

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE**

**Charakterizace nové linie progenitorových buněk,
EM-G3,
lidského mamárního karcinomu**

Dizertační práce



Školitel: Prof. MUDr. Zdeněk Fendrich, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Eva Matoušková, CSc.

Podpořeno Grantovou agenturou Univerzity Karlovy,

číslo grantu 93/2005/C/FaF.

Hradec Králové 2006

Markéta Prchalová

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce RNDr. Evě Matouškové, CSc. za odborné vedení, cenné rady, předané zkušenosti, obětavou pomoc a osobní přístup. Dále pak děkuji všem z Laboratoře buněčné biologie ÚMG AV ČR v Praze za vytvoření rodinného prostředí a příjemné pracovní atmosféry.

Ráda bych také poděkovala kolegům a přátelům z Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK v Praze, zejména pak MUDr. Zdeňku Kleiblovi, PhD., kteří mi otevřeli dveře k molekulární biologii, dali mi prostor k práci a věnovali nemálo času i sil.

Děkuji za spolupráci RNDr. Janě Březinové, PhD z Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze, MUDr. Pavlu Dundrovi a paní Kolářové z Ústavu patologie 1. LF UK a VFN v Praze, RNDr. Marii Zadinové z Ústavu biofyziky a informatiky 1. LF UK v Praze.

Děkuji panu prof. MUDr. Zdeňku Fendrichovi, CSc. z FaF UK v Hradci Králové, že mi umožnil pracovat na tomto tématu, děkuji paní Žurkové a Ing. Martině Tmějové za nesmírnou pomoc při řešení mnohých problémů spojených s mým studiem a získaným grantem.

Děkuji svému muži za trpělivost a ochotu kdykoli mi naslouchat. Celé rodině pak za to, že se na ně kdykoli mohu obrátit s prosbou o pomoc.

Obsah

1	ÚVOD.....	8
1.1	STRUKTURNÍ A BUNĚČNÉ CHARAKTERISTIKY MLÉČNÉ ŽLÁZY.....	9
1.2	PROGENITOROVÉ BUŇKY NORMÁLNÍ A NÁDOROVÉ TKÁŇE MLÉČNÉ ŽLÁZY	11
1.3	VZNIK NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ.....	13
1.4	MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ MECHANIZMY VZNIKU KARCINOMU PRSU	15
1.4.1	<i>Geny odpovědné za přenos signálu v buňce.....</i>	16
1.4.2	<i>Geny regulující buněčný cyklus</i>	18
1.4.3	<i>Geny regulující apoptózu.....</i>	19
1.4.4	<i>Reparační geny.....</i>	21
1.5	BUNĚČNÉ LINIE Z NÁDORŮ MLÉČNÉ ŽLÁZY.....	21
2	CÍL PRÁCE	23
3	MATERIÁL A METODY	24
3.1	USTAVENÍ A KULTIVACE BUNĚČNÉ LINIE EM-G3.....	24
3.1.1	<i>Charakteristika pacientky a nádoru.....</i>	24
3.1.2	<i>Zpracování vzorku</i>	25
3.1.3	<i>Kultivační metoda</i>	25
3.1.4	<i>Selekce buněčných klonů</i>	26
3.1.5	<i>Zmražování a rozmražování buněk.....</i>	26
3.1.6	<i>Pasážování buněk.....</i>	26
3.2	CHARAKTERIZACE BUNĚČNÉ LINIE EM-G3	27
3.2.1	<i>Imunocytochemické barvení.....</i>	27
3.2.2	<i>cDNA array</i>	29
3.2.3	<i>Mnohobarevná FISH.....</i>	32
3.2.4	<i>Fluorescenční in situ hybridizace (FISH).....</i>	32
3.2.5	<i>Mutační analýza genů p53, PIK3CA, BRAF a K-Ras.....</i>	32

3.2.6	<i>Charakterizace závislosti EM-G3 buněk na EGF</i>	34
3.2.7	<i>Charakterizace závislosti růstu EM-G3 na regulátorech ER</i>	35
3.2.8	<i>Schopnost tvořit nádory (tumorigenicita) v nu/nu myších</i>	35
4	VÝSLEDKY	36
4.1	USTAVENÍ BUNĚČNÉ LINIE EM	36
4.2	KLONOVÁNÍ A SELEKCE BUNĚČNÉ LINIE EM-G3	36
4.3	MORFOLOGICKÉ VLASTNOSTI BUNĚK EM-G3	37
4.4	IMUNOCYTOCHEMICKÁ ANALÝZA EM-G3 IN VITRO A IN VIVO. POROVNÁNÍ S PŮVODNÍM NÁDREM PACIENTKY.....	37
4.4.1	<i>Charakterizace EM-G3 buněk in vitro</i>	38
4.4.2	<i>Analýza vzorku původního karcinomu prsu</i>	41
4.5	CDNA ARRAY	46
4.6	KARYOLOGIE LINIE EM-G3	47
4.7	FISH PRO HER2/NEU, CYKLIN D1, C-MYC, RB A P53.....	49
4.8	MUTAČNÍ ANALÝZA P53, PIK3CA, BRAF A K-RAS V EM-G3 BUŇKÁCH ..	50
4.9	CHARAKTERIZACE ZÁVISLOSTI EM-G3 BUNĚK NA EGF	51
4.10	CHARAKTERIZACE ZÁVISLOSTI RŮSTU EM-G3 NA REGULÁTORECH ER	51
4.11	TUMORIGENICITA V NU/NU MYŠÍCH	53
4.11.1	<i>Imunocytochemie EM-G3 buněk in vivo</i>	54
5	DISKUZE	58
5.1	CHARAKTER A PŮVOD BUNĚK LINIE EM-G3.....	58
5.2	SCHOPNOST RUSTU EM-G3 BUNEK IN VITRO.....	60
5.3	GENOMOVA STABILITA EM-G3 BUNEK.....	61
5.4	VÝZNAM LINIE EM-G3	63
6	ZÁVĚR	65
7	LITERATURA	66

Příloha 1: Souhrn imunohistochemie/imunocytochemie u původního nádoru, EM-G3 buněk <i>in vitro</i> a EM-G3 <i>in vivo</i>.....	75
Příloha 2: Zkratky genů analyzovaných v rámci arraye.....	76
Příloha 3: Publikované práce.....	79

Seznam zkratek

Zkratky genů analyzovaných v rámci arrayí jsou uvedeny v příloze 1.
Do českého jazyka byly přeloženy ty zkratky, které nemění překladem význam.

3T3	buňky myši embryonální fibroblastové linie NIH 3T3
AEC	aminoethylkarbazol
AIB1 (NCOA3)	amplified in breast cancer 1 (nuclear receptor coactivator 3) (OMIM 601937)
APAF	apoptotické proteázy aktivující faktor 1 (OMIM 602233)
Bax	bcl-2 asociovaný protein X (OMIM 600040)
bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2 (OMIM 151430)
Bid	BH3-interacting domain death agonist (OMIM 601997)
bp	počet párů bází
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog b1 (OMIM 164757)
BRCA1	breast cancer gene 1 (OMIM 113705)
BRCA2	breast cancer gene 2 (OMIM 600185)
CD	cluster of differentiation
CD10 (CALLA)	common acute lymphocytic leukemia antigen (OMIM 120520)
CD29	β 1 integrin (OMIM 135630)
CD49	α 6 integrin (OMIM 147556)
cdk	cyklin dependentní kináza
cDNA	komplementární DNA
DAB	diaminobenzidin
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	epidermální růstový faktor (OMIM 131530)
EGFR (ErbB1)	receptor pro epidermální růstový faktor (OMIM 131550)
EMA (MUC1)	epithelial membrane antigen (OMIM 158340)
ER	estrogenní receptor
ErbB2 (Her2/neu)	human epidermal growth factor receptor (OMIM 164870)
ESA (EpCAM)	epithelial specific antigen (OMIM 131560)
FACS	fluorescent activated cell sorting
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GTP	guanosintrifosfát
H-MEM	Eaglovo minimální médium v Hanksově pufru
CHEK2	checkpoint kinase 2 (OMIM 604373)
IGF	inzulinu podobný růstový faktor
K	cytokeratin, keratin
K-ras	Kirsten-ras (OMIM 190070)
LOH	loss of heterozygosity
MAX	Myc-asociovaný faktor X (OMIM 154950)

mBAND	mnohobarevná pruhovací technika
MDM2	mouse double minute 2 homolog (OMIM 164785)
mFISH	mnohobarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
NOD/SCID	severe combined immunodeficiency in non-obese diabetic mouse
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
p16INK4A	inhibitor cdk (OMIM 600160)
p15INK4B	inhibitor cdk (OMIM 600431)
p18	inhibitor cdk (OMIM 603369)
p19ARF	inhibitor cdk (OMIM 600927)
p21WAF/CIP1	inhibitor cdk (OMIM 116899, wildtype p53 aktivovaný fragment 1, CDK-interagující protein 1)
p27/KIP	inhibitor cdk (OMIM 600778, kinasový inhibiční protein)
p53	OMIM 191170
p57	inhibitor cdk (OMIM 600856)
p63	tumor protein (OMIM 603273)
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerázová řetězová reakce
PIGs	p53 indukované geny
PIK3CA	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit A (OMIM 171834)
PR	progesteronový receptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog (OMIM 601728)
TNM	tumor, nodus, metastasis
Rad51	OMIM 179617
Rb	OMIM 180200, retinoblastomový gen
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	počet otáček za minutu
rRNA	ribosomální RNA
SDS	sodium dodecyl sulfate
SMA	smooth muscle actin
SSC	standard saline citrate buffer
STK11	serin/threonin protein kináza 11 (OMIM 602216)
TAE	Tris-Acetat-EDTA pufr
TDLU	terminální duktálně-lobulární jednotka
TGF	transformující růstový faktor
TNF	tumorový nekrotizující faktor (OMIM 191160)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (OMIM 192240)

1 Úvod

Karcinom prsu je druhé nejčastější maligní onemocnění žen v ČR. V roce 2002 bylo diagnostikováno 5378 nových případů (ročenka ÚZIS 2005, ČR)*. Celých 16 % úmrtí žen na zhoubné nádory je zapříčiněno právě karcinomem prsu. Incidence v České republice, podobně jako v jiných zemích, je trvale rostoucí - v období 1990-2000 stoupla o více než 30 % na současných 112/100000 žen. Za příznivé trendy je však možné považovat zvyšující se podíl pacientek nižších klinických stádií a snížení úmrtnosti [Novotný *et al.* 2005]

V současnosti je známa řada faktorů, které jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu. Patří sem faktory genetické (zejména výskyt karcinomu prsu v rodině), hormonální (dlouhodobé působení estrogenních hormonů na prsní žlázu), nutriční (nadbytek tuků v potravě, obezita) a faktory vnějšího prostředí.

Nejčastějšími zhoubnými nádory prsu jsou epitelální nádory - karcinomy. Adenokarcinom - nádor ze žláзовého epitelu - je zdaleka nejčastější maligní nádor prsu a může být původu duktálního (90 %), lobulárního (5 %) nebo smíšeného (5 %). Naopak nádory mezenchymálního původu - sarkomy - jsou vzácné.

Studium prsních karcinomů probíhá, kromě přímé analýzy nádorových tkání, i na tkáňových kulturách. Kultivace primárních epitelálních buněk z individuálních solidních primárních nádorů mléčné žlázy je obtížná. Řada poznatků o patogenezi a vývoji lidského karcinomu prsu byla proto získána ze studií permanentních buněčných linií, které poskytují neomezený zdroj homogenní populace prsních nádorových buněk. Většina linií je původem z metastáz, buněčné linie z primárních nádorů mléčné žlázy jsou velmi vzácné [O'Hare 1991; Wang *et al.* 2000].

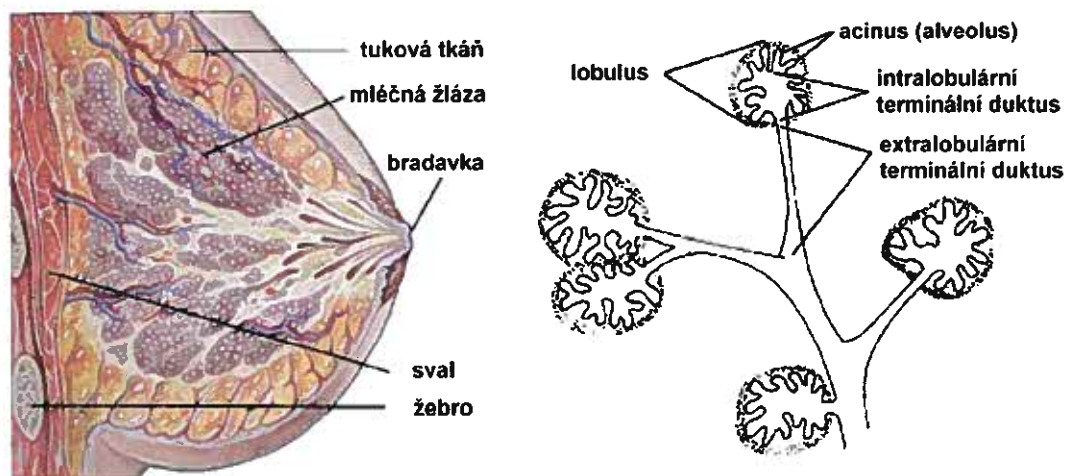
Laboratoř buněčné biologie ÚMG AV ČR, kde byla dizertační práce vypracována, se dlouhodobě zabývá kultivací buněk z primárních nádorů mléčné žlázy žen. Z přibližně 200 krátkodobých či střednědobých populací epitelálních buněk se zde podařilo vypěstovat pouze jednu permanentní linii. Ustavení klonální linie a charakterizace těchto buněk z hlediska buněčné i molekulární biologie je obsahem předkládané práce.

* Ke stažení na http://www.uzis.cz/download_file.php?file=1887

1.1 Strukturální a buněčné charakteristiky mléčné žlázy

Mléčná žláza se skládá z parenchymální části a vývodných kanálků vyústujících v podobě hlavních mlékovodů do oblasti bradavky. Žlázové těleso je uloženo v intersticiu bohatém na tukové buňky. Tuková tkáň pak obaluje celou žlázovou strukturu (Obr. 1).

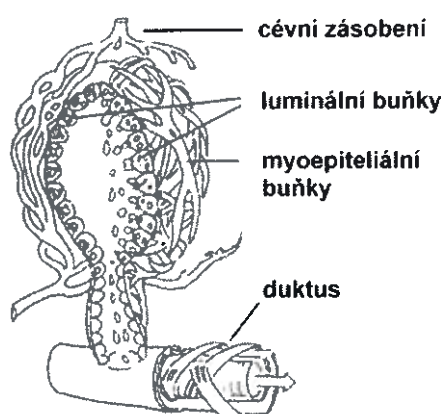
Obr. 1. Anatomické uspořádání mléčné žlázy u dospělé ženy v menoaktivním věku (vlevo) a schématické znázornění struktury sekreční a vývodné komponenty mamárního epitelu (vpravo).



Vývojově vzniká mléčná žláza z kožní epidermis invazí do podkožního mezenchymu a další morfogenezí větvením [Davies 2002; Fridriksdottir *et al.* 2005]. Terminální duktuly a alveoly navazující na intralobulární dukty se nazývají terminální duktálně-lobulární jednotky (TDLU) a jsou funkčními jednotkami prsu [Gudjonsson *et al.* 2002a]. Mléčná žláza zůstává po většinu menoaktivního života ženy velmi dynamickou tkání a prochází značnými morfologickými a funkčními změnami, které reagují na změny hormonálních hladin v těle. Juvenilní mléčná žláza ženy prochází v období puberty výrazným rozvojem charakterizovaným expanzí žlázových struktur. Tento vývoj vrcholí v období těhotenství, na jehož konci nastává významná proliferace sekrečního epitelu připravujícího se na období laktace.

Parenchym mléčné žlázy se skládá ze dvou typů epiteliálních buněk: (i) Luminální buňky tvoří sekreční vrstvu, která v acinu produkuje mléko. (ii) Myoepiteliální buňky, které obklopují luminální buněčný kompartment, poskytují kontraktilní aparát pro transport mléka v období laktace.

Myoepiteliální vrstva je organizována odlišně v duktech a v lobulech. V duktech tvoří protáhlé myoepiteliální buňky víceméně spojitou buněčnou vrstvu a jsou v přímém kontaktu s bazální membránou a stromatem. Interakce mezi duktálními luminálními buňkami a extracelulární matrix je z větší části zprostředkována myoepitelem, i když některé luminální buňky mohou být v kontaktu s bazální membránou. Alveolární myoepiteliální buňky jsou spíše hvězdicovitého tvaru, tvoří košíčkovitou strukturu kolem acinů a umožňují kontakt bazálního okraje luminálních buněk s bazální membránou (Obr. 2).



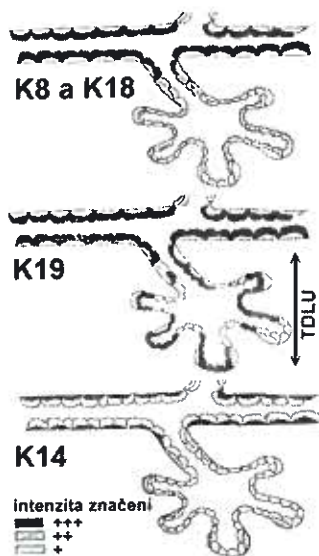
Obr. 2. Schéma uspořádání parenchymu mléčné žlázy v alveolu.

Alveolární struktury jsou tvořeny dvouvrstevným epitelem. Luminální buňky, které uvolňují apokrinní sekreci kapénky mléka, obklopuje vrstva myoepiteliálních buněk krytých bazální membránou. V oblasti lobulů vykazují luminální buňky nejvyšší sekreční aktivitu, zatímco v duktální části mají spíše charakter výstelkového epitelu.

Diferencované myoepiteliální buňky jsou silně kontraktilní a jejich ultrastruktura připomíná buňky hladkého svalstva. Obsahují velké množství mikrofilament, cytoskeletální a kontraktilní proteiny typické pro buňky hladkých svalů. Jsou to přitom skutečné epiteliální buňky: tvoří desmozomy a hemidesmozomy, hlavními intermediárními filamenti jsou cytokeratiny a jsou odděleny od pojivové tkáně bazální membránou.

Fenotypové vlastnosti buněčných typů *in vivo* jsou studovány na histologických řezech tkání imunohistochemickými technikami pomocí monoklonálních protilátek. Charakteristickými markery epiteliálních buněk jsou cytokeratiny (keratiny). Keratiny (K) jsou proteiny formující intermediární filamenta v epiteliálních buňkách. Byly rozděleny do skupin na základě struktury, náboje a molekulární hmotnosti [Moll *et al.* 1982]. Monospecifické protilátky reagující s jednotlivými cytokeratiny byly prvními markery využívanými k buněčné identifikaci epitelů. Jsou schopny rozlišení až na úroveň individuálních buněk v tkáni. Především díky cytokeratinům určujících imunitní

profil jednotlivých typů buněk mléčné žlázy bylo prostudováno jejich detailní uspořádání v mamárním epitelu. Luminální buňky jsou charakteristické expresí keratinů K7, K8, K18 a K19, zatímco myoepiteliální buňky exprimují K5 a K14 (Obr. 3) [Taylor-Papadimitriou *et al.* 1989].



Obr. 3. Schéma exprese některých charakteristických keratinů v buňkách epitelu mléčné žlázy.

K8, K18 a K19 jsou exprimovány v luminálních buňkách. K14 je exprimován v myoepiteliálních buňkách.

TDLU: terminální duktálně-lobulární jednotka

Dalšími proteiny charakterizujícími myoepiteliální buňky jsou jaderný protein p63 (patří do rodiny proteinů příbuzných p53), povrchový antigen CALLA (CD10) [Gusterson *et al.* 1986; Koker a Klecr 2004; Koukoulis *et al.* 1991] a protein hladkého svalstva SMA (smooth muscle actin). Pro luminální buňky jsou kromě keratinů typické povrchové antigeny EMA (epithelial membrane antigen) a ESA (epithelial specific antigen) [Clayton *et al.* 2004].

1.2 Progenitorové buňky normální a nádorové tkáně mléčné žlázy

Karcinomy prsu vznikají z epiteliálních buněk mléčné žlázy. Z rutinních vyšetření parafinových řezů nádorové tkáně je známo mnoho o terminálním stádiu nádorové transformace. Nové výzkumné směry však kladou vyšší důraz na identifikaci buněk, ze kterých nádor vzniká (tumor initiating cells). Je důležité znát fenotyp normálních a nádorových buněk, ale i fenotyp buněk, které mohou být z tkání kultivovány.

Luminální a myoepiteliální linie mají zřejmě společné progenitory, které se vyskytují v epitelu mamární tkáně v různých stádiích diferenciaci [Birnbauer *et al.* 2004; Bocker *et al.* 2002; Clayton *et al.* 2004; Deugnier *et al.* 2002b; Pechoux *et al.* 1999; Stingl *et al.* 2005]. Tyto progenitory se považují za bazální epiteliální buňky, které se nacházejí mezi bazální/suprabazální a luminální buněčnou vrstvou v blízkosti bazální membrány [DiRenzo *et al.* 2002; Gusterson *et al.* 2005]. Progenitorové buňky jsou také ve velké míře přítomny v TDLU, což jsou nejmenší, ale mitoticky nejaktivnější intralobulární ducty mléčné žlázy tvořící jakési zárodečné pupeny na koncích rozvětveného "mamárního stromu" [Gudjonsson *et al.* 2002b; Gusterson *et al.* 2005].

Analýzy mléčné žlázy dospělých žen ukazují na existenci společných progenitorů luminálních a myoepiteliálních buněk pozitivních na K5 [Boecker a Buerger 2003]. Tyto buňky mají schopnost diferencovat buďto do žlázových/luminálních (K18+), nebo do myoepiteliálních (SMA+) buněk přes přechodné (intermediární) buňky K5+/K18+ nebo K5+/SMA+. Jsou většinou lokalizované v nezralém luminálním epitelu včetně TDLU [Boecker a Buerger 2003; Gusterson *et al.* 2005].

Ačkoliv experimentální data jasně potvrzují existenci sebeobnovující mamární kmenové buňky, charakteristiky takových buněk nebyly dosud dostatečně definovány. Teprve v posledních letech byly publikovány práce, ve kterých byly izolovány potenciální kmenové buňky mléčné žlázy u myši i člověka, schopné růst *in vivo* i z velmi malého inokula (50 buněk) [Dontu *et al.* 2003a; Stingl *et al.* 2005]. Podarilo se též izolace a následná imortalizace K19+ suprabazálních údajně prekurzorových buněk z luminálně epiteliálního kompartmentu [Petersen *et al.* 2003]. V rekonstituované bazální membráně byly tyto buňky schopny tvořit struktury podobné TDLU. Další úspěšná izolace prsních kmenových/progenitorových buněk v průběhu minulých let umožnila sledovat jejich diferenciaci *in vitro* [Clayton *et al.* 2004; Gudjonsson *et al.* 2002b; Stingl *et al.* 2005] a identifikovat „tumor initiating cells“ [Al Hajj *et al.* 2003; Dontu *et al.* 2003b; Ponti *et al.* 2005].

Buňky invazivního prsního karcinomu většinou vykazují fenotyp diferencovaných luminálních epitelii K18+/K19+, předpokládá se tudíž, že vznikly z progenitorových buněk luminálního epiteliálního kompartmentu.

Kmenové nebo progenitorové buňky v TDLU jsou zřejmě nejčastějšími cílovými buňkami maligní transformace, neboť většina neoplastických prsních lézí vzniká právě v této oblasti [Petersen *et al.* 2003; Wellings *et al.* 1975].

1.3 Vznik nádorového onemocnění

Vznik nádorového onemocnění je víceúrovňový proces, který je výsledkem působení jak vnitřních, tak zevních faktorů. Počátek nádorové změny se odehrává na molekulární úrovni. K přeměně normální buňky na nádorovou dochází v důsledku mutací genomové DNA. Mutace vznikají působením zevních faktorů na DNA v jádře buňky, ale i v důsledku inkompetentních reparačních mechanismů či chyb v rámci replikace genomové DNA. Mezi důležité mutagenní zevní faktory patří především ionizující záření, kancerogeny a onkogenní viry. Vznik mutací v zárodečných buňkách vede k hereditárním mutacím, které jsou přítomny ve všech buňkách dospělého organismu a jsou přenášeny z generace na generaci.

Mutacemi vyvolané genetické změny se nemusí funkčně projevit (tiché mutace). V naprosté většině fenotypově aktivních mutací však dochází k zániku buňky v důsledku poškození důležitých regulačních nebo strukturních genů. Pouze ve velmi nízkém procentu vznikne v buňce taková kombinace mutací v kritických genech, která způsobí selhání kontrolních mechanismů buněčné proliferace nebo apoptózy. Následné dělení takové buňky neodpovídající na vnější ani vnitřní regulační mechanismy způsobí vývoj klonu maligně transformovaných buněk.

Vznik nádorového onemocnění je způsoben poškozením genů, které se účastní regulace tkáňové homeostázy. Tkáňová homeostáza je dynamická rovnováha buněčných populací ve tkáních. Je to výsledek komplexní signalizace mnohobuněčného organismu a současného respektování lokálních potřeb cílového orgánu/tkáně. K růstu masy nádorových buněk může tedy dojít dvěma způsoby. Absolutně - přírůstek buněčné populace je dán zvýšenou proliferační aktivitou. Relativně - nárůst vzniká na základě prodlouženého přežívání buněk, které neodpovídají na regulační signály a které ztratily schopnost indukovat apoptózu [Rowinsky 2003].

Narušení tkáňové homeostázy je výsledkem poruch v genech, které lze na základě jejich aktivit rozdělit do několika skupin. Jedná se o onkogeny (resp. protoonkogeny - geny, jejichž genové produkty stimulují buněčný cyklus a inhibují průběh apoptózy) a tumor

supresorové geny (recesivní onkogeny – geny, jejichž genové produkty naopak inhibují průběh buněčného cyklu nebo aktivují apoptózu). Kromě těchto dvou hlavních skupin se nepřímo na narušení tkáňové homeostázy účastní i reparační geny. Produkty reparačních genů se podílejí na vytváření reparačních komplexů genomové DNA. Jejich porucha pak vyvolává stav, který označujeme jako genomová nestabilita. V buňkách s takto narušenou genomovou stabilitou dochází k vyšší mutabilitě DNA a porucha v reparačních genech navíc umožňuje toleranci mutačních změn.

Ve skutečnosti výše uvedené skupiny genů řídí několik kritických signálně transdukčních dějů: intracelulární signalizaci, buněčný cyklus, apoptózu, reparaci DNA a intercelulární komunikaci [Rowinsky 2003].

Výzkumy posledních let ukazují, že počátečním místem vzniku nádorových změn ve tkáni pravděpodobně nejsou terminálně diferencované buňky, ale buňky kmenové nebo progenitorové. Akumulace genetických poškození může v těchto buňkách probíhat dlouhodobě a pravděpodobně ve většině případů po letech vyústit ve vznik maligně transformovaného buněčného klonu [Smalley a Ashworth 2003].

Onkogen v širším slova smyslu je každý gen, jehož produkt přispívá ke vzniku nádorové transformace. Jako **protoonkogeny** jsou označovány geny, jejichž fyziologickou úlohou je regulace buněčné proliferace a diferenciace. Jejich produkty jsou signální proteiny, signálně transdukční proteiny a transkripční faktory, které pozitivně ovlivňují nejen buněčný cyklus, ale i řadu normálních metabolických pochodů v buňce. Teprve následkem jejich mutace nebo aktivace v nevhodnou dobu může vzniknout trvalý promitotický signál způsobující aberantní aktivaci buněčného cyklu a tím následně vznik nádorového klonu.

Ke změnám v aktivitě protoonkogenů může docházet buď na úrovni jejich exprese, nebo vlivem strukturních změn postihujících samotné geny protoonkogenů. Jde např. o bodovou mutaci, při které dochází k záměně jediné nukleotidové baze. Výsledkem mutace může být začlenění nesprávné aminokyseliny do vznikajícího polypeptidového řetězce nebo jeho zkrácení (v případě vzniku terminačního kodonu). Postihuje-li mutace důležitou aminokyselinu nebo část řetězce, může být takováto změna z hlediska funkce produktu kritická. Dále může jít o strukturní změny chromozomů v důsledku jejich zlomů nebo změny lokalizace části chromozomu (přesunu lokusu na jiný chromozom -

translokace - nebo přemístění do jiné oblasti na stejném chromozomu – inverze). Tím může dojít ke změně v regulaci exprese protoonkogenu. Může se dostat do oblasti aktivované silnými promotorovými sekvencemi některých např. provozních (house-keeping) genů. U protoonkogenů postačuje pro vznik aktivního onkogenu schopného nádorové transformace mutace jen v jedné ze dvou alel. Jde tedy o dominantní genotypový projev.

Hlavní význam produktů **tumor supresorových genů** spočívá především v inhibici (negativní regulaci) buněčného cyklu, dále je důležitý jejich podíl na řízení diferenciaci, apoptózy a odpovědi na stresové podněty. Pro fenotypový projev onemocnění je nezbytná inaktivace obou alel tumor supresorového genu. Hereditární mutace tumor supresorových genů nacházíme v naprosté většině u familiárně se vyskytujících nádorů. Jedna mutovaná nebo deletovaná alela se přenáší geneticky, k somatické inaktivaci druhé dochází během života nosiče mutace. Tato inaktivace může vzniknout v cílové tkáni v důsledku mutace nebo delecce, avšak často je její podstatou funkční inaktivace genu na úrovni hypermetylace promotorové sekvence aktivní alely [Devilee *et al.* 2001].

1.4 Molekulárně-biologické mechanismy vzniku karcinomu prsu

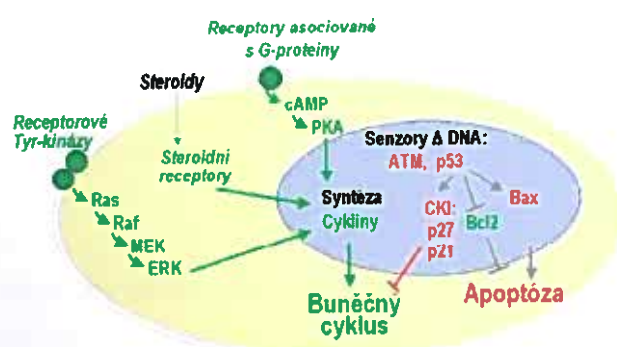
Karcinom prsu se vyskytuje ve dvou patogeneticky odlišných formách: častější **sporadická forma** karcinomu prsu je polygenním onemocněním, kde velkou úlohu schrávají i epigenetické vlivy a faktory prostředí. **Dědičné formy** karcinomu prsu tvoří 5-10 % všech případů onemocnění. Doposud bylo charakterizováno několik tumor supresorových genů, jejichž dědičné mutace vedou k predispozici pro vznik karcinomu prsu. Nejdůležitější z nich jsou tzv. hlavní predispoziční geny *BRCA1* a *BRCA2* tvořící přes 50 % hereditárních nádorů [Szabo a King 1995]. Mezi další geny, jejichž dědičné mutace predisponují nosiče ke vzniku karcinomu prsu, patří geny pro negativní regulátory buněčného cyklu *PTEN*, *p53*, a gen způsobující vznik Peutz-Jeghersova syndromu *STK11* (jeho genový produkt LKB1 se podílí na regulaci p53-dependentní apoptózy).

Na pomezí mezi genetickými rizikovými faktory a predispozičními geny se nacházejí tzv. geny s nízkou penetrancí. Jedná se většinou o tumor supresorové geny, jejichž varianty se v populaci vyskytují poměrně často (~ 1%). Mutace a polymorfismy v

genech s nízkou penetrancí zvyšují riziko vzniku nádorového onemocnění u nosiče výrazně méně, než je tomu v případě hlavních predispozičních genů. (Obvykle narůstá zvýšení celoživotního rizika vzniku onemocnění 2-3krát). Mezi takovéto doposud charakterizované geny patří geny pro kinázu regulující buněčný cyklus *CHEK2*, kofaktor nukleárních steroidních receptorů *AIB1 (NCOA3)* nebo polymorfismy v genu pro *TNFβ* [Dapic *et al.* 2005; Kleibl *et al.* 2005].

1.4.1 Geny odpovědné za přenos signálu v buňce

Promitogenní stimulace buňky počíná v extranukleárním kompartmentu buňky a zahrnuje řadu signálně transdukčních mechanismů (Obr. 4).



Obr. 4. Schématické znázornění úlohy klíčových onkogenů (zeleně) a tumor-supresorových genů (červeně) v regulaci buněčného cyklu a apoptózy.

Růstové faktory jsou polypeptidy ovlivňující proliferaci a diferenciaci buněk. V nádorových buňkách je porucha signalizace často způsobena autokrinním zvýšením exprese růstových faktorů, čímž dochází k zvýšení promitotické aktivity v nádorových buňkách či buňkách nádorového stromatu. Mezi růstové faktory, aktivované v nádorech prsu patří např. epidermální růstový faktor (EGF), inzulínu podobný růstový faktor (IGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) aj. [Rosfjord a Dickson 1999].

Receptory pro růstové faktory jsou transmembránové glykosylované molekuly sloužící pro navázání růstových faktorů. Navázáním růstového faktoru na příslušný receptor dochází k vytvoření aktivních dimerů receptoru, jehož jednotlivé podjednotky se vzájemně fosforylují, a tím se aktivují. V normální buňce jsou receptory s navázaným

růstovým faktorem rychle inaktivovány (např. jsou přesunuty do nitra buňky a zde degradovány). V nádorové buňce může být exprese receptoru zvýšena (např. amplifikací příslušného genu) nebo může být narušena jeho internalizace, což vede k prodloužení stimulačního účinku. Při mutacích genů receptorových molekul mohou vznikat i trvale aktivní receptorové molekuly, které jsou schopny vytvářet aktivní receptorové komplexy bez přítomnosti navázaného ligandu – růstového faktoru .

Častou aberací, se kterou se setkáváme u karcinomu prsu, je vysoká aktivita signálně transdukční dráhy růstových faktorů skupiny EGF. EGF se váže na transmembránový receptor EGFR (častěji nazývaný ErbB1) [Navolanic *et al.* 2003]. TGF α je klíčovým růstovým faktorem pro normální vývoj prsní žlázy [Lerebours a Lidereau 2002]. Amplifikace onkogenu pro ErbB2 (Her2/neu) receptor je častou alterací (v 15-30%) u sporadických karcinomů prsu. Přítomnost této amplifikace je důležitou prognostickou známkou nádoru a předpokladem pro selektivní biologickou léčbu pomocí specifických inhibitorů Her2/neu receptoru [Brand *et al.* 2006]. Možný je rovněž výskyt mutací v ErbB2 receptoru.

Proteiny zúčastněné v přenosu signálu (signální transducery) jsou z biochemického hlediska heterogenní skupina bílkovin (G-proteiny, nereceptorové tyrosinkinázy aj.), jejichž úkolem je zprostředkování přenosu signálu z aktivovaných receptorových komplexů do buněčného jádra.

Mezi nejznámější zástupce onkogenů této skupiny patří guanosintrifosfát (GTP) – vázající proteiny z rodiny ras (p21Ras). Mutace v onkogenech ras jsou nejčastěji se vyskytující genetickou změnou v genech protoonkogenů. U karcinomu prsu se setkáváme s mutacemi především genu *K-ras*, avšak méně často než je tomu u jiných nádorů (karcinomů gastrointestinálního traktu, ovaria) [Lerebours a Lidereau 2002]. Častým nálezem u nádorů je rovněž výskyt mutací v genech kódujících proteiny kaskády kináz (RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK). Příkladem může být častá alterace protoonkogenu BRAF.

Mutace v protoonkogenu *PIK3CA*, jehož genový produkt (podjednotka p110 proteinkinázy A) je zodpovědný za aktivaci kinázy AKT, se vyskytují až ve 35 % sporadických karcinomů prsu [Li *et al.* 2006].

Transkripční faktory jsou proteiny po aktivaci translokované do buněčného jádra, kde regulují expresi genů (nebo častěji sad genů) v závislosti na měnících se potřebách buňky. Patří mezi ně např. produkty protoonkogenů c-jun a c-fos, které tvoří heterodimerní transkripční faktor AP-1. Mutantní onkoproteiny transkripčních faktorů nejsou obvykle samy schopny vyvolat nádorovou transformaci ani při jejich zvýšené expresi. Vedou však ke vzniku populace tzv. imortalizovaných buněk s jinak normálním fenotypem. K nádorové transformaci dochází po následném poškození některého z dalších klíčových genů [Visvader a Lindeman 2003].

U sporadického karcinomu prsu se setkáváme často s amplifikacemi genu pro transkripční faktor c-myc, jehož genový produkt vytváří s proteinem MAX aktivní heterodimer zvyšující expresi transkripčních faktorů důležitých pro pozitivní regulaci buněčného cyklu ze skupiny E2F [Aulmann *et al.* 2006].

1.4.2 Geny regulující buněčný cyklus

Buněčný cyklus je komplexní regulační děj, jehož výsledkem je replikace buňky. V některých případech probíhá v rámci buněčného cyklu i diferenciací příslušných buněk.

Na řízení buněčného cyklu se podílí stovky proteinů. Základními regulačními bílkovinami buněčného cyklu jsou cykliny a cyklin dependentní kinázy (cdk). Cykliny se v buňce cyklicky syntetizují a zase rychle degradují. Tyto molekuly aktivují cdk, které jsou v buňce přítomné po celý buněčný cyklus. Komplexy cyklinů a cdk svou proteinkinázovou aktivitou regulují řadu bílkovinných substrátů zapojených do vlastních biochemických pochodů v jednotlivých fázích buněčného cyklu (proteiny zodpovědné za syntézu DNA v S-fázi, molekulární motory řídící transport chromatid při mitóze) nebo proteinů s regulačními aktivitami (produkt tumor supresorového genu pRb).

Amplifikace genů pro cykliny D a E je častým nálezem u sporadického karcinomu prsu. Je přítomna ve 20-40 % případů [Lerebours a Lidereau 2002].

Na aktivitu komplexů cyklinů a cdk mají zásadní vliv jejich inhibitory kódované tumor supresorovými geny *p16INK4A*, *p15INK4B*, *p18*, *p19ARF*, *p21WAF/CIP1*, *p27/KIP* a *p57*.

Produktem tumor supresorového genu *p53* je nukleární fosfoprotein. Jako transkripční faktor reguluje genovou expresi řady genů, mezi které patří například protein *p21WAF/CIP1* - kritický inhibitor komplexu cyklinu D/*cdk4/6*. Mutace v genu *p53* jsou nejčastější genetickou změnou u nádorů vůbec. Přibližně 50 % lidských nádorů nese inaktivovaný protein *p53* [Sherr 1996]. Sporadický karcinom prsu je onemocnění, u kterého se setkáváme s mutacemi *p53* v přibližně 10-15 % případů. Častější (přibližně 50%) je výskyt inaktivace proteinu *p53* u hereditárních karcinomů prsu [Oliveira *et al.* 2005]. Tato inaktivace může být způsobena řadou příčin. Častý je výskyt mutací v genu *p53*, ale dochází i k hypermetylaci promotoru genu, ztrátám alel nebo funkční inaktivaci *p53* proteinu. Příkladem může být ubikvitinem zprostředkovaná proteazomální degradace proteinu *p53* způsobená hyperexpresí proteinu *MDM2*.

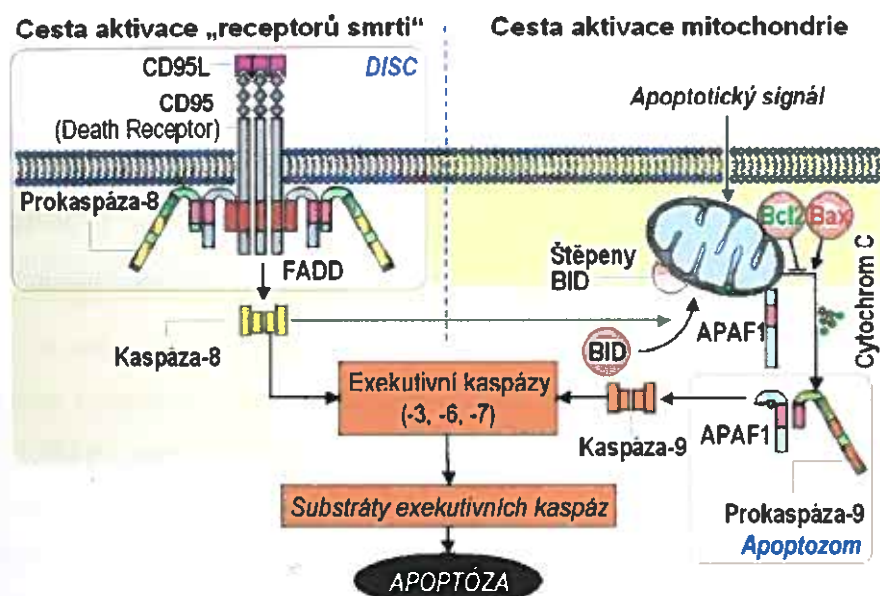
1.4.3 Geny regulující apoptózu

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je velmi důležitým dějem v řízení růstu buněčných populací, který stojí na opačném pólu vzhledem k mitóze. Vyžaduje aktivní účast buňky na svém vlastním zániku. V buňkách maligních nádorů často dochází k jejím poruchám [Kleibl *et al.* 2002]. Průběh apoptózy charakterizuje jednotný morfologický obraz se vznikem apoptotických tělísek.

Biochemickou podstatou apoptózy je série regulovaných proteolytických štěpení výkonných apoptotických proteolytických enzymů (kaspáz), jejichž terminálními substráty jsou pro buňku životně důležité regulační a strukturní bílkoviny. Aktivace apoptózy probíhá vnitřní nebo vnější cestou. Tyto cesty se spojují na úrovni aktivace exekutivních kaspáz (Obr. 5). K primární aktivaci kaspáz z neaktivních prokaspáz v extrinsické části apoptózy dochází cestou tzv. „receptorů smrti“ (TNF, CD95), které tvoří komplex DISC (death inducing signaling complex). Spouštěcím mechanismem intrinsické cesty apoptózy je uvolnění cytochromu *c* (AIF) z mitochondrie a následné sestavení apoptozomu. Postupná aktivace prokaspáz již aktivními kaspázami vede jak k amplifikaci apoptotického signálu, tak také k jeho propagaci napříč buněčnými kompartmenty. V regulaci apoptózy sehrávají důležitou roli proteiny rodiny *bcl-2*. Do této rodiny patří přes 20 proteinů a obsahuje jak inhibitory (*Bcl-2*, *Bcl-XL*), tak aktivátory (*Bax*, *Bad*, *Bid*) apoptózy [Cory *et al.* 2003]. Jejich prostřednictvím vykazuje zásadní vliv na průběh apoptózy i protein *p53*, který je aktivátorem exprese genu *Bax* a

inhibitorem exprese *Bcl-2*. Také se podílí na zvýšení exprese dalších proteinů aktivujících apoptózu, např. receptoru CD95 (též Apo-1) nebo p53-indukovaných genů (PIGs).

Obr. 5. Schématické znázornění procesu apoptózy. K primární aktivaci kaspáz z neaktivních prokaspáz v extrinsické části apoptózy dochází cestou aktivace proteinů patřících do rodiny receptorů pro tumor necrosis faktor (TNF) – tzv. „receptorů smrti“ (TNF, CD95). Spouštěcím mechanismem intrinsické cesty a apoptózy je uvolnění cytochromu c z mitochondrie, aktivace proteinu APAF1 a následné sestavení apoptozomu, které spočívá v navázání prokaspázy 9 na aktivované molekuly APAF1. Postupná aktivace prokaspáz již aktivními kaspázami vede jak k amplifikaci apoptotického signálu, tak také k jeho propagaci napříč buněčnými kompartmenty. Proteiny rodiny Bcl2 slouží nejen pro regulaci apoptózy na úrovni uvolnění cytochromu c z mitochondrie, ale v podobě proteinu Bid i pro vzájemné spojení obou apoptotických cest.



Schopnost buňky indukovat apoptózu určuje mimo jiné poměr intracelulárních koncentrací mezi skupinami proapoptotických resp. protiapoptotických zástupců rodiny *bcl-2*, obvykle vyjadřovaných jako poměr jejich dvou zástupců Bcl-2/Bax. S overexpresí proteinu Bcl-2 (obvykle způsobenou amplifikací genu) se setkáváme u 40 % karcinomu prsu. Tato overexprese je negativním prognostickým markerem, na druhou stranu rovněž možným cílem protinádorové léčby pomocí antisense oligonukleotidů [Sirvent *et al.* 2004].

1.4.4 Reparační geny

Úkolem reparačních genů je oprava poškozené DNA, která vzniká jak při procesu replikace DNA, tak působením množství kancerogenních vlivů z vnějšího prostředí. Stejně jako existují různé druhy poškození DNA, jsou v buňce přítomny i různé druhy reparačních mechanismů. Kritickou poruchou jsou defekty reparací dvouřetězcových zlomů DNA, k nimž dochází působením ionizujícího záření nebo některých chemických látek. Do systému oprav těchto defektů je zapojena řada proteinů, k nimž patří i produkty tumor supresorových genů vyskytujících se u familiárního karcinomu prsu – *BRCA1*, *BRCA2*, *Rad51*, *BRAF*, *NBS1* [Deng 2006]. Mutace v těchto proteinech jsou patogenetickou podstatou vzniku hereditárních karcinomů prsu, které u nás tvoří přibližně 5-10 % všech karcinomů prsu [Pohlreich *et al.* 2005]. Četnost somatických mutací těchto genů v případě sporadického karcinomu prsu pravděpodobně kolísá, častější je výskyt ztrát alel [Janatova *et al.* 2005].

1.5 Buněčné linie z nádorů mléčné žlázy

Většina patogenetických poznatků, které o nádorových onemocněních máme, byla získána z *in vitro* studií nádorových buněčných linií i přesto, že se buněčné nádorové linie mohou významně odlišovat od nádorových buněk *in situ* [Rummukainen *et al.* 2001]. Lidské mamární karcinomy jsou onemocněním velmi heterogenním. Onemocnění nese významné individuální charakteristiky, především z důvodu vysoké heterogenity nádorových buněk, která je pro prsní karcinomy typická.

Přes velký rozmach molekulární a buněčné biologie je počet stabilních nádorových linií karcinomu prsu nízký. Od konce 50. let, kdy byla připravena první buněčná linie BT20, se podařilo ustavit o málo více než 100 linií a jen velmi málo z nich je dobře charakterizováno [Lacroix a Leclercq 2004]. V nedávné studii bylo prokázáno, že permanentní buněčné linie karcinomů mléčné žlázy do velké míry odrážejí konkrétní vlastnosti buněk nádorů *in vivo*, ze kterých byly odvozeny [Lacroix a Leclercq 2004]. Pro rozšíření znalostí o prsních karcinomech a jejich morfologické a molekulárně-biologické různorodosti je proto žádoucí získat co největší škálu různých typů mamárních linií a tyto podrobně prostudovat. Jedním z důležitých přístupů je studium genové exprese pomocí mikroarrayových technologií. Problémem zůstává, že dvě

třetiny všech studií o prsních nádorových buňkách byly vypracovány pouze na třech liniích: MCF7, T47D a MDA-MB231. Navíc absolutní většina linií mamárních karcinomů (včetně tří jmenovaných) byla odvozena z metastáz, většinou pleurálních či břišních výpotků, tedy ze suspenzní formy velmi pozdního vývojového stádia těchto buněk.

Buněčné kultury založené přímo ze solidních nádorů jednotlivých pacientek jsou velmi vzácné [Wang *et al.* 2000]. Jejich dělení bývá pomalé (generační doba až 100 hodin), takže jsou pro experimentální studie obtížně použitelné [von Fournier *et al.* 1980]. Přitom jsou tyto buňky důležitým modelem pro výzkum časnějších stádií nemoci či jejích méně agresivních forem. Dobře charakterizované linie jsou důležitým zdrojem pro výzkum buněčné a molekulárně- biologické charakteristiky nádorů a pro vývoj nových strategií léčby.

2 Cíl práce

Cílem mojí práce bylo založení a podrobná charakterizace permanentní klonální buněčné linie, EM-G3, odvozené ze vzorku primárního lidského karcinomu prsu.

Součástí práce byly tyto dílčí úkoly:

1. Ustavení a kultivace permanentní klonální linie EM-G3.
2. Imunocytochemická, molekulárně-biologická a cytogenetická charakterizace buněk linie EM-G3.
3. Studium schopnosti růstu buněk linie EM-G3 v myším modelu.

Snahou práce bylo vysledovat původ buněk linie EM-G3 v původním nádorovém ložisku na základě srovnání imunocytochemického a imunohistochemického profilu buněk linie a buněk původního nádoru. Zároveň jsem se pokusila zhodnotit potenciální význam permanentní klonální linie EM-G3 pro její využití v oblasti dalšího studia kancerogeneze karcinomu prsu.

3 Materiál a metody

3.1 Ustavení a kultivace buněčné linie EM-G3

Linie EM byla ustavena ze vzorku primárního nádorového ložiska karcinomu prsu pomocí feeder-layer techniky. Po zjištění dostatečného proliferačního potenciálu (spontánní imortalizace) bylo nezbytné před následnou charakterizací buněk dosáhnout vysoce homogenní populace pomocí klonální expanze buněk linie z jedné buňky. Tato linie byla popsána jako EM-G3.

3.1.1 Charakteristika pacientky a nádoru

Vzorek tkáně pochází z operační biopsie získané v rámci druhého chirurgického výkonu od pacientky s metachronním karcinomem prsu v říjnu 2001. Operační výkon byl proveden na 1. chirurgické klinice 1. LF UK a VFN. Pacientce bylo v době druhé operace 65 let. Histologické vyšetření prokázalo přítomnost invazivního duktálního karcinomu, grade II, pT1cN0M0 s mikrokalcifikacemi, fibrogenézí a intraduktální propagací. Buňky nádoru vykazovaly pozitivitu na přítomnost estrogenního receptoru (ER) v 85 %, progesteronového receptoru (PR) v 90 % a ErbB2 v 80 %. Pacientka prodělala lumpektomii, při níž byl odebrán vzorek pro následnou kultivaci (schváleno etickou komisí VFN v Praze). Pacientka byla následně léčena letrozolem.

Pět let před operací, ze které byl získán vzorek tkáně pro kultivaci permanentní linie, se pacientka podrobila operaci pro karcinom mamy v horním zevním kvadrantu kontralaterálního prsu. Histologicky se jednalo o infiltruující duktální karcinom s ložisky papilomatózy s atypickou intraduktální epitelální hyperplazií s fibrocystickou chorobou zbývající prsní tkáně. V šesti vyšetřených axilárních lymfatických uzlinách nebyla zjištěna přítomnost metastáz (stádium IIA). U pacientky byla provedena radikální mastektomie. Pacientka následně podstoupila adjuvantní hormonální terapii tamoxifenem a léčbu letrozolem.

Matka pacienty zemřela na karcinom dělohy; jiné maligní onemocnění v rodině pacientka neudává. V současné době je pacientka v remisi, 10 let po první, respektive 5 let po druhé operaci.

3.1.2 Zpracování vzorku

Vzorek tkáně ($0,3 \text{ cm}^3$) byl rozdělen sterilními nůžkami na kousky o velikosti cca 1 mm^3 a inkubován v 5 ml 0,05% kolagenázy A (Roche) rozpuštěné ve standardním kultivačním médiu při 37°C . Výsledná buněčná suspenze byla naředěna médiem a centrifugována 10 min při 200 g.

3.1.3 Kultivační metoda

Základem metody byla kultivace epiteliálních buněk na porostu pomocných letálně ozářených (100Gy, Gammacel 220) 3T3 myších fibroblastů o hustotě 25000 buněk/cm^2 (feeder-layer). Tato vrstva pojivových buněk sloužila jako nedělicí se, ale mechanicky a metabolicky aktivní podklad pro epiteliální buňky mléčné žlázy. Buňky feeder-layeru produkující řadu růstových faktorů zůstávaly aktivní po dobu 7-10 dní. V případě potřeby byly nahrazeny jinými.

Buňky byly pěstovány v polystyrénových lahvičkách nebo Petriho miskách s povrchem upraveným pro tkáňové kultury. Kultivace probíhala v termostatu v 3,5% atmosféře CO_2 při 37°C . *Standardní kultivační médium* (používané pro kultivaci fibroblastů 3T3) bylo H-MEM (Eaglovo minimální médium v Hanksově pufru) doplněné o všechny neesenciální aminokyseliny, pyruvát sodný 0,12 g/l, NaHCO_3 1 g/l, 10% bovinního séra, penicilin 200 U/ml a streptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$. Médium pro kultivaci epiteliálních buněk bylo navíc obohaceno o 2 % fetálního bovinního séra, hydrokortizon 0,5 $\mu\text{g/ml}$, inzulin 5 $\mu\text{g/ml}$ (Actrapid, Novo Nordisk), cholera toxin 10^{-10} M (Sigma) a epidermální růstový faktor EGF 5 ng/ml (Sigma).

Buňky získané ze vzorku tkáně byly resuspendovány v epiteliálním kultivačním médiu a nasazeny do kultivační lahvičky (NUNC, 25 cm^2), která byla inkubována 3 hodiny při 37°C . Během této doby došlo k přichycení lidských fibroblastů ke kultivačnímu povrchu a tím k oddělení těchto rychle adheřujících buněk. Médium s plovoucími epiteliálními buňkami bylo přeneseno do druhé kultivační lahvičky na připravený feeder-layer.

3.1.4 Selekcce buněčných klonů

Pro získání homogenní populace odvozené z jedné buňky byla immortalizovaná linie epiteliálních buněk (nazvaná EM) klonována. Klonování proběhlo v 96jamkové kultivační destičce pro tkáňové kultury (NUNC). V průměru byly nasazeny dvě buňky na jamku v 0,2 ml média. Po 24 hodinách byly označeny jamky, které obsahovaly pouze jednu buňku. Dobře rostoucí jednobuněčné kolonie byly přeneseny do kultivačních misek o průměru 35 mm a klony byly dále pasážovány. Jeden z klonů, EM-G3, byl vybrán pro následný výzkum.

3.1.5 Zmražování a rozmražování buněk

Buňky byly sklizeny trypsinizací do kyvety s nesmáčivým povrchem, spočítány v Bürkerově komůrce a centrifugovány 10 min při 200 g. Peleta byla resuspendována v médiu a smíchána v poměru 1:1 s vychlazeným zmrazovacím médiem, složeným ze 3 ml epiteliálního kultivačního média, 1 ml bovinního séra a 1 ml dimethylsulfoxidu. Suspenze obsahující 10^6 - 10^7 buněk/ml byla rozplněna po 1 ml do zmrazovacích ampulí. Ampule byly vloženy do zmrazovací krabičky (freezing container, Nalgene) s izopropanolem a uloženy na 5-24 hodin do -70°C . Poté byly ampule trvale uskladněny v tekutém dusíku.

Při rozmražování buněk byla ampulka ohřáta ve vodní lázni (37°C), buňky byly resuspendovány v 9 ml kultivačního média a dle potřeby nasazeny.

3.1.6 Pasážování buněk

Z kultivační nádoby bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty PBS puřrem. K uvolnění buněk přisedlých na dně kultivační nádoby byl použit roztok 0,25% trypsin/0,02% EDTA (2:1), v kterém byly buňky inkubovány 10-15 min při 37°C . K uvolněným buňkám bylo v nadbytku přidáno standardní kultivační médium. V médiu obsažené sérum inhibuje účinek trypsinu. Buňky byly spočítány, centrifugovány, resuspendovány v epiteliálním kultivačním médiu a nasazeny v požadovaném množství do nových kultivačních nádob.

3.2 Charakterizace buněčné linie EM-G3

Buňky klonální linie EM-G3 byly charakterizovány pomocí imunocytochemických technik [Lacroix *et al.* 2004]. Imunohistochemicky byly studovány vzorky původního nádoru od pacientky s karcinomem prsu. Pro analýzu genové exprese buněk EM-G3 byly použity cílené cDNA arraye charakterizující geny ovlivňující intracelulární signalizaci, buněčný cyklus a apoptózu. Genomové alterace byly studovány pomocí mFISH. Byla provedena analýza vybraných onkogenů a tumor supresorových genů často alterovaných u karcinomu prsu. Dále byla charakterizovaná závislost EM-G3 buněk na EGF a regulátorech ER. Nakonec byl růstový potenciál buněk EM-G3 hodnocen *in vivo* v myším modelu.

3.2.1 Imunocytochemické barvení

Buňky linií EM-G3, parafinové řezy původního lidského nádoru a experimentálního myšího tumoru byly podrobeny imunocytochemické/imunohistochemické analýze s použitím monoklonálních protilátek proti K5, K7, K8, K14, EGFR, SMA, EMA, ESA (Novocastra), K18, K19 (DAKO), ER (Sigma), PR, ErbB2, CD24, CD44 (Immunotech) a p63 (BD Bioscience).

Subkonfluentní buněčná kultura byla opláchnuta PBS. Pro značení cytoplazmatických a jaderných markerů byly buňky fixovány vychlazenou (-20°C) směsí methanol/acetone (1:1) po dobu 5 min. Pro značení povrchových antigenů EMA, ESA, EGFR, ErbB2, CD24 a CD44 byla kultura fixována 4% paraformaldehydem 5–10 min při pokojové teplotě a opláchnuta PBS 3x 5 min.

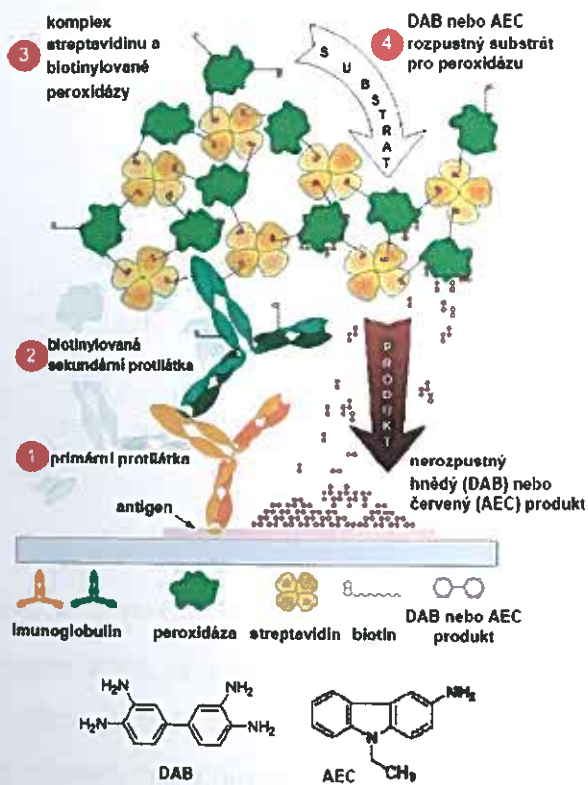
Nádorová tkáň byla fixována 10% formaldehydem a konzervována v parafinových bločcích. Příprava řezů k barvení spočívala v odparafinování, odhalení antigenů citrátovým pufrům či pepsinem, případně následovala blokáce endogenní peroxidázy. Provedeno ve spolupráci s Ústavem patologie I. LF UK a VFN v Praze.

Další postup byl pro všechny analyzované vzorky společný. Primární protilátka byla aplikována na buňky na 1 hodinu při pokojové teplotě, nebo ponechána přes noc ve 4°C ve vlhké komůrce. K zesílení signálu specificky navázaných protilátek byl použit Streptavidin-biotin univerzální detekční systém (Immunotech; Obr. 6):

Nejprve byly fixované buňky ošetřeny pomocí Protein blocking agent (5 min), čímž bylo zamezeno nespecifickému navázání protilátky. Poté byla na vzorky postupně aplikována:

1. primární protilátka (1 h – přes noc),
2. biotinylovaná sekundární protilátka (10 min)
3. streptavidin-peroxidáza (10 min)

Mezi jednotlivými kroky byl proveden důkladný oplach PBS, vyjma kroku s přidáním Protein blocking agent, který se neomývá.



Obr. 6. Streptavidin-biotin univerzální detekční systém.

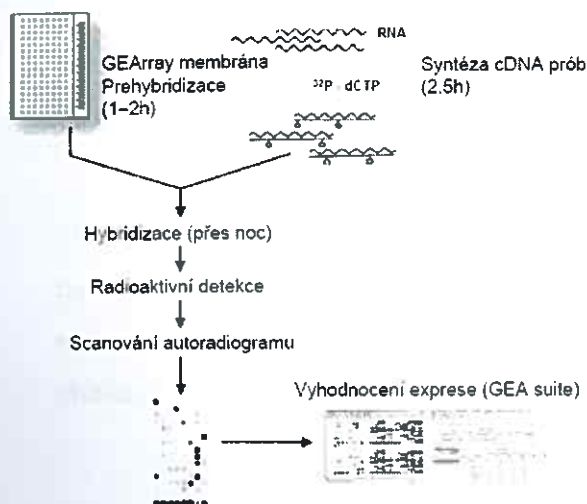
Základem je specifická vazba primární protilátky na antigen. Univerzálnost systému je daná biotinylovanou polyvalentní sekundární protilátkou, která se váže na primární protilátku, jež může být původem z králíka, myši, křavy nebo morčete. Biotin je kovalentně vázán jak k sekundární protilátce, tak k peroxidáze. Navíc se vyznačuje vysokou afinitou k streptavidinu. Tím dochází k tvorbě komplexů. Peroxidáza pak katalyzuje redukci H_2O_2 a oxidaci chromogenu DAB (AEC). Vzniká nerozpustný hnědý (červený) produkt.

Posledním (4.) krokem byla vizualizace antigenu 3-amino-9-ethyl-karbazolem (AEC, Sigma-Aldrich) v případě preparátů z buněčných kultur, resp. diaminobenzidinem (DAB, Sigma-Aldrich) u histologických řezů.

3.2.2 cDNA array

Pro tuto analýzu klíčových genů ovlivňujících průběh buněčného cyklu a apoptózy byl vybrán GEMatrix Q series Human Cancer PathwayFinder array kit od firmy SuperArray (www.superarray.com).

Celý proces lze rozdělit do několika fází: izolace celkové RNA, syntéza cDNA sond, prehybridizace, hybridizace, radioaktivní detekce, scanování radiogramu a vyhodnocení exprese (Obr. 7).



Obr. 7. Schéma postupu přípravy a vyhodnocení cDNA array (SuperArray). Bližší vysvětlení v textu.

Izolace celkové RNA

Kvalita RNA je jedním z nejdůležitějších faktorů nezbytných pro dosažení úspěšné analýzy genové exprese [Sherr 1996]. Metody analýzy RNA, které byly prováděny, vyžadovaly získání kvalitní, nedegradované RNA o vysokém výtěžku, proto byla k izolaci celkové RNA z tkáňových kultur použita sada ArrayGrade Total RNA Isolation Kit (SuperArray).

Izolace tímto kitem je založena na selektivní vazbě RNA na silikagelovou membránu kolony v prostředí s vysokou koncentrací solí a ethanolu. Lyzační pufr obsahující chaotropické soli stabilizuje RNA, předchází její degradaci a dovoluje její optimální zadržení na membráně kolony. Nežádoucí kontaminanty jsou odstraněny promytím kolony sadou pufrů a čistá RNA je eluována vodou.

Nejprve byly buňky sklizeny do suspenze v kultivačním médiu, zcentrifugovány 10 min při 200 g, médium bylo odstraněno, buňky byly resuspendovány v roztoku PBS a opět zcentrifugovány. Po opatrném odstranění PBS bylo dále pokračováno v izolaci celkové RNA podle protokolu výrobce. Na závěr byla RNA eluována do 30-50 μ l sterilní redestilované vody bez RNáz (podle předpokládaného výtěžku) do sterilní 1,5 ml zkumavky s víčkem. Voda byla nejdříve nanesena na kolonku, kde byla ponechána 3 min při pokojové teplotě, poté byla kolonka zcentrifugována 1 min při 11000 rpm. Eluát obsahoval celkovou RNA.

U získané RNA byla provedena kontrola kvality.

- a) spektrofotometricky: měřením absorbance při 260 a 280 nm, po zředění 50x, byla vypočítána koncentrace podle vzorce: $c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = A_{260} \times 40 \times \text{faktor ředění (50)}$, dále byla určena čistota vzorku vypočítáním koeficientu 260/280.
- b) elektroforézou na agarosovém gelu: 3 μ l vzorku byly smíchány se 3 μ l RNA pufru a 10 min denaturovány při 65°C, poté byly naneseny na 1,5% agarosový gel obsahující ethidiumbromid. Elektroforéza probíhala při napětí 90V po dobu přibližně 100 min.

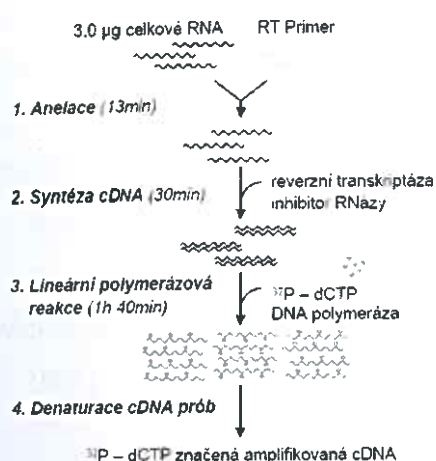
Syntéza cDNA sond značených ³²P-dCTP

Pro syntézu radioaktivně značených cDNA sond byl použit AmpoLabeling-LPR Kit (SuperArray) a ³²P-dCTP (Amersham Biosciences). K přípravě dostatečného množství cDNA stačily 3 μ g celkové RNA, vyizolované z EM-G3 buněk ve 197. pasáži. Syntéza se skládala z několika kroků (Obr 8):

- a) Syntéza cDNA byla zahájena anclací primerů (náhodných hexanukleotidů) inkubací 3 min při 70°C a následně 10 min při 37°C.
- b) Vlastní syntéza cDNA probíhala v přítomnosti reverzní transkriptázy a inhibitoru RNázy 25 min při 37°C. Následným zahřátím na 85°C po dobu 5 min byla hydrolyzována RNA a inaktivována reverzní transkriptáza.
- c) Značení cDNA bylo prováděno pomocí lineární polymerázové reakce – v přítomnosti ³²P-dCTP a DNA polymerázy byla cDNA plně denaturována 5 min při 85°C a následně amplifikována ve 30 cyklech (1 min při 85°C, 1 min

při 50°C, 1 min při 72°C). Po ukončení polymerace byl roztok inkubován 5 min při 72°C pro terminální dosyntetizování produktů.

- d) Před vlastní hybridizací byla provedena denaturace ^{32}P -dCTP značených cDNA sond – 2 min při 94°C.



Obr. 8. Schéma přípravy cDNA pomocí AmpoLabeling-LPR Kit (SuperArray). Bližší vysvětlení v textu.

Prehybridizace a hybridizace

Před vlastní hybridizací byla GEArray Q Series nylonové membrány prehybridizována 3 ml GEArray Hybridization Solution (60°C) s obsahem 10 µg/ml Sheared salmon sperm DNA (Invitrogen) inkubací po dobu 1 – 2 h v hybridizační peci (60°C, 5-10 rpm).

Následně byl prehybridizační roztok nahrazen za 0,75 ml GEArray Hybridization Solution (60°C) s cDNA sondou a hybridizován přes noc (60°C, 5-10 rpm).

Po ukončení hybridizace byl hybridizační roztok nahrazen promývacím roztokem A (2x SSC + 1% SDS) a omýván 2x po dobu 15 min (60°C, 20-30 rpm). Posledním krokem bylo promytí s promývacím roztokem B (0,1x SSC + 0,5% SDS), 2x 15 min (60°C, 20-30 rpm).

Membrána překrytá mikrotenovou fólií byla inkubována v autoradiografické kazetě s filmem Kodak Biomax X-Omat X-ray film (Amersham Biosciences) po dobu 16 hodin.

Analýza array

Po vyvolání byly autoradiogramy digitalizovány pomocí scanneru ScanJet 4370 (HP) a ve formátu jpg (256 odstínů šedi) použity pro vyhodnocení pomocí GEA suite software

(<http://gcasuite.superarray.com/index.jsp>). Normalizace expresních signálů byla provedena dle intenzity exprese house-keeping genů.

3.2.3 Mnohobarevná FISH

Vyšetření bylo provedeno ve 142. a 212. pasáži EM-G3 buněk. Nejprve byla provedena optimalizace metody na vhodnou koncentraci kolcemidu. Klon v exponenciální fázi růstu byl pak této koncentraci vystaven. Následovalo sklizení buněk směsí trypsin/EDTA, centrifugace, hypotonizace 0,075 M KCl a fixace směsí methanol/aceton (3:1). Pro mFISH a mBAND (mnohobarevná pruhovací technika) analýzu byly použity kity „24 XCyte MetaSystems 24 color whole chromosome painting probe kit“ a „XCyte 12 MetaSystems mBAND kit for human chromosome 12“ (Meta Systems) [Brezinova *et al.* 2005]. Analýza byla provedena ve spolupráci s Oddělením cytogenetiky ÚHK.

3.2.4 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Analýza genů *HER2/neu*, *cyklin D1*, *c-myc*, *Rb1* a *p53* v EM-G3 buňkách byla provedena podle firemních instrukcí (PathVysion DNA probe kit, Abbott-Vysis). Pro FISH analýzu v parafinových řezech původního lidského nádoru byl použit PathVysion Her-2 DNA Probe Kit (Abbott-Vysis) [Hermanova *et al.* 2003]. Analýza byla provedena ve spolupráci s Oddělením cytogenetiky ÚHK v Praze.

3.2.5 Mutační analýza genů *p53*, *PIK3CA*, *BRAF* a *K-Ras*

Mutační analýzou byly analyzovány vybrané frekventně mutované geny u karcinomu prsu. Celá kódující sekvence genu *p53* (OMIM 191170) (exony 2-11), včetně intron-exonového spojení, byla amplifikovaná PCR reakcí v 7 fragmentech (Tab. 1). Ostatní analyzované geny (respektive exony s častým výskytem mutací ve vzorcích karcinomu prsu) - katalytická podjednotka α fosfatidylinositol-3-kinázy (*PIK3CA*; OMIM 171834; exony 7, 9, 20), *BRAF* (OMIM 164757; exony 11, 14) a *K-Ras* (OMIM 190070; exon 2) byly amplifikovány s použitím publikovaných primerů [Li *et al.* 2006; Mayr *et al.* 2006] za optimalizovaných podmínek (Tab. 2). PCR produkty analyzovaných genů byly sekvenovány.

Genomová DNA byla izolována precipitační metodou z $2 \cdot 10^6$ buněk pomocí Wizard DNA isolation kitu (Promega) dle protokolu výrobce. PCR amplifikace byly provedeny v celkovém objemu 25 μ l s použitím 100 ng genomové DNA, 0,4 U GoldTaq DNA polymerázy (Applied Biosystems), 0,2 μ l 50xdNTP's (Invitex) 1,0 μ l 10x GoldTaq PCR buffer (Applied Biosystems), optimálního množství 50 mM $MgCl_2$ a 0,6 pmol primerů (Generi Biotech) v 36 cyklech (Tab. 1, 2). Výsledný PCR produkt byl analyzován elektroforeticky na 1,5% agarosovém gelu (Serva) v 1xTAE pufru. Purifikace vzorků před sekvenační reakcí probíhala kolonkovou separací na křemičité membráně (JetWell PCR purification kit; Genomed). Pro sekvenační reakci s BigDye Terminator ver. 3.1 (Applied Biosystems) bylo použito 200 ng PCR produktu. Sekvenační reakce byla analyzována na sekvenátoru ABI310 (Applied Biosystems) a získané sekvence byly srovnány s referenčními sekvencemi pomocí NCBI BLAST software.

Tab. 1. Podmínky pro amplifikaci genu *p53*. PCR byla prováděna touch-down PCR protokolem (13 cyklů: 95°C – 30 s, 68°C – 1 min (-1°C/cyklus), 72°C – 30 s; 23 cyklů: 95°C – 30 s, 55°C – 30 s, 72°C – 30 s) s úvodní denaturací 95°C – 10 min a terminální elongací 72°C – 10 min. Koncentrace $MgCl_2$ byla ve všech případech 2 mM. bp – počet párů bází, DMSO – dimethylsulfoxid.

Název	Exon	Sekvence	bp	DMSO
P40f	2+3	5'-GAC CCA GGG TTG GAA GCG TCT-3'	411	-
P41r		5'-GCAAGGGGGACTGTAGATGG-3'		
P42f	4	5'-ACC TGG TCC TCT GAC TGC TC-3'	363	-
P43r		5'-GCCAGGCATTGAAGTCTCAT-3'		
P44f	5+6	5'-CCGTGTTCCAGTTGCTTTAT-3'	488	-
P45r		5'-TTAACCCCTCCTCCCAGA-3'		
P46f	7	5'-TGC TTG CCA CAG GTC TCC -3'	301	-
P47r		5'-CCGGAAATGTGATGAGAGGT-3'		
P48f	8+9	5'-TTC CTT ACT GCC TCT TGC TT-3'	411	5%
P49r		5'-AGAAAACGGCATTGAGTG-3'		
p50Af	10	5'-CTC AGG TAC TGT GAA TAT AC-3'	218	2%
P51r		5'-CTATGGCTTTCCAACCTAGGA-3'		
P52f	11	5'- TCA TCT CTC CTC CCT GCT TC -3'	220	-
P53r		5'- CGCACACCTATTGCAAGCAAGG -3'		

Tab. 2. Podmínky pro amplifikaci vybraných onkogenů pro mutační analýzu. PCR byla prováděna PCR protokolem (36 cyklů: 95°C – 30 s, T_A – 1min, 72°C – 30s) s úvodní denaturací 95°C – 10 min a terminální elongací 72°C – 10 min. Koncentrace $MgCl_2$ byla ve všech případech 1,5 mM. bp – počet párů bází, T_A – anelační teplota.

Název	Sekvence	bp	T_A
BRAF-c11f	5'-TGT ACT TAG GGT GAA ACA TAA GG-3'	222	56°C
BRAF-c11r	5'-TTG TCA CAA TGT CAC CAC AT-3'		
BRAF-c15f	5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA-3'	224	56°C
BRAF-c15r	5'-AGG GCC AAA AAT TTA ATC AGT GG-3'		
Ras04f	5'-AGG CCT GCT GAA AAT GAC TGA-3'	173	61°C
Ras05r	5'-TCA AAG AAT GGT CCT GCA CCA G-3'		
PIK3CA-e07f	5'-CCT TTT GGG GAA GAA AAG TG-3'	284	56°C
PIK3CA-e07r	5'-GAG AGA AGG TTT GAC TGC CAT AA-3'		
PIK3CA-e09f	5'-TGA AAA TGT ATT TGC TTT TTC TGT-3'	300	56°C
PIK3CA-e09r	5'-ACA TGC TGA GAT CAG CCA AA-3'		
PIK3CA-e20f	5'-CAT TTG CTC CAA ACT GAC CA-3'	288	56°C
PIK3CA-e20r	5'-TGT GTG GAA GAT CCA ATC CA-3'		

3.2.6 Charakterizace závislosti EM-G3 buněk na EGF

EM-G3 buňky ve 141. pasáži byly nasazeny na kultivační misky v hustotě 2000 buněk/cm². Kultivace probíhala paralelně v plnohodnotném médiu pro kultivaci epitelálních buněk a v médiu bez EGF, vše v dubletu. Po 6 dnech byla část misek s buňkami zafixována a obarvena.

Z misek bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty roztokem PBS. Do každé misky byl přidán roztok May-Grünwald (150 μ l/cm², PENTA), po 5 minutách byl přilít stejný díl destilované vody. Po dalších 5 minutách byly fixované buňky opláchnuty vodou a dobarveny 10x ředěným roztokem Giemsa-Romanowski (250 μ l/cm², PENTA). Po 15 minutách byly misky opět řádně opláchnuty vodou a usušeny.

Druhá polovina misek byla ponechána v kultuře a dále pozorována pod mikroskopem.

3.2.7 Charakterizace závislosti růstu EM-G3 na regulátorech ER

Signálně-transdukční ovlivnění buněčného růstu na základě signalizace estrogenního receptoru bylo studováno pomocí závislosti EM-G3 linie na přítomnosti agonistů a antagonistů estrogenního receptoru v médiu. Pro tento experiment byly vybrány dvě kontrolní buněčné linie odvozené z metastáz lidského adenokarcinomu prsu. Buňky linie MCF7 exprimovaly estrogenní receptor, buňky linie MDA-MB231 estrogenní receptor neexprimovaly. V obou případech se jednalo o epiteliální buňky rostoucí v jedné vrstvě adheované ke kultivačnímu povrchu a pěstované v médiu bez hydrokortizonu, cholera toxinu, inzulinu a EGF (narozdíl od EM-G3 buněk).

Buňky EM-G3 ve 155. pasáži, MCF7 v 24. pasáži a MDA-MB237 v 17. pasáži byly nasazeny do 12jamkového platíčka (NUNC) v množství 10000 buněk/1,5 ml média/jamku. Následující den bylo přidáno 1,5 μ l aktivní substance (Tamoxifen nebo β -Estradiol, Sigma), která byla čerstvě naředěná ethylalkoholem pro UV spektroskopii (Lachema) na příslušné koncentrace. Kultivace v prostředí dané koncentrace tamoxifenu (antagonisty ER) či estradiolu (agonisty ER) probíhala 6 dní, s jednou výměnou za čerstvé médium s aktivní substancí po 3 dnech.

Růstové parametry byly stanoveny na základě kolorimetrické analýzy koncentrace proteinů, tzv. sulforhodaminovým testem [Skchan *et al.* 1990].

Nejprve byly buňky fixovány 10% kyselinou trichloroctovou (1 hodina, 4°C). Po důkladném oplachu vodou byly buňky barveny roztokem 0,4% sulforhodaminu B (Sigma) v 1% kyselině octové (30 minut). Poté byly jamky řádně, ale rychle opláchnuty 1% kyselinou octovou. Na závěr byla navázaná „barvička“ vyextrahovaná do 10mM TRIS (pH 10,5). Absorbance byla měřena při 540 nm.

3.2.8 Schopnost tvořit nádory (tumorigenicita) v nu/nu myších

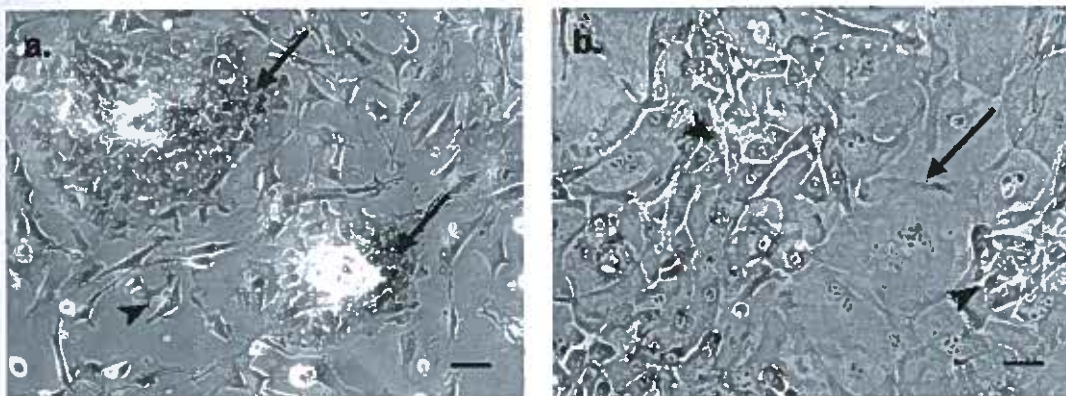
Pokusy na zvířatech byly schváleny fakultní komisí pro práci se zvířaty. Pro experiment byly použity imunodeficientní nu/nu myši (samičky) a EM-G3 buňky v 141. a 195. pasáži. Každé myši bylo subkutánně aplikováno $9 \cdot 10^6$ buněk v 0,1 ml média a 0,05 ml Matrigelu (BD Bioscience). Každá pasáž byla injikována do 4 myši. Provedeno ve spolupráci s Ústavem biofyziky a informatiky 1. LF UK v Praze.

4 Výsledky

4.1 Ustavení buněčné linie EM

Týden po nasazení enzymaticky rozvolněné tkáně byly pozorovány malé kolonie epitelíí, které rostly z jednotlivých buněk či malých shluků. Rostoucí kolonie s těsnými buněčnými kontakty vytěsňovaly 3T3 buňky (feeder-layer) do stran (Obr. 9a). V časných pasážích se buněčný porost skládal z menších a větších buněk (Obr. 9b). Menší buňky se evidentně dělily rychleji. První pasáž byla provedena 4 týdny po nasazení rozvolněné tkáně. Od 3. pasáže byl v prostředí 3T3 buněk pozorován rychlejší růst a od 10. pasáže už buňky rostly bez „feederu“. Bylo dosaženo stabilní generační doby 34 hodin a bylo jasné, že se jedná o immortalizované buňky. 18 měsíců po uvedení buněk do kultury bylo dosaženo 100. pasáže. Jedná se o stanovenou hranici, kdy může být buněčná kultura prohlášena za buněčnou linii. Tato linie byla nazvána EM.

Obr. 9. Morfologické charakteristiky buněčná linie EM v raných pasážích. (a) Malé kolonie epitelíálních buněk (šípky), obklopené řídkým porostem ozářených 3T3 buněk (hrot). (b) V časných pasážích se epitelíální porost skládal z buněk různých velikostí. Malé buňky se dělily rychle (hroty), velké buňky (šípka) už nebyly schopné dělení. Měřítko 20 μ m.



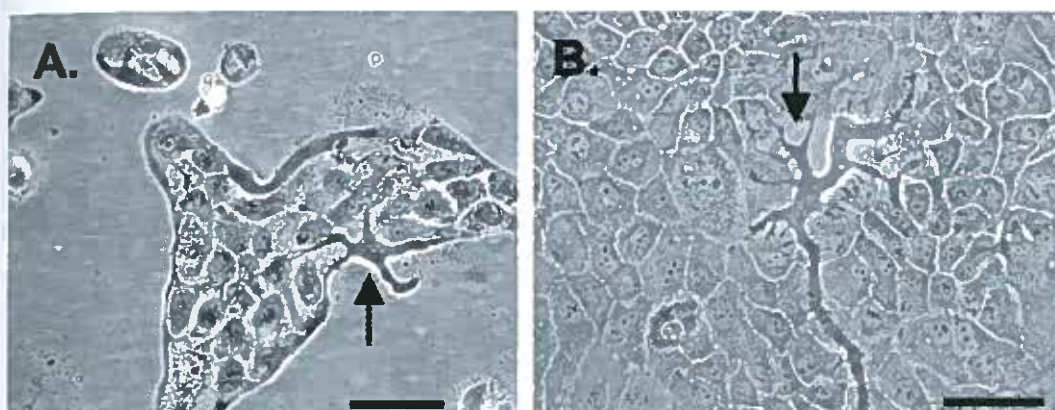
4.2 Klonování a selekce buněčné linie EM-G3

Ve 130. pasáži bylo z původních EM buněk úspěšně vyselektováno 5 klonů, které byly nazvány podle umístění na klonovací destičce: B6, D4, D11, G3 a G11. Tyto klony byly zmrazeny a uchovány v tekutém dusíku. Pro další studie byl vybrán klon EM-G3, který vykazoval nejlepší morfologické a růstové vlastnosti. Doposud bylo provedeno přes 200 pasáží EM-G3 buněk. V těchto pasážích jsou započteny i pasáže EM buněk.

4.3 Morfologické vlastnosti buněk EM-G3

EM-G3 linie vykazuje typickou epiteliální morfologii, tj. kuboidální nebo polygonální buňky rostoucí v jedné až dvou vrstvách. Příležitostně se některá buňka v kultuře (přibližně 1 ze 150 buněk) změnila na velkou větvičící se buňku s dlouhými výběžky. Tyto rozvětvené buňky jsou evidentně více diferencované a pravděpodobně zprostředkovávají kontakty mezi vzdálenějšími buňkami (Obr. 10A,B).

Obr. 10. Morfologie klonálních EM-G3 buněk *in vitro*. (A) Šestidenní kolonie vyrostlá z jedné buňky. Začíná se tvořit rozeklaná buňka s dlouhými výběžky (šipka). (B) Stejná kultura za 10 dní. V konfluentním porostu se vyskytovaly více diferencované buňky s dlouhými kontaktními výběžky (šipka). Měřítko 20 μm .



4.4 Imunocytochemická analýza EM-G3 *in vitro* a *in vivo*. Porovnání s původním nádorem pacientky.

Kultura EM-G3 buněk *in vitro*, parafinové řezy nádoru odebraného pacientce a parafinové řezy tumorů vzniklých *in vivo* v nu/nu myších (viz dále) po subkutánní aplikaci EM-G3 buněk byly testovány protilátkami proti K5, K7, K8, K14, K18, K19, SMA, p63, ER, PR, EGFR, ErbB2, EMA, ESA, CD24 a CD44 (Tab. 3).

Tab. 3. Imunocytochemie/imunohistochemie EM-G3 buněk *in vitro* a *in vivo* (v xenograftu nu/nu myši) ve srovnání s nádorovými a nenádorovými epiteliálními buňkami nacházejícími se v histopatologických parafinových řezech nádoru pacientky.

Antigen	EM-G3 buňky		Vzorek původního karcinomu prsu		
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i> (nu/nu myš)	Majoritní nádorová buněčná populace	Nenádorové prsní epiteliální buňky	
				Luminální	Myoepiteliální
K5	+	+	-	-	+
K7	+	∅	∅	∅	∅
K8	+	∅	∅	∅	∅
K14	+	+/- ^d	-	-	+
K18	+	+/-	+	+	-
K19	-	-	+	+	-
SMA	-	-	-	-	+
p63	+ ^a	+ ^a /- ^d	-	-	+ ^a
ER	- ^b	-	+ ^a	+	-
PR	- ^b	-	+ ^a	+	-
EGFR	+	+	∅	∅	∅
ErbB2	+/-	+/-	+	+/-	-/+
EMA	+	-/+ ^c	+	+	-
ESA	+	-/+ ^c	+	+	-
CD24	+	∅	∅	∅	∅
CD44	+	∅	∅	∅	∅

a) Jaderná pozitivita;

b) Jaderná negativita, slabá membránová/cytoplazmatická pozitivita;

c) Pozitivita centrálních buněk v pseudoduktálních strukturách nu/nu myši;

d) Negativita centrálních buněk v pseudoduktálních strukturách nu/nu myši;

∅ – netestováno

+/- spíše pozitivní;

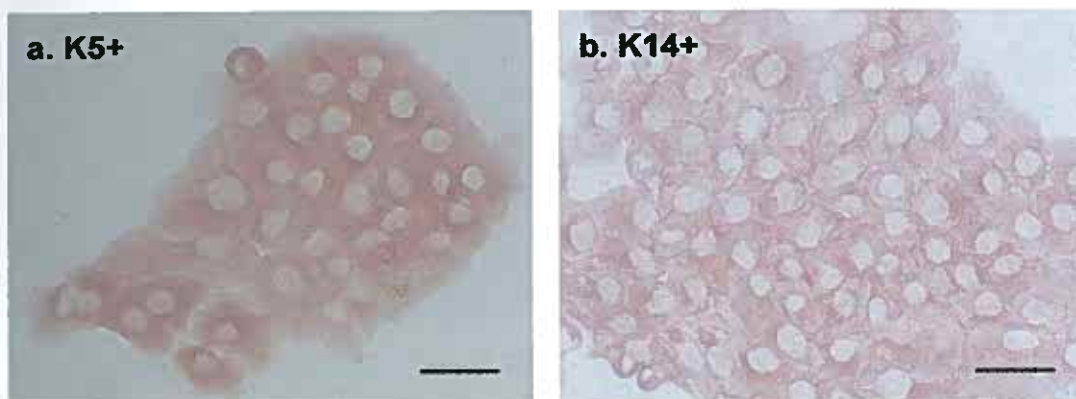
-/+ spíše negativní

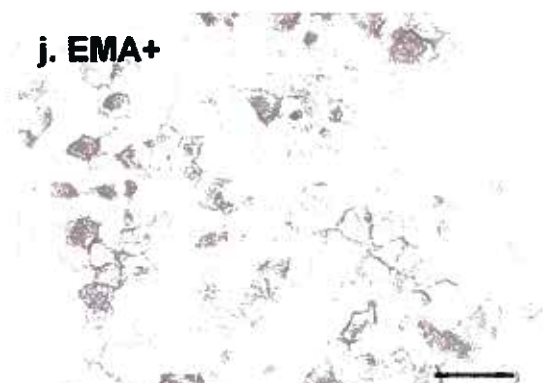
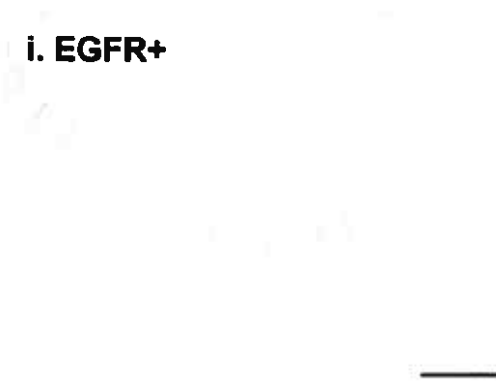
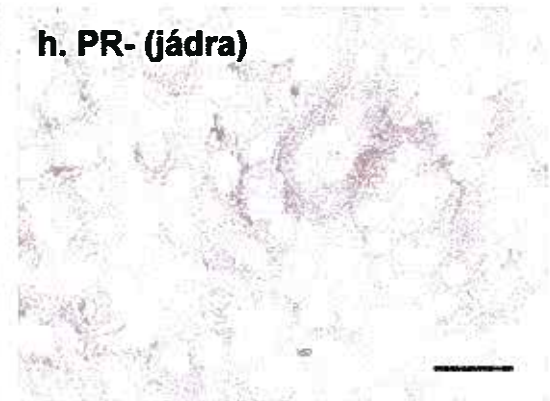
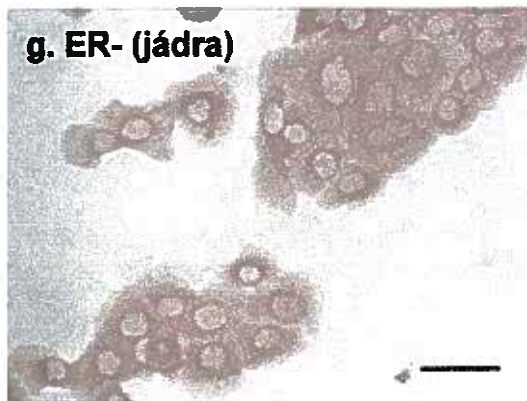
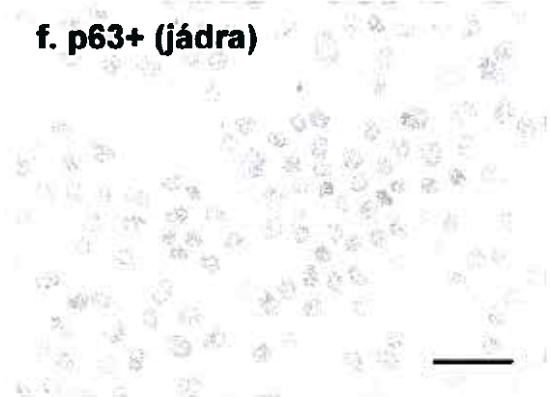
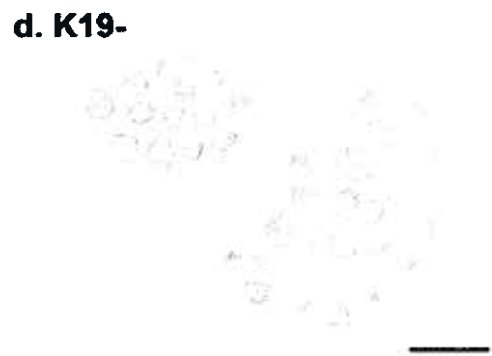
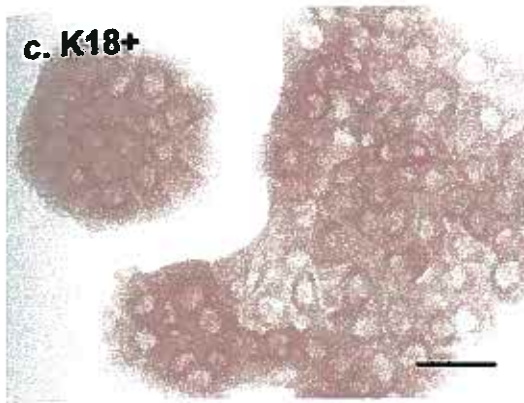
4.4.1 Charakterizace EM-G3 buněk *in vitro*

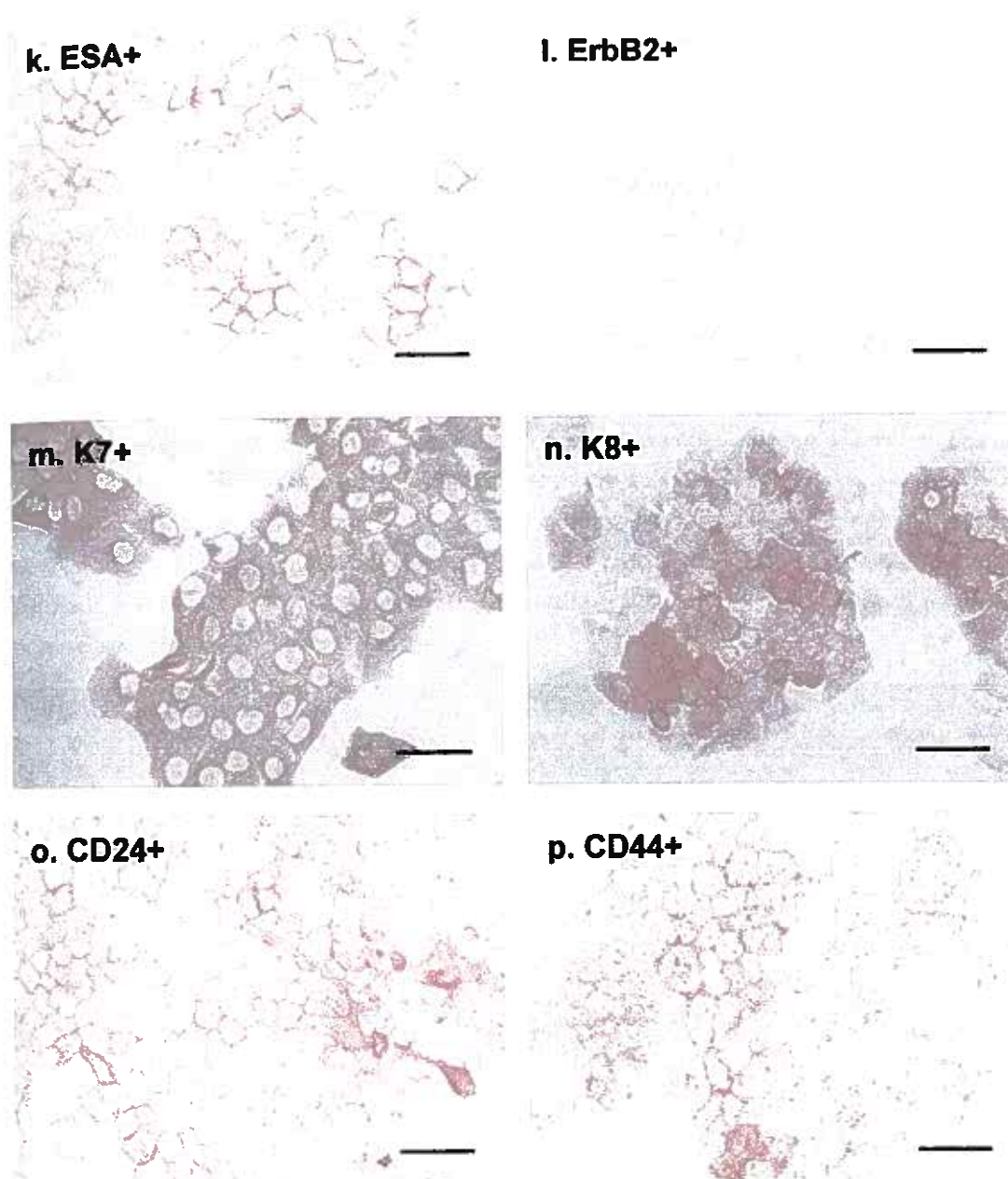
Epiteliální původ EM-G3 buněk v kultuře byl dokázán především pozitivitou na cytokeratiny. Buňky EM-G3 byly pozitivní jednak na markery luminálních buněk K18

(Obr. 11c), K7 (Obr. 11m), K8 (Obr. 11n), ale i na markery bazálních/myoepiteliálních buněk K5 (Obr. 11a), K14 (Obr. 11b). Cytokeratin K19, typický pro plně diferencované lumenální buňky, nebyl exprimován (Obr. 11d). Silně pozitivní byly EM-G3 na jaderný protein p63, vyskytující se v progenitorových a myoepiteliálních buňkách (Obr. 11f). Marker zralých myoepiteliálních buněk SMA nebyl exprimován (Obr. 11e). Silná membránová pozitivita byla detekována pro receptor EGFR (Obr. 11i), slabá membránová pozitivita pro transmembránový receptor ErbB2 (Obr. 11l). Dále byla detekována slabá membránová a cytoplazmatická (ale nikoliv nukleární) pozitivita na ER (Obr. 11g) a PR (Obr. 11h). Pozitivní byly též povrchové antigeny EMA (Obr. 11j) a ESA (Obr. 11k), typické pro lumenální buňky. Exprimovány byly povrchové markery CD24 a CD44, které se vyskytují u progenitorových a bazálních buněk mléčné žlázy.

Obr. 11. Imunocytochemické barvení buněčné kultury EM-G3 *in vitro*. K5, K14, p63, CD24 a CD44 jsou typické pro bazální/progenitorové buňky (a,b,f,o,p). EMA, ESA, K7, K8 a K18 jsou markery lumenálních buněk (j, k, m, n, c). ER a PR vykazují pozitivitu cytoplazmy a membrány, nikoli však jader, což indikuje jejich nezralost (g,h). Negativita na K19 a SMA dokazuje, že buňky nejsou terminálně diferencované (d, e). Pozitivní EGFR potvrzuje závislost EM-G3 buněk na EGF. ErbB2 je v kultuře exprimován velmi slabě. Měřítka 20 μ m.







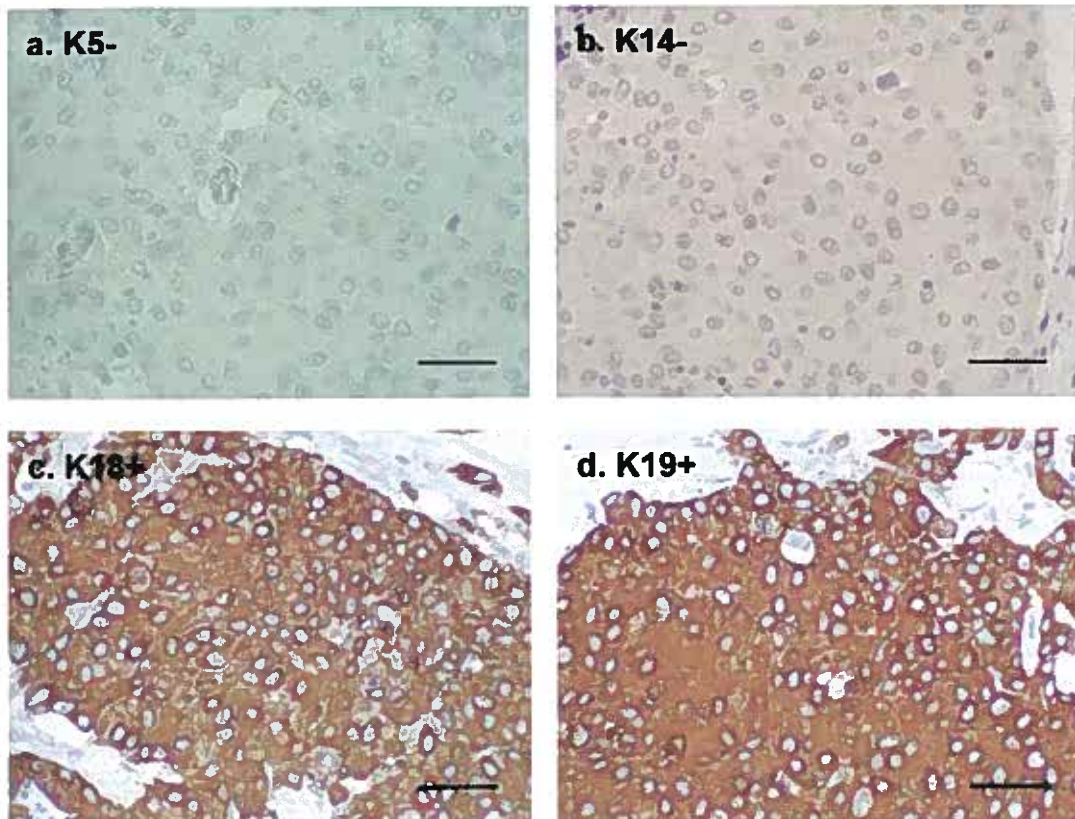
4.4.2 Analýza vzorku původního karcinomu prsu

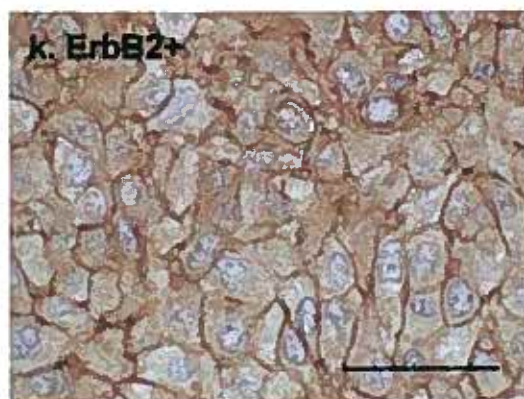
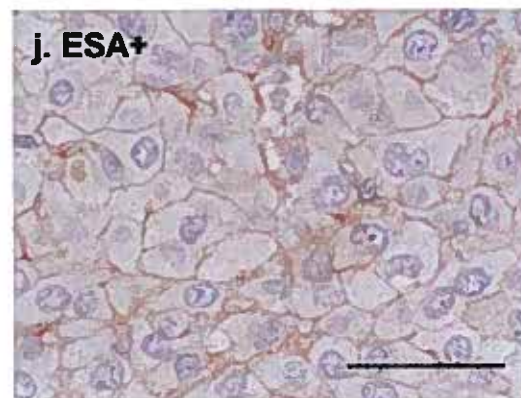
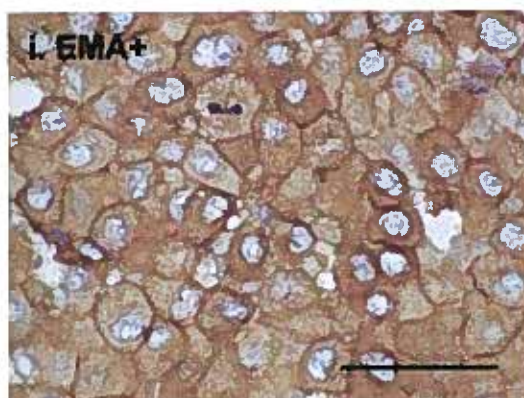
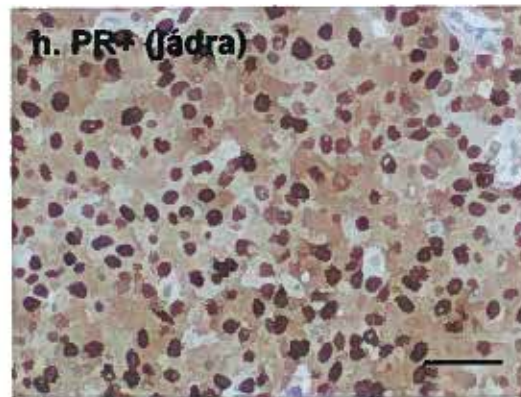
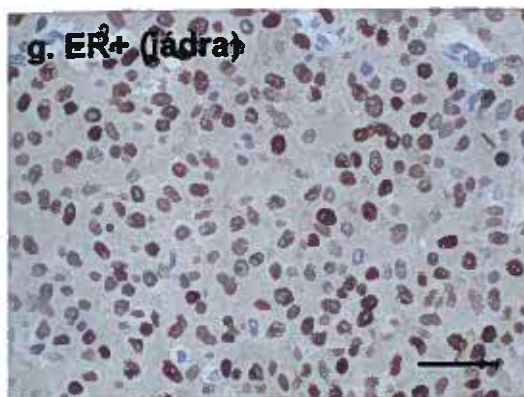
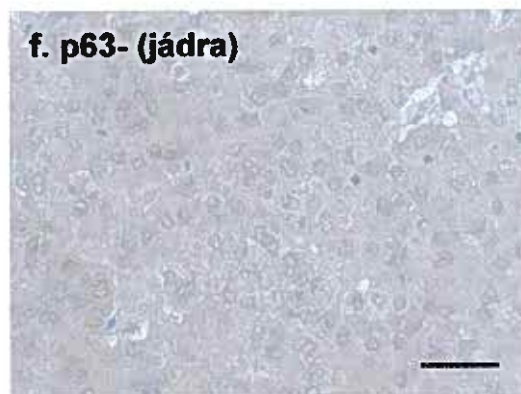
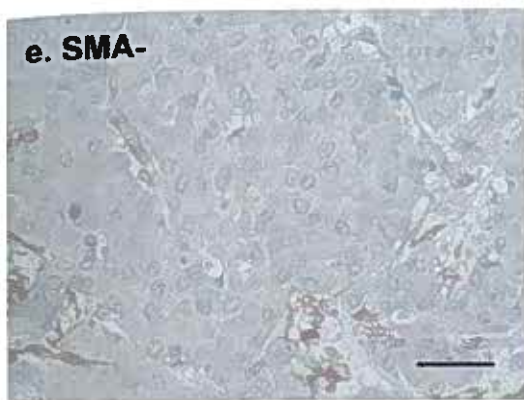
Ve vzorku nádoru, ze kterého byly EM-G3 buňky vypěstovány, byla provedena rozsáhlá imunohistochemická analýza na parafinových řezech, která odhalila různé populace epiteliálních buněk:

(1) Většina buněk nádoru, tj. majoritní nádorová buněčná populace (Tab. 1) nesla markery typické pro plně diferencované luminální buňky. Z hlediska výskytu cytokeratinů byly majoritní buňky K5- (Obr. 12a) a K14- (Obr. 12b), zatímco K18+

(Obr. 12c) a K19+ (Obr. 12d). Většina těchto buněk byla pozitivní na povrchové antigeny EMA+ (Obr. 12i) a ESA+ (Obr. 12j). SMA, znak zralých myoepiteliálních buněk, se v typických nádorových buňkách nevyskytoval (Obr. 12e). Jaderný protein p63 (Obr. 12f), který je v normální tkáni exprimován v progenitorových, bazálních a myoepiteliálních buňkách, byl v hlavní nádorové populaci také negativní. Jádra majoritní populace nádorových buněk byla v parafinových řezech většinou ER+ (Obr. 12g) a PR+ (Obr. 12h). Také transmembránový receptor ErbB2 byl v typických nádorových buňkách silně pozitivní (Obr. 12k).

Obr. 2. Imunohistochemické barvení parafinových řezů z původního prsního nádoru: majoritní populace buněk. Buňky měly charakter plně diferencovaných luminálních buněk (a-j). (a-d) Majoritní populace buněk byla negativní na K5 a K14, ale pozitivní na K18 a K19. (e,f) Buňky nádoru nevykazovaly znaky myoepiteliálních buněk SMA a p63. (g,h) Většina buněk (asi 80%) nádorové populace byla ER+ a PR+. (i-k) Povrchové proteiny EMA, ESA a ErbB2 byly v hlavní nádorové populaci silně vyjádřeny. Měřítka 20µm.





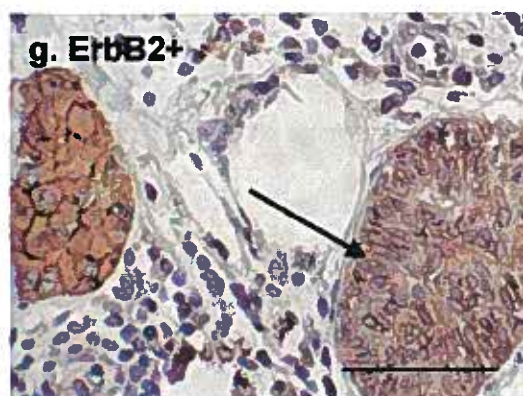
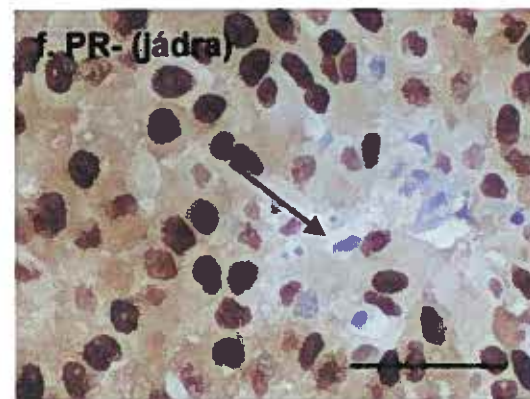
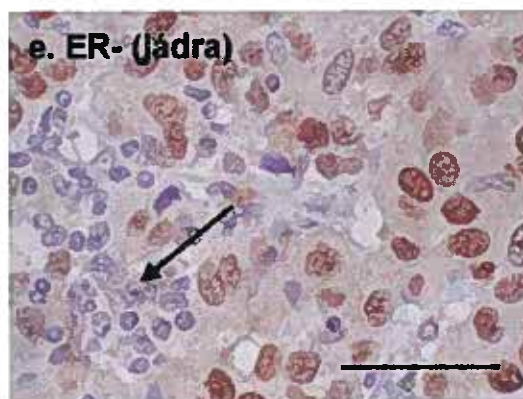
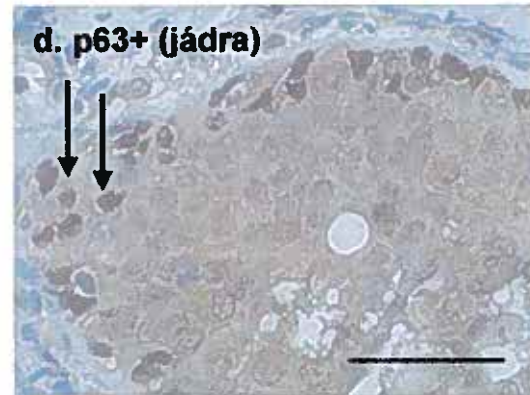
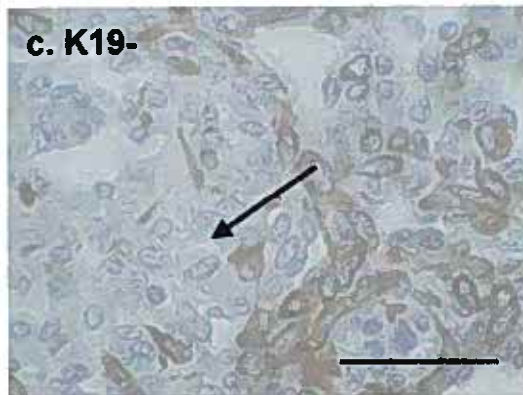
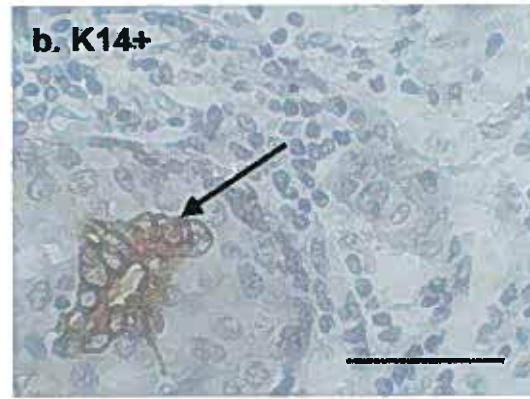
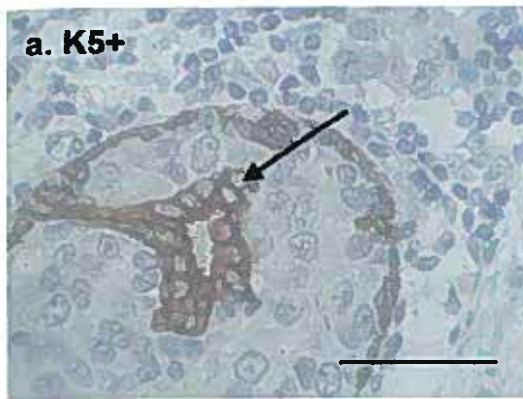
(2) Menšinová populace buněk, rozptýlená v tkáni nádoru, byla dosti různorodá. Vyskytovaly se zde malé ostrůvky K5+/K14+ buněk, které byly evidentně zbytky zanikajících myoepiteliálních buněk (Obr. 13a,b), i když jejich lokalizace v centru „nádorové kolonie“ nebo na jejím okraji (Obr. 13a) byla neobvyklá.

Buňky pozitivní na K5 (Obr. 14a), K14 a p63 (Obr. 14c) se nacházely i ve vzácně se vyskytujících shlucích buněk pravděpodobně formujících TDLU. Některé z těchto TDLU buněk byly SMA- (Obr. 14b). Všechny tyto charakteristiky odpovídají imunoprofilu EM-G3 buněk.

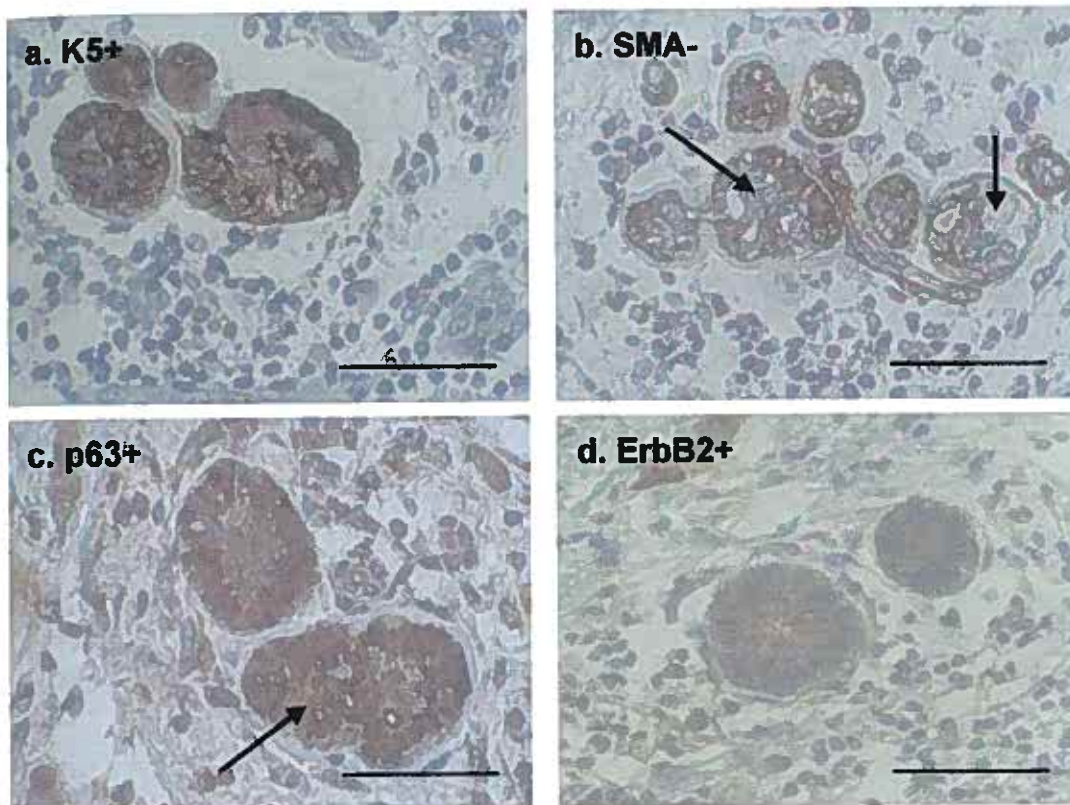
Všechny buňky, které byly pozitivní na K5, K14 a p63 (Obr. 13d), byly zároveň negativní na K19 (Obr. 13c), ER a PR. Kromě toho byly i některé buňky v hlavní nádorové populaci ER- (Obr. 13e), případně PR- (Obr. 13f). ErbB2 byl u menšinové populace pouze slabě pozitivní (Obr. 13g).

Velmi kvalitním znakem pro vyhledávání možných zdrojových buněk EM-G3 (ze kterých EM-G3 vznikly) byl marker p63. Každá jednotlivá buňka p63+ byla rozeznatelná podle obarveného jádra (Obr. 14c). Naopak nepříliš vhodným znakem pro stanovení buněk, ze kterých byly EM-G3 odvozeny, se ukázal ErbB2 (Obr. 14d). Byl sice silně exprimován u nádorových buněk, ale málo exprimován u buněk podobných normálním buňkám. V souhrnu odpovídajícími buňkami byla část málo diferencovaných buněk v TDLU, i když i zbytky myoepiteliálních buněk do velké míry odpovídaly imunoprofilu EM-G3.

Obr. 13. Imunohistochemické barvení parafinových řezů z původního prsního nádoru. minoritní populace buněk (strana 45). Buňky mají charakter podobný EM-G3 buňkám (a-g, šípky). (a,b) Malé ostrůvky K5+/K14+ buněk, které byly evidentně zbytky zanikajících myoepiteliálních buněk. (c) Nepravidelné zbytky žlázy obsahující směs K19+ a K19- (šípka) buněk v chaotickém uspořádání. (d) Na okraji "nádorové kolonie" se vyskytovaly zbytky neobvyklých myoepiteliálních buněk (p63+) ve více vrstvách. (e,f) Přímou v majoritní nádorové tkáni se vyskytovalo přibližně 20 % ER- a PR- buněk (šípky). (g) Hlavní populace nádorových buněk (vlevo) je silně pozitivní na ErbB2, zatímco kolonie drobných buněk podobných normálním vykazuje jen slabou expresi tohoto proteinu (šípka). Měřítka 20µm.

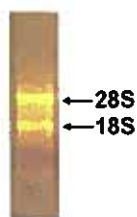


Obr. 14. Imunohistochemické barvení parafinových řezů z původního prsního nádoru: TDLU. Buňky mají charakter podobný EM-G3 buňkám (a-d, šipky). Struktury odpovídající TDLU se v malém množství vyskytovaly v přímém sousedství "nádorových kolonií". (a) Všechny buňky v TDLU (v luminální i myoepiteliální pozici) byly pozitivní na K5. (b) Asi polovina buněk v TDLU byla negativní na SMA (šipky). (c) Progenitorové buňky v "zárodečných pupenech" byly pozitivní na p63 (šipka). (d) ErbB2 protein byl v TDLU slabě exprimován. Měřítka 20 μ m.



4.5 cDNA array

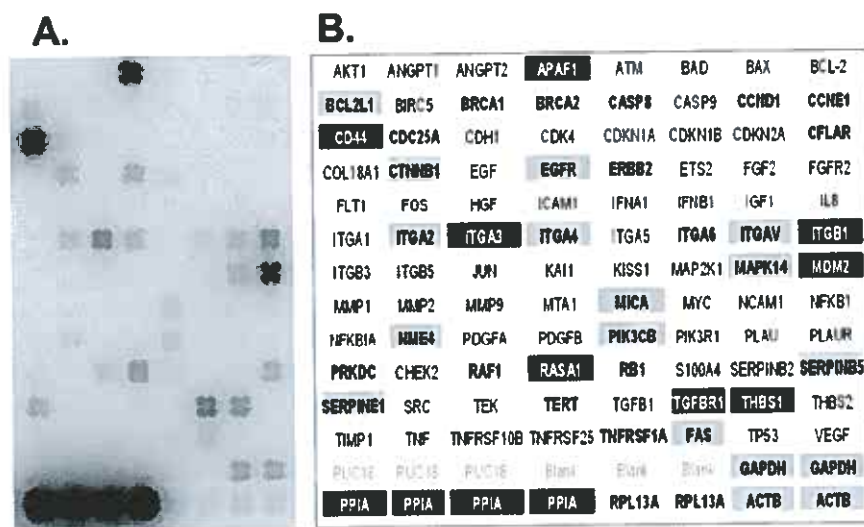
Izolace RNA byla provedena z $3 \cdot 10^6$ buněk v 197. pasáži. Koncentrace RNA byla 964 μ g/ml. Kvalita RNA byla určena koeficientem $260/280 > 1,8$ (dostatečná kvalita pro úspěšný array). Integrita izolované RNA byla kontrolována elektroforeticky na nedenujícím 1,5% agarosovém gelu v 1xTAE (Obr. 15).



Obr. 15. Izolace RNA z buněk EM-G3. Čistá, nepoškozená RNA se po obarvení ethidiumbromidem jeví jako smear, ze kterého ostře vystupují dva proužky odpovídající 28S a 18S rRNA. Ve vzorku nesmí být přítomna vysokomolekulární kontaminující DNA.

Analýza mRNA pomocí cDNA arrayí (Obr. 16) ukázala vysokou expresi apoptotického aktivátoru APAF1, membránových proteinů CD44 a TGFR1 β , integrinů $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, αV a $\beta 1$, dále pak p53 regulátoru MDM2, p21Ras GTP-ázu aktivující molekulu RasA1 a extracelulární matrix asociující protein tromboplastin I. Expres EGFR potvrdila výsledky imunocytochemické analýzy a expres integrinů $\alpha 6$ (CD49)/ $\beta 1$ (CD29) a CD44 prokázala kmenový/progenitorový charakter EM-G3 buněk [Clayton *et al.* 2004]. Výsledky arrayí jsou uloženy v GEO databázi (<http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) pod přístupovým číslem GSM81460.

Obr. 16. Expresní analýza EM-G3 buněk *in vitro* pomocí cDNA arrayí. (A) Z 96 genů v arrayi byla zaznamenána různá míra exprese u 35 genů. (B) Různou intenzitou šedi jsou označeny exprimované geny, podle jejich relativní exprese (černá = nejvyšší).



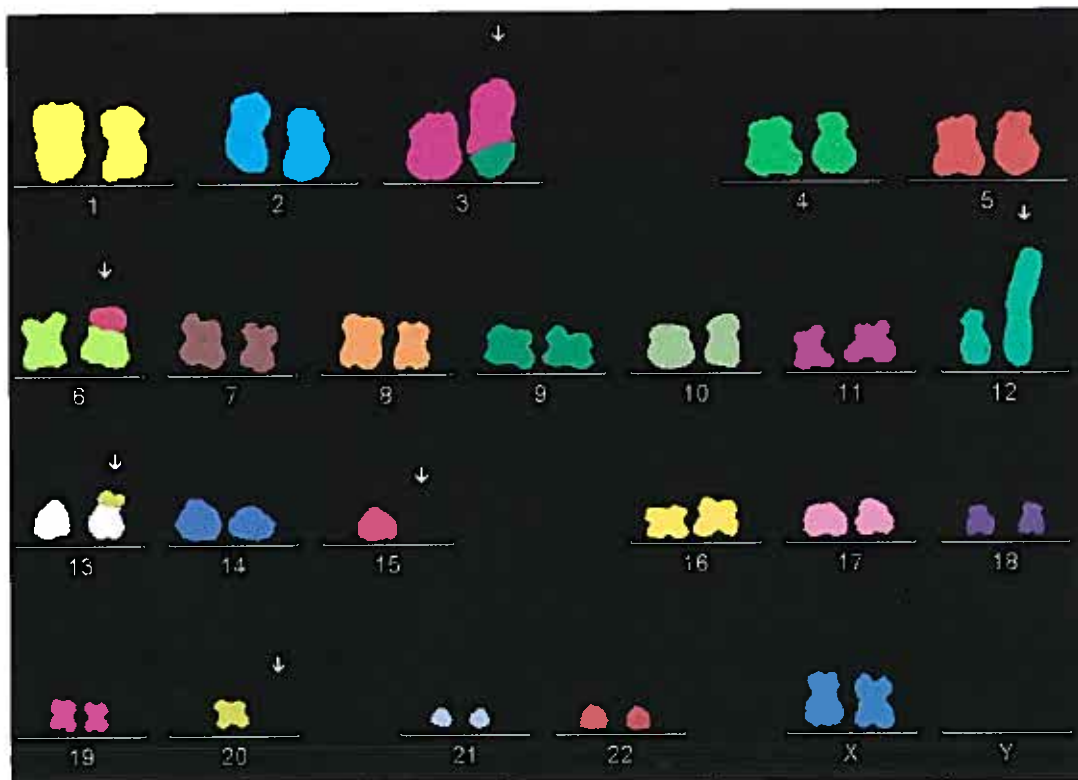
4.6 Karyologie linie EM-G3

EM-G3 buňky byly ve 142. pasáži podrobeny vyšetření pomocí mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace (mFISH), která umožňuje současnou vizualizaci chromozomů, komplexu chromozomálních změn a všech numerických aberací v jedné experimentální hybridizaci.

Bylo vyhodnoceno 15 různých mitóz v metafázi. Před vlastní mFISH byla metoda optimalizována pomocí Giemsa barvení tak, aby jednotlivé mitózy byly dobře hodnotitelné, tzn. aby se chromozomy nepřekrývaly, ale zároveň nebyly od sebe příliš vzdálené. Byla vybrána koncentrace kolcemidu 0,05 % a doba jeho působení 5 hodin.

Mitózy ukázaly ve většině případů diploidní charakter s dvěma monozomiemi (Obr. 17).

Obr. 17. mFISH karyotyp EM-G3 buněk vykazuje stabilní diploidní charakter 44,XX, s monozomií chromozomu 15 a 20 a translokacemi na chromozomech 3(9), 6(15), 12(12) a 13(20). Změny jsou označeny šipkami.



Byly zaznamenány translokace na derivovaných chromozomech 3, 6, 12, 13 a monozomie chromozomů 15 a 20. Vzácně se vyskytla ztráta některého dalšího chromozomu. Vyšetření bylo doplněno o podrobnější analýzu chromozomu 12 (pro ověření duplikace) pomocí mBAND. Na derivovaném chromozomu 12 byla potvrzena duplikace dlouhých ramének. Karyotyp byl vyhodnocen jako:

44,XX,der(3)t(3;9)(q26;?),der(6)t(6;15)(p21;q12),der(12)t(12;12)(p13.2;q?)dup(12)(q21.2q21.3)dup(12)(q21.2q21.3),der(13)t(13;20)(p11;?)-15,-20 (Obr. 17).

Ve 212. pasáži byla na buňkách EM-G3 provedena kontrolní mFISH. Bylo vyšetřeno 15 mitóz. Byla objevena další chromozomální aberace na derivovaném chromozomu 9.

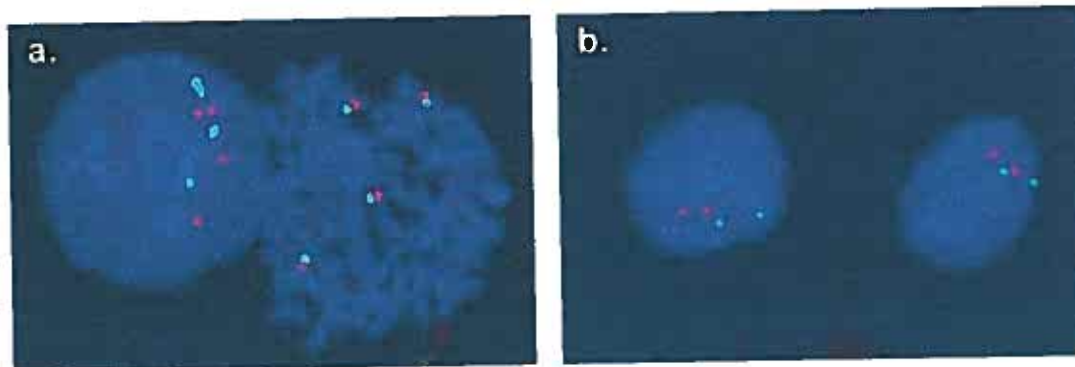
Jednalo se o delecii na krátkém i dlouhém raménku, $der(9)del(9)(p13)del(9)(q21)$. Jiné změny oproti předchozímu vyšetření ve 142. pasáži nebyly zjištěny.

4.7 FISH pro *HER2/neu*, *cyklin D1*, *c-myc*, *Rb* a *p53*

Amplifikace onkogenů (*HER2/neu*, *cyklin D1*, *c-myc*) a delece tumor supresorových genů (*Rb*, *p53*) je častým jevem u pacientek s karcinomem prsu. Proto byly tyto geny podrobeny vyšetření pomocí FISH.

V kultuře EM-G3 buněk bylo analyzováno 20 jader v metafázi a 200 jader v interfázi. U žádného z vyšetřovaných genů (*HER2/neu*, *cyklin D1*, *c-myc*, *Rb*, *p53*) nebyla pozorovaná žádná delece ani amplifikace (Obr. 18).

Obr. 18. FISH pro *cyklin D1* a *HER2/neu*. (a) FISH pro *cyklin D1*, dvě buňky v mitóze, levá v profázi, pravá v metafázi. Zelené signály značí chromozom 11, na kterém leží gen pro *cyklin D1* svítící červeně. Shodný počet signálů znamená, že gen není amplifikovaný. (b) FISH pro *HER2/neu*, dvě buňky v interfázi. Zelené signály značí chromozom 17, červené gen pro *HER2/neu*.

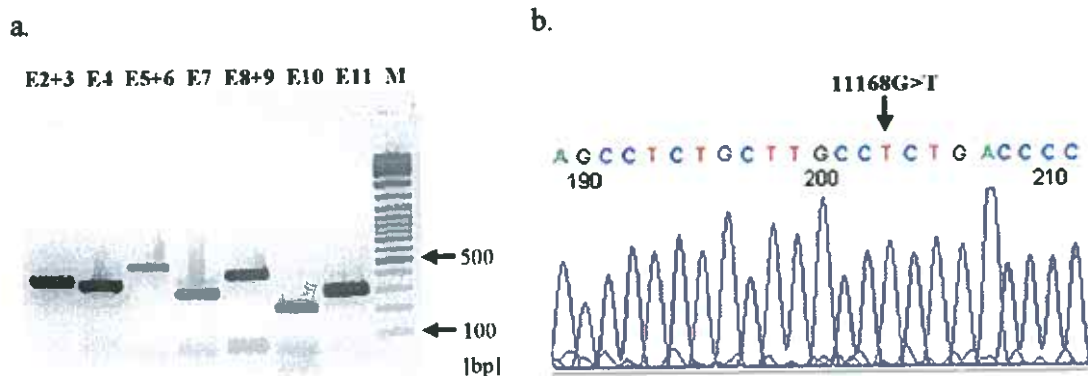


Dále byly analyzovány dva vzorky parafinových řezů, připravených z odoperovaného nádoru pacientky. V těchto případech jsme se zaměřili pouze na amplifikaci *HER2/neu* genu. Amplifikace byla pozorována v obou vzorcích, konkrétně 4,1x a 3,9x (vztaženo k počtu chromozomů 17). V průměru bylo zaznamenáno 8 signálů na buňku. Nicméně na okrajích parafinových řezů byly nalezeny i buňky s dvěma signály pro *HER2/neu* gen.

4.8 Mutační analýza *p53*, *PIK3CA*, *BRAF* a *K-Ras* v EM-G3 buňkách

Gen *p53* patří k nejčastěji inaktivovaným tumor supresorovým genům u maligních nádorů. Mutační analýza celé kódující sekvence (v sedmi fragmentech amplifikujících exony 2-11; Obr. 19a) a přilehlých intron-exonových spojení odhalila pouze jednu homozygotní nukleotidovou záměnu (T za G) na pozici 14168 v 7. intronu (Obr. 19b). Tato genetická alterace je v literatuře i mezinárodní validované IARC *p53* mutační databázi (<http://www.p53.iarc.fr/Polymorphism.html>) uvedena jako polymorfismus [Graf *et al.* 2001].

Obr. 19. (a) Výsledky amplifikace genu *p53* a (b) nalezená homozygotní genomová alterace v intronu 7 (11168G>T; *p53* accession number X54156).

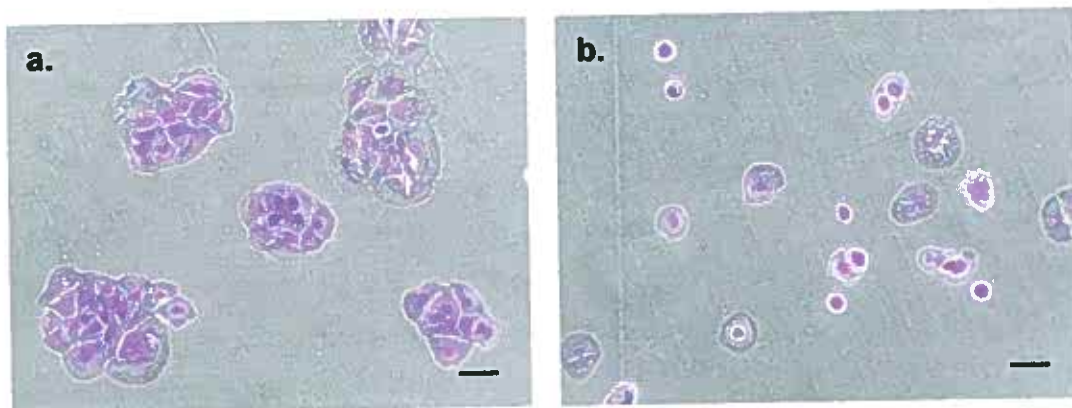


Dalším častým místem změn u nádorových onemocnění člověka jsou signální dráhy PIK3K-AKT a RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK. Více než 90 % mutací v *PIK3CA* genu je lokalizováno v exonech 7, 9, 20, které kódují funkčně podstatné domény C2, helikázovou a kinázovou [Campbell *et al.* 2004]. U pacientů s karcinomem prsu byl procentuální výskyt mutací v těchto exonech 35 % [Li *et al.* 2006]. Častější než mutace v onkogenu *K-Ras* u karcinomu prsu jsou alterace jeho následného signálního partnera – molekuly kinázy *BRAF*. Mutace genů *Ras* jsou soustředěny do kodónů 12, 13 a 61, zatímco nejčastější mutace E600V v *BRAF* se nachází v exonu 15 [Wooster *et al.* 2005]. Analýza klíčových míst onkogenů *PIK3CA*, *BRAF* a *K-Ras* v EM-G3 buňkách neodhalila žádnou mutaci.

4.9 Charakterizace závislosti EM-G3 buněk na EGF

Od počátku byly buňky závislé na přítomnosti EGF a dalších růstových faktorech (inzulinu, hydrokortizonu a cholera toxinu) v médiu. Pokud byl buňkám EGF faktor odebrán, došlo k inhibici buněčného růstu. Buňky v plnohodnotném médiu tvořily po 6 dnech kolonie obsahující průměrně 15 buněk, zatímco kolonie v médiu bez EGF sestávaly většinou pouze ze 2 buněk (Obr. 20a,b). Během dalších dnů bez EGF se buňky začaly zvětšovat a zplošťovat, následovala buněčná dezintegrace a případná smrt buňky.

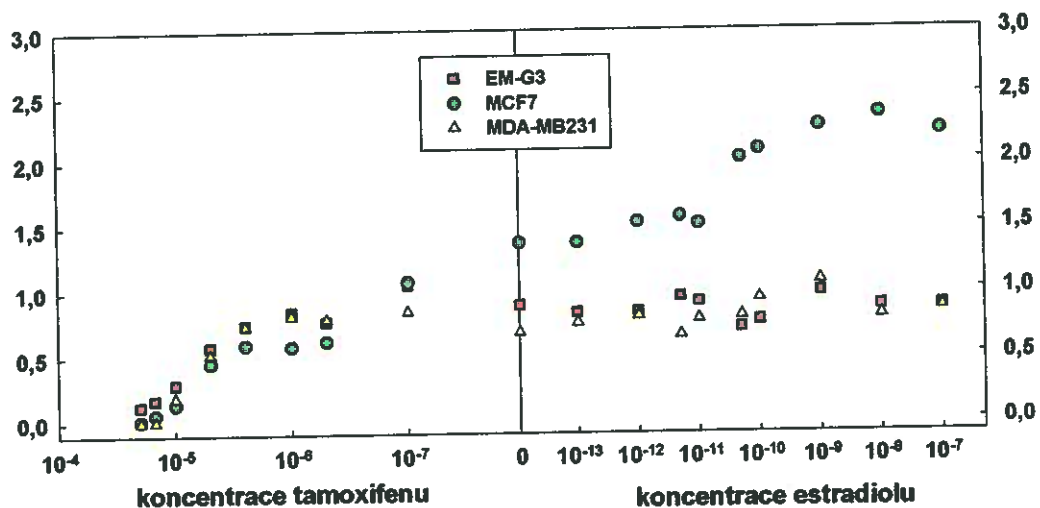
Obr. 20. Závislost EM-G3 buněk na přítomnosti EGF v kultivačním médiu. (a) Tvorba kolonií v plnohodnotném médiu a (b) v médiu bez EGF. Měřítka 20 μ m.



4.10 Charakterizace závislosti růstu EM-G3 na regulátorech ER

V histologických preparátech z původního nádoru je patrná jaderná lokalizace estrogenního receptoru (ER; Obr. 12g). Buněčná linie EM-G3 vykazovala při imunocytochemickém barvení pouze membránovou a cytoplazmatickou pozitivitu, jádra však byla negativní (Obr. 11g). Stanovení růstových charakteristik linie EM-G3 v různých koncentracích tamoxifenu (antagonisty ER) a estradiolu (agonisty ER) bylo provedeno za účelem zjištění závislosti EM-G3 buněk na přítomnosti regulátorů ER v médiu. Test proběhl ve srovnání s linií MCF7, která byla prokazatelně (nukleárně) ER pozitivní, a linií MDA-MB231, která byla ER negativní. Analýza ukázala, že EM-G3 buňky jsou nezávislé na přítomnosti regulátorů ER, podobně jako MDA-MB231 a na rozdíl od MCF7 (Obr. 21).

Obr. 21. Růstové parametry buněčných linií EM-G3, MCF7 a MDA-MB231 v závislosti na koncentraci tamoxifenu a estradiolu. Osa x: koncentrace aktivní substance (v M), osa y: násobky střední (jednotkové) hodnoty růstu kontrolní populace (bez aktivní substance).



Ze všech tří testovaných linií byly na přítomnost estradiolu v médiu citlivé pouze MCF7. Snížení růstu patrné u EM-G3 a obou komparátorů v koncentracích tamoxifenu $> 10^{-6}$ M vyplývá z toxického nespecifického účinku tamoxifenu. Použité koncentrace tamoxifenu a estradiolu jsou uvedeny v Tab. 4.

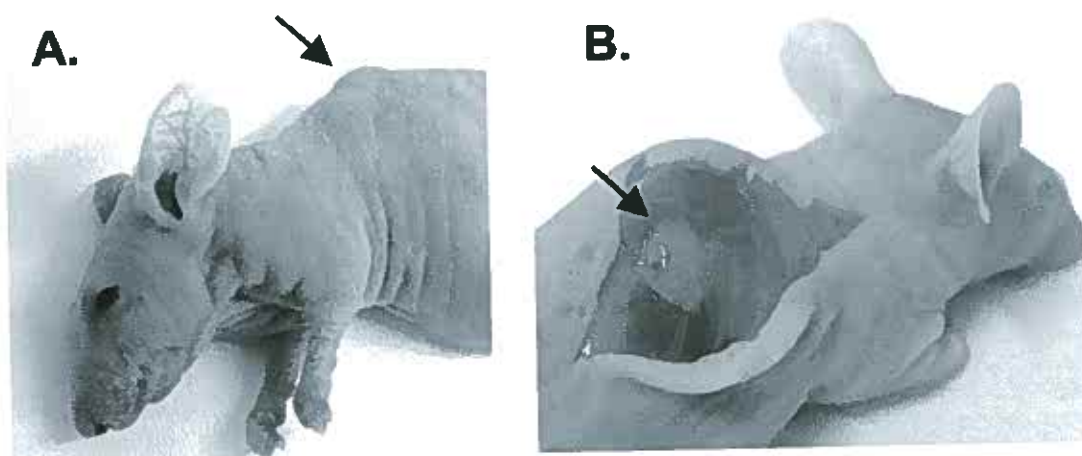
Tab. 4. Koncentrace tamoxifenu a estradiolu pro testování růstových parametrů EM-G3 linie ve srovnání s liniemi MCF7 (ER+) a MDA-MB231 (ER-).

Tamoxifen (M)	10^{-7}	$5 \cdot 10^{-7}$	10^{-6}	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	-
Estradiol (M)	10^{-13}	10^{-12}	$5 \cdot 10^{-12}$	10^{-11}	$5 \cdot 10^{-11}$	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}

4.11 Tumorigenicita v nu/nu myších

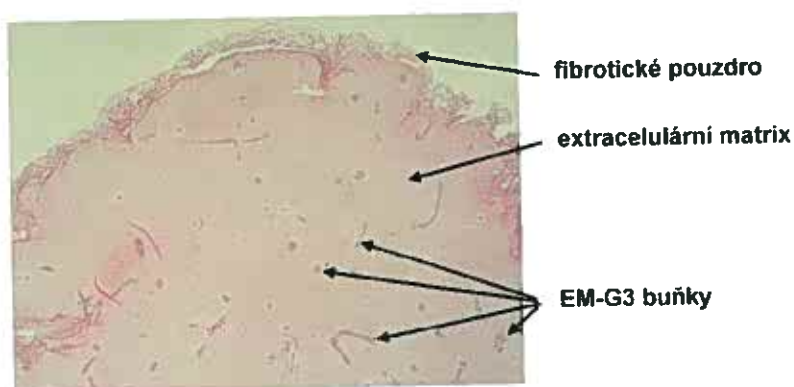
V průběhu dvou týdnů po subkutánní aplikaci EM-G3 buněk se u 7 z 8 myší vyvinul nádor (Obr. 22A,B). Další dva týdny byly obdobím růstu tumoru. Jeho maximální velikost se pohybovala v rozmezí 30 – 50 mm³. V následujících 2 měsících se již nádor nezvětšoval.

Obr. 22. Tumor vytvořený v nu/nu myších čtyři týdny po aplikaci EM-G3 buněk. (A) Vnější pohled. (B) Pohled na neinvazivní opouzdřený nádor přisedlý na svalové fascii po snesení kožního krytu.



Histologické vyšetření po obarvení hematoxylinem-eosinem odhalilo fibrotickým pouzdem ohraničené kulovité nádorové ložisko bez známek extrakapsulární expanze. Epiteliální ostrůvky byly obklopeny velkým množstvím extracelulární nebuněčné eosinofilní matrix (Obr. 23).

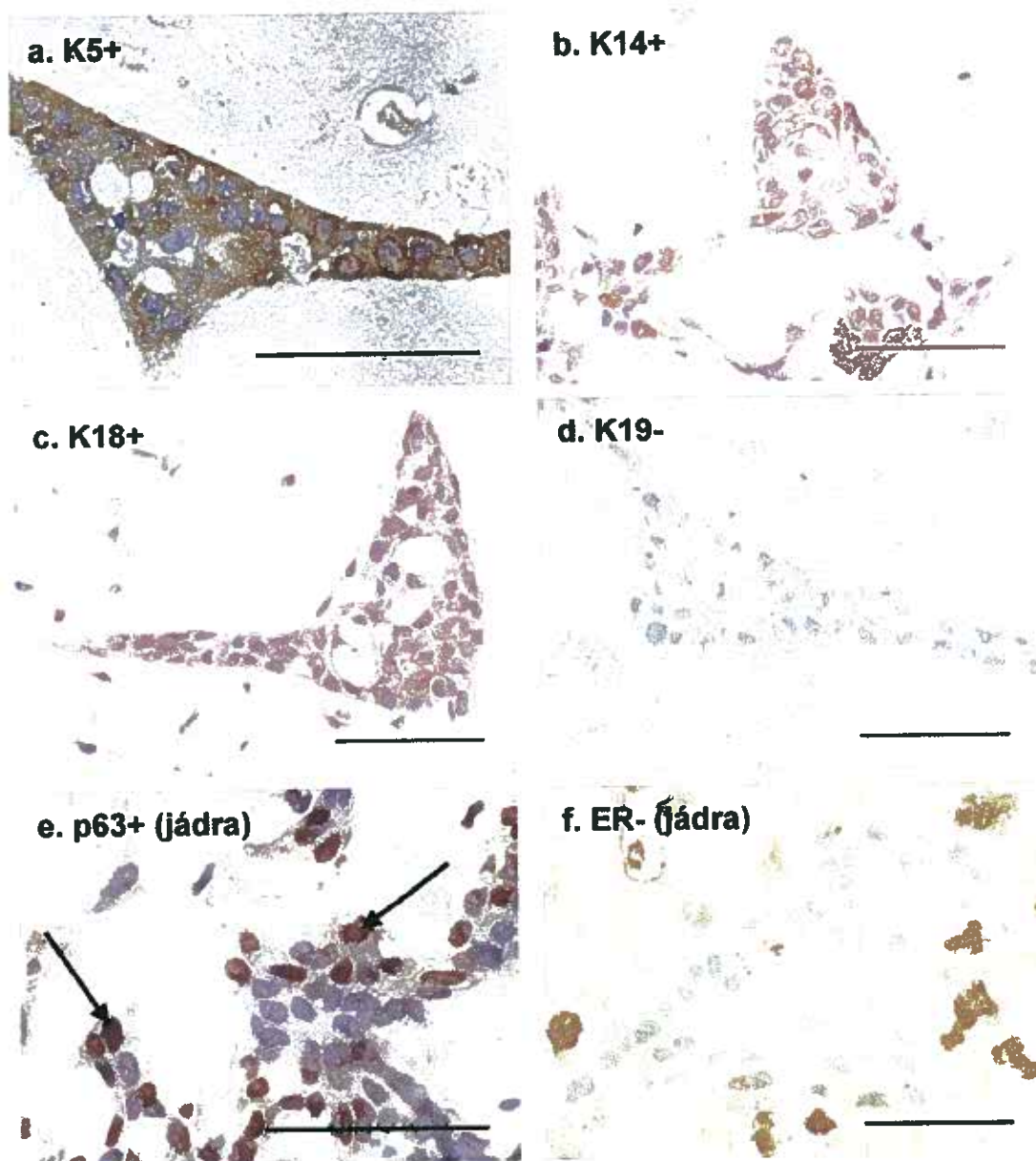
Obr. 23. Nádorové ložisko v nu/nu myši vzniklé po aplikaci EM-G3 buněk. (Hematoxylin-eosin; 4x)

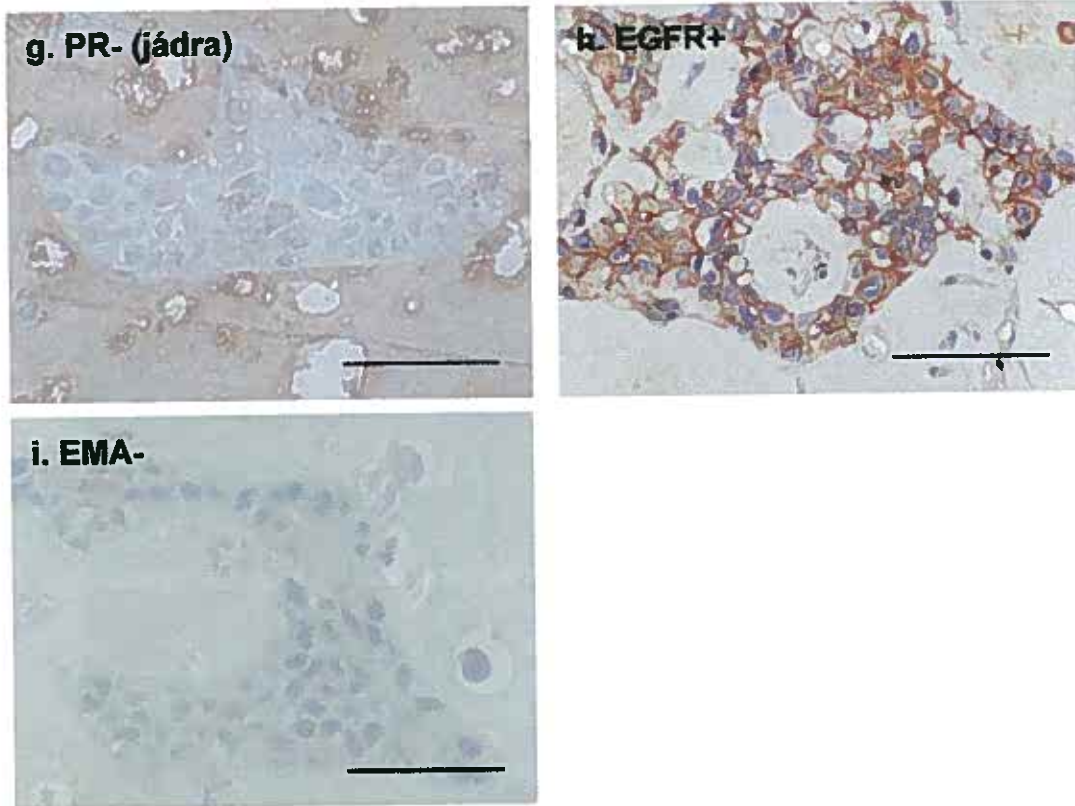


4.11.1 Imunocytochemie EM-G3 buněk *in vivo*

Imunohistochemická analýza tumoru v nu/nu myších odhalila totožný profil jaký měly EM-G3 buňky *in vitro*: K5+ (Obr. 24a), K14+ (Obr. 24b), p63+ (Obr. 24e), K18+ (Obr. 24c), K19- (Obr. 24d), ER- (Obr. 24f), PR- (Obr. 24g), EGFR+ (Obr. 24h) a SMA-. Většina buněk byla EMA- (Obr. 24i).

Obr. 24. Imunohistochemické barvení parafinových řezů z xenograftu nu/nu myši. (a-d) EM-G3 buňky v nádorovém ložisku v nu/nu myši byly stejně jako EM-G3 *in vitro* K5+/K14+/K18+/K19-. (f-i) I ostatní markery se shodovaly s linií EM-G3 *in vitro*. Měřítka 20 μ m.





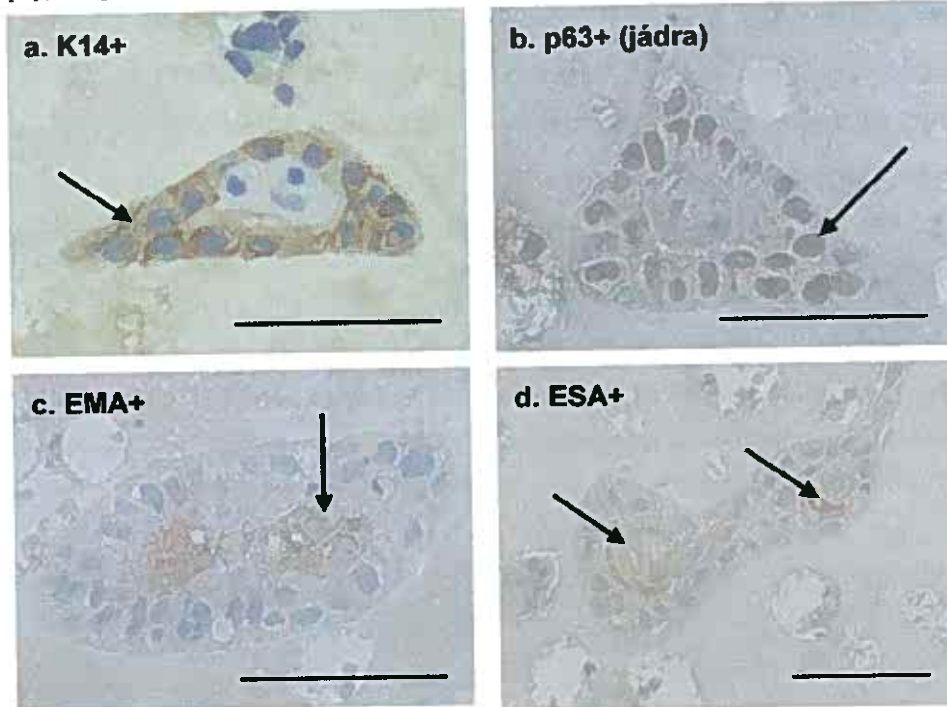
Ačkoli se myšim aplikovala klonální populace EM-G3 buněk, bylo zajímavé, že buňky na parafinových řezech myšního tumoru tvořily ostrůvky složené ze 2 typů buněk: (1) centrolobulárně lokalizovaných velkých buněk obklopených (2) menšími buňkami (Obr. 25).

Obr. 25. Pseudoduktální struktura tvořená EM-G3 buňkami v nu/nu myši.



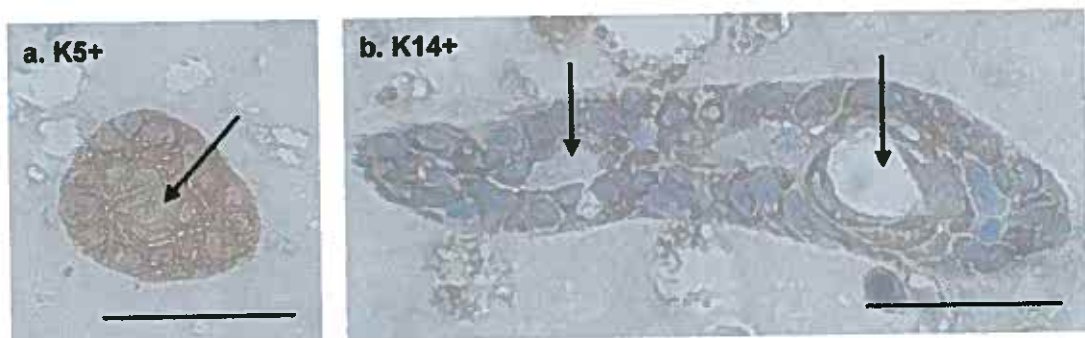
Velké centrální buňky exprimovaly luminální markery EMA (Obr. 26c) a ESA (Obr. 26d), zatímco periferně lokalizované buňky exprimovaly markery myoepiteliální - p63 (Obr. 26b), K14 (Obr. 26a).

Obr. 26. Imunohistochemické barvení parafinových řezů z xenograftu nu/nu myši: diferenciaci. EM-G3 buňky (i když klonálního původu) vykazují *in vivo* schopnost formovat primitivní duktální struktury, připomínajících dvojrstevné uspořádání buněk žlázo­vého epitelu. Centrální buňky vykazovaly makery lumenálních buněk EMA a ESA (c-d, šipky), periferní buňky myoepiteliálních buněk K14 a p63 (a-b, šipky). Za povšimnutí stojí výrazně větší centrální buňky, v porovnání s periferními. Měřít­ko 20µm.



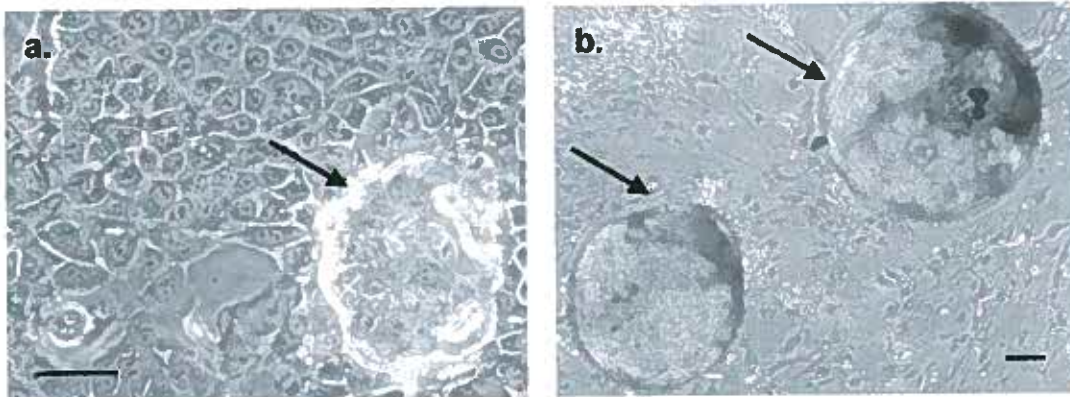
Pouze cytokeratin 5 zůstal pozitivní v centrálních i periferních buňkách (Obr. 27a), po celou dobu diferenciaci. Velké centrální buňky se postupem času rozpadly a na jejich místě tak vznikl pseudolumen (Obr. 27a,b).

Obr. 27. Imunohistochemické barvení parafinových řezů z xenograftu nu/nu myši: vznik pseudolumen. Centrální buňky se postupně rozpadaly a na jejich místě vznikl prostor připomínající lumen. (a) Velká centrální buňka (šipka). (b) Rozpad centrální buňky, postupný vznik pseudolumen (šipky). Měřít­ko 20µm.



Po jednom měsíci růstu nádoru v nu/nu myši byl tumor sterilně odebrán a přenesen neprodleně do sterilní nádoby s kultivačním médiem. Nádorová tkáň byla enzymaticky rozvolněna pomocí kolagenázy a nasazena do kultury. Buňky byly pěstovány v prostředí 3T3 feeder-layeru. Působením kolagenázy došlo k izolaci kulovitých buněčných shluků (Obr. 28a,b), ne však rozpadu na jednotlivé buňky. Buňky nasazené po 1. měsíci migrovaly *in vitro* z kulovitých shluků a rychle se dělily. Morfologie EM-G3 buněk byla zachována (Obr. 28a). Tři měsíce po injekci byla tatáž procedura opakována u další myši. Tyto buňky však přežily v kultuře pouze ve formě kulovitých shluků. Nedošlo k žádnému zjevnému vycestování buněk do okolí (Obr. 28b).

Obr. 28. Buňky EM-G3 přenesené do tkáňové kultury z nádoru vytvořeného v nu/nu myši. (a) 1 měsíc po aplikaci jsou buňky schopné vycestovat z fragmentu nádoru. (b) 3 měsíce po aplikaci se již buňky nedělily ani z kulovitých shluků nemigrovaly (v okolí jsou patrné 3T3 buňky feederu). Měřítko 20 μ m.



5 Diskuze

Předkládaná práce se zabývá založením a charakterizací nové klonální linie epiteliálních buněk EM-G3 izolovaných z tkáně primárního ložiska ductálního karcinomu lidské mléčné žlázy. Buňky EM-G3 jsou spontánně immortalizované, ale výrazně se liší od majoritní populace buněk původního nádoru.

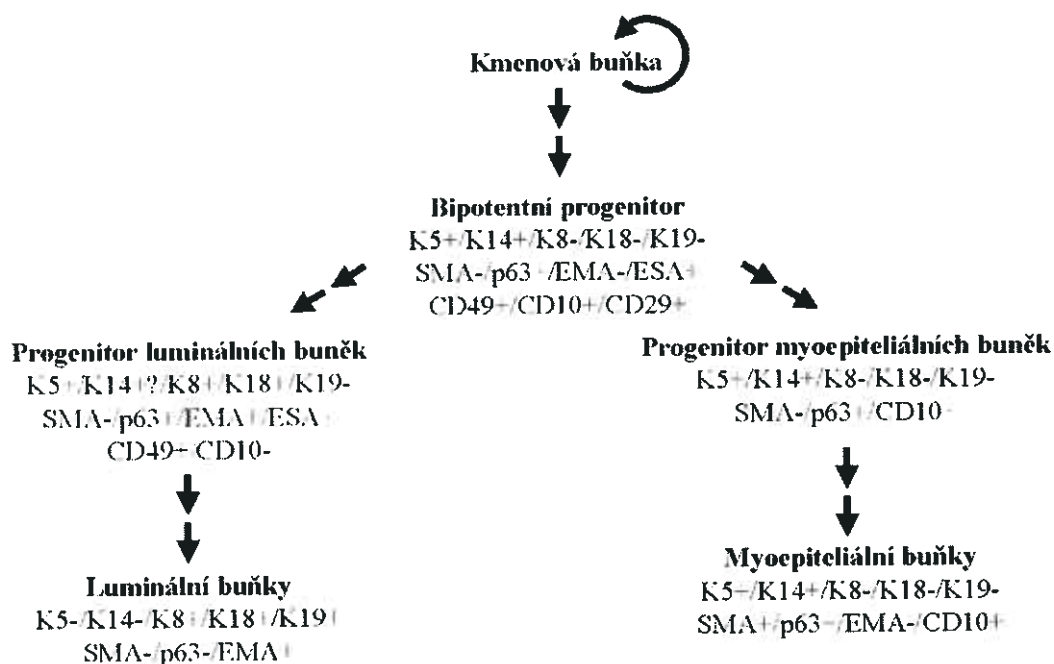
5.1 Charakter a původ buněk linie EM-G3

Klíčovou otázkou bylo zjištění původu EM-G3 buněk. Proto byla provedena rozsáhlá imunocytochemická analýza tohoto klonu a porovnána s buňkami vyskytujícími se v původním nádoru, jehož vzorek byl naštěstí v dostatečné velikosti zachován v histologickém parafinovém bločku. Bylo zjištěno, že buňky linie EM-G3 vykazovaly imunitní profil bazálních buněk (K5+/K14+/p63+/SMA-/K19-) a tím se podstatně lišily od majoritní nádorové populace, která vykazovala znaky typické pro plně diferencované lumenální buňky (K5-/K14-/p63-/K18+/K19+) (Příloha 1). Pokusili jsme se identifikovat, zda se v histologických řezech vyskytují buňky odpovídající imunoprofilu EM-G3 buněk, a mohly by tedy být jejich zdrojem.

V zásadě byly nalezeny dva typy takovýchto buněk, rozptýlené řídko v tkáni nádoru. Jednak malé ostrůvky K5+/K14+/p63+ buněk, které byly pravděpodobně zbytky zanikajících myoepiteliálních buněk s neobvyklou lokalizací přímo uprostřed nebo na okraji nádorových kolonií. Druhým typem byly buňky K5+/K14+/p63+/SMA-, které se vyskytovaly v TDLU jednotkách.

Vedle charakteristických znaků bazálních buněk exprimovaly EM-G3 buňky též některé lumenální markery, jako jsou K7, K8, EMA, ESA a K18. Smíšená exprese markerů bazálních/myoepiteliálních a lumenálních buněk (jmenovitě ko-exprese K5/K14/K18 s negativitou K19/SMA) indikuje, že EM-G3 klon reprezentuje nezralé buňky (K19 a SMA jsou markery zralých lumenálních, resp. zralých myoepiteliálních buněk), které pocházejí buď z populace bipotentních progenitorů (K5+/K14+) [Birnbaum *et al.* 2004], anebo z pozdějšího stádia progenitorů lumenálních buněk (K5+/K18+) [Gusterson *et al.* 2005] (Obr. 29). Cytokeratin 5 je totiž podle posledních výzkumů exprimován nejen v bazálních/myoepiteliálních buňkách, ale i v prekurzorech lumenálních buněk, tedy také ve společných progenitorrech obou typů mamárních epitelii.

Obr. 29. Schéma maturace buněk mamárního epitelu. Charakterizace jednotlivých vývojových stádií je prováděna na základě analýzy změn exprese populačně-specifických proteinů. (Modifikováno podle Bocker *et al.* 2002, Boccker *et al.* 2003, Petersen *et al.* 2003, Stingl *et al.* 2005)



Podle současných názorů se v TDLU nacházejí dospělé kmenové buňky zabezpečující v těhotenství intenzivní proliferaci buněk mléčné žlázy [Gusterson *et al.* 2005]. Tyto progenitorové buňky jsou častým terčem maligní transformace [Petersen *et al.* 2003; Wellings *et al.* 1975]. Z těchto skutečností vyplývá, že nejpravděpodobnějším zdrojem EM-G3 buněk by mohly být progenitorové buňky nacházející se v TDLU, u kterých již došlo k imortalizaci, ale ještě ne k finální maligní transformaci. Díky spontánní imortalizaci EM-G3 buněk nebylo nutné využít imortalizačních postupů výrazně ovlivňujících genom cílových buněk [Gudjonsson *et al.* 2004]. Imortalizované buňky linie EM-G3 jsou zřejmě odnoží populace buněk z rané fáze transformace, neboť imortalizace je jedním z prvních kroků maligního zvratu. Je tedy pravděpodobné, že EM-G3 mají společné předky s buňkami nádoru.

EM-G3 buňky jsou závislé na přítomnosti EGF v médiu. EGF je faktor, který je nutný k přežití normálních prsních epitelálních buněk. Stimuluje proliferaci rychle se dělicích normálních prsních epitelálních buněk, které se často vyskytují jako příměs i v prsním tumoru [Rosfjord a Dickson 1999]. Naopak je popsáno pouze několik linií buněk odvozených z prsního karcinomu, jejichž růst je závislý na přítomnosti EGF v médiu

[Deugnier *et al.* 2002a; Paine *et al.* 1992; Wang *et al.* 2000]. Většina nádorových buněk je schopna růst v relativně jednoduchých médiích bez přidavku růstových faktorů. Závislostí na EGF (ale i cholera toxinu) se EM-G3 klon blíží spíše vlastnostem a růstovým požadavkům normálních epitelálních buněk mléčné žlázy. Blízkost k normálním buňkám zároveň se spontánní imortalizací linie však zdůrazňuje její speciální postavení mezi podobnými buňkami izolovanými z prsních nádorů.

Další charakterizace EM-G3 buněk byla provedena na úrovni profilu genové exprese pomocí cDNA mikroarraye, zaměřené na buňky prsních nádorů. V mikroarrayích byla stanovena exprese 96 vybraných genů, které se účastní regulace (resp. deregulace) hlavních signálně transdukčních cest. Pomocí tohoto přístupu jsme detekovali především zvýšenou expresi markerů typických pro kmenové buňky různých tkání a pro bazální buňky mléčné žlázy (např. CD44 nebo integriny $\alpha 6$ a $\beta 1$). Nebyly nalezeny ve zvýšené míře markery typické pro prsní karcinomy. Tyto výsledky podporují hypotézu, že EM-G3 buňky pocházejí z progenitorových bazálních buněk mléčné žlázy v premaligním stádiu [Ponti *et al.* 2005; Tumber a Fuchs 2006].

5.2 Schopnost růstu EM-G3 buněk *in vivo*

Pouze malé množství lidských prsních nádorových linií má schopnost tvořit tumory v nu/nu myších. EM-G3 buňky tuto schopnost mají. Navíc v tomto biologickém prostředí nejen proliferují, ale dokonce i částečně diferencují. Přestože EM-G3 linie pochází z jedné jediné buňky, dokáže tvořit struktury připomínající jednoduché dukty. Tyto útvary se skládají z centrálních buněk exprimujících luminální antigeny (EMA/ESA) a periferních buněk exprimujících myoepiteliální antigeny (p63/K14). Podobné složení má zdravá mamární tkáň. EM-G3 je pravděpodobně první klonální spontánně imortalizovaná linie buněk izolovaných z karcinomu mléčné žlázy člověka, která vykazuje tak zjevný diferenciační potenciál *in vivo*. Pozorování diferenciace klonu do mamárních struktur, které jsou tvořeny dvěma různými typy buněk, podporuje hypotézu, která předpokládá, že se myoepiteliální a luminální buňky vyvíjejí ze společného prekurzoru [Clayton *et al.* 2004; Pechoux *et al.* 1999]. Ačkoliv má trojrozměrné prostředí *in vivo* podstatný vliv na buněčnou diferenciaci, byla exprese K18 *in vivo* slabá. Bylo popsáno, že prsní progenitorové buňky exprimují malé množství K18, často detekovatelné pouze ve kryořezech [Clarke *et al.* 2004; Laakso *et*

al. 2005]. Proteiny K19 (typický pro zralé lumenální buňky) a SMA (typický pro zralé myoepiteliální buňky), které nejsou v EM-G3 exprimovány, zůstaly negativní i v nu/nu xenograftech. To znamená, že k plné diferenciaci na zralé buňky nedošlo ani v *in vivo* prostředí. Cytokeratin 5 je jedním z nejvýraznějších markerů linie EM-G3 *in vitro* i *in vivo*. V souladu s důkazem, že K5 je marker mamárních kmenových a progenitorových buněk [Boccker a Buerger 2003], je naše zjištění, že tento keratin zůstává pozitivní ve všech buňkách (lumenálního i myoepiteliálního typu), které se vyskytují v primitivních duktálních strukturách, až do doby rozpadu centrálních buněk a tím vytvoření pseudolumen uprostřed "kolonie". Podobná diferenciacie *in vivo*, končící vytvořením pseudolumen, byla popsána u myši mamární epitelální linie BC44 [Deugnier *et al.* 2002a].

V době, kdy tumor dosáhl v nu/nu myších své největší velikosti (tj. čtyři týdny po subkutánní aplikaci), byl nádor odebrán a enzymaticky uvolněné EM-G3 buňky byly zpětně nasazeny do kultury. V mikroskopu jsme pozorovali kulovité shluky, ze kterých buňky migrovaly do okolí a dále proliferovaly. Tyto *in vitro* shluky byly podobné útvarům nazvaným „mamosféry“, které byly již dříve popsány u mamárních buněk iniciujících nádorový růst [Ponti *et al.* 2005]. Na druhou stranu tříměsíční nádorový růst v nu/nu myších způsobil podstatné snížení životaschopnosti EM-G3 buněk. Toto může být vysvětleno buď špatnou vaskularizací opouzdřeného tumoru (ve vzorku nebyly nalezeny žádné cévy), nebo v té době již vyšším stupněm buněčné diferenciacie, kdy buňky ztratily schopnost dělení.

Co se týká schopnosti růstu v 3D podmínkách *in vitro*, EM-G3 buňky netvoří kolonie v měkkém agaru (výsledky neuvedeny), což ukazuje na nízkou malignitu těchto buněk.

5.3 Genomová stabilita EM-G3 buněk

Většina linií prsních nádorových buněk vykazuje časté a podstatné chromozomální aberace a genomovou nestabilitu (<http://cgap.nci.nih.gov/>). V karyotypu buněčné linie EM-G3 ve 142. pasáži se objevily některé komplexní změny, především monozomie chromozomu 15 a 20 a derivace chromozomů 3, 6, 12 a 13. Analýza karyotypu provedená ve 212. pasáži přinesla velmi podobné výsledky. Byl zaznamenán pouze jeden rozdíl oproti buňkám ze 142. pasáže, a to v derivaci chromozomu 9. Ve srovnání

s ostatními liniemi prsních nádorových buněk [Wengcr *et al.* 2004] se tedy jedná o buňky se stabilním genomem.

Na druhou stranu nebyly detekovány amplifikace ani delece žádného z genů, které se často pojí s diagnózou karcinomu prsu. Nebyla zjištěna amplifikace *HER2/neu*, *cyklinu D* a *c-myc* onkogenů ani delece tumor supresorových genů *p53* a *Rb*. Ve srovnání s jinými buněčnými liniemi karcinomu prsu jsou tedy genetické změny relativně malé. Stačily však ke spontánní imortalizaci buněk, ze kterých byly EM-G3 odvozeny. Absence mutací v analyzovaných onkogenech a *p53* společně s neomezeným potenciálem dělení podporuje hypotézu, že EM-G3 linie reprezentuje buněčnou populaci v časném stádiu neoplastické progresce.

Amplifikace *HER2/neu* genu nebyla zjištěna v *in vitro* kultuře EM-G3 buněk, ale byla nalezena v majoritní populaci buněk v odoperovaném nádoru pacientky. Toto pozorování opět potvrzuje, že EM-G3 buňky nejsou pravé buňky karcinomu prsu, ale premaligní imortalizovaná buněčná populace, která se v odebraném vzorku nádorové tkáně také vyskytovala.

Současné výzkumy ukazují, že k časným změnám (zahrnující genomové změny DNA a/nebo mutace v klíčovém genech) dochází v populacích kmenových či progenitorových buněk dlouhou dobu (léta) před vznikem samotné první nádorové léze. Následuje doba, po kterou pozměňené progenitory akumulují genetické poruchy. Jen v určitých případech dosáhnou úrovně umožňující nezávislý a z hlediska makroorganismu nekontrolovatelný buněčný růst [Smalley a Ashworth 2003]. Časně transformované nádorové buňky nesou charakteristiky svých progenitorů, tj. znaky charakteristické pro určitou fázi jejich vývoje směrem k zralé buněčné populaci. Pomocí LOH (loss of heterozygosity) analýzy bylo zjištěno, že většina nádorové populace vlastní společné genetické alterace s přilehlou „histologicky normální“ tkání [Deng *et al.* 1996; Lakhani *et al.* 1999]. Hypotéza, že původ nádoru spočívá v mutaci kmenových buněk, je dobře rozpracována na příkladu hematopoetických buněk [Marx 2003; Reya *et al.* 2001]. Nicméně důkazy o vývoji solidních nádorů z transformovaných progenitorových či kmenových buněk jsou méně přesvědčivé [Reya *et al.* 2001]. V poslední době byly izolovány CD44⁺/CD24⁻ lidské kmenové/progenitorové buňky pocházející z karcinomu prsu. Tyto buňky byly schopny tvořit nádory v prsním tukovém polštáři imunokompromitovaných NOD/SCID myši [Al Hajj *et al.* 2003;

Dontu *et al.* 2003b; Ponti *et al.* 2005]. Zmíněné výsledky ukazují na možnost, že také prsní tumory vznikají z mutovaných kmenových buněk.

Naše výsledky týkající se charakteru a původu EM-G3 buněk podporují hypotézu nádorových prekurzorů, tj. imortalizovaných progenitorových buněk, které se vyvíjejí v různé nestabilní klony s variabilním stupněm diferenciaci a mitotické aktivity.

5.4 Význam linie EM-G3

Klonální buněčná linie EM-G3 je jedinou stabilní, spontánně imortalizovanou linií karcinomu prsu, která nese znaky jak buněk původního epitelu mléčné žlázy s jeho schopností diferenciaci, tak nádorových buněk s neomezeným generačním potenciálem. Domnívám se, že tyto vlastnosti společně s krátkou generační dobou, jednoduchou kultivací a schopností růstu v myším modelu *in vivo* umožňují využít ustavenou linii pro studium morfogeneze mamárního epitelu a studium faktorů, které tento vývoj ovlivňují. Pilotní výsledky týkající se vývoje pseudoluminálních struktur naznačují, že vznik lumen v duktálních strukturách mamy probíhá rozpadem centrálně lokalizovaných buněk. Tyto buňky pravděpodobně v určitém diferenciačním stádiu dospívají k apoptóze vlivem zatím nejasně charakterizovaných signálů okolních buněk.

Schopnost diferenciaci *in vivo* umožňuje v nezralých EM-G3 buňkách, charakterizovaných nízkou aktivitou estrogenního receptoru, studium tkáňových i systémových faktorů zodpovědných za terminální diferenciaci a progresi epiteliálních struktur v průběhu změn hormonálních aktivit v menoaktivním období u ženy.

Za další potenciál linie EM-G3 buněk považuji jejich dependenci na přítomnost EGF. Tato vlastnost ji předurčuje k farmakogenomickým analýzám EGF inhibitorů, zvažovaným k aplikaci u EGFR pozitivních pacientek s karcinomem prsu [Burris *et al.* 2005; Ciardiello *et al.* 2006; Polychronis *et al.* 2005].

Unikátnost této linie je shrnuta v následujících bodech: a) Je odvozena z primárního nádoru. b) Buňky se liší od majoritní populace nádoru. c) Je spontánně imortalizovaná ve velmi časně fázi kultivace, tzn. že buňky byly imortalizované již *in vivo*. d) Na rozdíl od většiny mamárních linií je její genom stabilní. e) Tvoří nádorová ložiska v imunodeficientních nu/nu myších. f) Linie je klonogenní, tj. pochází z jedné buňky.

Přesto je schopna diferencovat v nu/nu xenograftech na primitivní dukty skládající se z diferencujících lumenálních a myoepiteliálních buněk.

6 Závěr

EM-G3 buňky reprezentují unikátní spontánně imortalizovanou klonální buněčnou linií prokazatelně odvozenou z premaligních progenitorů karcinomu prsu. Takový původ společně s krátkou generační dobou, schopností tvořit tumory *in vivo* a zachovaným potenciálem diferenciacce jsou slibnými atributy EM-G3 buněk, které je předurčují k dalšímu využití ve výzkumu na poli progresce karcinomu prsu.

7 Literatura

- AL HAJJ M, WICHA MS, BENITO-HERNANDEZ A, MORRISON SJ, CLARKE MF: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3983-3988, 2003.
- AULMANN S, ADLER N, ROM J, HELMCHEN B, SCHIRMACHER P, SINN HP: c-myc amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences. *J Clin Pathol* **59**:424-428, 2006.
- BIRNBAUM D, BERTUCCI F, GINESTIER C, TAGETT R, JACQUEMIER J, CHARAFE-JAUFFRET E: Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). *Int J Oncol* **25**:249-258, 2004.
- BOCKER W, MOLL R, POREMBA C, HOLLAND R, VAN DIEST PJ, DERVAN P, BURGER H, WAI D, INA DR, BRANDT B, HERBST H, SCHMIDT A, LERCH MM, BUCHWALLOW IB: Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest* **82**:737-746, 2002.
- BOECKER W, BUERGER H: Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolif* **36 Suppl 1**:73-84, 2003.
- BRAND FX, RAVANEL N, GAUCHEZ AS, PASQUIER D, PAYAN R, FAGRET D, MOUSSEAU M: Prospect for anti-HER2 receptor therapy in breast cancer. *Anticancer Res* **26**:463-470, 2006.
- BREZINOVA J, ZEMANOVA Z, RANSDORFOVA S, SINDELAROVA L, SISKOVA M, NEUWIRTOVA R, CERMAK J, MICHALOVA K: Prognostic significance of del(20q) in patients with hematological malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* **160**:188-192, 2005.
- BURRIS HA, III, HURWITZ HI, DEES EC, DOWLATI A, BLACKWELL KL, O'NEIL B, MARCOM PK, ELLIS MJ, OVERMOYER B, JONES SF, HARRIS JL, SMITH DA, KOCH KM, STEAD A, MANGUM S, SPECTOR NL: Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical activity study of lapatinib (GW572016), a

reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients with metastatic carcinomas. *J Clin Oncol* **23**:5305-5313, 2005.

CAMPBELL IG, RUSSELL SE, CHOONG DY, MONTGOMERY KG, CIAVARELLA ML, HOOI CS, CRISTIANO BE, PEARSON RB, PHILLIPS WA: Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* **64**:7678-7681, 2004.

CIARDIELLO F, TROIANI T, CAPUTO F, DE LAURENTIIS M, TORTORA G, PALMIERI G, DE VITA F, DIADEMA MR, ORDITURA M, COLANTUONI G, GRIDELLI C, CATALANO G, DE PLACIDO S, BIANCO AR: Phase II study of gefitinib in combination with docetaxel as first-line therapy in metastatic breast cancer. *Br J Cancer* **94**:1604-1609, 2006.

CLARKE CL, SANDLE J, PARRY SC, REIS-FILHO JS, O'HARE MJ, LAKHANI SR: Cytokeratin 5/6 in normal human breast: lack of evidence for a stem cell phenotype. *J Pathol* **204**:147-152, 2004.

CLAYTON H, TITLEY I, VIVANCO M: Growth and differentiation of progenitor/stem cells derived from the human mammary gland. *Exp Cell Res* **297**:444-460, 2004.

CORY S, HUANG DC, ADAMS JM: The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **22**:8590-8607, 2003.

DAPIC V, CARVALHO MA, MONTEIRO AN: Breast cancer susceptibility and the DNA damage response. *Cancer Control* **12**:127-136, 2005.

DAVIES JA: Do different branching epithelia use a conserved developmental mechanism? *Bioessays* **24**:937-948, 2002.

DENG CX: BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res* **34**:1416-1426, 2006.

DENG G, LU Y, ZLOTNIKOV G, THOR AD, SMITH HS: Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science* **274**:2057-2059, 1996.

- DEUGNIER MA, FARALDO MM, JANJI B, ROUSSELLE P, THIERY JP, GLUKHOVA MA: EGF controls the in vivo developmental potential of a mammary epithelial cell line possessing progenitor properties. *J Cell Biol* **159**:453-463, 2002a.
- DEUGNIER MA, TEULIERE J, FARALDO MM, THIERY JP, GLUKHOVA MA: The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res* **4**:224-230, 2002b.
- DEVILEE P, CLETON-JANSEN AM, CORNELISSE CJ: Ever since Knudson. *Trends Genet* **17**:569-573, 2001.
- DIRENZO J, SIGNORETTI S, NAKAMURA N, RIVERA-GONZALEZ R, SELLERS W, LODA M, BROWN M: Growth factor requirements and basal phenotype of an immortalized mammary epithelial cell line. *Cancer Res* **62**:89-98, 2002.
- DONTU G, ABDALLAH WM, FOLEY JM, JACKSON KW, CLARKE MF, KAWAMURA MJ, WICHA MS: In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* **17**:1253-1270, 2003a.
- DONTU G, AL HAJJ M, ABDALLAH WM, CLARKE MF, WICHA MS: Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* **36 Suppl 1**:59-72, 2003b.
- FRIDRIKSDOTTIR AJ, VILLADSEN R, GUDJONSSON T, PETERSEN OW: Maintenance of cell type diversification in the human breast. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**:61-74, 2005.
- GRAF J, MERK B, MAURER U, MULLER E, BERGMANN L: Identification of novel polymorphisms in intron 7 of the human p53 gene in acute myeloid leukemia and healthy donors. *Leuk Lymphoma* **41**:655-658, 2001.
- GUDJONSSON T, RONNOV-JESSEN L, VILLADSEN R, RANK F, BISSELL MJ, PETERSEN OW: Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *J Cell Sci* **115**:39-50, 2002a.

- GUDJONSSON T, VILLADSEN R, NIELSEN HL, RONNOV-JESSEN L, BISSELL MJ, PETERSEN OW: Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev* **16**:693-706, 2002b.
- GUDJONSSON T, VILLADSEN R, RONNOV-JESSEN L, PETERSEN OW: Immortalization protocols used in cell culture models of human breast morphogenesis. *Cell Mol Life Sci* **61**:2523-2534, 2004.
- GUSTERSON BA, MONAGHAN P, MAHENDRAN R, ELLIS J, O'HARE MJ: Identification of myoepithelial cells in human and rat breasts by anti-common acute lymphoblastic leukemia antigen antibody A12. *J Natl Cancer Inst* **77**:343-349, 1986.
- GUSTERSON BA, ROSS DT, HEATH VJ, STEIN T: Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res* **7**:143-148, 2005.
- HERMANOVA M, LUKAS Z, KROUPOVA I, KLEIBL Z, NOVOTNY J, NENUTIL R, PAZOURKOVA M, BRAZDIL J, KREN L, DITE P: Relationship between K-ras mutation and the expression of p21WAF1/CIP1 and p53 in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasma* **50**:319-325, 2003.
- JANATOVA M, ZIKAN M, DUNDR P, MATOUS B, POHLREICH P: Novel somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic breast tumors. *Hum Mutat* **25**:319-2005.
- KLEIBL Z, NOVOTNY J, BEZDICKOVA D, MALIK R, KLEIBLOVA P, FORETOVA L, PETRUZELKA L, ILENCIKOVA D, CINEK P, POHLREICH P: The CHEK2 c.1100delC germline mutation rarely contributes to breast cancer development in the Czech Republic. *Breast Cancer Res Treat* **90**:165-167, 2005.
- KLEIBL Z, RAISOVA M, NOVOTNY J, POHLREICH P, MATOUS B: Apoptosis and its importance in the development and therapy of tumors (review). *Sb Lek* **103**:1-13, 2002.

- KOKER MM, KLEER CG: p63 expression in breast cancer: a highly sensitive and specific marker of metaplastic carcinoma. *Am J Surg Pathol* **28**:1506-1512, 2004.
- KOUKOULIS GK, VIRTANEN I, KORHONEN M, LAITINEN L, QUARANTA V, GOULD VE: Immunohistochemical localization of integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. Correlations with their functions as receptors and cell adhesion molecules. *Am J Pathol* **139**:787-799, 1991.
- LAAKSO M, LOMAN N, BORG A, ISOLA J: Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Mod Pathol* **18**:1321-1328, 2005.
- LACROIX M, LECLERCQ G: Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* **83**:249-289, 2004.
- LACROIX M, TOILLON RA, LECLERCQ G: Stable 'portrait' of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics. *Endocr Relat Cancer* **11**:497-522, 2004.
- LAKHANI SR, CHAGGAR R, DAVIES S, JONES C, COLLINS N, ODEL C, STRATTON MR, O'HARE MJ: Genetic alterations in 'normal' luminal and myoepithelial cells of the breast. *J Pathol* **189**:496-503, 1999.
- LEREBOURS F, LIDEREAU R: Molecular alterations in sporadic breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **44**:121-141, 2002.
- LI SY, RONG M, GRIEU F, IACOPETTA B: PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res Treat* **96**:91-95, 2006.
- MARX J: Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. *Science* **301**:1308-1310, 2003.
- MAYR D, HIRSCHMANN A, LOHRS U, DIEBOLD J: KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: A comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecol Oncol*: in press.

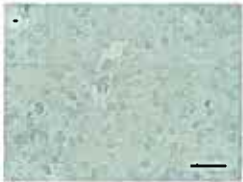

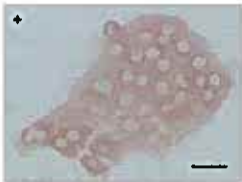

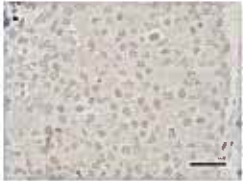
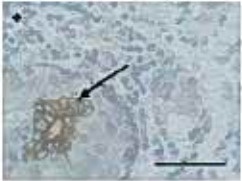

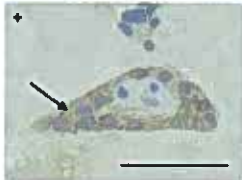
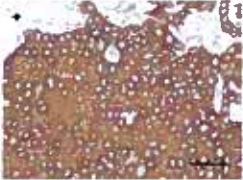

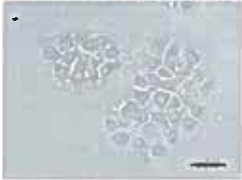

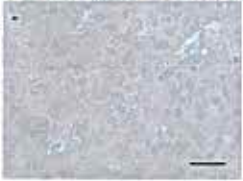
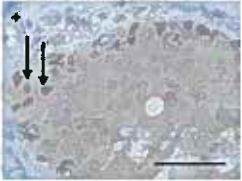

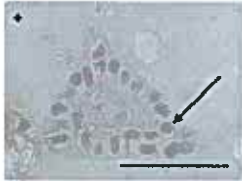
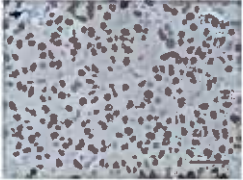
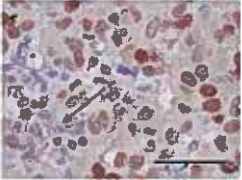
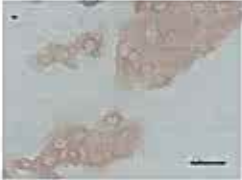
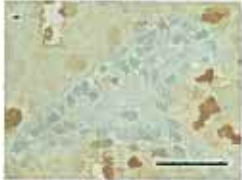
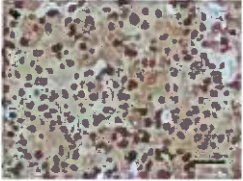
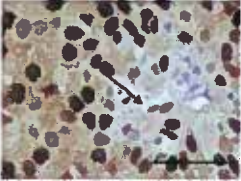


- MOLL R, FRANKE WW, SCHILLER DL, GEIGER B, KREPLER R: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**:11-24, 1982.
- NAVOLANIC PM, STEELMAN LS, MCCUBREY JA: EGFR family signaling and its association with breast cancer development and resistance to chemotherapy (Review). *Int J Oncol* **22**:237-252, 2003.
- NOVOTNÝ J, VÍTEK P, PETRUŽELKA L: Karcinom prsu. In: *Klinická radiční onkologie pro praxi*. Triton, Praha:158-179, 2005.
- O'HARE MJ: Breast Cancer. In: Masters JRW (ed) *Human cancer in primary culture*, 1st edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht:271-286, 1991.
- OLIVEIRA AM, ROSS JS, FLETCHER JA: Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *Am J Clin Pathol* **124 Suppl**:S16-S28, 2005.
- PAINE TM, SOULE HD, PAULEY RJ, DAWSON PJ: Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. *Int J Cancer* **50**:463-473, 1992.
- PECHOUX C, GUDJONSSON T, RONNOV-JESSEN L, BISSELL MJ, PETERSEN OW: Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Dev Biol* **206**:88-99, 1999.
- PETERSEN OW, GUDJONSSON T, VILLADSEN R, BISSELL MJ, RONNOV-JESSEN L: Epithelial progenitor cell lines as models of normal breast morphogenesis and neoplasia. *Cell Prolif* **36 Suppl 1**:33-44, 2003.
- POHLREICH P, ZIKAN M, STRIBRNA J, KLEIBL Z, JANATOVA M, KOTLAS J, ZIDOVSKA J, NOVOTNY J, PETRUZELKA L, SZABO C, MATOUS B: High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res* **7**:R728-R736, 2005.
- POLYCHRONIS A, SINNETT HD, HADJIMINAS D, SINGHAL H, MANSI JL, SHIVAPATHAM D, SHOUSA S, JIANG J, PESTON D, BARRETT N,

- VIGUSHIN D, MORRISON K, BERESFORD E, ALI S, SLADE MJ, COOMBES RC: Preoperative gefitinib versus gefitinib and anastrozole in postmenopausal patients with oestrogen-receptor positive and epidermal-growth-factor-receptor-positive primary breast cancer: a double-blind placebo-controlled phase II randomised trial. *Lancet Oncol* **6**:383-391, 2005.
- PONTI D, COSTA A, ZAFFARONI N, PRATESI G, PETRANGOLINI G, CORADINI D, PILOTTI S, PIEROTTI MA, DAIDONE MG: Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* **65**:5506-5511, 2005.
- REYA T, MORRISON SJ, CLARKE MF, WEISSMAN IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**:105-111, 2001.
- ROSFJORD EC, DICKSON RB: Growth factors, apoptosis, and survival of mammary epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **4**:229-237, 1999.
- ROWINSKY EK: Signal events: Cell signal transduction and its inhibition in cancer. *Oncologist* **8 Suppl 3**:5-17, 2003.
- RUMMUKAINEN J, KYTOLA S, KARHU R, FARNEBO F, LARSSON C, ISOLA JJ: Aberrations of chromosome 8 in 16 breast cancer cell lines by comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization, and spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet* **126**:1-7, 2001.
- SHERR CJ: Cancer cell cycles. *Science* **274**:1672-1677, 1996b.
- SIRVENT JJ, AGUILAR MC, OLONA M, PELEGRI A, BLAZQUEZ S, GUTIERREZ C: Prognostic value of apoptosis in breast cancer (pT1-pT2). A TUNEL, p53, bcl-2, bag-1 and Bax immunohistochemical study. *Histol Histopathol* **19**:759-770, 2004.
- SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D, MONKS A, MCMAHON J, VISTICA D, WARREN JT, BOKESCH H, KENNEY S, BOYD MR: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* **82**:1107-1112, 1990.

- SMALLEY M, ASHWORTH A: Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer* **3**:832-844, 2003.
- STINGL J, RAOUF A, EMERMAN JT, EAVES CJ: Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**:49-59, 2005.
- SZABO CI, KING MC: Inherited breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* **4 Spec No**:1811-1817, 1995.
- TAYLOR-PAPADIMITRIOU J, STAMPFER M, BARTEK J, LEWIS A, BOSHELL M, LANE EB, LEIGH IM: Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium. *J Cell Sci* **94**:403-413, 1989.
- TUMBAR T, FUCHS E: Epithelial skin stem cells. In: Lanza R, Gearhart J, Hogan B (eds) *Essentials of stem cell biology*, 1st edn. Elsevier Academic Press:216-245, 2006.
- VISVADER JE, LINDEMAN GJ: Transcriptional regulators in mammary gland development and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **35**:1034-1051, 2003.
- VON FOURNIER D, WEBER E, HOEFFKEN W, BAUER M, KUBLI F, BARTH V: Growth rate of 147 mammary carcinomas. *Cancer* **45**:2198-2207, 1980.
- WANG CS, GOULET F, LAVOÏE J, DROUIN R, AUGER F, CHAMPETIER S, GERMAIN L, TETU B: Establishment and characterization of a new cell line derived from a human primary breast carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* **120**:58-72, 2000.
- WELLINGS SR, JENSEN HM, MARCUM RG: An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst* **55**:231-273, 1975.
- WENGER SL, SENFT JR, SARGENT LM, BAMEZAI R, BAIRWA N, GRANT SG: Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci Rep* **24**:631-639, 2004.

WOOSTER R, FUTREAL AP, STRATTON MR: Sequencing Analysis of BRAF Mutations in Human Cancers. *Methods Enzymol* **407**:218-224, 2005.

Příloha 1. Souhrn imunohistochemie/imunocytochemie u původního nádoru, EM-G3 *in vitro* a EM-G3 *in vivo*. Přehledné uspořádání nejvýraznějších znaků. Měřitko 20μm.

	Major. populace (původní nádor)	Minor. populace (původní nádor)	Kultura EM-G3	EM-G3 v nu/nu
K5				
K14				
K19				
p63				
ER				
PR				

Příloha 2. Seznam genů vyšetřovaných v rámci GEArray Q Series Human Cancer PathwayFinder Gene Array (HS-006, Superarray).

Position	Unigene	GeneBank	Symbol	Description	Gene Name
1	Hs.525622	NM_005163	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	PKB/PRKBA
2	Hs.369675	NM_001146	ANGPT1	Angiopoietin 1	AGP1/AGPT
3	Hs.553484	NM_001147	ANGPT2	Angiopoietin 2	AGPT2/ANG2
4	Hs.552567	NM_001160	APAF1	Apoptotic peptidase activating factor	CED4
5	Hs.435561	NM_000051	ATM	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	AT1/ATA
6	Hs.370254	NM_004322	BAD	BCL2-antagonist of cell death	BBC2/BCL2L8
7	Hs.159428	NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein	Bax zeta
8	Hs.150749	NM_000633	BCL2	B-cell CLL lymphoma 2	Bcl-2
9	Hs.516966	NM_138578	BCL2L1	BCL2-like 1	BCL-XL/S
10	Hs.514527	NM_001168	BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	API4/EPR-1
11	Hs.194143	NM_007294	BRCA1	Breast cancer 1, early onset	BRCA1/BRCC1
12	Hs.34012	NM_000059	BRCA2	Breast cancer 2, early onset	BRCC2/FACD
13	Hs.369736	NM_001228	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	FLICE/MACT1
14	Hs.329502	NM_001229	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	APAF-3/APAF3
15	Hs.523852	NM_053056	CCND1	Cyclin D1	BCL1/D11S287E
16	Hs.244723	NM_001238	CCNE1	Cyclin E1	CCNE
17	Hs.459142	NM_000610	CD44	CD44 antigen (Indian blood group)	CDW44/FCMR-III
18	Hs.1634	NM_001789	CDC25A	Cell division cycle 25A	CDC25A2
19	Hs.461086	NM_004360	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	Arc-1/CDHE
20	Hs.95577	NM_000075	CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	CMM3/PSK-J3
21	Hs.370771	NM_000389	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CAP20/CDKN1
22	Hs.238990	NM_004064	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	CDKN4/KIP1
23	Hs.512599	NM_000077	CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	ARF/CDK4I
24	Hs.390736	NM_003879	CHL1	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CAS11/CASP8API
25	Hs.517356	NM_030582	COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1	KNO
26	Hs.476018	NM_001904	CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, SSKDa	CTNNB
27	Hs.419815	NM_001963	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)	URG
28	Hs.488293	NM_005228	EGFR	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	FRBB/ERBB1
29	Hs.446352	NM_004448	ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2.	HER-2/HER-2
30	Hs.517296	NM_005239	ETS2	V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2	e-Ets2
31	Hs.284244	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	BFGF/FGFB
32	Hs.533683	NM_000141	FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2	BEK/BFR-1
33	Hs.507621	NM_002019	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	FLT/VEGFR1
34	Hs.25647	NM_005252	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	c-fos
35	Hs.396530	NM_000601	HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	F-TCF/HGF

36	Hs.515126	NM_000201	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	BB2/CD54
37	Hs.37026	NM_024013	IFNA1	Interferon, alpha 1	IFL/IFN
38	Hs.93177	NM_002176	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	IFB/IFF
39	Hs.160562	NM_000618	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGFI
40	Hs.624	NM_000584	IL8	Interleukin 8	3-10C/AMCF-1
41	Hs.519304	NM_181501	ITGA1	Integrin, alpha 1	CD49a/VLA1
42	Hs.482077	NM_002203	ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	BR/CD49B
43	Hs.265829	NM_002204	ITGA3	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	CD49C/GAP-B3
44	Hs.553495	NM_000885	ITGA4	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	CD49D/IA4
45	Hs.505654	NM_002205	ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	CD49e/FNRA
46	Hs.133397	NM_000210	ITGA6	Integrin, alpha 6	CD49f
47	Hs.436873	NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	CD51/MSK8
48	Hs.429052	NM_002211	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	CD29/FNRB
49	Hs.218040	NM_000212	ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	CD61/GP3A
50	Hs.13155	NM_002213	ITGB5	Integrin, beta 5	Integrin b5
51	Hs.525704	NM_002228	JUN	V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	API
52	Hs.527778	NM_002231	CD82	CD82 antigen	4F9/C33
53	Hs.95008	NM_002256	KISS1	KiSS-1 metastasis-suppressor	KiSS-1
54	Hs.145442	NM_002755	MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAPKK1/MEK1
55	Hs.485233	NM_001315	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	CSBP1/CSBP2
56	Hs.567303	NM_002392	MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein	hdm2
57	Hs.83169	NM_002421	MMP1	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	CLG/CLGN
58	Hs.513617	NM_004530	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	CLG4/CLG4A
59	Hs.297413	NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	CLG4B/GELB
60	Hs.525629	NM_004689	MTA1	Metastasis associated 1	Mta-1
61	Hs.549053	NM_000247	MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A	truncated
62	Hs.202453	NM_002467	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	c-Myc
63	Hs.503878	NM_000615	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	CD56/MSK39
64	Hs.431926	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	DKFZp686C01211/EBP-1
65	Hs.81328	NM_020529	NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	IKBA/MAI-3
66	Hs.9235	NM_005009	NMF4	Non-metastatic cells 4, protein expressed in	NM23H4/nm23-H4
67	Hs.376032	NM_002607	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGF-A/PDGF1
68	Hs.1976	NM_002608	PDGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)	PDGF2/SIS
69	Hs.239818	NM_006219	PIK3CB	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	DKFZp779K1237/PI3K

70	Hs.132225	NM_181504	PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)	GRB1/p85-ALPHA
71	Hs.77274	NM_002658	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	ATF/UPA
72	Hs.466871	NM_002659	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	CD87/UPAR
73	Hs.491682	NM_006904	PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	DNAPK/DNPK1
74	Hs.291363	NM_007194	CHK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	CDS1/CHK2
75	Hs.159130	NM_002880	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	CRAF/Raf-1
76	Hs.582303	NM_002890	RASA1	RAS p21 protein activator	CMAVM/DKFZp434N071
77	Hs.408528	NM_000321	RB1	Retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	OSRC/RB
78	Hs.81256	NM_002961	S100A4	S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calyculin, metastasin, murine placental homolog)	18A2/42A
79	Hs.514913	NM_002575	SERPINB2	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	HsT1201/PA1
80	Hs.55279	NM_002639	SERPINB5	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	P15/maspin
81	Hs.414795	NM_000602	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	PA1/PAI-1
82	Hs.195659	NM_005417	SRC	V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)	ASV/SRC1
83	Hs.89640	NM_000459	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal)	CD202B/TIE-2
84	Hs.492203	NM_003219	TER1	Telomerase reverse transcriptase	EST2/TCS1
85	Hs.1103	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1 (Canurati-Engelmann disease)	CED/DPD1
86	Hs.494622	NM_004612	TGFBRI	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa)	ACVRLK4/ALK-5
87	Hs.164226	NM_003246	THBS1	Thrombospondin 1	THBS/TSP
88	Hs.371147	NM_003247	THBS2	Thrombospondin 2	TSP2
89	Hs.522632	NM_003254	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	CLG/EPA
90	Hs.241570	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	DIF/TNF-alpha
91	Hs.521456	NM_003842	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	DR5/KILLER
92	Hs.462529	NM_003790	TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	APO-3/DDR3
93	Hs.279594	NM_001065	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	CD120a/FFP
94	Hs.244139	NM_000043	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	ALPS1A/APO-1
95	Hs.408312	NM_000546	TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	LFS1/TRP53
96	Hs.73793	NM_003376	VEGF	Vascular endothelial growth factor	VEGFA/VPE
97	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
98	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
99	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
103-4	Hs.544577	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD
105-8	Hs.356331	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	CYPA/CYP11
109-10	Hs.546356	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	RPL13A
111-2	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin

Příloha 3. Seznam publikovaných prací.

Publikace

BROZOVA M, KLEIBL Z, NETIKOVA I, SEVCIK J, SCHOLZOVA E, BREZINOVA J, CHALOUPKOVA A, VESELY P, DUNDR P, ZADINOVA M, KRASNA L, MATOUSKOVA E: Establishment, growth and in vivo differentiation of a new clonal human cell line, EM-G3, derived from Breast cancer progenitors. *Breast Cancer Res*: in press.

MATOUSKOVA E, KUDLACKOVA I, CHALOUPKOVA A, BROZOVA M, NETIKOVA I, VESELY P: Origin of cells cultured in vitro from human breast carcinomas traced by cyclin D1 and HER2/neu FISH signal numbers. *Anticancer Res* **25(2A)**:1051-7, 2005.

Postery

MATOUSKOVA E, BROZOVA M, SEVCIK J, SCHOLZOVA E, VESELY P, NETIKOVA I, ZADINOVA M, KLEIBL Z: The new cell line, EM-G3, derived from breast cancer progenitors. *EACR19*:Budapešť 1.-4.7.2006.

BROŽOVÁ M, KLEIBL Z, ZADINOVÁ M, NETÍKOVÁ I, SCHOLZOVÁ E, MATOUŠKOVÁ E: EM-G3 linie progenitorových buněk: nový experimentální model studia vývoje lidského mamárního karcinomu. *Dny diagnostické prediktivní a experimentální onkologie*:Olomouc 9.-10.12.2005.