá situaci, kdy se směrem k implantátu objevilo několik nových cév a skóre +2 znamená výrazné zvýšení četnosti a hustoty nových cév směřujících k inzertu (Knighton et al., 1977).

Další metoda využívá fotografických rekonstrukcí CAM, přičemž jsou spočítány všechny nové cévy směřující k inzertu v okolí vzdáleném do 1 mm. Cévy, které se dichotomicky větví vně tohoto okolí jsou počítány jako 2, cévy větvící se uvnitř 1 mm okolí inzertu jsou počítány jako 1 (Dusseau et al., 1986).

Jiná metoda je založena na pozorování CAM pod lupou a hodnocení uspořádání a hustoty nových cév v okolí implantátu bodovou škálou od 0 do 5. Skóre 0 znamená žádnou změnu cévní sítě v okolí vzorku, +1 značí malé zvýšení počtu cév vedoucích k implantátu, +2, +3, +4 a +5 potom znamenají postupné zvyšování počtu cév a změnu směru jejich růstu k implantátu (Folkman and Cotran, 1976).

### 3.2.2.2 Mikroskopické vyhodnocování angiogeneze pomocí kvantitativních metod

Kvantitativní určení angiogeneze je poněkud náročnější na provedení a vyžaduje izolaci a fixaci vlastní CAM s implantátem. Počet cév je potom určován při mikroskopování ze 6 náhodně zvolených polí z plochy rozdělené na 12 x 12 čtverců a výsledné pokrytí cévami je vyjádřeno v procentech plochy zabrané cévami vzhledem k celkové ploše (Elias and Hyde, 1983).

### 3.2.2.3 Výhody a limitace CAM testu

CAM je jedním z nejvyužívanějších systémů pro studium angiogeneze zejména díky snadnému provedení, nízkým finančním nákladům, reprodukcibilitě a širokým možnostem výběru vzorků ke zkoumání. Další klasické testy pro studium angiogeneze *in vivo* zahrnují modelové systémy jako jsou křeččí lícni torby, králičí uši, dorsální část kůže nebo rohovka hlodavců (Ribatti and Vacca, 1999) či embrya ryb druhu *Danio rerio* (Serbedzia et al., 2000). Většina těchto modelů je omezena na studium pouze druhově

specifických vzorků a často vyžaduje složitou manipulaci, což může dále vést k vyšším finančním nákladům na provedení testu (Ribatti and Vacca, 1999).

Hlavní limitací CAM testu je případná nespecifická zánětlivá reakce, která by se mohla objevit po vložení implantátu a způsobit sekundární angiogenní odpověď, přičemž zdrojem angiogenních faktorů mohou být makrofágy či jiné leukocyty. Lymfoidní buňky pocházející ze žloutkového vaku a sleziny se obvykle objevují v brzlíku až 8. den embryonálního vývoje a ve Fabriciově burze teprve 11. den embryonálního vývoje (Leene et al., 1973). Možnost vzniku nespecifické zánětlivé reakce lze tedy významně eliminovat vložním implantátu v časném stádiu embryogeneze, kdy je ještě velmi málo vyvinutý imunitní systém, obvykle je vkládán 8. dne embryonálního vývoje (Leene et al., 1973).

Byla provedena řada testování různých materiálů používaných pro aplikaci vzorku včetně želatinových a viskózních houbiček, filtračního papíru, agarózy a dále také části vejce jako například skořápkovou mebranu, koagulovaný žloutek či koagulovaný bílek (Jakob et al., 1978).

Jelikož je CAM rostoucí a vyvíjející se živá struktura, jako taková se stává předmětem vlivu různých faktorů z okolí, včetně změn pH nebo koncentrace kyslíku, které mohou samy o sobě způsobit angiogenní reakci (Spanel-Burowski et al., 1998). Aby se takovýmto změnám co nejvíce zamezilo a výsledky pokusů byly vzájemně porovnatelné, jsou vejce inkubována za optimálních a konstantních podmínek (37°C, 60% vlhkost) (Ribatti et al., 2006).

### **3.3 Proteiny vybrané ke zkoumání**

Při studiu angiogenních a invazivních vlastností zkoumaných buněk jsme se z důvodů uvedených v kapitole 5.1.4 zaměřili na následující čtyři proteiny: ARNT2, ISL1, PROM1 a HOXA11.

#### **3.3.1 ARNT2**

Dimerický transkripční faktor HIF1 aktivuje při hypoxickém stresu transkripci řady genů. Aktivní HIF1 komplex je dimer tvořený proteiny HIF-1 $\alpha$  a HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\beta$  bývá často označován jako ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator) (Hoffman et al., 1991). ARNT je rovněž znám jako dimerizační partner proteinu AHR (aryl hydrocarbon receptor) (Sogawa et al., 1995).

ARNT2 je přibližně 80 kDa velký protein, stejně jako HIF-1  $\alpha$  a ARNT i patří do rodiny proteinů obsahující dva konzervované motivy: basický helix-loop-helix (bHLH) a PAS motiv (Per-ARNT-Sim) v N-terminální oblasti. Oba motivy se uplatňují při tvorbě dimeru HIF1 i při jiných protein-proteinových interakcích (Gradin et al., 1996).

Stejně jako ARNT může ARNT2 tvořit funkční dimery s HIF-1 $\alpha$  a aktivovat transkripci genů navázáním na HREs (hypoxia response elements) uvnitř promotorů či enhancerů příslušných genů (Maltepe et al., 2000). Také se může vázat k AHR (Hirose et al., 1996), avšak zatímco ARNT je exprimován ve všech tkáních, ARNT2 byl u myšího i kuřecího modelu objeven zatím pouze v ledvinách, mozku a očích (Hirose et al., 1996; Lee et al.). ARNT2 se pravděpodobně účastní hypoxických reakcí v centrální nervové soustavě (Maltepe et al., 2000). Během embryogeneze je u myši exprimován v prvním branchiálním oblouku a v dorsální části neurální trubice, což naznačuje, že by se mohl uplatňovat při neurogenezi (Hirose et al., 1996).

U teratokarcinomů, které vznikly z ARNT-deficientních buněk, způsobil ARNT2/HIF-1 $\alpha$  komplex zvýšenou expresi VEGF, což následně vyvolalo angiogenní reakci (Maltepe et al., 2000). Obecně je ARNT2 exprimován častěji v nádorové než v normální tkáni a mohl by být využíván jako biomarker některých typů nádorů (Martinez et al., 2008).

### 3.3.2 ISL1/Islet-1

ISL1 je přibližně 39 kDa velký protein patřící do rodiny transkripčních faktorů s LIM-homeodoménou. Tento protein se kromě jiného podílí na aktivaci transkripce genu kódujícího inzulin (Zhang et al., 2009). ISL1 zřejmě také podporuje postnatální angiogenezi (Barzelay et al.), je známý i jako jeden z markerů progenitorových buněk, jež dávají vzniknout buňkám myokardu, pacemakerovým buňkám, endoteliálním buňkám a buňkám hladké svaloviny cév (Moretti et al., 2006; Sun et al., 2007). Během embryogeneze je ISL1 nepostradatelný pro vznik tzv. sekundární srdeční oblasti (Cai et al., 2003). Sekundární srdeční oblast zahrnuje značnou část srdce vznikající později z populace kardiovaskulárních progenitorových buněk, které přimigrují k původně lineární primární srdeční oblasti (Kelly and Buckingham, 2002; Mjaatvedt et al., 2001) a jedním z markerů těchto progenitorových buněk je právě ISL1 (Cai et al., 2003).

U mezenchymálních kmenových buněk transdukce genu kódujícího ISL1 zvýšila angiogenní vlastnosti *in vitro*. U endoteliálních buněk transdukovaných ISL1 byla zjištěna zvýšená sekrece důležitých pro-angiogenních cytokinů IL-1 $\beta$  a VEGF, což vyvolalo buněčnou migraci a uspořádávání endoteliálních buněk do trubicovitých útvarů *in vitro*.

Také došlo ke zvýšení proliferace, migrace, adhezivitu (zejména k fibronektinu) a parakrinních schopností (Barzelay et al.).

Nadexprese ISL1 způsobuje nárůst exprese adhezivních proteinů ICAM-1 a VCAM-1 (Barzelay et al.). Oba dva proteiny jsou klíčové v procesu angiogeneze, ICAM-reguluje motilitu endoteliálních buněk (Kevil et al., 2004), zatímco VCAM-1 umožňuje adhezi endoteliálních buněk k okolním buňkám (Garmy-Susini et al., 2005).

### 3.3.3 PROM1/ Prominin-1/CD131

Prominin-1 je asi 115 kDa velký transmembránový glykoprotein. Má pět transmembránových domén, N-terminální extracelulární doménu, C-terminální intracelulární doménu, dvě malé cytoplasmatické smyčky a dvě velké glykosylované extracelulární smyčky (Miraglia et al., 1997). Poprvé byl identifikován v cytoplasmatické membráně buněčných výběžků u myších neuroepiteliálních kmenových buněk. Odtud také pochází jeho název (lat. *prominere* = vyčnívající) (Weigmann et al., 1997).

Je důležitým povrchovým markerem používaným při identifikaci a izolaci různých typů kmenových buněk včetně hematopoetických kmenových buněk (Yin et al., 1997) a kmenových buněk centrální nervové soustavy (Uchida et al., 2000).

Ačkoliv jeho biologická funkce stále není známa, bývá považován za jeden z markerů tzv. nádorových kmenových buněk (Shmelkov et al., 2005). Obecně převládá názor, že nádorové kmenové buňky jsou malou subpopulací nádorových buněk, která je analogicky jako klasické orgánové kmenové buňky schopna sebeobnovy i diferenciaci v různé typy buněk příslušného nádoru. Obojí je klíčové pro expanzi a životaschopnost nádoru (Clarke et al., 2006). Právě nádorové kmenové buňky jsou považovány za zdroj maligních buněk v primárním nádoru a za příčinu relapsu po chemoterapeutické léčbě (Jordan et al., 2006).

Exprimovaný Prominin-1 byl popsán u nádorových kmenových buněk mnoha typů nádorů jako jsou meduloblastomy (Singh et al., 2003), glioblastomy (Yuan et al., 2004), leukémie (Bhatia, 2001), kolorektálního karcinomu (Ricci-Vitiani et al., 2007), nádorů pankreatu (Hermann et al., 2007), plic (Eramo et al., 2008), jater (Yin et al., 2007) nebo vaječníků (Suzuki et al.). V klinické praxi je již využíván jako marker nádorových kmenových buněk lidského kolorektálního karcinomu (Saigusa et al.).

Další výzkumy naznačují, že Prominin-1 se podílí na tvorbě metastáz. Některé nádorové buňky sice mohou migrovat do míst vzdálených od primárního nádoru, avšak pouze buňky, které exprimují Prominin-1 jsou schopny vytvořit nové metastázy (Hermann et al., 2007).

### 3.3.4 HOXA11

HOXA11 je jedním z mnoha transkripčních faktorů rodiny HOX. Proteiny této rodiny jsou známými regulátory embryonálního vývoje. Hox geny jsou kolineárně uspořádány v komplexech a podle pořadí, v jakém po sobě následují, jsou exprimovány v různou dobu v různých částech těla embrya. Důsledkem této tzv. strukturální kolinearity je specifický vývoj různých tělesných segmentů v rámci anteriorně-posteriorního uspořádání těla daný unikátními kombinacemi Hox genů (Duboule and Dolle, 1989; Gehring, 1987).

Sekvence kuřecího HOXA11 je z 80% homologní se svým lidským a myším ortologem, přičemž evolučně konzervované jsou právě klíčové regulační sekvence (Bodenmiller et al., 2002). HOXA11 se účastní vývoje páteře, obratlů a urogenitálního systému (Zakany et al., 1996). Během vývoje končetin kuřecího embrya reguluje HOXA11 vývoj v oblasti zeugopodu (část končetiny, kde se bude nacházet ulna a radius) (Rogina, 1997). Také se podílí na vývoji svalů budoucí končetiny. Je exprimován v migrujících a proliferujících premyoblastech končetinového pupenu. Během vývoje končetiny inhibuje expresi MyoD a brání diferenciaci premyoblastů, dokud je potřeba (Yamamoto and Kuroiwa, 2003).

Transkripční faktory HOX se podílejí na vývoji kůže u kuřecích embryí, přičemž HOXA-11 je exprimován v kůži celého těla narozdíl od některých jiných proteinů HOX, které jsou exprimovány pouze na určitých místech (Reid and Gaunt, 2002).

Pro nás důležitým poznatkem je, že transkripční faktory HOX regulují místně specifickou expresi adhezivních molekul, jako je například N-CAM (neural cell adhesion molecule) (Edelman and Jones, 1995).



#### **4. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

- 1) Sestavit protokol pro provedení CAM testu v podmínkách naší laboratoře.
  
- 2) Popsat fenotyp vybraných kuřecích sarkomových buněčných linií a otestovat jejich angiogenní a invazivní vlastnosti pomocí CAM testu.
  
- 3) Zaklonovat kódující oblast vytipovaných genů, které by mohly podporovat angiogenní nebo invazivní vlastnosti zkoumaných buněk. Připravit expresní vektory nesoucí kódující oblast takových genů a pomocí transfekce připravit buňky, které by exprimovaly zvýšenou hladinu vytipovaných genů.
  
- 4) Charakterizovat fenotyp transfekovaných buněk, otestovat jejich chování na CAM a porovnat je z původními liniemi.

## 5. MATERIÁL A METODIKA

U speciálních chemikálií, enzymů atd. je v závorce uveden výrobce, vše ostatní pocházelo od různých výrobců. Chemikálie byly použity vždy v nejvyšší dostupné čistotě.

### 5.1 Materiál a metody související s prací s buněčnými kulturami

#### 5.1.1 Kuřecí buněčné sarkomové linie PR9692 a PR9692-E9

##### PR9692

PR9692 je transformovaná linie kuřecího fibrosarkomu odvozená z nádoru vyvolaného injekcí DNA konstruktů obsahujícího v-src cDNA mezi RSV LTR sekvencemi („LTR, v-src, LTR“) do prsního svalu kuřete č. 9692 pocházejícího z pražské kongenní linie slepic PR-CC.R1 (Plachy and Vilhelmova, 1984; Svoboda et al., 1992). Buňky izolované z nádoru byly převedeny do buněčné kultury a pasážovány, dokud nedošlo k spontánní imortalizaci. Po inokulaci do prsního svalu kuřat vytváří buňky PR9692 rychle rostoucí nádory, které metastázuji do plic. Nyní jsou nepřetržitě kultivovány již přes 10 let (více než 500 populačních zdvojení, přes 200 pasáží) (Cermak et al.).

##### PR9692-E9

Linie PR9692-E9 vznikla spontánně *in vitro* jako buněčný klon PR9692 (175. pasáž). Po inokulaci do prsního svalu kuřat PR-CC.R1 také tvoří rychle rostoucí nádory, avšak ztratila schopnost metastázovat. Obě linie se liší i svým fenotypem; PR9692 jsou za jsou podmíněk *in vitro* mnohem adhezivnější než PR9692-E9. Bylo zjištěno, že u PR9692-E9 je výrazně snížena exprese genu kódujícího transkripční faktor EGR1, který pravděpodobně ovlivňuje geny důležité pro tvorbu filopodií, kontraktilitu cytoskeletu, produkci specifických komponent ECM a další geny klíčové pro tvorbu metastáz (Cermak et al.).

##### PR9692-GFP a PR9692-E9-GFP

Do buněk PR9692 i PR9692-E9 byl V. Čermákem vnesen gen kódující GFP, jehož exprese umožňuje lokalizaci těchto buněk. Obě linie byly infikovány replikačně nekompetentními retrovirovými partikulami, které produkovaly pakážovací buňky

KUNDRA po transfekci plazmidem pSFCV-GFP, jak je popsáno v Čermák a kol. 2010 (Cermak et al., ; Cosset et al., 1990; Fuerstenberg and Vennstrom, 1993). Transfekce buněk KUNDRA byla provedena s využitím Lipofectamine 2000 (Invitrogen) podle instrukcí od výrobce. Klony, které po infekci exprimovaly GFP, byly vyselektovány G418 (500 µg/ml) (Cermak et al.).

### **5.1.2 Kuřecí buněčné sarkomové linie 1259 a 5967**

#### **1259**

Buňky 1259 vznikly v kuřecí linii CB (Plachy et al., 1989) s využitím transformace v-src provirem stejným způsobem, jako tomu bylo u linie 9692. Během kultivace *in vitro* u nich došlo imortalizaci. Po implantaci do prsního svalu kuřat CB tvoří nádory, které nejsou schopny tvořit metastázy (Plachý, ústní sdělení).

#### **5967**

Buněčná linie 5967 vznikla *in vivo* u CB kuřat jako spontánní sub-klon linie 1259. Tyto buňky byly izolovány ze sekundárního nádoru v plicích a pomocí sekvenace okolí integračních míst v-src proviru bylo zjištěno, že se skutečně jedná o sub-klon linie 1259. Buňky 5967 tvoří po implantaci do prsního svalu kuřat nádory, které metastázuji do plic (Plachý, ústní sdělení).

Způsob vzniku buněk 5967 z buněk 1259 je zajímavý zejména tím, že zde došlo k pozitivní selekci buněk s takovými mutacemi, jež vedly k agresivnějšímu a invazivnějšímu chování buněk, zatímco u předchozích dvou buněčných linií (PR9692 a PR9692-E9) naopak došlo k oslabení invazivních vlastností buněk a ke ztrátě schopnosti tvořit sekundární nádory.

#### **1259-GFP a 5967-GFP**

Do buněčných linií 1259 a 5967 byl J. Koslou vnesen gen kódující GFP, aby bylo možné tyto buňky lokalizovat. Vnesení bylo provedeno stejným způsobem jako u PR9692 a PR9692-E9.

### 5.1.3 Kultivace buněk *in vitro*

Všechny kuřecí sarkomové linie byly kultivovány v médiu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) s 1 g/l glukosy (Sigma) + 4% fetálního telecího séra, 2% kuřecího séra, 2mM glutaminu, 100 jednotek/ml penicilinu a 0,1 mg/ml streptomycinu.

Na jednu Petriho misku o průměru 10 cm bylo vyseto přibližně  $2 \times 10^6$  buněk do 10 ml média. Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 42°C s atmosférou obsahující 5% CO<sub>2</sub>.

Pasážování probíhalo přibližně 1x za dva až čtyři dny, vždy když byl buněčný povlak konfluentní.

Buňky GP2-293 byly kultivovány v médiu s nižším obsahem séra se složením: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) s 1 g/l glukosy (Sigma) + 2% fetálního telecího séra, 1% kuřecího séra, 2mM glutaminu, 100 jednotek/ml penicilinu a 0,1 mg/ml streptomycinu.

### 5.1.4 Analýza transkripčního profilu buněk na expresním mikročipu a výběr genů pro další zkoumání

Analýza transkripčního profilu buněk 1259 a 5967 z izolované celkové RNA byla provedena J. Koslou a V. Čermákem s využitím expresního mikročipu Affymetrix Chicken Gene Chips stejným způsobem, jako je popsán v článku Čermák a kol. 2010. Z údajů, které poskytla analýza na expresním mikročipu je patrné, že nejzásadnější rozdíly mezi buňkami 1259 a 5967 se týkají exprese genů souvisejících s angiogenezí, hypoxií či adhesivním chováním buněk, přičemž exprese většiny těchto genů se zdá být vyšší u linie 5967 oproti 1259 (Čermák a Kosla, ústní sdělení).

Při výběru genů vhodných pro transfekci buněk 1259 jsme se zaměřili zejména na geny kódující proteiny, které jsou transkripčními faktory nebo mají nějakou regulační funkci. Současně by se mělo jednat o geny, u kterých lze podle literatury očekávat účast při metastatických procesech, angiogenezi či hypoxické reakci. Cílem bylo zvolit klíčové regulační proteiny, které by mohly ovlivňovat spuštění celých buněčných programů a nesoustředit se na takové proteiny, které leží ve spodní části regulačních kaskád.

Zvolili jsme čtyři proteiny, které vykazovaly výrazně vyšší expresi u metastazující linie 5967 než u linie 1259. Prvním je ARNT2, transkripční faktor, který se přímo účastní odpovědi na hypoxický stres a byla popsána jeho funkce i při angiogenezi (Maltepe et al., 2000). Dalším vybraným transkripčním faktorem je ISL1, který pravděpodobně může regulovat angiogenezi, invazivitu, proliferaci, i adhesivní chování

buněk (Barzelay et al.). Prominin-1 jsme zvolili proto, že je známým markerem nádorových kmenových buněk, i když jeho funkce zatím není známá (Shmelkov et al., 2005). HOXA11 je dalším z transkripčních faktorů se zvýšenou expresí u buněk 5967, mohl by regulovat například expresi adhezivních molekul jako je N-CAM (Edelman and Jones, 1995).

Expresе dalších genů kódujících proteiny důležité při procesech angiogeneze a invazivity, která byla podle expresního mikročipu rozdílná, byla dále testována pomocí semikvantitativní RT PCR (sqRT PCR). Také jsme s využitím sqRT PCR zjišťovali, zda u některých transfekovaných buněk neodšlo ke změně exprese vybraných genů.

## 5.2 Metody související s přípravou expresních plazmidů

### 5.2.1 Štěpení restrikčními endonukleázami

Pro analytické účely bylo štěpení prováděno v 10  $\mu$ l celkového objemu restrikční směsi. Na naštěpení 1  $\mu$ g DNA byly použity 2 jednotky restrikčního enzymu. Do reakce byl přidán 1  $\mu$ l 10x koncentrovaného pufru a v případě, že jsem napoužila pufr od firmy fermentas ještě BSA ve výsledné koncentraci 0,1 mg/ml. Pro preparativní účely byl objem reakční směsi zvětšován podle množství štěpené DNA. Teplota použitá při inkubaci a typ pufru odpovídaly doporučením výrobců použitých enzymů. Analytické štěpení probíhalo minimálně 1 hodinu, preparativní minimálně 3 hodiny.

Enzym	Výrobce	Pufr (Výrobce)
BamH I	Fermentas	2 (NEB), R <sup>+</sup> (Fermentas)
EcoR I	Fermentas	O <sup>+</sup> , R <sup>+</sup> (Fermentas)
EcoR V	Fermentas	2 (NEB)
Hind III	Fermentas	2 (NEB), R <sup>+</sup> (Fermentas)
Not I	Fermentas	O <sup>+</sup> (Fermentas)
Sma I	Fermentas	Y <sup>+</sup> (Fermentas)
Spe I	New England Biolabs	2 (NEB)
Xba I	Fermentas	2 (NEB), Y <sup>+</sup> (Fermentas)

Tab.1 Přehled použitých restrikčních endonukleáz a příslušných pufrů

### **5.2.2 Odstranění jednovláknového přesahu nukleázou Mung Bean**

V několika případech klonování bylo nutno použít ligaci tzv. tupých konců DNA. Při odbourávání jednovláknového přesahu byla použita Mung-bean nukleáza. Pro 1-5 µg DNA byl použit 1x koncentrovaný Mung Bean pufru (New England Biolabs) a 20 jednotek Mung Bean nukleázy (New England Biolabs), doplněno vodou tak, aby celkový objem reakční směsi byl 100 µl. Reakce probíhala 1 hodinu při 30°C.

### **5.2.3 Extrakce DNA (fenol-chloroformová extrakce)**

K roztoku DNA přidán pufr 0,5xTE (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 8,0), aby celkový objem byl 360 µl.

Přidáno 40 µl 5 M octanu sodného.

Přidáno 200 µl fenolu (ekvilibrovaného 0,1 M Tris pH 8,0) a 200 µl chloroformu, intenzivně promícháno.

Centrifugace 5 minut při 17 000 g, 4°C.

Odebrána horní fáze. Pokud bylo DNA méně než 10 µg přidán 1 µl glykogenu (5 µg/µl).

Doplněno 96% ethanolem, aby celkový objem byl 1,5 ml, promícháno.

Inkubováno 10 minut při laboratorní teplotě.

Centrifugace 15 minut při 17 000 g, 4°C.

Sediment opláchnut 600 µl 80% ethanolu a usušen při 50°C.

Usušený sediment rozpuštěn v odpovídajícím objemu H<sub>2</sub>O, 0,5xTE nebo ligační směsi dle potřeby.

### **5.2.4 Elektroforéza nukleových kyselin v agarozovém gelu**

Elektroforéza byla prováděna v horizontálním agarozovém gelu, který byl připraven krátkým povařením agarózy v 60 ml elektrodozem pufru TBE (89 mM Tris, 89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA, pH 8,3), přidáno výsledně 0,5 µg/ml ethidium bromid. Množství agarózy odpovídalo požadované hustotě gelu (1-2%) v závislosti na velikosti fragmentu. Vzorky nukleových kyselin byly smíchány s 1/10 objemu vzorkového roztoku (50 mM Tris, 100 mM EDTA, 50% glycerol, 1 mg/ml bromfenolová modř, pH 8,0). Elektroforéza probíhala v TBE pufru 30 až 60 minut při laboratorní teplotě s vloženým napětím 5-10 V/cm.

Nukleové kyseliny byly vizualizovány pomocí ethidium bromide v UV světle.

### 5.2.5 Extrakce DNA z agarozového gelu

Vyříznutý fragment gelu obsahující požadovanou DNA přenesen do 1,5 ml mikrokumavky a rozřezán skalpelem.

Přidáno 400 µl fenolu, krátce centrifugováno při 17 000 g.

Inkubováno ve vodní lázni o teplotě 70-75°C, dokud se gel úplně nerozpustil, intenzivně promícháno.

Přidáno 300 µl pufru 0,5xTE (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 8,0).

Přidáno 30 µl 10 M LiCl.

Promícháno, centrifugace 5 minut při 17 000 g, 4°C.

K odebrané horní fázi přidáno 80 µl LiCl.

Promícháno, inkubováno na ledu 5-10 min, krátce centrifugace minut při 17 000 g.

Přidáno 300 µl fenolu (ekvilibrovaného 0,1 M Tris pH 8,0) a 300 µl chloroformu, intenzivně promícháno.

Centrifugace 5 minut při 17 000 g, 4°C.

Odebrána horní fáze. Pokud bylo DNA méně než 10 µg přidán 1 µl glykogenu (5 µg/µl).

Přidáno 600 µl isopropanolu, inkubováno 10 minut při laboratorní teplotě.

Centrifugace 15 minut při 17 000 g, 4°C.

Sediment opláchnut 600 µl 80% ethanolu a usušen při 50°C.

### 5.2.6 Ligace DNA

DNA izolovaná z agarozového gelu (produkt štěpení restrikcími endonukleázami)

rozpuštěná v 8,2 µl H<sub>2</sub>O

0,5 µl vektorové DNA

1 µl 10x koncentrovaného T4 ligačního pufru (Fermentas)

0,3 µl T4 DNA ligázy (5 jednotek/µl, Fermentas)

Ligace probíhala 2 hodiny 30 minut při laboratorní teplotě.

### 5.2.7 Použité bakteriální kmeny

One Shot® TOP10 *Escherichia coli* -{ F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG>}. Kmen je velmi vhodný pro klonování a zmnožování plasmidů. Výhodami jsou vysoká účinnost transformace, stabilní replikace mnoha kopií, snížená možnost případné nespecifické rekombinace a snadná izolace DNA. Zakoupeno u firmy Promega.

### 5.2.8 Kompletní bohatá půda pro bakteriální buňky

Základ: 10 g trypton

10 g yeast extrakt

5 g casamino acids

Doplněno vodou na celkový objem 1 l, sterilizováno.

Na 450 ml základu přidáno: 25 ml 10% glukózy

25 ml 2 M NaHPO<sub>4</sub>

2,5 ml 2 M KCl

2,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>

### 5.2.9 Transformace kompetentních bakterií

Při molekulárním klonování byly použity bakterie One Shot® TOP10 *Escherichia coli*.

3 µl ligační směsi obsahující ligovanou DNA

60 - 90 µl suspenze transformačně kompetentních bakterií

promícháno a inkubováno 15 minut na ledu

1 minutu při 42°C

2 minuty na ledu

sterilní skleněnou „hokejkou“ rozetřeno na agarovou plotnu s Ampicilinem o průměru 10 cm

inkubováno při 37°C 12-16 hodin

Při klonování do prázdného vektoru byla použita β-galaktosidázová selekce: k ligační směsi přidáno ještě 15 µl 1 M IPTG a 35 µl XGAL.

### 5.2.10 Inokulace bakteriálních kultur

Po inkubaci bylo z agarové plotny inokulováno několik kolonií a přemístěno do zkumavek s 1,25 ml kompletní bohaté půdy.

Bakterie byly inkubovány přes noc na třepačce při 37°C a 250 otáčkách za minutu.

### 5.2.11 Izolace plazmidové DNA alkalickou metodou

1 ml bakteriální suspenze narostlé přes noc centrifugován 20 s při 17 000 g.

Dekantováno, k sedimentu přidáno 100 µl pufru TEG (25 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM glukosa, pH 8,3), intenzivně promícháno.

Přidáno 200 µl roztoku o složení 1% SDS, 0,4 M NaOH, promícháno.



Inkubováno 1 minutu při laboratorní teplotě.

Přidáno 300  $\mu$ l 10 M octanu amonného, intenzívně promícháno.

Inkubováno 5 minut při laboratorní teplotě.

Přidáno 300  $\mu$ l fenolu (ekvilibrovaného 0,1 M Tris pH 8,0) a 300  $\mu$ l chloroformu., intenzívně promícháno.

Centrifugace 5 minut při 17 000 g.

K odebrané horní fázi přidáno 420  $\mu$ l isopropanolu, promícháno.

Inkubováno 10 minut při laboratorní teplotě.

Centrifugace 15 minut při 17 000 g.

Sediment opláchnut 500  $\mu$ l 80% ethanolu a usušen při 50°C.

Usušený sediment rozpuštěn ve 20  $\mu$ l pufru 0,5xTE (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 8,0) + RNasa A (50  $\mu$ g/ml), inkubováno 30 minut při 37°C.

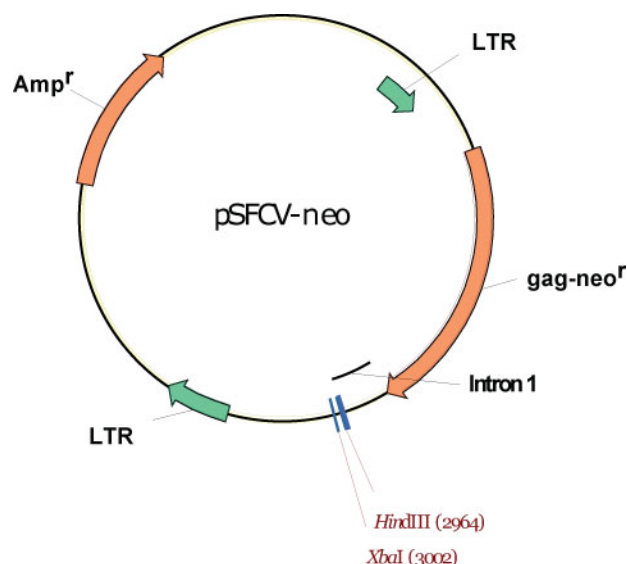
### **5.2.12 Plazmidy použité při molekulárním klonování**

*pGEM-4z*: zakoupen u firmy Promega, kóduje lacZ  $\alpha$ -peptid, ampicilinovou resistenci, obsahuje klonovací region odvozený od pUC18, jenž umožňuje  $\beta$ -galaktosidázovou modrobílou selekci.

*pLitmus29*: zakoupen u firmy New England Biolabs, kóduje lacZ  $\alpha$ -peptid, obsahuje gen kódující ampicilinovou resistenci.

*pBS-5'UTR-BAMBI-FLAG*: získaný od J. Kosly, odvozen od pBS, kóduje fúzní protein BAMBI-FLAG, obsahuje gen pro ampicilinovou resistenci.

*pSFCV*: připraven a popsán v článku Fuerstenberg and Vennström (1993). Obsahuje geny kódující neomycinovou i ampicilinovou resistenci a retrovirové LTR sekvence (Obr. 3).



Obr.3: Restriční mapa retrovirového vektoru pSFCV (Fuerstenberg and Vennstrom, 1993)

### 5.2.13 Sekvence DNA

Protože plazmidová DNA získaná při molekulárním klonování měla být dále využita k transfekci kuřecích buněk, byly správnost sekvence a čtecí rámec ověřeny sekvenací Sangerovou metodou.

1) Sekvenační reakce (10  $\mu$ l)

1  $\mu$ g plazmidové DNA

2  $\mu$ l sekvenačního premixu (Big Dye Terminator v. 3.0, Applera)

0,75  $\mu$ M primeru

Primery použité pro sekvenační reakci:

*Uni* (tzv. M13 univerzální sekvenační primer): CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC

*Rev* (tzv. M13 reverzní sekvenační primer): GCGGATAACAATTTTCACACAGGA

PCR reakce provedeny v celkovém objemu 10  $\mu$ l

1x 98°C 90 s

25cyklů (98°C 10s, 58°C 5s, 60°C 4min)

1x 72°C 10 min

2) Srážení ethanolem (do 100  $\mu$ l)  
10  $\mu$ l octanu sodného 5 M (0,1x objem)  
80  $\mu$ l 0,5xTE (doplnění objemu na 100  $\mu$ l)  
1  $\mu$ l glykogenu  
400  $\mu$ l 96% ethanolu  
srážet 10 min  
centrifigováno 15 min, 17 000 g, 4°C  
opláchnuto 500  $\mu$ l 80% ethanolu  
rozpuštěno ve 25  $\mu$ l HiDi (formamid)  
před sekvenací denaturováno při 92°C po 10 min

### 3) Sekvence

Sekvenováno a analyzováno na přístroji ABI PRISM 310.

#### **5.2.14 Konstrukce expresních plazmidů**

Z výchozího plazmidu byl restrikcími endonukleázami vyštěpen požadovaný fragment, který byl elektroforeticky separován od zbylé DNA. Vektor, do něhož měl být fragment vložen, byl naštěpen stejnými restrikcími enzymy jako vkládaný fragment, aby vznikly stejné konce DNA. Naštěpený vektor byl purifikován fenol-chloroformovou extrakcí.

Purifikované DNA byly smíseny ve vhodném poměru a ligovány T4 DNA ligázou. Výslednou plazmidovou DNA byly transformovány kompetentní bakterie. Několik kolonií transformovaných bakterií bylo odděleně rozmnoženo v tekutém médiu a byla izolována plazmidová DNA. Analytickým štěpením restrikcími endonukleázami bylo zjištěno, které klony obsahovaly požadovaný plazmid. Ten byl potom u vybraných klonů izolován alkalickou metodou.

Názvy plazmidů byly tvořeny z názvu vektoru a názvu proteinu, který je kódován vloženou cDNA, oddělených pomlčkou.

### **Zaklonování kuřecího HOXA11 do pGEM4z:**

1 µl cDNA z buněk 5967-GFP

1x koncentrovaný Pfu pufr (Promega)

3% DMSO

200 µM směs deoxynukleotidtrifosfátů (0,6 µl 10 mM)

0,6 U Pfu polymerázy (Promega)

0,5 µM primery HOXA11atg a HOXA11stop

*HOXA11atg*: GAAGCCGAGGTAGCCCTAATGA

*HOXA11stop*: TCTAGAGTAGTGGATTAGCTGAGTAATA

PCR reakce provedeny v celkovém objemu 30 µl

1x 98°C 90 s

40cyklů (98°C 10s, 50°C 20s, 72°C 2min 40s)

1x 72°C 10 min

Požadovaný DNA fragment kódující protein HOXA11 byl po extrakci z agarozového gelu vyštěpen restriční endonukleázou Hind III a vložen do plazmidu pGEM4z.

Výsledkem je plazmid nazvaný pGEM4z-HOXA11.

### **pSFCV-HOXA11**

Fragment plazmidu pGEM4z-HOXA11 vyštěpený enzymy Xba I a Hind III byl vložen mezi místa Hind III a Xba I plazmidu pSFCV.

Výsledný plasmid pSFCV-HOXA11 byl použit pro transfekci buněk 1259.

### **pBS-HOXA11-FLAG**

Fragment Xba I a Hind III plazmidu pGEM4Z-HOXA11, jehož jednořetězcový přesah vzniklý štěpením Xba I byl zatupen exonukleázou Mung Bean, byl zaměněn za fragment plazmidu pBS-5'UTR-BAMBI-FLAG vzniklý štěpením enzymy Sma I a Hind III. Nový plasmid pBS-HOXA11-FLAG kóduje fúzní protein HOXA11-FLAG.

### **pSFCV-HOXA11-FLAG**

Fragment plazmidu pBS-HOXA11-FLAG vyštěpený Xba I a Hind III byl vložen mezi místa Hind III a Xba I plazmidu pSFCV.

Výsledný plasmid pSFCV-HOXA11-FLAG kóduje celý kuřecí HOXA11 s připojeným epitopem, jehož přesná aminokyselinová sekvence je GGDYKDDDDDKG. Plasmid pSFCV-HOXA11-FLAG byl použit pro transfekci buněk 1259.

### **Zaklonování kuřecího ISL1 do pGEM4z**

1 µl cDNA z buněk 5967-GFP

1x koncentrovaný Pfu pufr (Promega)

3% DMSO

200 µM směs deoxynukleotidtrifosfátů (0,6 µl 10 mM)

0,6 U Pfu polymerázy (Promega)

0,5 µM primery ISL1atg a ISL1stop

*ISL1atg*: AGATATGGGAGACATGGGAGAC

*ISL1stop*: CCTCATGCCTCAATAGGACTGG

PCR reakce provedeny v celkovém objemu 30 µl

1x 98°C 90 s

43cyklů (98°C 10s, 62°C 20s, 72°C 2min)

1x 72°C 10 min

Požadovaný DNA fragment kódující protein ISL1 byl vyříznut z agarózového gelu, po extrakci štěpen restrikční endonukleázou Hind III a vložen do plazmidu pGEM4z.

Získali jsme plasmid pGEM4z-ISL1.

### **pLit29-ISL1**

Fragment plazmidu pGEM4Z-ISL1 vyštěpený enzymy BamH I a Hind III byl vložen mezi místa BamH I a Hind III plazmidu pLit29.

### **pSFCV-ISL1**

Fragment plazmidu pLit29-ISL1 vyštěpený Xba I byl vložen mezi dvě místa Xba I plazmidu pSFCV. Výsledný plasmid pSFCV-ISL1 byl použit pro transfekci buněk 1259.

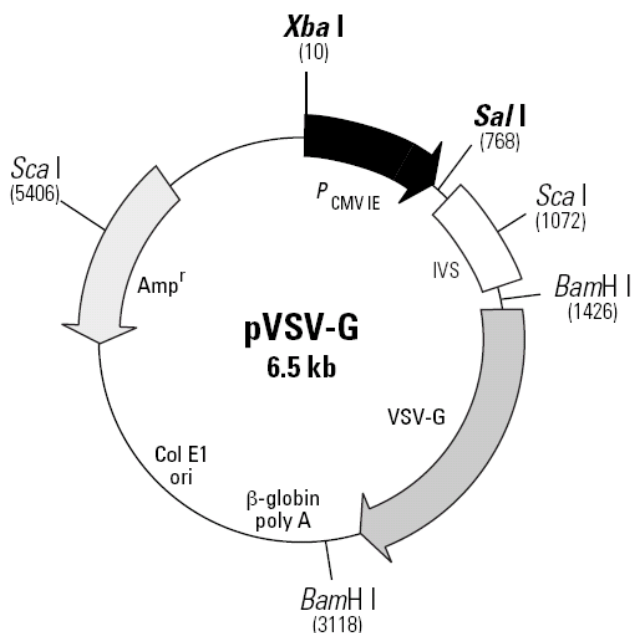
Další plazmidy pSFCV-ARNT2, pSFCV-ARNT2-FLAG, pSFCV-PROM1, které jsme použili pro transfekci buněk byly připraveny J. Koslou.

### 5.3 Tranzientní transfekce s využitím pakážovacího systému AviPack

Pro transfekci buněčných linií 1259 jsme použili pakážovací systém AviPack, jehož vytvoření je popsáno v článku Plachého a kol. 2010 (Plachy et al.).

V buňkách GP2-293 jsou stabilně integrované geny kódující virové proteiny gag a pol, nikoliv však env. Kotransfekcí retrovirálním expresním vektorem pVSV-G (Obr. 4) vnášíme do buněk GP2-293 gen kódující glykoprotein G vesikulárního viru stomatitidy (VSV-G), což u jím následně umožní produkci infekčních replikačně nekompetentních retrovirových částic (Plachy et al.). VSV-G nevyžaduje na rozdíl od env žádný receptor na povrchu cílové buňky, ale interaguje s membránovými fosfolipidy a způsobuje fúzi virové a buněčné membrány (Burns et al., 1993). Oddělená integrace virových genů do pakážovací buněčné linie s použitím minimálních virových sekvencí výrazně omezuje možnost produkce replikačně kompetentních virů při rekombinaci.

Spolu s vektorem pVSV-G jsme buňky transfekovali vektorem pSFCV nesoucím retrovirové pakážovací sekvence, gen pro resistenci vůči neomycinu a vnesený gen kódující námi vybraný protein.



Obr.4: Restriční mapa retrovirálního vektoru pVSV-G (Clontech, Mountain View, CA)

Tranzientní transfekce buněk 1259 byla provedena pomocí kalciumfosfátové metody následujícím způsobem:

4 µg expresního vektoru pSFCV s vloženým příslušným genem

1 µg vektoru pVSV-G

Přidáno 221 µl vody, 25 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> a 250 µl 2x HBS (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,48 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,05).

Promícháno, zcentrifugováno na dno mikrozkušavky a inkubováno 30 minut při laboratorní teplotě. Poté rovnoměrně nakapáno na Petriho misky o průměru 60 mm s buňkami GP2-293 v médiu DMEM s nižším obsahem séra (kapitola).

Po 18 hodinách inkubace při 37°C, v atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub> bylo medium odsáto, buňky opláchnuty třikrát sterilním PBS a v 5ml čerstvého media pak inkubovány za stejných podmínek dalších 24 hod.

Z 60 mm Petriho misek s buňkami 1259 a 5967 bylo odstraněno médium a přidáno kondiciované médium od buněk GP2-293. Buňky GP2-293 byly kultivovány v čerstvém médiu. Médium bylo takto vyměněno ještě dvakrát vždy po 24 hodinách.

K transfekovaným buňkám bylo potom přidáno 100x ředěné antibiotikum G418.

Transfekcí se nám podařilo vytvořit buněčné linie 1259-ISL1, 1259-ARNT2, 1259-PROM1, 1259-ARNT2-FLAG.

Buňky 1259-HOXA11 a 1259-HOXA11-FLAG přežily jen několik dní po transfekci.

## **5.4 Metody spojené s analýzou transkripčního profilu buněk**

### **5.4.1 Izolace RNA**

Buňky všech zkoumaných linií byly pro účely izolace RNA sklíženy z Petriho misky o průměru 100 mm a lyzovány přidáním 1000 µl Trizolu (GIBCO BRL) a protahováním špičkou automatickou pipetou při laboratorní teplotě. Vzniklý lyzát byl přenesen do zkumavek o objemu 1,5 ml a do vlastní izolace RNA byl uchováván v -80°C.

Po rozmrazení vzorků bylo ke každému z nich přidáno 200 µl chloroformu, intenzivně promícháno a inkubováno 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky centrifugovány 15 minut při 17000 g a 4°C odebrána vodná fáze. K vodné fázi bylo přidáno 600 µl isopropanolu, vzorky byly promíchány a inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě. Centrifugovány 15 minut při 17000g a 4°C.

Sediment byl opláchnut 800  $\mu$ l 75% ethanolu a ponechán uschnout při laboratorní teplotě.

Sediment byl rozpuštěn v 50  $\mu$ l vody ošetřené diethylpyrokarbonátem.

Kvalita RNA byla ověřena elektroforézou na nedenujícím 1% agarosovém gelu (0,6 g agarosy v 60 ml pufru TBE + 0,3  $\mu$ g/ml ethidiumbromid). Byl pozorován typický vzorec pruhů rRNA bez zjevné degradace a spektrum molekul mRNA sahalo až do oblasti mnohakilobázových molekul.

RNA byla kvantifikována spektrofotometricky při absorbanci A260 (A260 odpovídá koncentraci 40  $\mu$ g/ml.) a naředěna na výslednou koncentraci 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l.

#### 5.4.2 Reverzní transkripce

Příprava cDNA reverzní transkripcí byla provedena následujícím způsobem:

1,5  $\mu$ g izolované celkové RNA (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l)

2  $\mu$ M primeru 3'-CDS

Doplněno vodou tak, aby celkový objem byl 7,5  $\mu$ l

Inkubováno 2 minuty při 72°C

Inkubováno 2 minuty na ledu

1x koncentrovaný pufr pro M-MLV (Promega)

2 mM směsi deoxynukleotidtrifosfátů

2,25  $\mu$ l vody

150 U reverzní transkriptázy M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Promega)

Inkubováno 1 hodinu 20 minut při 42°C.

cDNA byla doplněna vodou, aby celkový objem byl 70  $\mu$ l.

Skladováno při -82°C.

3'-CDS (25 $\mu$ M) = 3'-RACE cDNA Synthesis Primer:

5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T)<sub>30</sub>N<sub>-1</sub>N-3'

N = A, C, G, T

N<sub>-1</sub> = A, G, C

Byla připravena cDNA z buněk 1259, 5967, 1259-GFP, 5967-GFP, 1259-ISL1, 1259-ARNT2 a 1259-PROM1. Pro PCR byly vybrány vždy dva vzorky cDNA od každé buněčné linie z různých a nezávislých kultivací.



### 5.4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR):

Pro všechny PCR reakce byla namíchána reakční směs podle následujícího vzoru:

PCR reakce provedeny v celkovém objemu 10  $\mu$ l

0,6  $\mu$ l cDNA

0,5  $\mu$ M každého primeru

100  $\mu$ M směsi deoxynukleotidtrifosfátů

1x koncentrovaný Taq pufr (New England Biolabs)

0,08 U Taq DNA polymerasy (New England Biolabs)

3% DMSO (dimethylsulfoxid)

#### Seznam primerů:

Pro GAPDH: *GAPDHs*: CCA TGA CAA CTT TGG CAT TG

*GAPDH*a: TCC CCA CAG CCT TAG CAG

Pro PROM1: *PROM1*a: CGGCAACCCACTGAAATTGGCA

*PROM1*s: CACCTGAGCAACACCCTCAATGA

Pro ARNT2: *ARNT2*s: GCATCAGCGTCATTGGCTACCA

*ARNT2*a: CTGCTGCTGGAGCTGCTTTACA

Pro ISL1: *ISL1*s: GTGGAGGTGCAAAGTTACCAGC

*ISL1*stop: CCTCATGCCTCAATAGGACTGG

Pro HOXA11: *HOXA11*s: GAAATCCGGCAGCTCCAGTGG

*HOXA11*a: GGCGGTCCGGTCAGATTGAGCA

Pro RSPO3: *RSPO3*a: GGAAGGCTGTTAATGTGCAGTG

*RSPO3*s: CAGCTACAAGCGAGAGCAGAAA

Pro CA9: *CA9*s: CACAGGAGATGGGTTCTGGCAA

*CA9*a: CCGCTGTGTAGATGACCTTGGA

Pro FLT1: *FLT1*s2: CGCTTCACGTGGACAGGCAGC

*FLT1*a: CTTAGCCCAGAAACACTCAAATGG

Pro FN1: *FN1*a: TGACCACTGCCAAAGCCTAAGC

*FN1*s: GCCAACCAGTCAGCCAGGATG

Pro NRP1: *NRP1*s: ACCATGGATTGGGGACTTTTCCTGC

*NRP1*a: TTAGGAAACAGTAGGGACAGCCG

Pro TGF- $\beta$ 2: *TGFB2*s: CAGAGCTGCCACTTGCGAGA

*TGFB2*a: GCTGTCAATGTAACGCTGTCCTG

Pro LOXL1: *LOXL1s*: GGAATTACGTCCTAAAGGTCCAAG  
*LOXL1a*: CTCTGGATAATGTGAAGCAGTCAG  
Pro IL-1 $\beta$ : *IL1Bs*: GCCATGGCGTTCGTTCCCGACC  
*IL1Ba*: GTTGGAGCGGGCAGTCAGCG  
Pro VEGFA: *VEGFs*: ACCATGAACTTTCTGCTCACTTGG  
*VEGFa2*: CACCGTCTCGGTTTTTTCACATC

PCR reakce provedeny vždy v celkovém objemu 10  $\mu$ l.

Pro reakce byly na přístroji PTC-200 firmy MJ Research použity tyto programy:

Pro GAPDH: 1x 98°C 90 s  
19 cyklů (98°C 10s, 63°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

Pro PROM1: 1x 98°C 90 s  
32 cyklů (98°C 10s, 63°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

Pro ARNT2: 1x 98°C 90 s  
35 cyklů (98°C 10s, 63°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

Pro ISL1: 1x 98°C 90 s  
40 cyklů (98°C 10s, 63°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

Pro HOXA11: 1x 98°C 90 s  
35 cyklů (98°C 10s, 50°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

Pro RSPO3: 1x 98°C 90 s  
29 cyklů (98°C 10s, 60°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

Pro CA9: 1x 98°C 90 s  
29 cyklů (98°C 10s, 62°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

Pro FLT1: 1x 98°C 90 s  
31 cyklů (98°C 10s, 58°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

Pro FN1: 1x 98°C 90 s  
28 cyklů (98°C 10s, 62°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

Pro NRP1: 1x 98°C 90 s  
29 cyklů (98°C 10s, 63°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

Pro TGF-  $\beta$ 2: 1x 98°C 90 s  
29 cyklů (98°C 10s, 62°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

Pro LOXL1: 1x 98°C 90 s  
32 cyklů (98°C 10s, 62°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

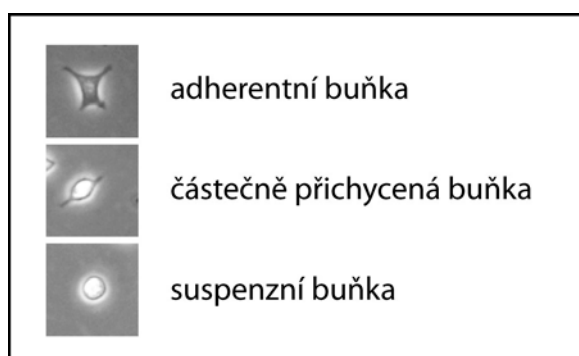
Pro IL-1 $\beta$ : 1x 98°C 90 s  
35 cyklů (98°C 10s, 62°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

Pro VEGFA: 1x 98°C 90 s  
30 cyklů (98°C 10s, 60°C 20s, 72°C 40s)  
1x 72°C 10 min

## 5.5 Metody používané při charakterizaci fenotypu buněčných linií

### 5.5.1 Test adhezivních vlastností buněk

Adhezivní vlastnosti jednotlivých buněčných linií byly studovány na Petriho miskách o průměru 60 mm potažených kolagenem, fibronectinem a na čistých nepotažených miskách. Na každou misku bylo vyseto po  $2 \times 10^5$  buněk. Po 24 hodinách bylo digitální kamerou (Leica DFC420) vyfotografováno několi reprezentativních míst na každé misce. Následně byly na fotografiích z přibližně 1500 buněk spočítány adherentní buňky (ploché, přisedlé), suspenzní buňky (kulovité, plovoucí) a buňky částečně přichycené k podkladu (kulovité s výběžky přichycenými k podkladu) (obr. 5). Jejich vzájemný poměr byl vyjádřen v procentech.



Obr. 5: Buňky typické pro různé kategorie podle jejich adhezivity.

Příprava misek potažených kolagenem a fibronectinem:

Kolagen:

1) Směs pro 3 Petriho misky o průměru 6 cm podle následujícího schématu

480  $\mu$ g kolagenu (Sigma C3867-IVL)

4800  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

2) Směs byla rozplněna po 1600  $\mu$ l do každé misky. Misky byly uchovávány v chladu.

3) Následující den byla směs s kolagenem z misek odebrána, povrch misek se nechal uschnout, následně bylo přidáno 5 ml PBS a misky byly opět uskladněny v chladu.

4) Odebraná směs s kolagenem byla napipetována na další 3 misky, které byly opět minimálně 24 hodin skladovány v chladu a opakovat se postup uvedený v bodě 3).

Fibronektin:

1) Směs pro 3 misky byla namíchána podle tohoto schématu:

120 µg fibronektinu (Sigma, F1141-IMG)

4000 µl PBS

2) Směs byla rozplněna po 1320 µl do každé misky. Misky byly uchovávány v chladu.

3) Další den byla směs s fibronektinem z misek odebrána a ihned přidáno 5 ml PBS. Misky byly opět uskladněny v chladu.

4) Odebraná směs s fibronektinem byla napipetována na další 3 misky, které byly opět minimálně 24 hodin skladovány v chladu a opakoval se postup uvedený v bodě 3).

Před vysetím buněk byl z připravených misek s povrchem potaženým kolagenem nebo fibronektinem odebrán PBS. Do těchto misek a misek s nepotaženým povrchem bylo následně napipetováno 5 ml nového média a vyseto  $2 \times 10^5$  buněk.

### 5.5.2 Počítání buněk a sestavení růstové křivky

Buňky byly počítány na přístroji CASY cell counter. Program počítá s ředěním 200x. Buňky byly stočeny na centrifuze při 200g a resuspendovány v 1 ml média. 25 µl suspenze buněk bylo přidáno do zkumavky s 5 ml roztoku Hemosol, lehce promícháno a změřeno.

Na plastovou Petriho misku o průměru 10 cm bylo vyseto  $2 \times 10^6$  buněk. Buňky byly kultivovány 72 hodin za standardních podmínek uvedených v kapitole 5.1.3 a poté spočítány. Na novou Petriho misku bylo vyseto opět po  $2 \times 10^6$  buněk. Pro každé testované buňky byla provedena čtyři měření, podle nichž byly sestaveny růstové křivky.

### 5.5.3 CAM test

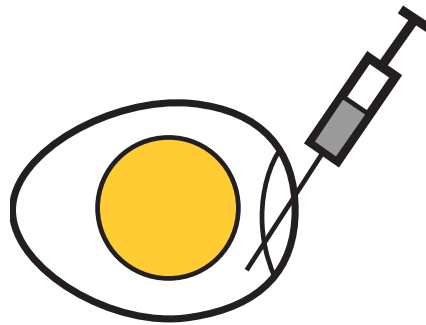
Všechny pokusy probíhaly na kuřecích embryích hejna Brown Leghorn outbred.

1) Oplozená vejce byla vložena do líhně s automatickým naklápěním a inkubována za standardních podmínek při 37°C a 50% vlhkosti.

2) 3. den inkubace vytváříme „okénka“. Vejce musí alespoň 3 - 4 hodiny před tím ležet v takové poloze, aby bylo místo budoucího okénka navrchu (embryo s membránou se přesune přímo pod toto místo). Tužkou si předkreslíme obrysy budoucího okénka (asi 1,5 x 2 cm). Vejce otřeme 80% ethanolem, abychom snížili riziko případné infekce.

3) Na tupém konci vejce bruskou ztenčíme skořápku. Injekční stříkačkou prorazíme v tomto místě otvor, jehlu vedeme opatrně tak, abychom nezasáhli žloutek (viz obr. 6), a odsajeme

asi 3 – 4 ml bílku. Tím docílíme toho, že CAM s embryem poklesne a vznikne tak prostor pro budoucí manipulaci a také zabráníme případnému poškození embrya či CAM při vyřezávání okénka.



Obr. 6: Jehlu vedeme tupým koncem velce přes vzduchovou bublinu opatrně, abychom nezasáhli žloutek.

4) Bruskou s kotoučkem opatrně ztenčíme skořápku v obrysech budoucího okénka, které jsme si předkreslili tužkou. Špičkou skalpelu potom prořízneme blánu a odstraníme skořápku.

5) Pokud je embryo v pořádku, můžeme okénko zakrýt. Používáme buď lepicí pásku nebo sklíčko připevněné rozeřtým prafínem. Výhodou použití lepicí pásky je rychlé provedení, což je užitečné, když potřebujeme zpracovat více vzorků. Použití sklíčka je trochu časově náročnější, ale umožňuje kdykoliv zkontrolovat vyvíjející se embryo (obr.7). Otvor po odsátí bílku zakryjeme buď kouskem lepicí pásky nebo zalijeme rozeřtým parafínem. Pracujeme, jak nejsterilněji je to možné.



Obr. 7: Vejce se skleněným okénkem - 3. den inkubace

6) Vejce vložíme do líhne okénkem nahoru a necháme inkubovat.

7) 8. den inkubace vkládáme implantáty. Pro umístění vzorku používáme Gelaspon (želatinová porézní houbička, k dostání v lékárnách) nastříhaný na kousky o velikosti

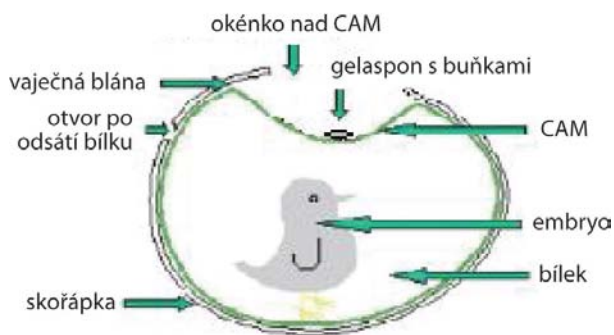
přibližně 1 mm<sup>3</sup>. Kousky Gelasponu si připravíme do zkumavek a napipetujeme na ně přibližně 10<sup>6</sup> buněk v 15 µl média, které používáme ke kultivaci, avšak bez přidání séra (neboť sérum je samo o sobě angiogenní). Jako negativní kontroly jsme při pokusech použili Gelaspon s médiem bez séra a Gelaspon s embryonálními fibroblasty (protože testované buňky byly všechny mezenchymálního původu).

8) Vejce přeneseme do tkáňového boxu nebo alespoň do místnosti předem vyzářené UV světlem a odkryjeme okénko. Sterilní pinzetou opatrně vložíme implantát na CAM na místo, kde nevede žádná céva, aby byly dobře rozeznatelné nové cévy vedoucí k implantátu (nejlépe uprostřed mezi dvě větší cévy). Výhodné je umístit inzert dále od skořápky, neboť kvůli růstu a pohybům embrya může být inzert snadno odsunut ke skořápce, kde se snadno přichytí. Okénko opět zakryjeme a vejce vrátíme do inkubátoru.

9) 11. den inkubace je pozorovatelná případná angiogenní reakce. Celá vejce s odkrytým okénkem pozorujeme pod lupou a fotografujeme CAM s implantátem pomocí digitální kamery (Leica DFC420).

10) Pokud chceme sledovat další růst nádorů a případné invazivní chování buněk, vejce opět vrátíme do inkubátoru. Další dny se již uspořádání cév v CAM téměř nemění.

11) 17. den inkubace můžeme zkoumat, jestli se primární ložiska zvětšila a jestli se na CAM vytvořila další nádorová ložiska. Jsou-li buňky značené GFP, můžeme je sledovat s využitím fluorescence. Opět pořizujeme fotografie pro další vyhodnocování.



Obr. 8: Schéma provedení CAM testu, převzato a upraveno podle (Laurin et al., 2004)

#### 5.5.4 Izolace a fixace vzorků

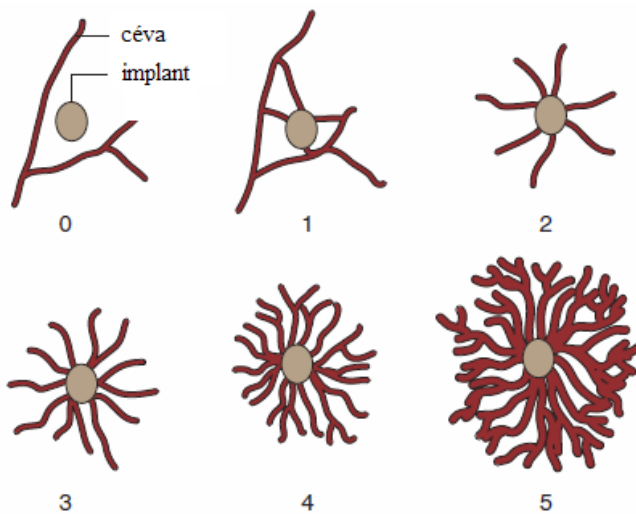
CAM s inzertem byla vystřižena a opláchnuta v PBS. Z usmrcených kuřecích embryí byla odebrána játra, plíce a slezina. Odebrané orgány spolu s CAM byly vloženy

do zkumavky se 4% paraformaldehydem, takto byly odeslány k imunohistochemickému zpracování do Fingerlandova ústavu patologie v Hradci Králové.

Řezy byly barveny eosinem a hematoxylinem a také protilátkou GFP (B-2): sc-9996 konjugovanou s křenovou peroxidázou, abychom mohli detekovat buňky, které invadovaly do tkání.

### 5.5.5 Vizuální analýza angiogeneze z fotografií

Angiogenní reakci u jednotlivých vzorků jsem hodnotila z fotografií pořízených 11. den embryonálního vývoje (tedy 3. den po vložení implantátu) podle uspořádání a hustoty nových cév v okolí implantátu bodovým skóre od 0 do 5 popsáném v článku Folkman a Cotran, 1976. Skóre 0 znamená žádnou změnu cévní sítě v okolí vzorku, +1 značí malé zvýšení počtu cév vedoucích k implantátu, +2, +3, +4 a +5 potom znamenají postupné zvyšování počtu cév a změnu směru jejich růstu k implantátu (obr. 9) (Folkman and Cotran, 1976).



Obr. 9: Makroskopické hodnocení angiogenní reakce semikvantitativním bodovým hodnocením (převzato a upraveno podle Ribatti et al., 2006).

### 5.5.6 Analýza nádorových ložisek na CAM z fotografií

Fotografie byly pořízeny ve formátu tif při zvětšení 7,11x (nejmenší možné zvětšení na přístroji). Rozměry primárních ložisek a vzdálenost jednotlivých sekundárních ložisek jsem změřila pomocí programu ImageJ a přepočítala na hodnoty vyjádřené v mm případně  $\text{mm}^2$  (rozměry sekundárních ložisek byly zanedbatelné a neměly žádnou výpovědní hodnotu).



## 6. VÝSLEDKY

### 6.1 CAM test

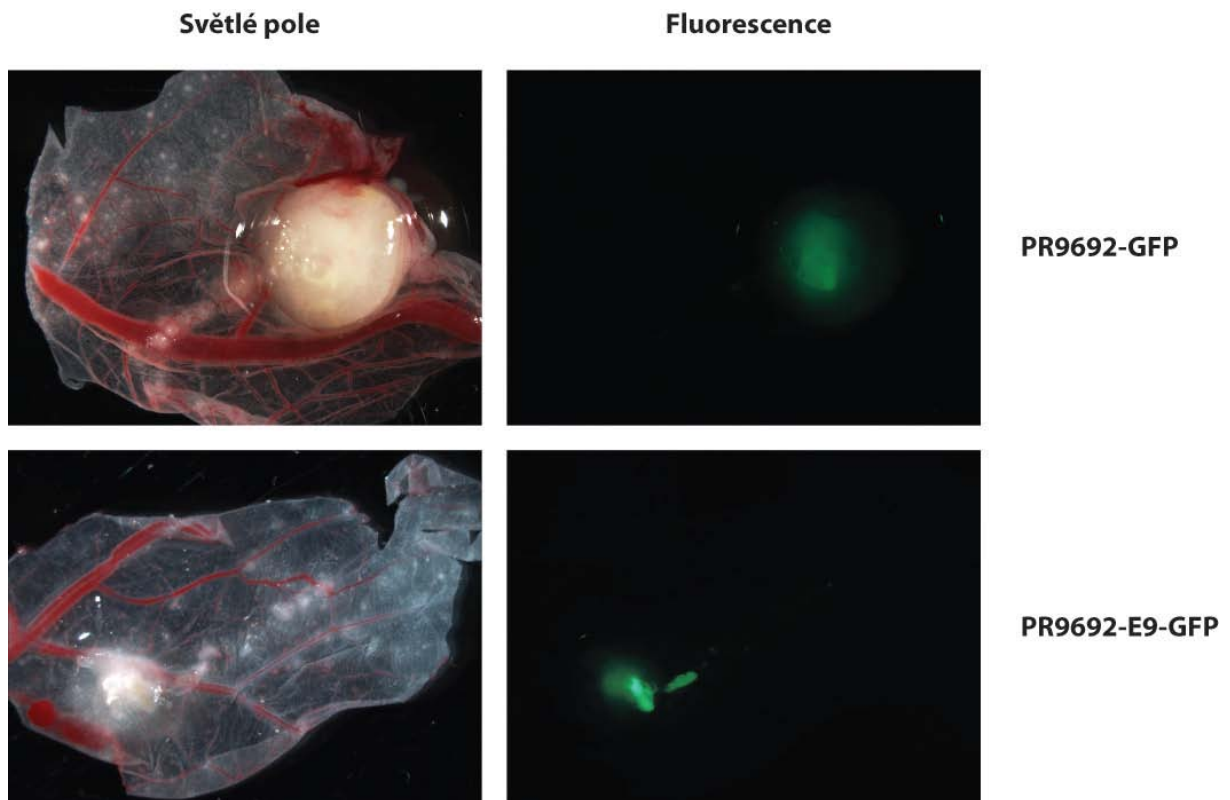
Jedním z cílů této diplomové práce bylo vypracování postupu provedení CAM testu v podmínkách naší laboratoře, což se podařilo a výsledkem je pracovní protokol uvedený v kapitole 5.5.3. Jako materiál nosiče pro vložení vzorku jsme zvolili želatinu. Využili jsme velmi snadno dostupný a levný Gelaspon (k zakoupení v lékárnách), což je porézní houbovitý materiál ze 100% želatiny. Jak již bylo uvedeno, želatina je imunitním systémem kuřecího embrya velmi dobře snášena (Ribatti et al., 1997).

V rámci optimalizace a zavedení CAM testu jsme jej nejprve vyzkoušeli u již dobře popsanych a přes 10 let kontinuálně kultivovaných kuřecích buněčných sarkomových linií PR9692 a PR9692-E9 (Svoboda et al., 1992). Do obou linií byl V. Čermákem pomocí pakážovací buněčné linie KUNDRA (Cosset et al., 1990) vnesen gen kódující GFP (stejným způsobem jako gen *egr1* viz. Čermák et al), čehož jsme využili pro detekci buněk na CAM a v orgánech embrya.

U obou buněčných linií byly 9. den po vložení implantátu na membráně dobře pozorovatelná primární a většinou i několik sekundárních ložisek. Pomocí lupy a digitální kamery jsme pořídili fotografie membrán s implantáty (obr. 10 a 11). Izolované a fixované membrány spolu s dalšími orgány embryí (játra, plíce, slezina) byly odeslány do Fingerlandova patologického ústavu k nařezání a histochemickému a imunohistochemickému barvení. Nádorové buňky jsme na řezech detekovali pomocí protilátky proti GFP. Oba typy buněk vyvolávaly na CAM přibližně stejně silnou angiogenní reakci (obr. 11).

Nádory vytvořené buňkami PR9692-GFP byly obecně větší (plocha 20 až 100 mm<sup>2</sup>) než u buněk PR9692-E9-GFP (plocha 10 až 30 mm<sup>2</sup>), což bylo v souladu s našim očekáváním, neboť buňky PR9692 proliferují v kultuře rychleji.

PR9692-GFP i PR9692-E9-GFP tvořily na CAM přibližně stejné množství sekundárních ložisek (obvykle 5 až 10). Ačkoliv PR9692-E9 netvoří u kuřat metastázy, na některých CAM se objevila sekundární nádorová ložiska vzdálená od primárního nádoru. To může být způsobeno tím, že imunitní systém kuřecího embrya je v době vkládání implantátu jen minimálně vyvinutý, a také protože bohaté cévní zásobení CAM vytváří velmi příznivé prostředí pro nádorové buňky.



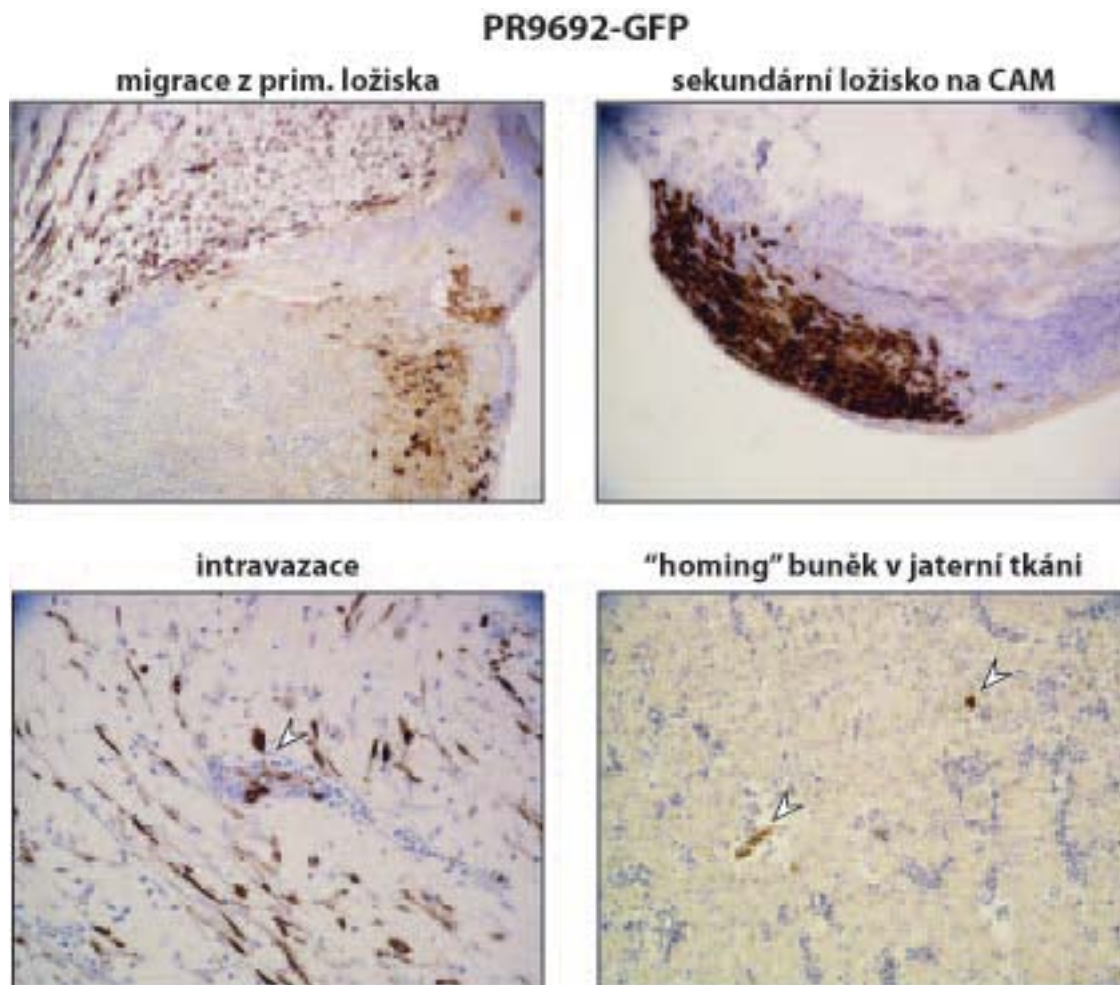
Obr. 10: Izolované chorioalantoidální membrány 9 dní po vložení implantátu (17. den embryonálního vývoje). Zvětšeno 7,11x. Primární nádory tvořené buňkami PR9692-GFP byly typicky větší než u buněk PR9692-E9-GFP.



Obr. 11: CAM 3. den po vložení implantátu. U buněk PR9692 a PR9692-E9 nebyl patrný žádný rozdíl v angiogenezi. Zvětšeno 7,11x.

Na histologických řezech barvených protilátkou proti GFP jsme byly schopni sledovat všechny kroky metastatického procesu. Detekovali jsme buňky, které unikaly z míst primárního ložiska, buňky vstupující do cévního řečiště, migrující v cévách, vystupující z cévního řečiště i buňky které se dostaly z cévy daleko do tkání orgánů embrya (obr. 12).

Zda jsou buňky, které se dostaly do orgánů embrya schopné zde vytvořit další sekundární nádory, jsme nemohli zjistit, neboť celý proces od vložení inzertu po izolaci tkání je kvůli délce embryonálního vývoje kuřete omezen na pouhých 9 dní.



Obr. 12: Různá stádia metastatického procesu zachycená na histologických řezech. Nádorové buňky jsou značeny protilátkou proti GFP (hnědé). Snímek v levém horním rohu je zvětšen 12,5x, ostatní snímky 25x.

## 6.2 Expresní plazmidy

Pro účely transfekce buněk jsem vytvořila tyto expresní plazmidy:

pSFCV-HOXA11 kódující kuřecí protein HOXA11.

pSFCV-HOXA11-FLAG, který kóduje celý kuřecí protein HOXA11 s připojeným epitopem FLAG, jehož přesná aminokyselinová sekvence je GGDYKDDDDKKG.

pSFCV-ISL1, který kóduje kuřecí protein ISL1.

Další plazmidy pSFCV-ARNT2, pSFCV-ARNT2-FLAG a pSFCV-PROM1, které jsme použili pro transfekci buněk byly připraveny J. Koslou.

## 6.3 Stabilně transfekované buněčné linie

Metodou kalciumfosfátové transfekce s využitím pakažovacího systému AviPack (Plachy et al.) a plazmidů uvedených v kapitole 5.1 se nám podařilo úspěšně vytvořit stabilně transfekované buněčné linie 1259-ISL1, 1259-ARNT2, 1259-ARNT2-FLAG a 1259-PROM1.

Buňky 1259-HOXA11 a 1259-HOXA11-FLAG velmi špatně proliferovaly a přežívaly jen několik dní po transfekci, proto nebyly použity pro další plánované pokusy.

## 6.4 Charakterizace studovaných buněčných linií

### 6.4.1 Srovnání buněčných linií 1259 a 5967 vs. 1259-GFP a 5967-GFP

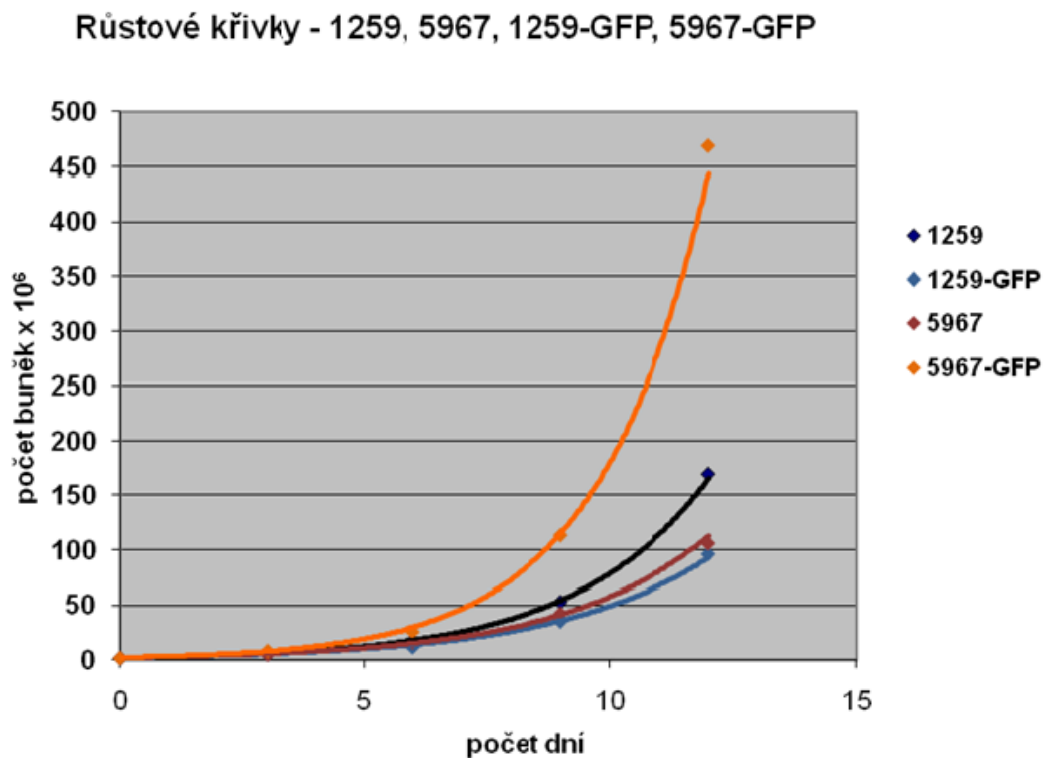
Pokud by DNA sekvence kódující GFP byla zaintegrována do nějaké klíčové oblasti DNA, mohlo by dojít ke změně buněčného fenotypu. Abych zjistila, jestli k tomu nedošlo, porovnávala jsme buňky 1259 a 5967 s jejich protějšky značenými GFP.

Sledovala jsem, jestli neznačené a značené buňky vyvolávají přibližně stejnou angiogenní reakci (kapitola 6.4.5), jaké jejich invazivní chování na CAM (kapitola 6.4.6), sestavila jsem růstové křivky (kapitola 6.4.2), porovnávala jejich adhezivní vlastnosti na různých površích (kolagen, fibronectin a nepotažený povrch Petriho misky; kapitola 6.4.4) a také jsem zjišťovala, zda nedošlo ke změně exprese genů, které jsme si zvolili ke studiu (kapitola 6.4.3).

## 6.4.2 Růstové křivky

### 6.4.2.1 1259 a 5967 vs. 1259-GFP a 5967-GFP

Při kultivaci buněk pro účely různých pokusů bylo na první pohled zřejmé, že buňky 5967 i 5967-GFP proliferovaly mnohem rychleji než 1259 a 1259-GFP. U buněk 1259 a 1259-GFP mají růstové křivky přibližně stejný průběh. V průběhu posledních pokusů však došlo u buněk 5967 k výraznému zpomalení růstu na úroveň srovnatelnou s 1259 a 1259-GFP (obr. 13), což bylo pravděpodobně způsobeno spontánní selekcí pomaleji rostoucích klonů.

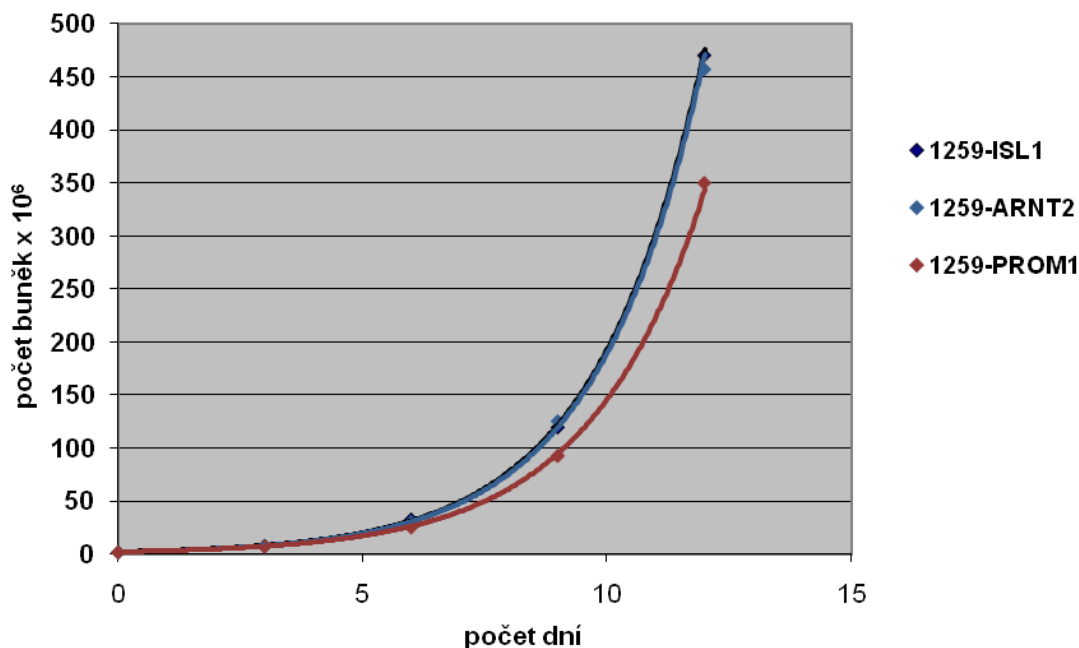


Obr. 13: Růstové křivky - původní buňky značené a neznačené GFP

### 6.4.2.2 1259-ISL1, 1259-ARNT2 a 1259-PROM1

U všech testovaných transfekovaných buněk jsme pozorovali výrazné zvýšení proliferace, zejména u 1259-ISL1 a 1259-ARNT2.

### Růstové křivky - 1259-ISL1, 1259-ARNT2, 1259-PROM1



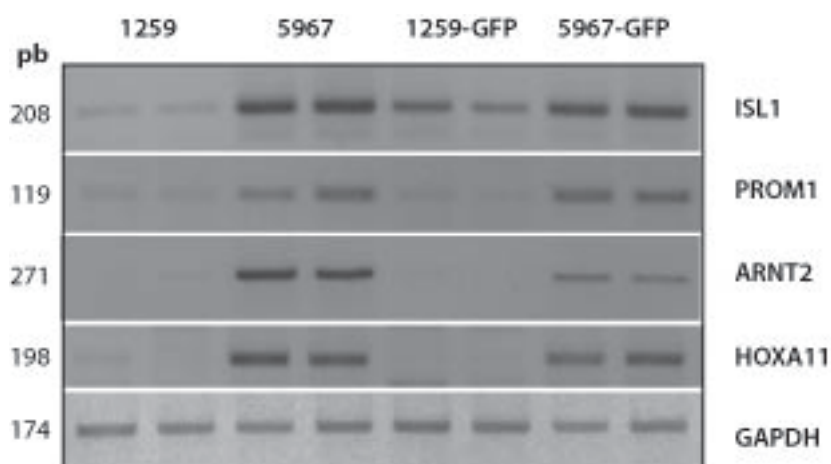
Obr. 14: Růstové křivky – transfekované buňky

Pro buňky 1259-ARNT2-FLAG se nepodařilo sestavit růstovou křivku, neboť přežívaly jen velmi krátkou dobu a nestačila jsem provést potřebný počet měření. Během kultivace těchto buněk bylo zřejmé, že proliferují pomaleji než 1259-ARNT2-FLAG.

### 6.4.3 Porovnání exprese vybraných genů pomocí metody sqRT PCR (semikvantitativní RT PCR)

#### 6.4.3.1 1259 a 5967 vs. 1259-GFP a 5967-GFP

Pomocí sqRT PCR jsme potvrdili, že geny kódující ISL1, PROM1, ARNT2 a HOXA11 jsou u buněk 5967 silněji exprimované než u buněk 1259. Také jsme ověřili, že vnesení GFP do buněk nemělo na úroveň exprese těchto vybraných genů žádný vliv a rozdíly mezi oběma liniemi zůstaly zachovány (Obr. 15).



Obr. 15: Expres vybraných genů u buněk 1259 a 5967 vs. 1259-GFP a 5967-GFP

#### 6.4.3.2 Trankripční profil buněk 1259, 5967 a transfektantů

Kromě již zmíněných genů pro ISL1, PROM1, ARNT2 a HOXA11 jsou u agresivnějších metastázujících nádorových buněk 5967 zvýšeně exprimovány další různé geny, které souvisejí s angiogenezí, hypoxií, proliferací či buněčnou invazivitou. Zatím jsme pomocí metody sqRT PCR otestovali několik genů, jejichž zvýšenou expresi u 5967 naznačovala analýza na expresním mikročipu (obr. 16).

Stručná charakteristika testovaných genů a jejich potenciální význam pro nádorové buňky je popsán na následujících řádcích.

CA9 (carbonic anhydrase 9) je jediným izoenymem z rodiny CA, který byl identifikován pouze u nádorových buněk. Stejně jako ostatní proteiny této rodiny katalyzuje reverzibilní hydrataci  $\text{CO}_2$ . CA9 je výrazně indukována hypoxií u řady nádorových buněčných linií (Wykoff et al., 2000) a bylo zjištěno, že stimuluje buněčnou migraci a invazivitu při metastázování u mnoha typů nádorů (Shin et al.).

RSPO3 (R-spondin 3) je sekretovaný protein, který podporuje proliferaci endoteliálních buněk a reguluje angiogenezi během embryonálního vývoje (Kazanskaya et al., 2008).

VEGFA je klíčovým mediátorem angiogeneze, jeho cílem jsou zejména endoteliální buňky, podporuje jejich růst a migraci, stimuluje aktivitu matrixových metaloproteináz a inhibuje apoptózu. VEGFA zprostředkovává angiogenezi skrze interakci s transmembránovými receptory VEGFR1 a VEGFR2. VEGFA také může interagovat s NRP1 (Mamluk et al., 2002; Soker et al., 1998).

Flt1 (fms-related tyrosine kinase 1, též VEGFR1) patří mezi transmembránové receptorové tyrosin kinázy a je receptorem pro VEGF (de Vries et al., 1992).

FN1 (fibronectin 1), velký transmembránový dimerní protein, který se váže k integrinům a komponentám extracelulární matrix, má klíčový význam pro buněčnou adhezivitu, růst, migraci a diferenciaci (Pankov and Yamada, 2002). Zvýšená exprese fibronektinu 1 byla zjištěna u mnoha typů nádorů (Abeysinghe et al., 2005; Engbring et al., 2008; Huang and Chakrabarty, 1994; Mitra et al., ; Nanki et al., 2001; Ruiz-Garcia et al., ; Thomas et al., ; Waalkes et al.).

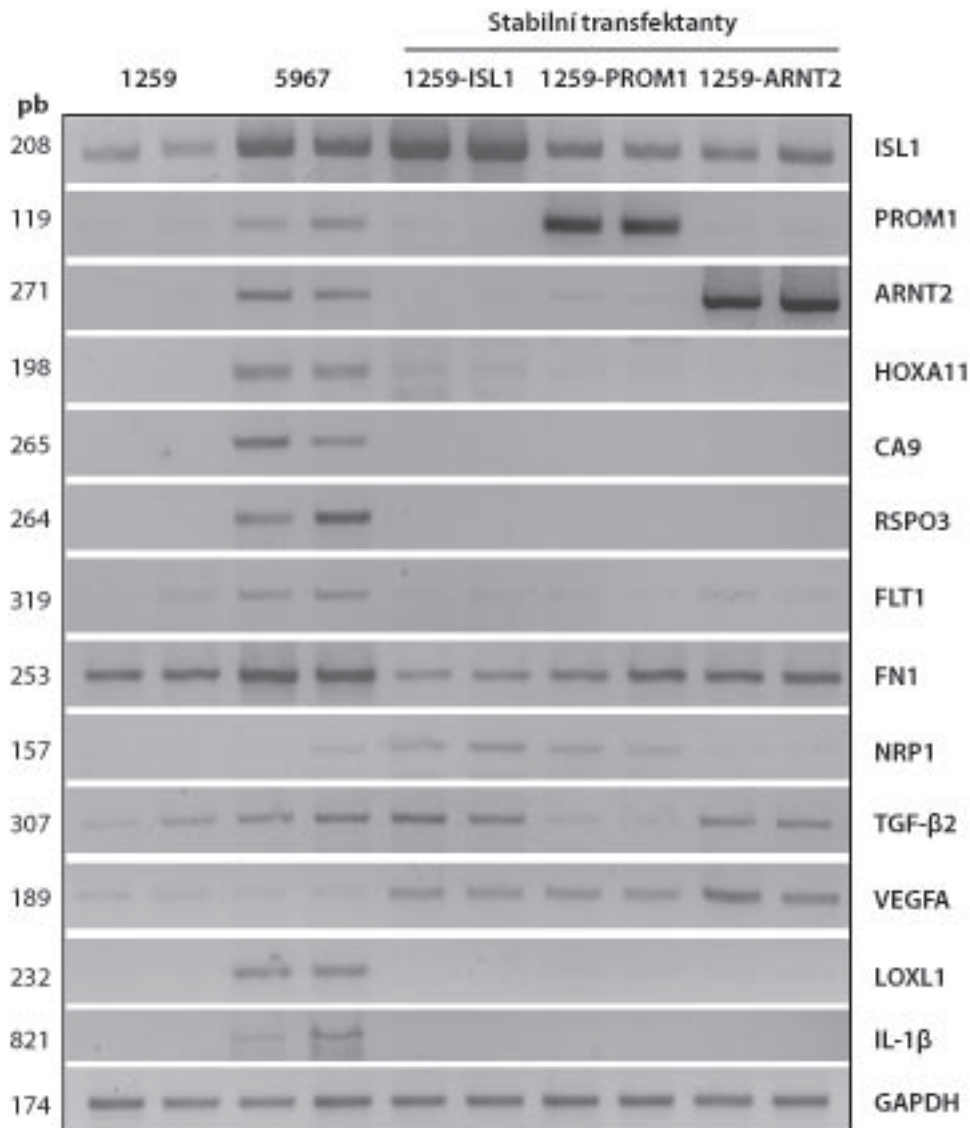
NRP1 je jedním z transmembránových receptorů pro VEGF (Soker et al., 1998) a některé další pro-angiogenní cytokiny včetně proteinů rodiny FGF a HGF (Sulpice et al., 2008). Také interaguje s PDGF-B a TGF- $\beta$ 1 (Banerjee et al., 2006; Glinka and Prud'homme, 2008). NRP1 může přispívat k nádorové angiogenezi a je zvýšeně exprimován u řady rakovin, zejména v pokročilejších stádiích (Bagri et al., 2009).

TGF- $\beta$ 2 (Transforming growth factor- $\beta$ 2) je sekretovaný cytokin, který je klíčový pro přežití buněk a účastní se mnoha procesů jako je růst a zánětlivá reakce (Clark and Coker, 1998). Při testování na CAM Roberts a Sporn popsali angiogenní reakci vyvolanou TGF- $\beta$ 2 (Roberts and Sporn, 1989).

LOXL1 (lysyl oxidase-like 1) interaguje s extracelulární matrix a katalyzuje propojování kolagenových a elastinových vláken (Thomassin et al., 2005).

IL-1 $\beta$  je prozánětlivý cytokin, který se účastní buněčných procesů, jako je proliferace, diferenciace a apoptóza, ale také byla prokázána jeho souvislost s řadou nádorových onemocnění (He et al.).





Obr. 16: Transkripční profil buněk 1259, 5967 a transfekovaných buněk. Geny důležité pro angiogenezi a další procesy související s nádorovou progresí jsou silněji transkribované u buněk 5967 než u 1259.

U většiny genů sqRT PCR potvrdila výsledky z expresního mikročipu. Exprese VEGFA však překvapivě vyšla stejná u 1259 i 5967.

Zajímalo nás, zda u některých dalších testovaných genů nedošlo ke změně transkripce u transfekovaných buněk oproti výchozím 1259. Většina genů zůstala na přibližně stejné úrovni, ale ve všech případech došlo k nárůstu VEGFA, což je v souladu se zvýšenou angiogenezí při CAM testech u všech transfektantů.

U buněk 1259-ISL1 je kromě VEGFA patrná vyšší transkripce NRP1, TGF- $\beta$  2 a náznak zvýšení transkripce u HOXA11. NRP1 byl také vyšší u 1259-PROM1, zatímco TGF- $\beta$ 2 vzrostl u 1259-ARNT2.

#### **6.4.4 Adhezivní vlastnosti**

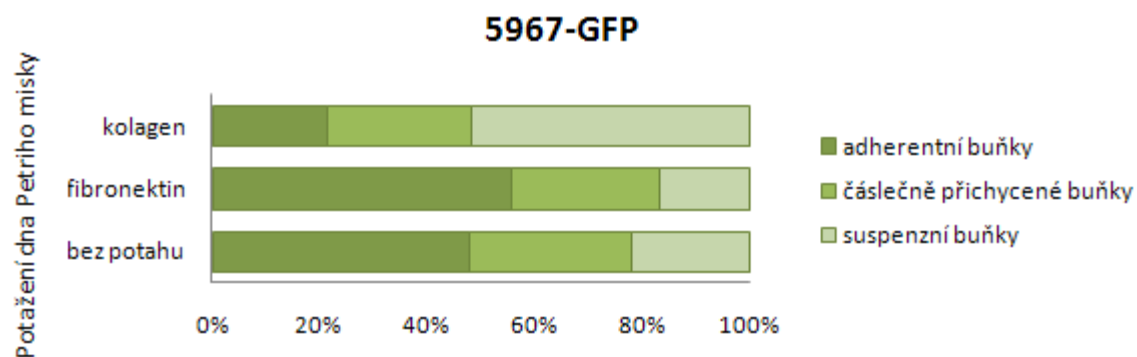
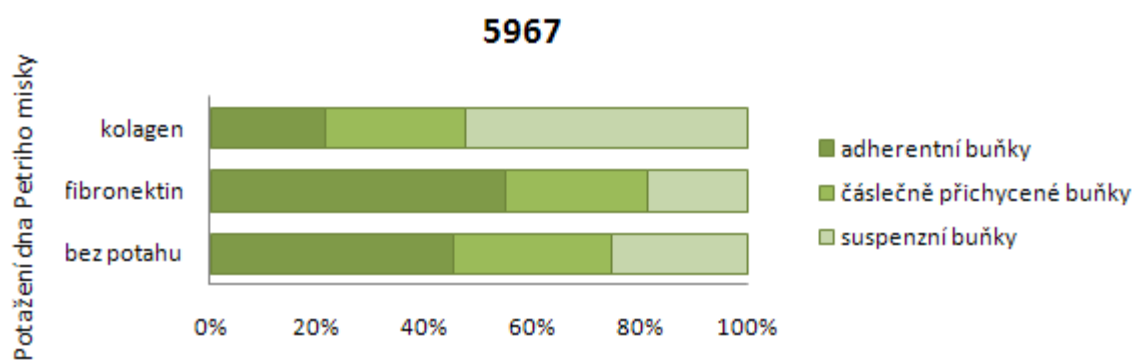
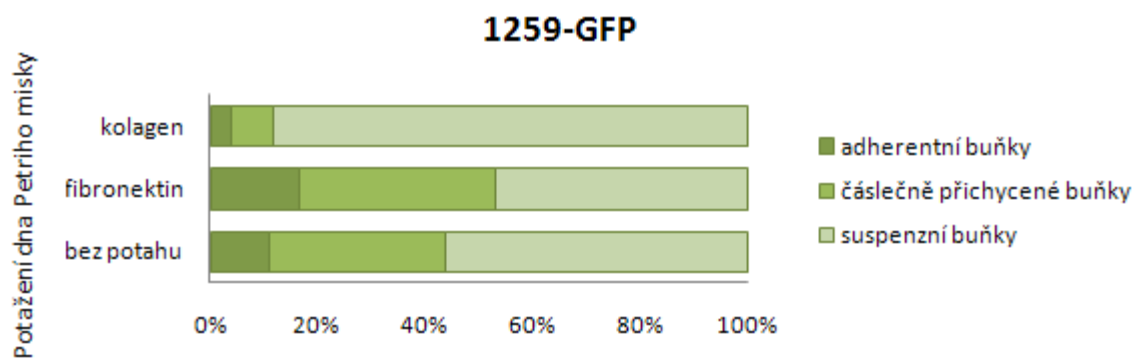
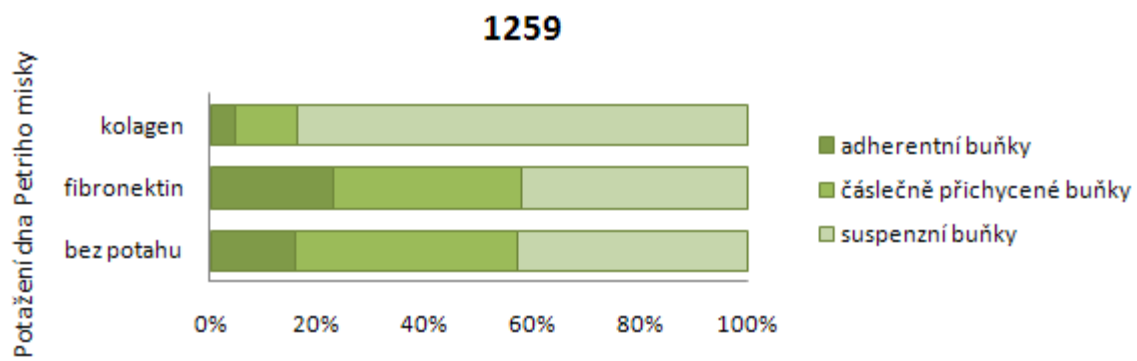
Buňky 5967 byly adhezivnější ke všem testovaným povrchům (kolagen, fibronectin, dno Petriho misky bez potahu) než buňky 1259, které byly v kultuře spíše suspenzní a často tvořily plovoucí shluky několika buněk. Adhezivní vlastnosti zůstaly v přibližně stejné míře zachovány i u 1259-GFP a 5967-GFP, z čehož jsme usoudili, že vnesení GFP do buněk tyto vlastnosti nijak neovlivnilo. Obecně všechny buňky nejvíce adherovaly k povrchu potaženému fibronectinem.

U buněk 1259-ISL1 došlo k výraznému nárůstu adhezivity ke všem povrchům, přičemž většina buněk v kultuře byla adherentní. O proteinu ISL1 je již známo, že jeho zvýšená exprese vede k nárůstu buněčné adhezivity, zejména k fibronectinu (Barzelay et al.).

O něco menší než u 1259-ISL1, ale přeci jen výrazné bylo zvýšení adhezivních schopností u buněk 1259-ARNT2, které bylo srovnatelné s úrovní u buněk 5967.

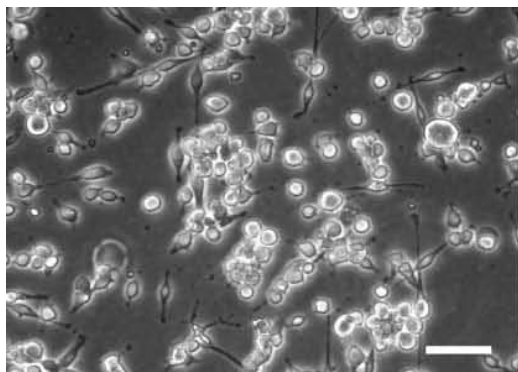
1259-PROM1 byly na Petriho miskách s nepotaženým dnem a na miskách s kolagenovým potahem spíše suspenzní a tvořily plovoucí shluky několika buněk stejně jako původní 1259. Překvapivě velký byl však u těchto buněk nárůst adhezivity k fibronectinu, kdy 80% buněk v kultuře bylo adherentních, zatímco u buněk 1259 to bylo pouze 23%.

Adhezivní vlastnosti všech testovaných buněk k vybraným typům povrchů jsou shrnuty do následujících grafů.

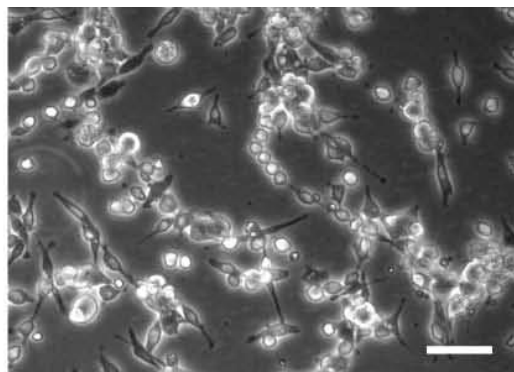




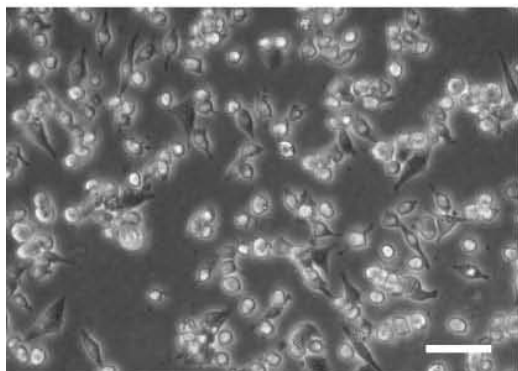
Grafy 1: Adhezivita buněk kultivovaných na Petriho miskách s různými potaženými povrchy.



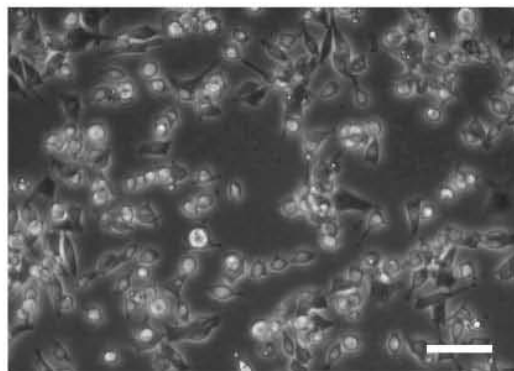
**1259**



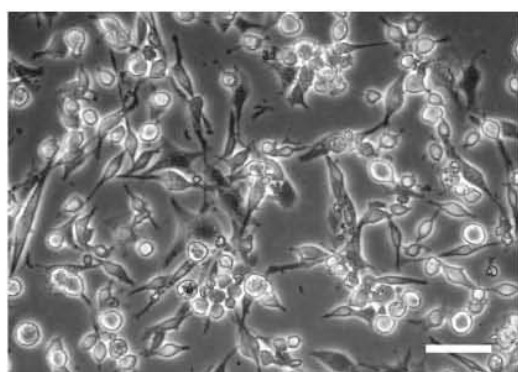
**1259-GFP**



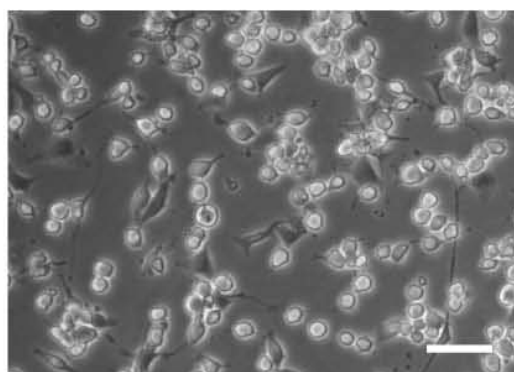
**5967**



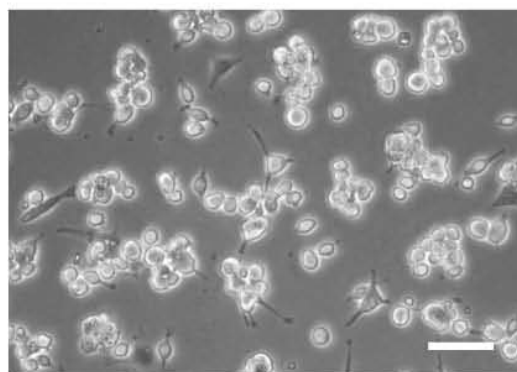
**5967-GFP**



**1259-ISL1**



**1259-ARNT2**



**1259-PROM1**

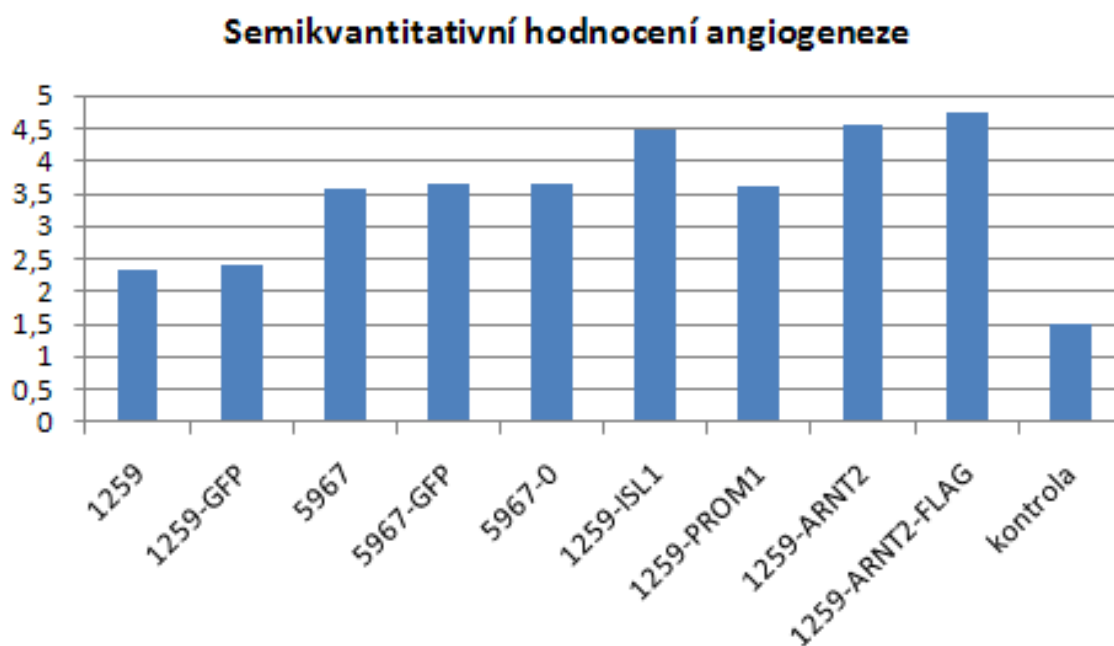
Obr. 17: Buněčné kultury kultivované za standardních podmínek na plastových Petriho miskách (dno bez potahu). Úsečka na obrázcích odpovídá 50  $\mu\text{m}$ .

### 6.4.5 Angiogenní vlastnosti

Angiogenní reakce byla sledována 3. den po vložení implantátu na CAM, tedy 11. den embryonálního vývoje. Jako negativní kontrolu jsem použila Gelaspon s čistým médiem bez séra, protože sérum samo o sobě vyvolává na CAM angiogenezi (Ribatti et al., 1996).

Dále jsem pro testování angiogeneze na CAM získala od J. Kosly buňky 5967-0, jež byly transfekovány prázdným vektorem pSFCV stejným způsobem jako je popsán v kapitole 5.3.

Pro vyhodnocování angiogeneze v okolí implantátu jsem využila semikvantitativní hodnocení bodovou škálou od 0 do 5 popsané v kapitole 5.5.5. U všech testovaných buněčných linií bylo vyhodnoceno 6 až 8 vzorků, u buněk 5967-0 a negativní kontroly po 4 vzorcích. U všech vzorků daného typu buněk bylo hodnocení přibližně stejné, proto jsem z nich spočítala průměrné hodnoty, aniž by to zkreslilo výsledek. Z výsledných hodnot jsem potom sestavila graf.



Graf 2: Průměrné bodové hodnocení angiogenní reakce, bodová škála 0 až 5 bodů

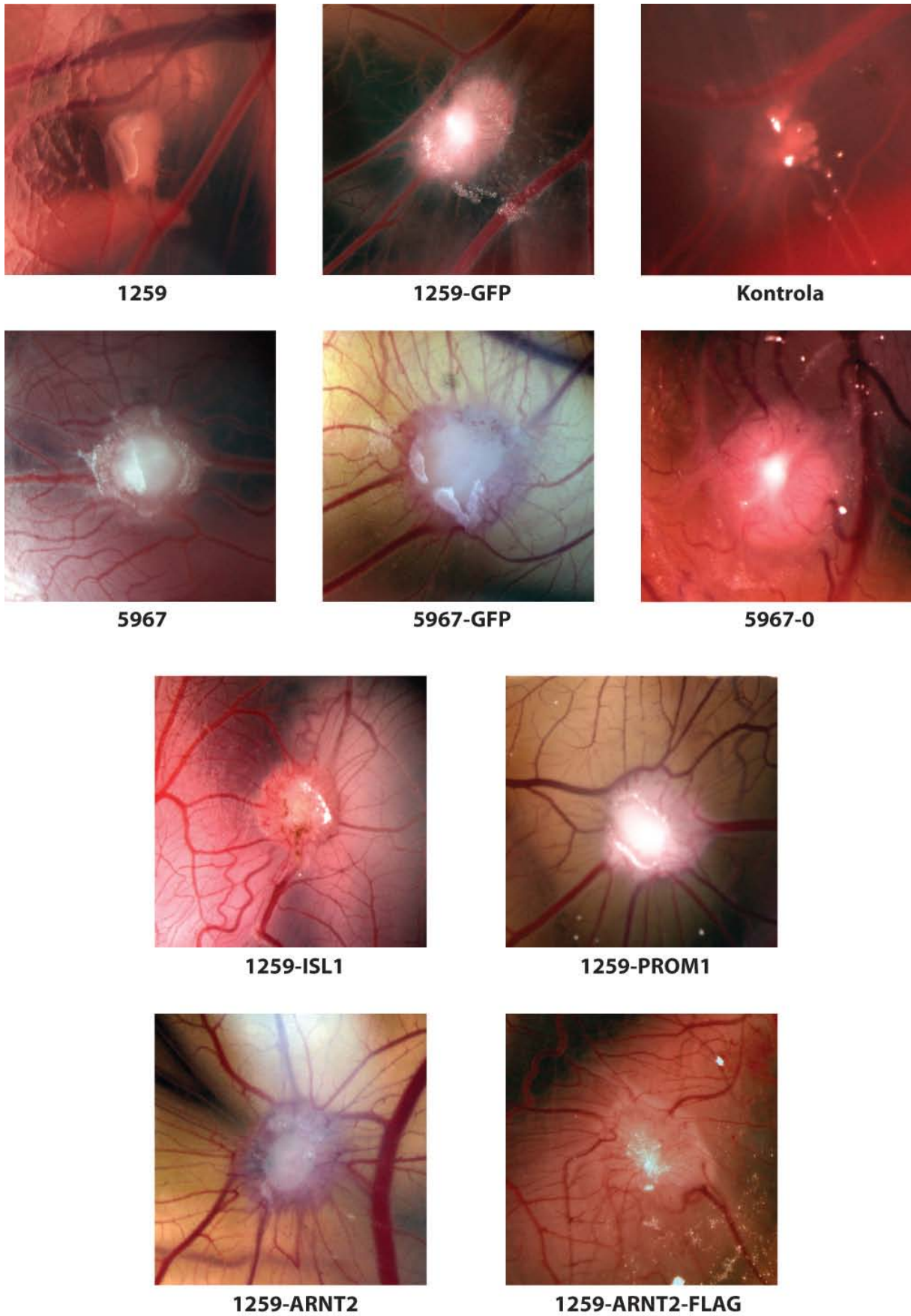
Všechny testované buňky způsobily angiogenní reakci. U buněk 5967 byla v souladu s naším očekáváním angiogeneze silnější než u buněk 1259.

Jak je zřejmé z grafu 2 i obr. 18, jsou rozdíly mezi buňkami 1259 a 1259-GFP minimální, stejně jako u buněk 5967 a 5967-GFP, takže vnesení GFP do buněk zřejmě

nijak neovlivnilo jejich schopnost vyvolat angiogenezi. Taktéž u buněk 5967-0 nedošlo k téměř žádné změně oproti buňkám 5967.

K nejvýraznějším angiogenním reakcím docházelo u buněk 1259-ISL1 a 1259-ARNT2. U buněk 1259-PROM1 byla angiogenní reakce také silnější než u původních buněk 1259 a dosáhla na úroveň srovnatelnou s 5967.

Vnesení epitopu FLAG nemělo v případě buněk 1259-ARNT2 a 1259-ARNT2-FLAG žádný vliv na angiogenní působení těchto buněk, neboť výsledky byly u obou téměř stejné.



Obr. 18: Angiogenní reakce na CAM po vložení různých vzorků. Zvětšeno 7,11x.



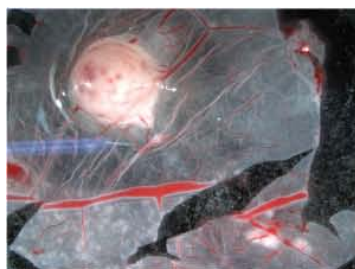
#### 6.4.6 Tvorba nádorových ložisek na CAM

Primární nádory u buněk 1259, 5967, 1259-GFP i 5967-GFP dosahovaly v rámci každého testovaného buněčného typu různých velikostí od 10 do 50 mm<sup>2</sup> a nebyl mezi nimi zjištěn žádný prokazatelný rozdíl. Všechny zmíněné buňky tvořily různý počet sekundárních ložisek na CAM (0 až 20), přičemž ani v tomto případě nebylo možné jednotlivé testované typy buněk mezi sebou porovnávat. Sekundární ložiska vznikala ve většině případů podél jedné nebo dvou větších cév.

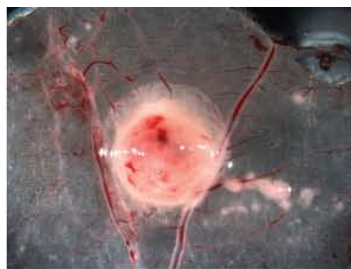
Stejně tak primární ložiska na CAM u všech transfekovaných buněk dosahovala v rámci každého testovaného buněčného typu různých velikostí v rozptylu od 10 do 40 mm<sup>2</sup> a nebyl u nich pozorovatelný žádný trend.

Množství sekundárních ložisek u buněk 1259-ISL1 a 1259-ARNT2 bylo u různých vzorků v rozptylu od 0 do 20 podobně jako u původních buněk, ale jejich distribuce byla odlišná. Sekundární ložiska těchto buněk nebyla omezená na okolí větší cévy, ale většinou byla rozptýlená do více směrů od primárního nádoru.

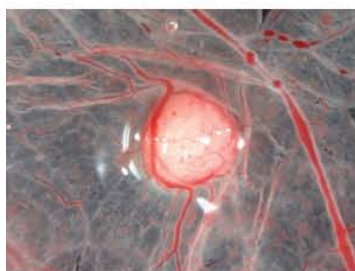
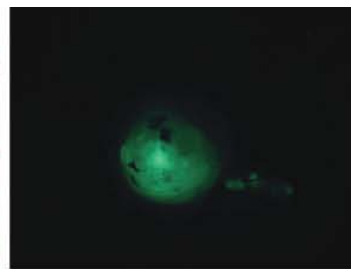
U jednotlivých vzorků 1259-PROM1 bylo množství sekundárních ložisek na CAM také ve velkém rozptylu hodnot, včetně 0, ale v některých případech přesahoval počet 80. Kromě dobře rozeznatelných víceméně ohraničených sekundárních ložisek byla u všech vzorků 1259-PROM1 na CAM rozprostřena „mlhovina“ buněk, která difundovala všemi směry od primárního nádoru. Tato „mlhovina“ buněk byla v menší míře pozorovatelná i u některých vzorků buněk 1259-ISL1 a 1259-ARNT2.



**1259**



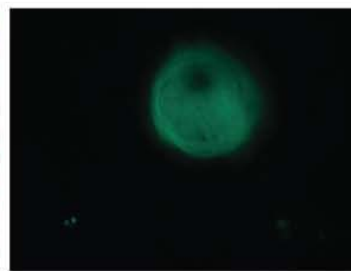
**1259-GFP**



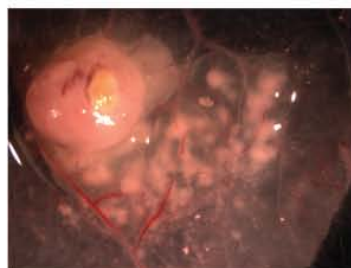
**5967**



**5967-GFP**



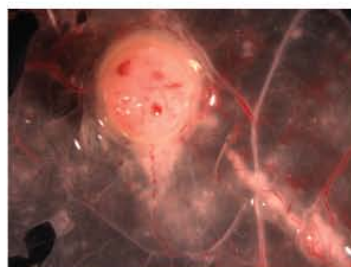
**5967-ISL1**



**1259-PROM1**



**1259-ARNT2**



**1259-ARNT2-FLAG**



**neg. kontrola**

Obr. 19: Izolované chorioalantiodální membrány 9. den po vložení implantátu. Jako negativní kontrola byl použit Gelaspon s čistým médiem bez séra. Zvětšeno 7,11x.

### 6.4.7 Invazivní vlastnosti

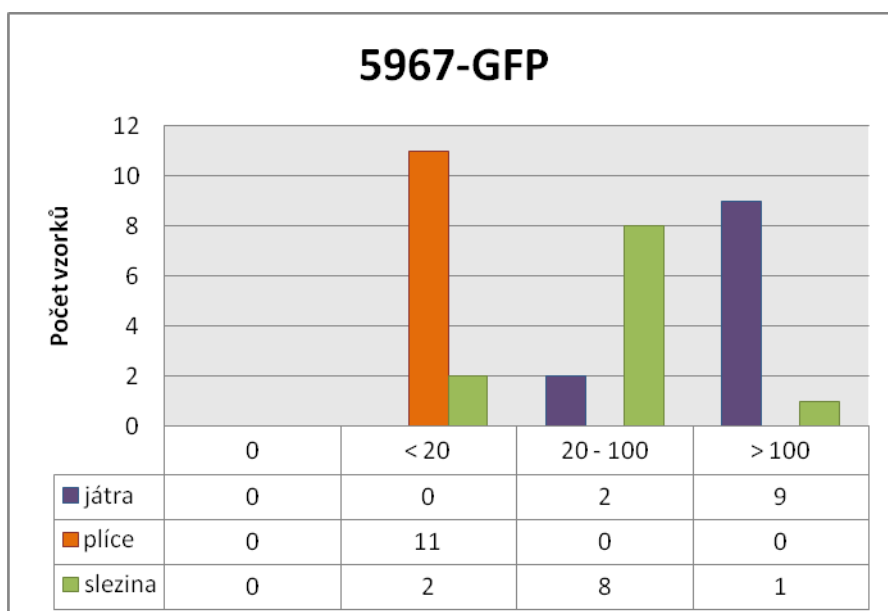
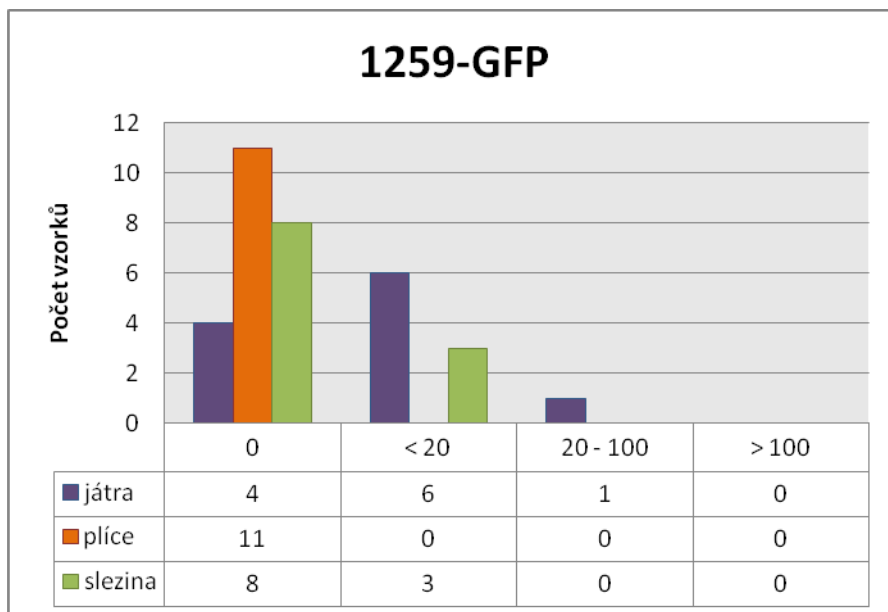
Buňky 1259-GFP a 5967-GFP jsme na histologických řezech detekovali pomocí protilátky proti GFP konjugované s křenovou peroxidázou (GFP B-2: sc-9996). Sledovali jsme přítomnost buněk v játrech, plicích a slezině embrya. Největší množství buněk jsme předpokládali v játrech, neboť sem přichází krev z celé CAM a jsou hodně prokrvená. Plíce jsme zvolili, protože jsou místem, kde buňky 5967 tvoří metastázy u kuřat, a slezinu, protože je rovněž bohatě prokrvená.

U obou buněk jsem vyhodnocovala vždy po 11 vzorcích od každého orgánu. Podle množství buněk v jednotlivých řezech jsem vzorky rozdělila do čtyř kategorií: 0, < 20 buněk, 20 až 100 buněk a >100 buněk (plocha nařezané tkáně byla přibližně stejně velká, takže jednotlivé vzorky byly vzájemně srovnatelné).

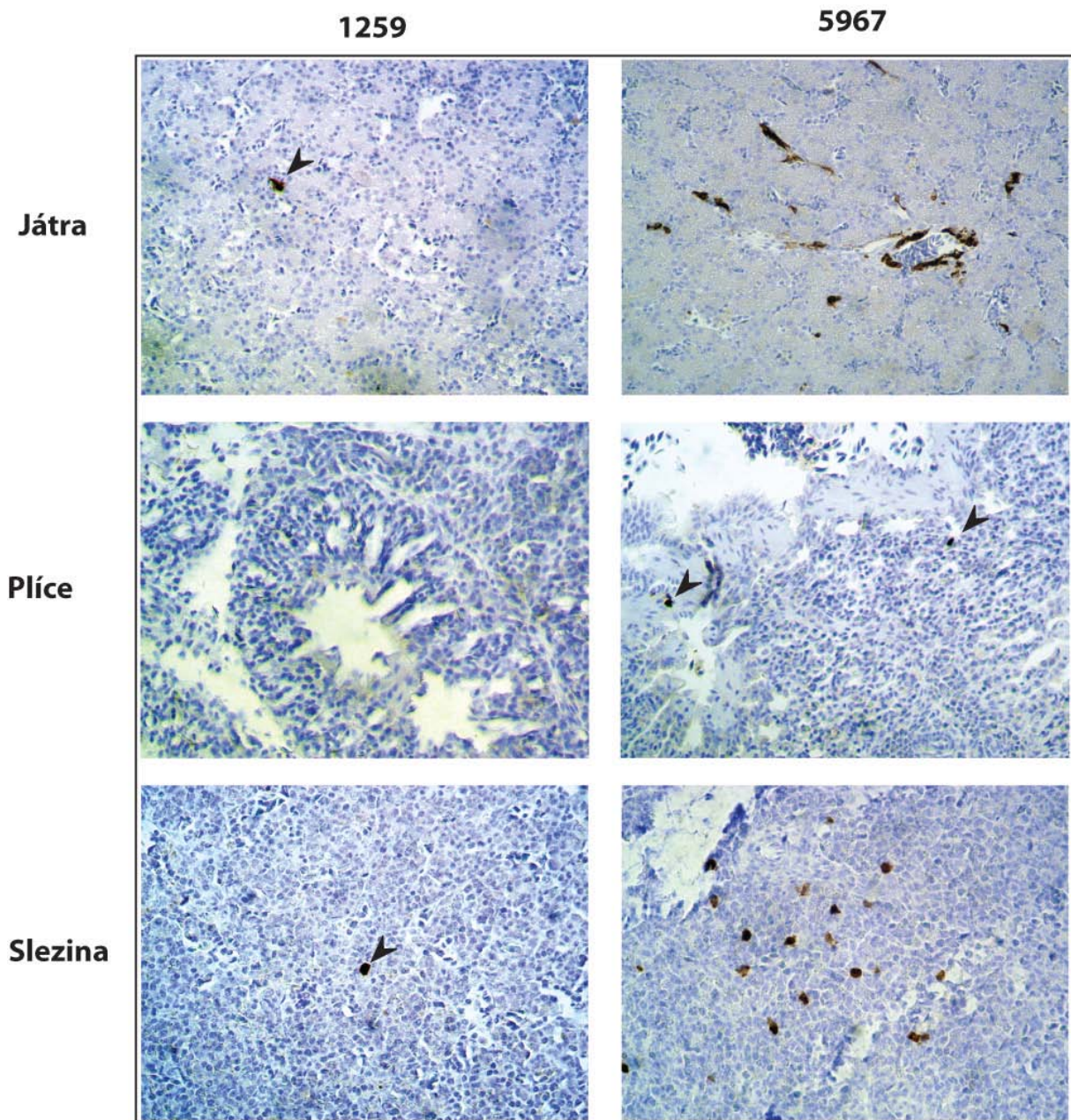
Z grafů č. 3 i obr. 20 je zřejmé, že buňky 1259-GFP i 5967-GFP se dostaly do jater i sleziny, avšak buněk 5967-GFP bylo v těchto orgánech mnohem více.

Ve všech plicních vzorcích jsem našla 5967-GFP, i když jen v počtu několika buněk. Oproti tomu 1259-GFP jsem u žádného plicního vzorku neobjevila.

To, že byly oba typy buněk přítomné v játrech a slezině si vysvětlujeme zejména tím, že jsou oba tyto orgány bohatě prokrvené, navíc do jater je přiváděna krev z chorioalantoidální žíly, která sbírá krev z celé CAM, takže játra jsou prvním orgánem embrya, kam se mohou nádorové buňky z implantátu dostat. Agresivnější 5967-GFP však byly v obou těchto orgánech zastoupeny ve výrazně větším množství. Do plic se potom dostaly již jen 5967-GFP, což je důležitý poznatek, neboť na rozdíl od 1259 pouze buňky 5967 tvoří u kuřat metastázy v plicích.



Grafy 3: Počet značených buněk 1259-GFP a 5967-GFP ve vzorcích z různých tkání.



Obr. 20: Buňky 1259-GFP a 5967-GFP byly značeny protilátkou proti GFP. Buňky 5967-GFP byly invazivnější než 1259-GFP a do tkání embrya se jich dostalo více. Do plicní tkáně se dostaly jen 5967-GFP. Některé izolované buňky jsou pro lepší viditelnost na obrázcích označeny šipkou. Zvětšeno 25x.

#### 6.4.8 1259-ARNT2-FLAG

Buňky 1259-ARNT2-FLAG přežily jen několik dní po transfekci. Během jejich kultivace bylo zřejmé, že proliferují hůře než 1259-ARNT. Jediný pokus, který jsem s nimi stačila provést, byl test angiogenních a invazivních vlastností na CAM, přičemž

výsledky byly téměř stejné jako u 1259-ARNT2. Pod mikroskopem měly v kultuře na Petriho miskách přibližně stejný fenotyp jako 1259-ARNT2.

## 7. DISKUZE

Kučecí chorioalantoidální membrána (CAM) je jedním z nejvyužívanějších systémů pro studium angiogeneze a buněčné invazivity *in vivo* (Ribatti and Vacca, 1999). Proces angiogeneze je nepostradatelný pro růst nádorů i pro tvorbu metastáz (Gasparini, 1994). CAM je velmi příznivým prostředím pro růst nádorových buněk bez druhově specifického omezení (Murphy, 1913). Její bohaté cévní zásobení podporuje růst nádorových buněk a umožňuje studovat komplexní proces metastázování během velmi krátké doby (Deryugina and Quigley, 2008).

Jedním z cílů této práce bylo vypracování pracovního protokolu pro CAM test v podmínkách naší laboratoře, což se podařilo. Výsledný postup práce je nenáročný na provedení a vybavení a je reprodučibilní. Jako materiál nosiče pro vložení vzorku jsme zvolili snadno dostupný Gelaspon, což je porézní houbovitý materiál ze 100% želatiny. Jak již bylo uvedeno, želatina je imunitním systémem kuřecího embrya velmi dobře snášena (Ribatti et al., 1997).

CAM test jsme nejprve vyzkoušeli u již dobře popsanych kuřecích buněčných sarkomových linií PR9692 a PR9692-E9 (Svoboda et al., 1992). Od obou linií byla k dispozici varianta s vneseným genem kódujícím GFP, čehož jsme využili při imunohistochemické detekci sledovaných buněk. Nádory na CAM vytvořené buňkami PR9692 byly typicky větší než nádory vytvořené PR9692-E9, což bylo v souladu s naším očekáváním, neboť PR9692 prolifерují *in vitro* rychleji než PR9692-E9. Ačkoliv PR9692-E9 tvoří u kuřat nemetastázující nádory, na CAM byl počet sekundárních ložisek přibližně stejný jako u PR9692. PR9692. To může být způsobeno tím, že metastáza PR9692-E9 je v kuřatech omezena imunitním systémem nebo dalšími regulačními mechanismy, které nejsou u embrya v době vkládání implantátu vyvinuté (Leene et al., 1973). Je rovněž možné, že bohaté cévní zásobení CAM vytváří příznivější podmínky pro šíření nádorových buněk, než je tomu ve svalové tkáni dospělého experimentálního zvířete. Proces metastázování má řadu kroků, během nichž musí nádorové buňky překonat řadu překážek. V těle organismu je zjevně více přirozených překážek než na CAM.

U PR9692 i PR9692-E9 jsme mohli 3. den po vložení implantátu pozorovat angiogenní reakci, která byla u obou buněk přibližně stejná.

U těchto dvou buněčných linií jsme také prokázali, že jsme schopni po imunohistochemickém barvení CAM a embryonálních tkání sledovat všechny kroky

metastatického procesu až po invazi buněk do orgánů embrya. Nemohli jsme jen zjistit, zda by z těchto buněk mohl vzniknout sekundární nádor, neboť celý proces od vložení inzertu po izolaci tkání je limitován délkou embryonálního vývoje na 9 dní.

Poté co se podařilo úspěšně provést testování angiogenních vlastností a buněčné invazivity na CAM u buněk PR9692 a PR9692-E9, jsme mohli přejít k charakterizaci buněk 1259 a 5967, což je náplní velké části této práce.

Kuřecí sarkomové linie 1259 a 5967 byly pro náš výzkum zajímavé zejména tím, že buňky 5967, které tvoří u kuřat metastázuující nádory, vznikly *in vivo* jako sub-klon původně nemetastázuujících 1259. Analýza na expresním mikročipu ukázala, že u buněk 5967 jsou zvýšené hladiny mRNA pro některé proteiny podporující angiogenezi a buněčnou invazivitu. Podrobnější studium vlivu změn v genové expresi, ke kterým došlo v případě těchto buněčných linií, by pro mohlo být přínosné pro pochopení procesů vedoucích k metastazování. Fenotyp obou typů buněk dosud nebyl dobře popsán.

V rámci této práce jsem provedla několik pokusů včetně CAM testu, s jejichž pomocí jsem se snažila buňky 1259 a 5967 lépe charakterizovat. Do 1259 i 5967 byl kvůli jejich detekci na CAM a v orgánech embrya vnesen gen kódující GFP. Testy s původními buňkami 1259 a 5967 jsme prováděli souběžně i s buňkami 1259-GFP a 5967-GFP. Vnesení GFP do buněk, které by mohlo zkreslit některé výsledky, jejich vlastnosti nijak neovlivnilo.

Podobně 1259-HOXA11 přežily jen několik dní po transformaci. Je to zřejmě proto, že vysoká hladina tohoto transkripčního faktoru je pro buňky těžko snesitelná. V budoucích experimentech proto chceme gen HOXA11 exprimovat z upraveného expresního vektoru pSFCV, v němž bude před oblastí kódující HOXA11 vyměněno „splice-acceptor“ místo za výrazně slabší, pocházející ze sekvence regulující sestřih genu *c-myc*.

U buněk 5967 jsou mimo jiné ve zvýšené míře exprimovány proteiny ISL1, HOXA11, ARNT2 a PROM1. Abychom zjistili, jaký mají tyto proteiny vliv na chování zkoumaných buněk, zvýšili jsme pomocí stabilní transfekce jejich hladinu u původních buněk 1259. Fenotyp transfekovaných buněk jsme potom charakterizovali stejně jako u původních buněčných linií a sledovali jsme, zda u nich došlo k nějaké změně. Pro usnadnění detekce při CAM testu jsme se pokusili připravit buňky exprimující zkoumané proteiny fúzované s epitopem FLAG. Vnesení proteinů fúzovaných s FLAG bylo pravděpodobně nepříznivé pro buněčnou proliferaci, neboť tyto buňky rostly výrazně pomaleji a přežily jen velmi krátkou dobu po transfekci.



Také buňky 1259-HOXA11 přežily jen několik dní po transformaci a nepodařilo se s nimi provést žádný pokus. Podařilo se nám tedy připravit tři stabilně transfekované buněčné linie: 1259-ISL1, 1259-ARNT2 a 1259-PROM1.

U buněk 1259-HOXA11 se transfekce nemusela povést z technických důvodů nebo je vysoká hladina tohoto transkripčního faktoru pro buňky těžko snesitelná. Pokus o stabilní transfekci bude opakován a pokud se opět nepodaří, bude HOXA11 exprimován z upraveného expresního vektoru pSFCV. V takovém vektoru bude před oblastí kódující HOXA11 vyměněno „splice/acceptor“ místo za výrazně slabší, pocházející ze sekvence regulující sestřih genu *c-myb*.

1259 i 5967 způsobily na CAM angiogenní reakci, která však byla u buněk 5967 výrazně silnější. Buňky 5967 mají oproti 1259 také zvýšené adhezivní schopnosti.

Při zkoumání invazivních vlastností buněk jsme zjistili, že buňky 1259-GFP i 5967-GFP migrovaly do jater a sleziny, avšak buňky 5967-GFP byly invazivnější, neboť jsme jich v těchto orgánech detekovali mnohem více. Pouze buňky 5967-GFP byly schopné se dostat do plicní tkáně, což je důležitý poznatek, neboť na rozdíl od 1259 pouze buňky 5967 tvoří u kuřat metastázy v plicích. To, že byly oba typy buněk přítomné v játrech a slezině, i když u kuřat metastázuje pouze 5967, si vysvětlujeme zejména tím, že jsou oba tyto orgány bohatě prokrvené, navíc do jater je přiváděna krev z chorioalantoidální žíly, která sbírá krev z celé CAM, takže játra jsou prvním orgánem embrya, kam se mohou nádorové buňky z CAM dostat. Navíc, jak již bylo zmíněno embryonální imunitní systém je v době vkládání implantátu velmi málo vyvinutý a nebude příliš bránit postupu nádorových buněk.

S využitím sqRT PCR jsme potvrdili, že u buněk 5967 je zvýšená transkripce mRNA pro různé proteiny, které souvisejí s angiogenezí, hypoxií, proliferací či buněčnou invazivitou.

Podle našeho očekávání vyvolaly nejvýraznější angiogenezi buňky 1259-ISL1 a 1259-ARNT2, neboť o ISL1 a ARNT2, je známo že podporují angiogenezi (Barzelay et al., ; Maltepe et al., 2000). Zvýšená exprese ISL1 podpořila buněčnou proliferaci a adhezivitu, což je v souladu s poznatky Barzelay a kol. O proteinu ISL1 je známo, že indukuje expresi adhezivních proteinů jako jsou ICAM-1 a VCAM-1 (Barzelay et al.). U buněk 1259-ISL1 vzrostla oproti buňkám 1259 transkripce mRNA pro VEGFA, NRP1, TGF- $\beta$  2 a byl patrný i náznak zvýšení exprese u HOXA11. VEGFA je pro-angiogenní izoformou VEGF. NRP1 je jedním z transmembránových receptorů pro VEGF a bylo zjištěno, že může podporovat nádorovou angiogenezi (Bagri et al., 2009). Sekretovaný

cytokin TGF-  $\beta$ 2 může kromě buněčné proliferace také podporovat angiogenezi (Roberts and Sporn, 1989).

O ARNT2 je známo, že může podporovat angiogenezi a je častěji exprimován v nádorové než v normální tkáni (Martinez et al., 2008). Také naše výsledky potvrdily, že nadexprese ARNT2 velmi zvýšila schopnost buněk způsobovat angiogenezi.

Kromě toho nadexprese ARNT2 způsobila zvýšení proliferace buněk a adhezivitu ve srovnání s původními buňkami 1259. U buněk 1259-ARNT2 došlo k nárůstu transkripce mRNA pro VEGFA a TGF- $\beta$ 2, což je stejně jako v případě ISL1 v souladu s jejich zvýšenou schopností způsobovat angiogenezi.

Vnesení FLAG nemělo v případě buněk 1259-ARNT2 a 1259-ARNT2-FLAG na angiogenezi žádný vliv, neboť výsledky byly u obou srovnatelné.

U buněk 1259-PROM1 byl při makroskopickém pozorování patrný nárůst buněčné invazivity na CAM, u některých vzorků byl počet sekundárních ložisek několikanásobně vyšší než u původních buněk 1259 i 5967. Navíc kromě dobře rozeznatelných sekundárních ložisek byla u 1259-PROM1 na CAM vždy pozorovatelná „mlhovina“ buněk, která se rozprostírala do všech směrů od primárního nádoru. Tato „mlhovina“ buněk v menší míře vznikla také u některých vzorků buněk 1259-ISL1 a 1259-ARNT2. U buněk 1259 a 5967 vznikala sekundární ložiska obvykle jen v okolí jedné či dvou větších cév. Oproti tomu u všechny transfekované buňky se většinou šířily do několika různých směrů od implantátu. Zdá se, že buňky na CAM migrovaly nejen přes cévní řečiště, ale i vně cév po celé CAM. Migrace nádorových buněk v CAM vně cév byla popsána také v článku Lugassy a kol. (Lugassy et al., 2004).

Překvapivý byl velký nárůst adhezivitu k fibronektinu u buněk 1259-PROM1, kdy 80% buněk v kultuře bylo adherentních, zatímco u původních buněk 1259 to bylo pouze 23%. Tuto změnu si zatím neumíme vysvětlit a ani v odborné literatuře se mi nepodařilo najít zmínku o souvislosti mezi PROM1 a adhezivitou k fibronektinu. Možné vysvětlení by mohlo přinést testování transkripce mRNA kódující některé známé adhezivní molekuly u buněk 1259-PROM1 ve srovnání s původními 1259.

Novější výzkumy naznačují, že PROM1, který je nejvíce známý jako marker nádorových kmenových buněk, může být klíčový také pro úspěšnou tvorbu metastáz (Hermann et al., 2007), což podporují i naše výsledky.

Také nadexprese PROM1 vedla ke zvýšení angiogeneze a to na úroveň srovnatelnou s 5967. To je v souladu se zjištěním zvýšené transkripce NRP1 u 1259-

PROM1, neboť jak již bylo zmíněno, NRP1 podporuje proces angiogeneze (Bagri et al., 2009).

Buňky se zvýšenou expresí ISL1, ARNT2 a PROM1 proliferovaly mnohem rychleji než původní 1259. Všechny testované transfekované buňky měly zvýšené angiogenní vlastnosti. Schopnost adherovat k různým komponentám extracelulární matrix podporuje buněčnou migraci a invazivitu. Ukázali jsme, že nadexprese ISL1, PROM1 i ARNT2 1259 vedla ke zvýšení buněčné adhezivity, zejména k fibronektinu. Vyšší hladina těchto proteinů u buněk 5967 tedy zřejmě podporuje jejich invazivnější a agresivnější nádorový fenotyp ve srovnání s 1259.

Vnesení GFP do buněk 1259 a 5967 nijak nezměnilo jejich adhezivní a angiogenní vlastnosti. Také transkripce mRNA pro ISL1, PROM1, ARNT2 a HOXA11 zůstala u buněk 1259-GFP a 5967-GFP stejná jako u původních 1259 a 5967. Předpokládáme tedy, že GFP nijak neovlivnilo ani schopnost buněk invadovat do orgánů embrya, a výsledky zjištěné u 1259-GFP a 5967-GFP budou odpovídající i pro 1259 a 5967.

Jako kontrola byly v některých pokusech použity buňky 5967-0 s prázdným plazmidem pSFCV a zjistili jsme, že vnesení pSFCV do buněk jejich fenotyp nijak neovlivnilo. Stejným způsobem připravené buňky 1259-0 jsme bohužel nestačili připravit. U buněk PR9692 a PR9692-E9 bylo již potvrzeno, že transfekce prázdným vektorem pSFCV jejich vlastnosti nijak nezměnila. Navíc vnesení genu pro GFP do buněk PR9692, PR9692-E9, 1259 a 5967 bylo provedeno také s využitím pSFCV a nebyla pozorována žádná změna fenotypu.

Ze získaných výsledků CAM testu a z dalších pokusů jsme schopni určit spoustu vlastností zkoumaných buněk. V nejbližší době bude u nově vytvořených stabilně transfekovaných buněk testována jejich schopnost vytvářet metastázy po inokulaci do prsního svalů kuřat. Výsledky budou porovnány s tím, co se nám doposud podařilo zjistit.

Jelikož v rámci projektu zkoumání buněčných linií 1259 a 5967 zůstává mnoho nezodpovězených otázek a máme v plánu v něm pokračovat. Rozhodující pro další směřování výzkumu budou výsledky inokulace nově vzniklých linií 1259- ISL1, 1259- ARNT2 a 1259-PROM1 do kuřat.

Z časových důvodů se již v rámci této práce nepodařilo ověřit, zda jsou rozdíly mezi jednotlivými buněčnými liniemi i na úrovni proteinů. Připravila jsem proteinové lyzáty od všech zkoumaných buněčných linií, včetně nově vytvořených stabilních

transfektantů. Až se nám podaří získat vhodné protilátky, budeme zkoumat hladinu vybraných proteinů v buňkách pomocí metody western blot. Do dalších experimentů zahrneme i buňky 1259-0 a 5967-0.

Pokusíme připravit další stabilně transfekované buněčné linie 1259-HOXA11, 1259-HOXA-FLAG, 1259-ARNT2-FLAG, 1259-PROM1-FLAG a 1259-ISL1-FLAG. Budou-li životaschopné, chtěli bychom tyto buňky testovat na CAM, pomocí protilátky proti FLAG detekovat buňky v orgánech kuřecích embryí a zjistit, jak se změnila jejich invazivní schopnost. V rámci studia rozdílů mezi buňkami 1259 a 5967 chceme podrobněji prozkoumat jejich expresní profil.

Také bychom chtěli vytvořit stabilně transfekované buněčné linie, které by současně zvýšeně exprimovaly různé kombinace proteinů, které nás zajímají, a sledovat změny v jejich fenotypu a metastatickém chování.

## 8. SHRNU TÍ

Všechny cíle stanovené pro tuto práci byly splněny. Podařilo se vypracovat protokol provedení CAM testu pro použití v naší laboratoři. CAM test byl nejprve vyzkoušen a optimalizován při testování již dobře popsaných kuřecích sarkomových buněčných linií PR9692 a PR9692-E9. Poté byly charakterizovány dosud málo popsané kuřecí sarkomové linie 1259 a 5967. Již dříve bylo popsáno, že pouze buňky linie 5967 vyvolávají metastázy v experimentálních zvířatech a bylo rovněž provedeno expresní profilování buněk 1259 a 5967 s využitím mikročipů Affymetrix. Na základě těchto výsledků jsme pro tuto práci vytipovali 4 proteiny (ISL1, ARNT2, PROM1, HOXA11), jejichž zvýšená exprese by mohla buňkám 5967 usnadňovat metastázu. Byly připraveny odvozené buněčné linie se zvýšenou hladinou exprese genů kódujících ISL1, ARNT2 a PROM1. Buňky s nadexprimovaným HOX11 nebyly životaschopné.

Prokázali jsme, že zvýšení transkripční hladiny ISL1, ARNT2 a PROM1 skutečně potencuje angiogenní vlastnosti buněk. V soulase s tím jsme pozorovali, že námi nadexprimované geny (především transkripční faktory) ovlivňují transkripci dalších genů (např. VEGFA, NRP1, TGF- $\beta$ 2), které hrají důležitou roli v angiogenezi a nádorové progresi. V blízké budoucnosti chceme zjistit, zda-li buňky s nadexprimovanými geny ovlivňujícími angiogenezi podporují vznik metastáz v komplexním prostředí *in vivo*. Pokus bude proveden způsobem popsaným v Čermák a kol. 2010. Z takového pokusu vyplyne, které geny (případně jejich kombinace) zasluhují více pozornosti. Pochopení molekulárních základů podmiňujících angiogenní vlastnosti nádorových buněk je klíčové pro pochopení procesu nádorové progresi a metastázování. Poznání těchto procesů může v budoucnosti umožnit efektivnější léčbu nádorových onemocnění.

## 9. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Abeyasinghe, H.R., Li, L.Q., Guckert, N.L., Reeder, J., and Wang, N. (2005). THY-1 induction is associated with up-regulation of fibronectin and thrombospondin-1 in human ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 161, 151-158.
- Auerbach, R., Kubai, L., and Sidky, Y. (1976). Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues, and lymphocytes. *Cancer Res* 36, 3435-3440.
- Ausprunk, D.H. (1986). Distribution of hyaluronic acid and sulfated glycosaminoglycans during blood-vessel development in the chick chorioallantoic membrane. *Am J Anat* 177, 313-331.
- Ausprunk, D.H., Knighton, D.R., and Folkman, J. (1974). Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev Biol* 38, 237-248.
- Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Watts, R.J. (2009). Neuropilins in tumor biology. *Clin Cancer Res* 15, 1860-1864.
- Baldewijns, M.M., van Vlodrop, I.J., Vermeulen, P.B., Soetekouw, P.M., van Engeland, M., and de Bruine, A.P. VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. *J Pathol* 221, 125-138.
- Banerjee, S., Sengupta, K., Dhar, K., Mehta, S., D'Amore, P.A., Dhar, G., and Banerjee, S.K. (2006). Breast cancer cells secreted platelet-derived growth factor-induced motility of vascular smooth muscle cells is mediated through neuropilin-1. *Mol Carcinog* 45, 871-880.
- Barzelay, A., Ben-Shoshan, J., Entin-Meer, M., Maysel-Auslender, S., Afek, A., Barshack, I., Keren, G., and George, J. A potential role for islet-1 in post-natal angiogenesis and vasculogenesis. *Thromb Haemost* 103, 188-197.
- Bhatia, M. (2001). AC133 expression in human stem cells. *Leukemia* 15, 1685-1688.
- Bodenmiller, D.M., Baxter, C.S., Hansen, D.V., and Potter, S.S. (2002). Phylogenetic analysis of Hoxa 11 sequences reveals absence of transposable elements, conservation of transcription factor binding sites, and suggests antisense coding function. *DNA Seq* 13, 77-83.
- Bristow, R.G., and Hill, R.P. (2008). Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer* 8, 180-192.
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8033-8037.
- Cai, C.L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P.H., Pfaff, S.L., Chen, J., and Evans, S. (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 5, 877-889.
- Cermak, V., Kosla, J., Plachy, J., Trejbalova, K., Hejnar, J., and Dvorak, M. The transcription factor EGR1 regulates metastatic potential of v-src transformed sarcoma cells. *Cell Mol Life Sci* 67, 3557-3568.
- Clark, D.A., and Coker, R. (1998). Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 30, 293-298.

- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66, 9339-9344.
- Cosset, F.L., Legras, C., Chebloune, Y., Savatier, P., Thoraval, P., Thomas, J.L., Samarut, J., Nigon, V.M., and Verdier, G. (1990). A new avian leukosis virus-based packaging cell line that uses two separate transcomplementing helper genomes. *J Virol* 64, 1070-1078.
- de Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., and Williams, L.T. (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989-991.
- Deryugina, E.I., and Quigley, J.P. (2008). Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol* 130, 1119-1130.
- Duboule, D., and Dolle, P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *EMBO J* 8, 1497-1505.
- Dusseau, J.W., and Hutchins, P.M. (1988). Hypoxia-induced angiogenesis in chick chorioallantoic membranes: a role for adenosine. *Respir Physiol* 71, 33-44.
- Dusseau, J.W., Hutchins, P.M., and Malbasa, D.S. (1986). Stimulation of angiogenesis by adenosine on the chick chorioallantoic membrane. *Circ Res* 59, 163-170.
- Edelman, G.M., and Jones, F.S. (1995). Developmental control of N-CAM expression by Hox and Pax gene products. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349, 305-312.
- Engbring, J.A., Hossain, R., VanOsdol, S.J., Kaplan-Singer, B., Wu, M., Hibino, S., and Koblinski, J.E. (2008). The laminin alpha-1 chain derived peptide, AG73, increases fibronectin levels in breast and melanoma cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 25, 241-252.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15, 504-514.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676.
- Finger, E.C., and Giaccia, A.J. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* 29, 285-293.
- Elias, H., and Hyde D.M. (1983). Stereological measurements of isotropis structures. In *A Guide to Practical Stereology* (Eds. H. Elias and D.M. Hyde). Karger, Basel, pp. 25-44.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-1186.
- Folkman, J. (1992). The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 3, 65-71.
- Folkman, J., and Cotran, R. (1976). Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol* 16, 207-248.
- Fong, G.H. (2008). Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis* 11, 121-140.

- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16, 4604-4613.
- Frantz, S., Vincent, K.A., Feron, O., and Kelly, R.A. (2005). Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res* 96, 15-26.
- Fuerstenberg, S.M., and Vennstrom, B. (1993). Versatile avian retrovirus vectors. *Anal Biochem* 209, 375-376.
- Fuchs, A., and Lindenbaum, E.S. (1988). The two- and three-dimensional structure of the microcirculation of the chick chorioallantoic membrane. *Acta Anat (Basel)* 131, 271-275.
- Garmy-Susini, B., Jin, H., Zhu, Y., Sung, R.J., Hwang, R., and Varner, J. (2005). Integrin alpha4beta1-VCAM-1-mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *J Clin Invest* 115, 1542-1551.
- Gasparini, G. (1994). Quantification of intratumoral vascularization predicts metastasis in human invasive solid tumors (review). *Oncol Rep* 1, 7-12.
- Gehring, W.J. (1987). Homeo boxes in the study of development. *Science* 236, 1245-1252.
- Gerber, H.P., Condorelli, F., Park, J., and Ferrara, N. (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 272, 23659-23667.
- Glinka, Y., and Prud'homme, G.J. (2008). Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* 84, 302-310.
- Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R.H., Kvietikova, I., fhitelaw, M.L., Toftgard, R., Tora, L., Gassmann, M., and Poellinger, L. (1996). Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol* 16, 5221-5231.
- Harris, A.L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2, 38-47.
- He, B., Zhang, Y., Pan, Y., Xu, Y., Gu, L., Chen, L., and Wang, S. Interleukin 1 beta (IL1B) promoter polymorphism and cancer risk: evidence from 47 published studies. *Mutagenesis* 26, 637-642.
- Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., and Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1, 313-323.
- Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fujii, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1996). cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol* 16, 1706-1713.
- Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A., and Hankinson, O. (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252, 954-958.
- Huang, S., and Chakrabarty, S. (1994). Regulation of fibronectin and laminin receptor expression, fibronectin and laminin secretion in human colon cancer cells by transforming growth factor-beta 1. *Int J Cancer* 57, 742-746.



- Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., and Schumacker, P.T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11715-11720.
- Chung, A.S., Lee, J., and Ferrara, N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 10, 505-514.
- Jakob, W., Jentzsch, K.D., Mauersberger, B., and Heder, G. (1978). The chick embryo chorioallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis factors: reactions induced by carrier materials. *Exp Pathol (Jena)* 15, 241-249.
- Johnston, P.M., and Comar, C.L. (1955). Distribution and contribution of calcium from the albumen, yolk and shell to the developing chick embryo. *Am J Physiol* 183, 365-370.
- Jordan, C.T., Guzman, M.L., and Noble, M. (2006). Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355, 1253-1261.
- Kazanskaya, O., Ohkawara, B., Heroult, M., Wu, W., Maltry, N., Augustin, H.G., and Niehrs, C. (2008). The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. *Development* 135, 3655-3664.
- Kelly, B.D., Hackett, S.F., Hirota, K., Oshima, Y., Cai, Z., Berg-Dixon, S., Rowan, A., Yan, Z., Campochiaro, P.A., and Semenza, G.L. (2003). Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res* 93, 1074-1081.
- Kelly, R.G., and Buckingham, M.E. (2002). The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart. *Trends Genet* 18, 210-216.
- Kevil, C.G., Orr, A.W., Langston, W., Mickett, K., Murphy-Ullrich, J., Patel, R.P., Kucik, D.F., and Bullard, D.C. (2004). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) regulates endothelial cell motility through a nitric oxide-dependent pathway. *J Biol Chem* 279, 19230-19238.
- Klagsbrun, M., Knighton, D., and Folkman, J. (1976). Tumor angiogenesis activity in cells grown in tissue culture. *Cancer Res* 36, 110-114.
- Knighton, D., Ausprunk, D., Tapper, D., and Folkman, J. (1977). Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *Br J Cancer* 35, 347-356.
- Langer, R., and Folkman, J. (1976). Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 263, 797-800.
- Laurin, T., Schmitz, U., Riediger, D., Frank, H.G., and Stoll, C. (2004). [Chorioallantoic membrane of fertilized avian eggs as a substrate for assessment of cancerous invasiveness]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8, 223-228.
- Lee, J.S., Kim, E.Y., Iwabuchi, K., and Iwata, H. Molecular and functional characterization of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 1 (ARNT1) and ARNT2 in chicken (*Gallus gallus*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 153, 269-279.
- Leene, W., Duyzings, M.J., and van Steeg, C. (1973). Lymphoid stem cell identification in the developing thymus and bursa of Fabricius of the chick. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 136, 521-533.
- Levy, N.S., Chung, S., Furneaux, H., and Levy, A.P. (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 273, 6417-6423.

- Liao, D., Corle, C., Seagroves, T.N., and Johnson, R.S. (2007). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* 67, 563-572.
- Lugassy, C., Kleinman, H.K., Engbring, J.A., Welch, D.R., Harms, J.F., Rufner, R., Ghanem, G., Patierno, S.R., and Barnhill, R.L. (2004). Pericyte-like location of GFP-tagged melanoma cells: ex vivo and in vivo studies of extravascular migratory metastasis. *Am J Pathol* 164, 1191-1198.
- Maksimov, V.F., Korostyshevskaya, I.M., and Kurganov, S.A. (2006). Functional morphology of chorioallantoic vascular network in chicken. *Bull Exp Biol Med* 142, 367-371.
- Maltepe, E., Keith, B., Arsham, A.M., Brorson, J.R., and Simon, M.C. (2000). The role of ARNT2 in tumor angiogenesis and the neural response to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 231-238.
- Mamluk, R., Gechtman, Z., Kutcher, M.E., Gasiunas, N., Gallagher, J., and Klagsbrun, M. (2002). Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain. *J Biol Chem* 277, 24818-24825.
- Martinez, V., Kennedy, S., Doolan, P., Gammell, P., Joyce, H., Kenny, E., Prakash Mehta, J., Ryan, E., O'Connor, R., Crown, J., *et al.* (2008). Drug metabolism-related genes as potential biomarkers: analysis of expression in normal and tumour breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 110, 521-530.
- Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (1993). Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2423-2427.
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K., and Buck, D.W. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90, 5013-5021.
- Mitra, A.K., Sawada, K., Tiwari, P., Mui, K., Gwin, K., and Lengyel, E. Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and alpha(5)beta(1)-integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene* 30, 1566-1576.
- Mjaatvedt, C.H., Nakaoka, T., Moreno-Rodriguez, R., Norris, R.A., Kern, M.J., Eisenberg, C.A., Turner, D., and Markwald, R.R. (2001). The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol* 238, 97-109.
- Mole, D.R., and Ratcliffe, P.J. (2008). Cellular oxygen sensing in health and disease. *Pediatr Nephrol* 23, 681-694.
- Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Lam, J.T., Bernshausen, A., Chen, Y., Qyang, Y., Bu, L., Sasaki, M., Martin-Puig, S., *et al.* (2006). Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 127, 1151-1165.
- Moriarty, C.M., and Terepka, A.R. (1969). Calcium transport by the isolated chick chorio-allantoic membrane. *Arch Biochem Biophys* 135, 160-165.
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R.K., and McDonald, D.M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 160, 985-1000.
- Murphy, J.B. (1913). Transplantability of Tissues to the Embryo of Foreign Species : Its Bearing on Questions of Tissue Specificity and Tumor Immunity. *J Exp Med* 17, 482-493.

- Nanki, N., Fujita, J., Yang, Y., Hojo, S., Bandoh, S., Yamaji, Y., and Ishida, T. (2001). Expression of oncofetal fibronectin and syndecan-1 mRNA in 18 human lung cancer cell lines. *Tumour Biol* 22, 390-396.
- Nguyen, M., Shing, Y., and Folkman, J. (1994). Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvasc Res* 47, 31-40.
- Pankov, R., and Yamada, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115, 3861-3863.
- Plachy, J., Kotab, J., Divina, P., Reinisova, M., Senigl, F., and Hejnar, J. Proviruses selected for high and stable expression of transduced genes accumulate in broadly transcribed genome areas. *J Virol* 84, 4204-4211.
- Plachy, J., and Vilhelmova, M. (1984). Syngeneic lines of chickens. VII. The lines derived from the recombinants at the B complex (MHC) of Rous sarcoma regressor and progressor inbred lines of chickens. *Folia Biol (Praha)* 30, 189-201.
- Plachy, J., Vilhelmova, M., Karakoz, I., and Schulmannova, J. (1989). Prague inbred lines of chickens: a biological model for MHC research. *Folia Biol (Praha)* 35, 177-196.
- Rankin, E.B., and Giaccia, A.J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 15, 678-685.
- Reid, A.I., and Gaunt, S.J. (2002). Colinearity and non-colinearity in the expression of Hox genes in developing chick skin. *Int J Dev Biol* 46, 209-215.
- Ribatti, D., Gualandris, A., Bastaki, M., Vacca, A., Iurlaro, M., Roncali, L., and Presta, M. (1997). New model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane: the gelatin sponge/chorioallantoic membrane assay. *J Vasc Res* 34, 455-463.
- Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., and Presta, M. (2006). The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. *Nat Protoc* 1, 85-91.
- Ribatti, D., and Vacca, A. (1999). Models for studying angiogenesis in vivo. *Int J Biol Markers* 14, 207-213.
- Ribatti, D., Vacca, A., Bertossi, M., De Benedictis, G., Roncali, L., and Dammacco, F. (1990). Angiogenesis induced by B-cell non-Hodgkin's lymphomas. Lack of correlation with tumor malignancy and immunologic phenotype. *Anticancer Res* 10, 401-406.
- Ribatti, D., Vacca, A., Roncali, L., and Dammacco, F. (1996). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol* 40, 1189-1197.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111-115.
- Rizzo, V., Kim, D., Duran, W.N., and DeFouw, D.O. (1995). Ontogeny of microvascular permeability to macromolecules in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. *Microvasc Res* 49, 49-63.
- Roberts, A.B., and Sporn, M.B. (1989). Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF-beta. *Am Rev Respir Dis* 140, 1126-1128.

- Rogina, B. (1997). Patterns of expression of Hoxa-11 in micromass cultures of chick limb mesenchyme from various stages suggest a role for Hoxa-11 in the specification of the zeugopod. *Biochem Mol Biol Int* 42, 583-589.
- Romanoff, A.L. (1960). The extraembryonic membranes. In *The Avian Embryo: Structural and Functional Development*. Mac Millan, New York, pp. 1039-1141.
- Ruiz-Garcia, E., Scott, V., Machavoine, C., Bidart, J.M., Lacroix, L., Delalogue, S., and Andre, F. Gene expression profiling identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as candidate biomarkers for breast cancer screening. *Br J Cancer* 102, 462-468.
- Saigusa, S., Tanaka, K., Toiyama, Y., Yokoe, T., Okugawa, Y., Koike, Y., Fujikawa, H., Inoue, Y., Miki, C., and Kusunoki, M. Clinical significance of CD133 and hypoxia inducible factor-1alpha gene expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 23, 323-332.
- Semenza, G.L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29, 625-634.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.
- Semenza, G.L., Neufeld, M.K., Chi, S.M., and Antonarakis, S.E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5680-5684.
- Semenza, G.L., and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12, 5447-5454.
- Serbedzija, G.N., Flynn, E., and Willet, C.E. (2000). Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening. *Angiogenesis* 3, 512-528.
- Shin, H.J., Rho, S.B., Jung, D.C., Han, I.O., Oh, E.S., and Kim, J.Y. Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion. *J Cell Sci* 124, 1077-1087.
- Shmelkov, S.V., St Clair, R., Lyden, D., and Rafii, S. (2005). AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 715-719.
- Simon, M.C., and Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 285-296.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-5828.
- Sogawa, K., Iwabuchi, K., Abe, H., and Fujii-Kuriyama, Y. (1995). Transcriptional activation domains of the Ah receptor and Ah receptor nuclear translocator. *J Cancer Res Clin Oncol* 121, 612-620.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-745.
- Spanel-Borowski, K., Schnapper, U., and Heymer, B. (1988). The chick chorioallantoic membrane assay in the assessment of angiogenic factors. *Biomed. Res.* 9: 253-260.

- Sulpice, E., Plouet, J., Berge, M., Allanic, D., Tobelem, G., and Merkulova-Rainon, T. (2008). Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Blood* *111*, 2036-2045.
- Sun, Y., Liang, X., Najafi, N., Cass, M., Lin, L., Cai, C.L., Chen, J., and Evans, S.M. (2007). Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev Biol* *304*, 286-296.
- Suzuki, S., Terauchi, M., Umezu, T., Kajiyama, H., Shibata, K., Nawa, A., and Kikkawa, F. Identification and characterization of cancer stem cells in ovarian yolk sac tumors. *Cancer Sci* *101*, 2179-2185.
- Svoboda, J., Plachy, J., Hejnar, J., Karakoz, I., Guntaka, R.V., and Geryk, J. (1992). Tumor induction by the LTR, v-src, LTR DNA in four B (MHC) congenic lines of chickens. *Immunogenetics* *35*, 309-315.
- Taylor, C.T. (2008). Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem J* *409*, 19-26.
- Thomas, F., Holly, J.M., Persad, R., Bahl, A., and Perks, C.M. Fibronectin confers survival against chemotherapeutic agents but not against radiotherapy in DU145 prostate cancer cells: involvement of the insulin like growth factor-1 receptor. *Prostate* *70*, 856-865.
- Thomassin, L., Werneck, C.C., Broekelmann, T.J., Gleyzal, C., Hornstra, I.K., Mecham, R.P., and Sommer, P. (2005). The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers. *J Biol Chem* *280*, 42848-42855.
- Tuan, R.S. (1984). Carbonic anhydrase and calcium transport function of the chick embryonic chorioallantoic membrane. *Ann N Y Acad Sci* *429*, 459-472.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., and Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 14720-14725.
- Waalkes, S., Atschekzei, F., Kramer, M.W., Hennenlotter, J., Vetter, G., Becker, J.U., Stenzl, A., Merseburger, A.S., Schrader, A.J., Kuczyk, M.A., *et al.* Fibronectin 1 mRNA expression correlates with advanced disease in renal cancer. *BMC Cancer* *10*, 503.
- Wagner-Amos, K., and Seymour, R.S. (2002). Effect of regional changes to shell conductance on oxygen consumption and growth of chicken embryos. *Respir Physiol* *129*, 385-395.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 5510-5514.
- Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., and Huttner, W.B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12425-12430.
- Wilting, J., Christ, B., and Weich, H.A. (1992). The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF165 and PDGF-BB. *Anat Embryol (Berl)* *186*, 251-257.

- Wykoff, C.C., Beasley, N.J., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., *et al.* (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 60, 7075-7083.
- Yamamoto, M., and Kuroiwa, A. (2003). Hoxa-11 and Hoxa-13 are involved in repression of MyoD during limb muscle development. *Dev Growth Differ* 45, 485-498.
- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., and Buck, D.W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012.
- Yin, S., Li, J., Hu, C., Chen, X., Yao, M., Yan, M., Jiang, G., Ge, C., Xie, H., Wan, D., *et al.* (2007). CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* 120, 1444-1450.
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L., and Yu, J.S. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23, 9392-9400.
- Zakany, J., Gerard, M., Favier, B., Potter, S.S., and Duboule, D. (1996). Functional equivalence and rescue among group 11 Hox gene products in vertebral patterning. *Dev Biol* 176, 325-328.
- Zhang, H., Wang, W.P., Guo, T., Yang, J.C., Chen, P., Ma, K.T., Guan, Y.F., and Zhou, C.Y. (2009). The LIM-homeodomain protein ISL1 activates insulin gene promoter directly through synergy with BETA2. *J Mol Biol* 392, 566-577.