

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Biologie
Imunologie



Bc. Anna-Marie Šůchová

Vliv signalizace související se zánětem na invazivitu nádorových buněk

The role of inflammatory signaling in cancer cell invasiveness

Diplomová práce

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D

Praha, 2020

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Janu Brábkovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, cenné rady a odborný dohled. Děkuji také členům Laboratoře invazivity nádorových buněk – jmenovitě Mgr. Anetě Gandalovičové za veškeré konzultace a pomoc se zvládnutím metodologie.

Prohlášení:

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

V Praze, 2020

Podpis:

ABSTRAKT

U devadesáti procent onkologických pacientů jsou příčinou úmrtí sekundární nádorová ložiska. Metastatické nádorové buňky mají několik strategií, které pro invazi do okolních tkání využívají – mohou migrovat společně a nebo individuálně. Při migrování jednotlivých buněk zaujímají nádorové buňky dvě rozdílné morfologie. Jsou buď protáhlé a migrují v proteolyticky aktivním mezenchymálním módu a nebo jsou zakulacené a migrují v améboidním módu. Mezi těmito módy mohou metastatické nádorové buňky přepínat, což komplikuje vývoj účinných migrastatik. V této práci jsme se zaměřili na vliv zánětlivé signalizace na migraci metastatických buněk. Pracovali jsme s buněčnými liniemi maligního lidského melanomu, které mají smíšenou morfologii a při migraci vykazují améboidní i mezenchymální fenotyp. Při stimulaci melanomových lidských buněk interferonem beta dochází k mezenchymálně-améboidnímu přechodu. Interferon beta zřejmě indukuje améboidní morfologii díky udržování vysoké hladiny komplexu ISGF3, který je složený z heterodimeru STAT 1 a STAT 2 a proteinu IRF9. Pokud dojde k zablokování signální dráhy Jak/Stat pomocí negativních regulátorů, tak dojde k návratu melanomových lidských buněk k mezenchymální morfologii.

Klíčová slova – invazivita, mezenchymálně-ameboidní přechod, interferony, zánět, migrace, metastáze

ABSTRACT

Metastasizing is responsible for 90% of death in cancer patients. Metastatic tumour cells have several strategies that they use to invade surrounding tissues - they can migrate together or individually. When individual cells migrate, tumour cells adopt two different morphologies. They are either elongated and migrate using the proteolytically active mesenchymal mode, or they are rounded and migrate in the amoeboid mode. Metastatic tumour cells can switch between these modes, which complicates the development of effective migrastatics. In this work, we focused on the effect of inflammatory signalling on metastatic cell migration. We worked with cell lines of malignant human melanoma, which adopt a mixed morphology and show both amoeboid and mesenchymal phenotype during migration. Upon stimulation of melanoma human cells with interferon beta, a mesenchymal to amoeboid transition occurs. Interferon beta appears to induce amoeboid morphology by maintaining high levels of the ISGF3 complex, which is composed of the heterodimer of STAT 1 and STAT 2 proteins and the IRF9 protein. Upon blocking of Jak / Stat signalling pathway by negative regulators, human melanoma cells return to mesenchymal morphology.

Key words – invasiveness, mesenchymal-amoeboid transition, interferons, inflammation, migration, metastases

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMT – améboidně mezenchymální přechod (ameboid-mesenchymal transition)

DOX – doxycyklin

EMT – epiteliálně mezenchymální přechod (epithelial-mesenchymal transition)

GAS – interferonem gama aktivovaný element (z anglického IFN- γ activated site element)

IARC – Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research of Cancer)

IFN- α R1 – IFN- α/β receptor 1

IFN- α R2 – IFN- α/β receptoru 2

IFN β – interferon beta

IRF9 – interferony regulující faktor 9 (interferon regulatory factor 9)

ISG – interferonem stimulované geny

ISGF3 – interferonem stimulovaný genový faktor 3

ISRE – interferonem stimulovaný responzivní element

Jak – Janus kináza

MAPK – mitogenem aktivovaná proteinkináza

MAT – mesenchymálně améboidní přechod (mesenchymal-ameboid transition)

MLC2 – myozinový lehký řetězec 2

MLCK – kináza myozinového lehkého řetězce

MLCP – fosfatáza myozinového lehkého řetězce

NF- κ B – nukleární faktor kappa B

PKC – proteinová kináza C

p-STAT1 – fosforylovaný přenašeč signálu a aktivátor transkripce (phosphorylated signal transducer and activator of transcription 1)

p-STAT2 – fosforylovaný přenašeč signálu a aktivátor transkripce 2 (phosphorylated signal transducer and activator of transcription 2)

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce

RFP – červený fluorescenční protein (red fluorescent protein)

ROCK – Rho asociovaná protein kináza

RT – pokojová teplota (room temperature)

shRNA – malá vlásenková ribonukleová kyselina (small hairpin ribonucleic acid)

siRNA – malá interferující ribonukleová kyselina (small interfering ribonucleic acid)

SOCS – proteiny potlačující cytokinovou signalizaci

STAT1 – přenašeč signálu a aktivátor transkripce 1 (signal transducer and activator of transcription 1)

STAT2 – přenašeč signálu a aktivátor transkripce 2 (signal transducer and activator of transcription 2)

TYK – tyrozin kináza

ZIPK – zipem-interagující protein kináza

OBSAH

Abstrakt	iii
Abstract	iv
Seznam použitých zkratek	v
1. Úvod	1
2. Cíle práce	2
3. Literární rešerše	3
3.1. Maligní melanom	3
3.2. Invazivita nádorových buněk a tvorba metastáz	5
3.2.1. Způsoby invazivity nádorových buněk	7
3.3. Interferony	10
3.3.1. Interferonová signalizace	12
4. Materiál a chemikálie	15
4.1. Buněčné linie	15
4.2. Roztoky	15
4.3. Enzymy	17
4.4. Vektory	18
4.5. Vybavení	18
5. Metody	18
5.1. Kultivace buněk	18
5.1.1. Pasážování buněk	19
5.1.2. Buněčné stabiláty	19
5.1.3. Rozmrazování buněčných stabilátů	21
5.2. Analýza morfolgie a chování buněk	21
5.2.1. Příprava kolagenů	21
5.2.2. Vyhodnocování morfolgie buněk ve 3D prostředí v kolagenu ..	23
5.2.3. Příprava sféroidů	23
5.2.4. Kvantitativní analýza invazivity ze sféroidů	25
5.3. Biochemické a molekulárně biologické metody	25
5.3.1. Příprava proteinových lyzátů	25
5.3.2. SDS elektroforéza	27
5.3.3. Western blot	28
5.3.4. Agarosová elektroforéza	29
5.4. Molekulární metody	30

5.4.1.	Anylace.....	30
5.4.2.	Ligace	31
5.4.3.	Transformace bakterií heat-shockem	31
5.4.4.	Zaočkování bakterií.....	31
5.4.5.	Extrakce DNA	32
5.4.6.	Restrikční štěpení	34
5.4.7.	Přečišťování DNA pomocí AMPure XP beads	35
5.4.8.	Příprava stabilních linií	35
5.4.9.	qPCR	39
5.5.	Statistická analýza	39
6.	Výsledky	41
6.1.	Vliv IFN β na morfologii buněk.....	43
6.2.	Ověřování aktivace signalizace přes IFN β v améboidních melanomových buňkách na úrovni proteinů a mRNA	45
6.3.	Ověření důležitosti signalizace přes IFN β pro morfologii melanomových buněk.....	49
6.4.	Ověření důležitosti signalizace přes IFN β pro invazivitu melanomových buněk	55
7.	Diskuze.....	59
8.	Závěr	63
9.	Přílohy	64
10.	Použitá literatura	69

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou podle Světové zdravotnické organizace celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí. V roce 2018 se nádorová onemocnění vyvinula podle odhadů u více než 18 milionů lidí, zhruba 9,6 milionů lidí nemoci podlehl (Ferlay, Colombet et al. 2019).

U devadesáti procent onkologických pacientů s pevnými nádory jsou příčinou úmrtí sekundární nádorová ložiska (Sleeman and Steeg 2010, Chaffer and Weinberg 2011). Právě metastazování nádorových buněk by se proto mělo stát jedním z hlavních cílů onkologické léčby. Pro vyvinutí co nejučinnějších léků je ale nezbytné znát všechny faktory, které migraci nádorových buněk ovlivňují.

Metastatické nádorové buňky využívají několik strategií pro migraci a zakládání sekundárních nádorových ložisek. Nádorové buňky mají dva hlavní způsoby migrace z primárního nádoru. Pokud jsou zachovány mezibuněčné spoje mezi migrující skupinou buněk jde o kolektivní migraci (Nabeshima, Inoue et al. 1999), pokud naopak migrující buňky vzájemné mezibuněčné spoje neudržují, jde o individuální migraci. Typů individuální migrace je celé spektrum. Toto spektrum různých fenotypů a mechanismů ohraničují dva hlavní fenotypy – protažené mezenchymální buňky a „kulaté“ améboidní buňky. Buňky ale mohou mezi migračními módy přecházet a zvyšovat tak šance nádoru na založení sekundárního nádorového ložiska (shrnutí v (Friedl, Locker et al. 2012). Je proto důležité znát mechanismy, které se na přecházení mezi jednotlivými migračními módy podílejí.

Jednou z příčin vzniku i jednou z charakteristik nádorového mikroprostředí je zánětlivá signalizace (shrnutí (Greten and Grivennikov 2019). Řada recentních prací diskutuje roli zánětlivé signalizace a imunitních buněk i při metastazování. Důležitou roli by mohla hrát signalizace spuštěná interferony, jako je například Jak/Stat signalizace, která ovlivňuje mezenchymálně-améboidní přechod. Jak přesně jednotlivé signalizační dráhy a buněčné procesy podporují nádorové buňky v migraci a v zakládání sekundárních nádorových ložisek, ale zatím není jasné. Detailní znalost nádorového mikroprostředí a vlivu nejen zánětlivé signalizace na migraci buněk je zásadní pro pochopení vývoje nádorových onemocnění i pro vývoj cílených účinných látek, které doplní nebo nahradí tradiční léčebné postupy pro onkologické pacienty.

2. CÍLE PRÁCE

Tato diplomová práce si kladla dva hlavní cíle. Oba dva vycházely z předběžných a dosud nepublikovaných výsledků naší laboratoře (Laboratoř invazivity nádorových buněk). Moji kolegové pozorovali, že u melanomových buněk dochází k posunu od mesenchymální k améboidní morfologii, pokud jsou vystaveny působení interferonu beta (dále IFN β) (**Fig. 1**). Prvním cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda je tento efekt specifický pro IFN β a nebo platí pro interferony prvního typu obecně.

Pokud by efekt skutečně byl specifický pro IFN β , druhým cílem bylo zjistit, jaké signální mechanismy jsou za mezenchymálně-améboidní přechod (dále MAT, z anglického mesenchymal-ameboid transition) vyvolaný IFN β zodpovědné.

Oba cíle se dají rozložit do několika menších dílčích cílů:

1. Ověřit, že je efekt na morfologii melanomových buněk specifický pro IFN β
 - a. Porovnat vlivy vybraných interferonů prvního a druhého typu na několika buněčných liniích odvozených od melanomů a to jak ve 2D tak ve 3D prostředí
 - b. Ověřit efekt IFN β pomocí inhibitorů a negativních regulátorů signalizace zprostředkované IFN β
2. Zjistit, které signální mechanismy se na vlivu IFN β na morfologii melanomových buněk podílí
 - a. Pomocí literatury vytipovat vhodné cíle v rámci signalizace přes IFN β , na které je vhodné se zaměřit
 - b. Ověřit aktivaci jednotlivých elementů signalizace přes IFN β pomocí western blotů a qPCR
 - c. Ověřit důležitost jednotlivých elementů signalizace přes IFN β pro morfologii a invazivitu melanomových buněk vyřazením vybraných proteinů, které se signalizace účastní

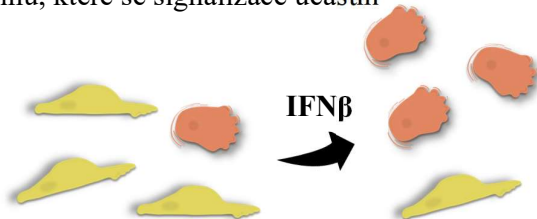


Fig. 1 – Schematické znázornění pozorovaného efektu IFN β na morfologii melanomových

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1. Maligní melanom

Maligní melanom je nádorové onemocnění, k jehož vývoji dochází po nekontrolované proliferaci melanocytů (Lerner and McGuire 1964, Abdel-Malek, Swope et al. 1995, Abdel-Malek, Suzuki et al. 1999, Tsatmali, Ancans et al. 2002). Nejčastěji se vyvíjí v kůži ale může vznikat i na dalších mukózních površích a orgánech (například v oku) a nebo v centrální nervové soustavě. Maligní melanom představuje méně než 5 % zhoubných nádorů kůže, ale má na svědomí většinu úmrtí spojenou s nádorovými onemocněními kůže (Rigel and Carucci 2000, Markovic, Erickson et al. 2007, Linos, Swetter et al. 2009).

Melanom v kůži vzniká ve většině případů de novo (zhruba u 70 % případů), v menší míře vzniká v oblasti již existujícího znaménka – ať už vrozeného nebo vyvinutého během života (Longo, Rito et al. 2011). K vývoji melanomu přispívá několik rizikových faktorů – světlá barva kůže, náchylnost ke spálení kůže, velké množství mateřských znamének, nepravidelná a neohraničená znaménka, časté vystavování se ultrafialovému záření (Qureshi, Laden et al. 2008, Wu, Han et al. 2014, Moan, Grigalavicius et al. 2015, Li, Cho et al. 2016, Seebode, Lehmann et al. 2016, Martens, Seebode et al. 2018), melanom a další formy nádorového onemocnění kůže v rodinné anamnéze nebo imunodeficiencie (Gandini, Sera et al. 2005, Gandini, Sera et al. 2005, Gandini, Sera et al. 2005).

Melanom kůže se vyskytuje napříč všemi věkovými skupinami a etniky – častější je ale u jedinců se světlou barvou kůže (Chao, Patterson et al. 2017, Padovese, Franco et al. 2018). Jejich melanocyty mají méně melaninu a poskytují jim tak menší ochranu proti slunečnímu záření a hlavně jeho UV složce (Everett, Yeargers et al. 1966, Brenner and Hearing 2008). Oproti lidem s tmavší barvou kůže proniká u lidí se světlou kůží UVB záření do epidermis o zhruba 50 procent více a UVA záření o 33 nebo 23 procent více (v závislosti na vlnové délce světelného zdroje) (Everett, Yeargers et al. 1966, Brenner and Hearing 2008). Melanin totiž omezuje pronikání UVA i UVB paprsků, které vedou k apoptóze a nádorovému bujení kožních buněk. Výskyt melanomu v kůži je hodně závislý nejen na hladině melaninu v melanocytech ale i na geografické poloze (Lancaster 1956). Pronikání UV záření ovlivňuje několik faktorů například složení atmosféry, nadmořská výška, zeměpisná šířka, roční období

nebo oblačnost. Zároveň překvapivě platí, že čím více se blížíme k rovníku tím více stoupá mortalita u melanomu – takzvaný jev gradientu zeměpisné šířky byl popsán už v roce 1956 (Lancaster 1956) a potvrdily ho i další práce (Lancaster and Nelson 1957, Elwood, Lee et al. 1974, Magnus 1977, Crombie 1979, Moan and Dahlback 1992, Lee and Scotto 1993, Bulliard, Cox et al. 1994, Eide and Weinstock 2005). Melanom v kůži je častější u mužů, což může být dáno vyšší hladinou androgenu (Zhang, Qureshi et al. 2012, Li, Qureshi et al. 2013, Li, Cho et al. 2016).

Melanom byl dřív považovaný za vzácnou formu nádorového onemocnění, nicméně jeho incidence v posledních letech stoupá (Rigel and Carucci 2000, Markovic, Erickson et al. 2007, Kosary, Altekruse et al. 2014, Brenner, Ruan et al. 2019, Thrift and Gudenkauf 2019, Wu, Wang et al. 2019). Podle odhadů Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (dále jako IARC z anglického International Agency for Research of Cancer) bude incidence dál narůstat (viz Tab. 1).

Tabulka 1 – Odhadovaný vývoj incidence a mortality melanomu kůže u obou pohlaví podle IARC (data z Globocan 2018)

	<i>Incidence</i>		<i>Mortalita</i>	
	2018	2040	2018	2040
<i>Světová populace</i>	287 723	466 914	60 712	105 904
<i>Evropská populace</i>	144 209	164 452	27 147	34 527
<i>Česká populace</i>	2 451	2 891	397	528

Nicméně zvyšující se incidence může být dána nejen nárůstem počtu nemocných ale i lepšími screeningovými metodami (Dennis 1999, Linos, Swetter et al. 2009).

Včasná diagnóza a odstranění melanomu zvyšuje šance na přežití pacienta (Bataille 2009). Pokud je ale nádor v pokročilém stádiu, tak jeho chirurgické odstranění nestačí a léčba se komplikuje (Califano and Nance 2009, Filippi, Fava et al. 2016). Melanomové buňky navíc často migrují mimo primární nádor a tvoří metastázy v dalších orgánech. S metastázemi se výrazně zhoršuje prognóza a zkracuje se doba dožití (medián 8 až 14 měsíců) a to i v případě cílené léčby (Filippi, Fava et al. 2016).

3.2. Invazivita nádorových buněk a tvorba metastáz

Tvorba metastáz je komplexní proces, který je závislý na schopnosti nádorových buněk migrovat z místa primárního nádoru a invadovat do okolních tkání organismu. Vznik metastáz popisuje takzvaná metastatická kaskáda (**shrnutí Geiger a Peeper** (Geiger and Peeper 2009)).

Obecně platí, že se nádorové buňky musí nejprve oddělit z místa primárního nádoru, poté migrovat skrz mezibuněčnou hmotu, která daný nádor obklopuje. Druhým krokem je intravazace do krevního nebo lymfatického řečiště a následné uchycení migrujících buněk v jiné části organismu. Obvykle pak následuje třetí krok – extravazace do tkáně. Tam mohou buňky zůstat dormantní řadu let (Hüsemann, Geigl et al. 2008), nebo mohou ihned proliferovat a založit sekundární nádorové ložisko (metastázi). Právě sekundární ložiska jsou příčinou úmrtí až u 90 procent onkologických pacientů s pevnými nádory (Sleeman and Steeg 2010, Chaffer and Weinberg 2011).

Úspěšné založení sekundárního ložiska ale ovlivňuje řada faktorů. Roli hrají migrující buňky, předpokládá se, že jen některé buňky primárního nádoru dokážou založit metastázi a vytvořit nový nádor (**shrnutí Visvader a Lindeman** (Visvader and Lindeman 2008)). Takové buňky bývají částí vědců označované jako nádorové kmenové buňky. Takzvaná „cancer stem cell“ teorie tvrdí, že v nádoru existuje jen určitá subpopulace buněk schopných nádor obnovovat a udržovat jeho heterogenitu (Lapidot, Sirard et al. 1994, Al-Hajj, Wicha et al. 2003, Clarke, Dick et al. 2006, Barker, Ridgway et al. 2009, Malanchi, Santamaria-Martínez et al. 2011). Vliv má také nádorové mikroprostředí (**shrnutí Brábek** (Brábek, Mierke et al. 2010)). Nádor produkuje molekuly (například exosomální microRNA, cytokiny, chemokiny a další) (Oskarsson, Acharyya et al. 2011, Qian, Li et al. 2011, Wang, Jiang et al. 2012, Bonapace, Coissieux et al. 2014, Liu, Gu et al. 2016) i buněčné komponenty (extracelulární vezikuly) (Becker, Thakur et al. 2016), které ovlivňují nejen nádor samotný ale i jeho okolí a zároveň pomáhají vytvářet mikroprostředí vhodné pro založení nového ložiska. Dalším důležitým faktorem je proudění krve v krevním řečišti – to podle mechanické hypotézy určuje cestu migrujících buněk a pomáhá jim tak dopravit se na vhodné místo pro založení metastáze (**shrnutí Follain a kolegové** (Follain, Herrmann et al. 2019)). Vhodné mikroprostředí pro založení sekundárního ložiska je dalším důležitým faktorem. Podle takzvané „seed and soil“ teorie migrují

nádorové buňky přednostně do tkání, ve kterých mají na založené nového ložiska vhodné podmínky – bez nich by se totiž sekundární nádor nevytvořil, stejně jako by bez vhodné půdy nevyrostla ze zasazeného semínka rostlina (Paget 1889). Teorií a hypotéz, které se snaží vysvětlit mechanismy tvorby metastáz je celá řada – většina z nich se vzájemně nevyklučuje nýbrž naopak doplňuje a navzájem obohacuje (Liu, Zhang et al. 2017).

Ke tvorbě metastáz je nutné, aby měly nádorové buňky migrační fenotyp. Buňky se proto musí polarizovat a získat předozadní orientaci, oddělit se od masy nádoru (omezením mezibuněčného kontaktu) a aktivovat migrační signální mechanismy (Friedl and Wolf 2009, Nelson 2009, Macara and McCaffrey 2013). Nádorové buňky podstupují změnu morfologie, která se nejvíce blíží epiteliálně mezenchymálnímu přechodu (dále jako EMT z anglického epithelial-mesenchymal transition) – právě tento proces je považován za první krok k migraci buněk a následnému založení metastáze (shrnutí v (Thiery, Acloque et al. 2009). Při EMT se polarizovaná epiteliální buňka transdiferencuje a získává mezenchymální fenotyp – ubývá mezibuněčných spojů a buňka ztrácí apikobazální polaritu a naopak získává předozadní orientaci (**shrnutí Halaoui a McCaffrey (Halaoui and McCaffrey 2015))**). Získaný mezenchymální fenotyp je doprovázen zvýšenou schopností migrace, invazivity, zvýšenou produkcí složek mezibuněčné hmoty a odolností vůči apoptóze (Kopfstein and Christofori 2006, Kalluri and Weinberg 2009). Zároveň dochází ke změnám v transkripčním programu buněk – aktivují se pro-mezenchymální faktory (například Snail, Twist, ZEB), které vedou ke snížení exprese epiteliálních genů a zvýšení exprese pro-migratorních genů (například genů pro N-cadherin, vimentin, fibronektin, β 1 a β 3 integriny a dalších) (**Fig. 2**).

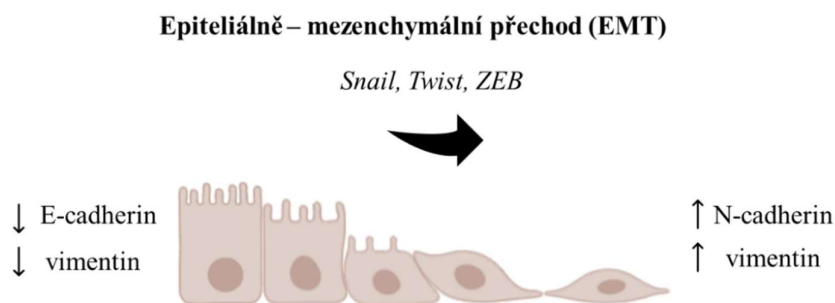


Fig. 2 – Schematické znázornění epiteliálně-mezenchymálního přechodu (vytvořeno pomocí softwaru biorender.com)

K EMT přispívá řada faktorů – třeba změna v regulaci signálních drah Wnt, TGF- β , Hedgehog, Notch, NF κ B nebo působení protoonkogenů (například Ras, PI3K nebo Src) (shrnutí Lamouille a kolektiv (Lamouille, Xu et al. 2014)).

Samotná migrace je závislá na neustálé reorganizaci cytoskeletu buněk za současné remodelace mezibuněčné hmoty – konkrétní mechanismy se liší v závislosti na konkrétním způsobu migrace (viz následující kapitola).

3.2.1. Způsoby invazivity nádorových buněk

Nádorové buňky mají dva hlavní způsoby migrace z primárního nádoru. Pokud jsou zachovány mezibuněčné spoje mezi migrující skupinou buněk jde o kolektivní migraci (Nabeshima, Inoue et al. 1999), pokud naopak migrující buňky vzájemné mezibuněčné spoje neudržují jde o individuální migraci. Kolektivní způsob migrace je často spojen se vstupem nádorových buněk do lymfatického systému – individuální způsob migrace je zase spojen se vstupem do krevního řečiště (Giampieri, Manning et al. 2009). Kolektivní způsob migrace mohou buňky často využívat při metastazování jako první – zřejmě se totiž díky němu oddělují od primárního nádoru (Bronsert, Enderle-Ammour et al. 2014). Buňky ale mohou mezi migračními módy přecházet a zvyšovat tak šance nádoru na založení sekundárního nádorového ložiska (**shrnutí Friedl** (Friedl, Locker et al. 2012)).

3.2.1.1. Kolektivní migrace

Při kolektivní migraci se buňky vzájemně propojené mezibuněčnými spoji (spojení je stabilizováno cadheriny) pohybují kolektivně – závislé jedna na druhé. Celou skupiny buněk obvykle vede jedna nebo několik málo migrujících buněk. Rozlišit můžeme tři různé typy kolektivní migrace nádorových buněk.

Buňky mohou putovat v takzvaném „mnohobuněčném proudu“ (z anglického multicellular streaming) – první vedoucí buňka „razí“ cestu mezibuněčnou hmotou, kterou ostatní buňky následují (Friedl, Locker et al. 2012, Manning, Hooper et al. 2015)). Migrující buňky mohou využívat již existujících struktur v mezibuněčné hmotě (Friedl, Maaser et al. 1997) a nebo se orientovat pomocí chemokinového gradientu (**shrnutí Haeger a kolektiv** (Haeger, Wolf et al. 2015)). Tento druh kolektivní migrace se přitom nejvíce podobá individuální migraci – spojení mezi migrujícími buňkami jsou totiž slabá a každá buňka tak vytváří trakci sama (Friedl, Locker et al. 2012). Pokud buňky migrují ve více buněčném shluku, který je vzájemně

pevně propojen mezibuněčnými spoji (Friedl, Noble et al. 1995, Alexander, Koehl et al. 2008, Friedl, Locker et al. 2012) tak mluvíme opravdu o kolektivní migraci. Shluk buněk vede jedna nebo více buněk, které se podobají mezenchymálním buňkám. Takzvané vedoucí buňky určují směr migrace – na jejich předním konci (tj. ve směru migrace) se vytváří integrinové adheze, které generují napětí vedoucí k aktinomyosinové kontrakci a pohybu buňky (Hegerfeldt, Tusch et al. 2002). Zároveň produkují proteolytické enzymy, které degradují mezibuněčnou hmotu (Nabeshima, Inoue et al. 2000, Wolf, Wu et al. 2007). Jelikož jsou všechny buňky vzájemně propojené, tak za sebou vedoucí buňky „táhnou“ ostatní připojené migrující buňky. Třetí možností je migrování buněk ve shluku zhruba pěti a více buněk, což bylo pozorováno u několika typů nádorových onemocnění (**pro karcinomy shrnul Grigore a kolektiv**(Grigore, Jolly et al. 2016), (Carr, Levy et al. 1986, Prall, Nizze et al. 2005, Bronsert, Enderle-Ammour et al. 2014). Tato práce se ale bude vzhledem k relevanci pro melanomy věnovat převážně individuální migraci nádorových buněk a kolektivní migrace tak nebude dále rozváděna ani diskutována.

3.2.1.2. Individuální migrace

Pokud dojde k rozvolnění mezibuněčných spojení tak nádorové buňky migrují individuálně – typů individuální migrace je celé spektrum. Toto spektrum různých fenotypů a mechanismů ohraničují dva hlavní fenotypy – protažené mezenchymální buňky a „kulaté“ améboidní buňky.

Buňky, které využívají mezenchymální způsob migrace mají protažený vřetenovitý tvar s četnými výběžky na přední straně migrující buňky a často tvoří fokální adheze. Ty jsou tvořeny integriny (hlavně $\beta 1$ a $\beta 3$ integriny) a adaptorovými proteiny (například talin nebo paxillin) (Parsons, Horwitz et al. 2010, Nagano, Hoshino et al. 2012) a pomáhají buňce vytvářet trakční síly, které nádorové buňky využívají k migraci skrz mezibuněčnou hmotu (**shrnutí Huttenlocher a Horwitz** (Tamariz and Grinnell 2002, Huttenlocher and Horwitz 2011)).

Tvorba různých buněčných výběžků (lamelipodií, pseudopodií) a adhezí je regulována pomocí Rho GTPáz – konkrétně proteiny Rac1 (Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008, Yamazaki, Kurisu et al. 2009) a Cdc42 (Nalbant, Hodgson et al. 2004). Interagují s proteinovým komplexem Arp2/3 a ovlivňují tak polymeraci aktinu a jeho větvení v cytoplasmě (Amann and Pollard 2001, Giri, Bajpai et al. 2013). Následnou retrakci buněčného cytoskeletu regulují malé GTPázy a jimi aktivované kinázy ROCK

(Ridley, Schwartz et al. 2003, Friedl and Wolf 2009). Charakteristická jsou i kontraktilní stresová vlákna, která jsou napojená na fokální adheze (Sheetz, Felsenfeld et al. 1998) a remodelace mezibuněčné hmoty v místech, kterými se migrující buňka pohybuje pomocí proteáz (například pomocí membránově vázaných matrixových metaloproteáz) (**shrnutí Linder** (Linder, Wiesner et al. 2011)).

Matrixové metaloproteázy jsou lokalizované v invadopodiích a podosomech, které se typicky nachází na ventrální straně buňky a jsou charakteristické pro mezenchymální typ migrace. Jejich hlavní složkou je aktin, ale obsahují i proteiny, které regulují dynamiku aktinového cytoskeletu například WASP nebo Arp2/3 (Tolde, Rösel et al. 2010) a také proteiny, které se podílejí na tvorbě adhezí jako je paxillin nebo vinculin (Linder 2009).

Remodelace mezibuněčné hmoty a tvorba a zánik fokálních adhezí jsou při mezenchymálním způsobu migrace rychlost regulující procesy. Fokální adheze vznikají a zanikají v časovém rozmezí 10 až 120 minut a tím určují i rychlost migrace – ta je v podmínkách in vitro zhruba 0,1-2 μm za minutu (Friedl 2004).

Druhým hlavním fenotypem jsou „kulaté“ améboidní buňky. Zásadní pro jejich způsob migrace je tvorba takzvaných blebů, které se díky své malé velikosti protáhnou mezibuněčnou hmotou (**Fig. 3**).

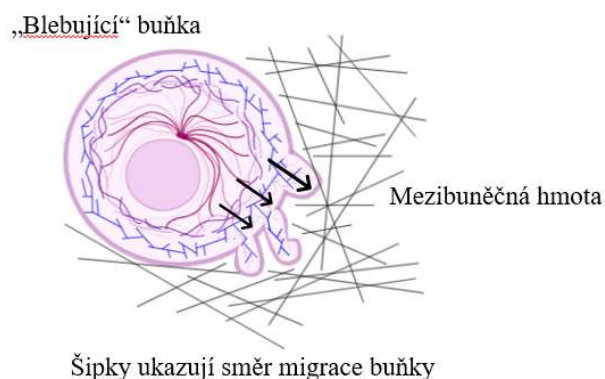


Fig. 3 – Schematické znázornění tvorby blebů u migrující améboidní nádorové buňky (vytvořeno pomocí softwaru biorender.com)

Bleby vznikají v důsledku kombinace několika faktorů – slabého propojení membrány s buněčným kortexem, přítomnosti menších fokálních adhezí s menším zapojením $\beta 1$ integrinu a zvýšeného intracelulárního tlaku (Wolf, Mazo et al. 2003,

Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008, Petrie, Gavara et al. 2012). Dochází tak k dočasnému oddělení buněčné membrány od cytoskeletu a nebo dočasnému oslabení vazeb mezi buněčnou membránou a cytoskeletem, zároveň se vlivem mechanistických sil zvětšuje buněčný bleb a dochází k rychlému vzniku aktinomyosinových filament za současné retrakce „neblebující“ části buňky (**shrnutí Charras a Paluch** (Charras and Paluch 2008). Postupně dochází také k deformaci jádra a celá buňka se posouvá ve směru vznikajících blebů na přední části buňky. Polarita buňky a tím i směr migrace je určován mimo jiné přítomností ezrinu v zadní části buňky (Lorentzen, Bamber et al. 2011). Důležité jsou také proteiny moesin a radixin, které spolu s ezrinem v buňce fungují jako proteiny spojující aktinový kortex a plasmatickou membránu.

Pro améboidní způsob migrace je důležitá vysoká úroveň aktinomyosinové kontraktility, která je regulována přes ROCK kinázu a fosforylaci Myosinu II. ROCK reguluje fosforylaci myosinového lehkého řetězce 2 (MLC2) třemi způsoby – jeho přímou fosforylací (Amano, Ito et al. 1996) a nepřímo skrz snížení aktivity fosfatázy lehkého myozinového řetězce (MLCP) (Ito, Nakano et al. 2004) a interakcí se zipem-interagující protein kinázou (ZIPK), která aktivuje kinázu lehkého myozinového řetězce (MLCK) (Hagerty, Weitzel et al. 2007).

Tento způsob migrace je rychlejší než mezenchymální mód protože tvorba a remodelace fokálních adhezí nehraje při pohybu buněk tak velkou roli. Buňky mohou v podmínkách in vitro migrovat rychlostí až 25 μm za minutu. U nádorových buněk byla pozorována v podmínkách in vivo rychlost 1-15 μm za minutu (Pinner and Sahai 2008) a u lymfocytů byla pozorována maximální rychlost 25 μm za minutu (Friedl, Noble et al. 1994).

Nádorové buňky mohou při individuální migraci využívat celou další řadu různých přechodných fenotypů, které se nachází na spektru mezi mezenchymálními a améboidními buňkami. Jejich přehled ale nebude v této práci dále diskutován.

3.3. Interferony

Interferony patří mezi cytokiny druhé třídy, kam patří například také interleukin-10, interleukin-19, interleukin-20 a další cytokiny. Cytokiny druhé třídy spojuje evolučně konzervovaný strukturní prvek složený ze šesti α -helixů. Většina z nich má společnou také strukturu receptoru, který je složen ze dvou extracelulárních částí odvozených od fibronektinu třetího typu – tyto dvě extracelulární části

dohromady tvoří vazebné místo pro daný cytokin (**shrnutí Renault** (Renauld 2003)). Interferony se dělí do tří skupin – interferony prvního typu, druhého typu a třetího typu.

Interferony prvního typu byly objeveny v roce 1957 (Isaacs and Lindenmann 1957) díky svým protivirovým vlastnostem – svým působením přímo inhibují replikaci virů. Podílejí se i na vytváření dlouhodobé imunity proti virovým nákazám. Mají vliv na imunitní odpověď i při naze neviróvým patogenem, jsou negativními regulátory proliferace a mají imunomodulační účinky (**shrnutí Malmgaard** (Malmgaard 2004)). U lidí je 18 různých interferonů I. prvního typu. Velkou skupinu tvoří IFN- α , který má celkem 13 podtypů – IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 6, IFN- α 7, IFN- α 8, IFN- α 10, IFN- α 13, IFN- α 14, IFN- α 16, IFN- α 17 a IFN- α 21. Dále jsou u lidí IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ a IFN- ω . Geny, které je kódují jsou v lidském genomu na 9. chromosomu.

Naopak zástupce interferonů druhé třídy je u lidí jen jeden – interferon gamma (dále jako IFN γ). Kódován je v lidském genomu na 12. chromosomu. Je produkovaný NK buňkami nebo aktivovanými T buňkami. IFN γ má protivirové účinky a zesiluje efekt působení interferonů prvního typu. Podílí se na směřování lymfocytů do místa vznikajícího zánětu, stimuluje makrofágy a podílí se taky na regulaci imunitní odpovědi, založené na Th2 lymfocytech.

Jako poslední byly objeveny interferony třetího typu. Nejdříve byly objeveny IFN- λ 1, IFN- λ 2 a IFN- λ 3 (nazývané také IL-29, IL-28a, IL-28b), které na imunitní systém působí velmi podobně jako interferony prvního typu. Později byl objeven i IFN- λ 4 (Prokunina-Olsson, Muchmore et al. 2013). Receptory pro interferony třetího typu se vyskytují jen na některých buňkách, jako jsou například některé druhy lymfocytů, plazmacytoïdní dendritické buňky nebo epiteliální buňky (Sommerreyns, Paul et al. 2008, Yoshio, Kanto et al. 2013).

Tabulka 2 – Shrnutí interferonů, které se vyskytují v lidském organismu
převzato a upraveno podle Pestky (Pestka, Krause et al. 2004)

<i>Typ IFN</i>	<i>Molekula</i>	<i>Lokalizace kódujících genů</i>	<i>Receptorové podjednotky</i>	<i>Signální dráha</i>
I.	IFN- α	9p21+3	IFN- α R1, IFN- α R2	Jak1, Tyk2
	IFN- β	9p21+3		Stat1, Stat2, Stat3
	IFN- ϵ	9p21+3		PI3K
	IFN- κ	9p21+1		Akt
	IFN- ω	9p21+3		MAPK
II.	IFN- γ	12q14+3	IFN- γ R1, IFN- γ R2	Jak1, Jak2, Stat1, Stat3, Stat5, PI3K, Akt, NF κ B, MAPK
III.	IFN- λ 1	19q13+2	IL-28R1, IL-10R2	Stat5
	IFN- λ 2	19q13+2		Jak1, Tyk2
	IFN- λ 3	19q13+2		Stat1, Stat2, Stat3
	IFN- λ 4	19q13+2		

3.3.1. Interferonová signalizace

Signální kaskáda interferonů prvního typu byla popsána před více než 25 lety. Interferony prvního typu se vážou na transmembránový receptor, který je složen ze dvou podjednotek – IFN- α/β receptoru 1 a IFN- α/β receptoru 2 (dále jako IFN- α R1 a IFN- α R2) (Pestka, Krause et al. 2004, Plataniias 2005). Interferon prvního typu se nejprve naváže na podjednotku IFN- α R2, ke které má větší afinitu. Poté se naváže i na druhou podjednotku receptoru. Navázání interferonu na obě podjednotky receptoru IFNAR aktivuje tyrosin kinázu Janus kináza 1 (dále JAK1) a tyrosin kinázu 2 (dále jako TYK2), což vede k fosforylaci cytoplasmatických transkripčních faktorů přenašeč signálu a aktivátor transkripce 1 (dále jako STAT1 z anglického signal transducer and activator of transcription 1) a přenašeč signálu a aktivátor transkripce 2 (dále jako STAT2 z anglického signal transducer and activator of transcription 2). STAT1 a STAT2 fosforylované na tyrosinu (poloha 701 u STAT1 a poloha 690 u STAT2) vytvářejí heterodimer a přemísťují se do jádra buňky, kde se po navázání interferonu regulujícího faktoru 9 (dále jako IRF9) vytvoří komplex nazvaný interferonem stimulovaný genový faktor 3 (dále jako ISGF3). ISGF3 se váže na regulační sekvenci

zvanou interferonem stimulovaný responzivní element (dále jako ISRE) (**Fig. 3**) (**shrnutí Raftery** (Raftery and Stevenson 2017). Komplex ISGF3 tak přímo aktivuje transkripci interferonem stimulovaných genů (dále jako ISG) (Schoggins, Wilson et al. 2011, Rusinova, Forster et al. 2013).

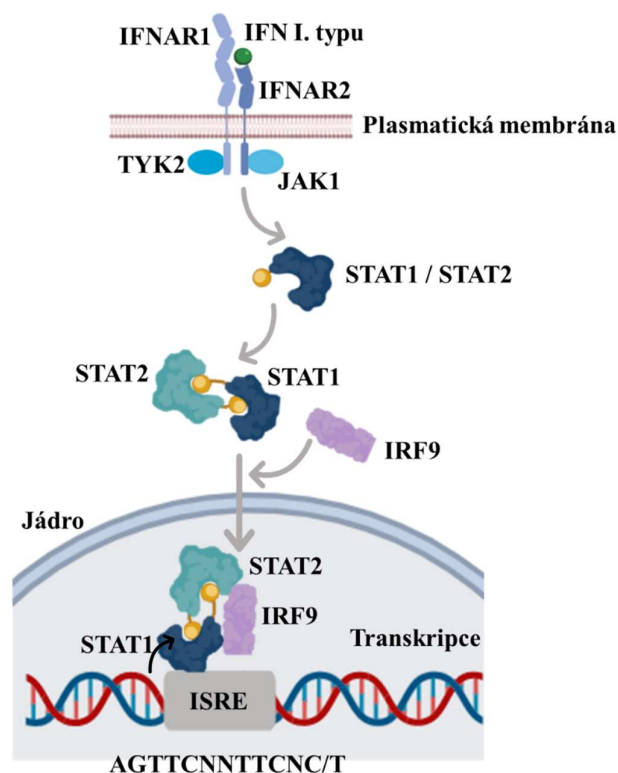


Fig. 4 – Schematické znázornění signalizace interferonu I. typu (vytvořeno pomocí softwaru biorender.com)

Interferony prvního typu mohou tvořit i další heterodimery nebo homodimery z různých typů proteinu STAT. Popsány byly také dimery: STAT1–STAT1, STAT3–STAT3, STAT4–STAT4, STAT5–STAT5, STAT6–STAT6, STAT1–STAT3, STAT1–STAT4, STAT1–STAT5, STAT2–STAT3 a STAT5–STAT6 (Platanias and Fish 1999, Parmar and Platanias 2003). Tyto komplexy se přemísťují do jádra, kde se vážou na část promotoru ISGs zvanou interferonem gama aktivovaný element (dále GAS z anglického IFN- γ activated site element) (Fasler-Kan, Pansky et al. 1998, Matikainen, Sareneva et al. 1999), což opět vede k transkripci ISGs.

Pro vytvoření komplexů STAT proteinů i jejich následnou translokaci do jádra je zásadní fosforylace tyrosinových zbytků pomocí JAK1 a TYK2. Pro maximální

aktivaci transkripce pomocí proteinů STAT1 a STAT3 je ale nutná fosforylace serinu (Ser727) – to platí pro signalizaci interferonů prvního i druhého typu (Wen, Zhong et al. 1995, Wen and Darnell 1997).

Signální dráha interferonů prvního typu se dá ovlivnit na několika úrovních – signalizace se dá zesílit, zeslabit i zcela zablokovat. K zesílení signalizace vede indukce exprese proteinů STAT1 a IRF9, zesílení fosforylace proteinů STAT pomocí tyrosin kináz SYK a PYK2. K zesílení transkripční aktivity proteinů STAT1 a STAT3 lze využít i již zmíněnou fosforylaci serinu (Ser727) v cytoplazmě pomocí serinových kináz z rodiny proteinových kináz C (dále jako PKC) – PKC- δ (Uddin, Sassano et al. 2002, Deb, Sassano et al. 2003, Kristof, Marks-Konczalik et al. 2003), PKC- ϵ , pomocí mitogenem aktivovaných proteinkináz (dále jako MAPK) (Choudhury 2004) a proteinkinázy II závislé na vápníku a kalmodulinu (Nair, DaFonseca et al. 2002).

Mechanismy vedoucí k potlačení nebo zeslabení odpovědi stimulované interferony prvního typu zahrnují snížení exprese buněčného receptoru IFNAR nebo jeho internalizace – toho využívají například některé viry nebo nádorové buňky. Dalším mechanismem je zvýšení exprese proteinů, které potlačují cytokinovou signalizaci (dále jako SOCS) nebo ubiquitinačních proteinů – například USP18. (Yoshimura, Naka et al. 2007, Sarasin-Filipowicz, Wang et al. 2009). Proteiny SOCS1, SOCS3 a USP18 jsou také součástí přirozené regulace signalizace interferonů prvního typu – jejich exprese je indukovaná vazbou interferonů na receptor.

4. MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

4.1. Buněčné linie

G361 – buňky lidské melanomová maligní linie

HEK293 – buňky odvozené z ledvin lidského zárodku

HT1080 – buňky lidské fibrosarkomové linie

WM3629 – buňky lidské melanomové maligní linie, odvozené z metastáze v lymfatické uzlině

WM88 – buňky lidské melanomové maligní linie, odvozené z metastáze (nespecifikováno)

Phoenix – pakážovací linie pro virovou infekci (ATCC, Cat-3214)

4.2. Roztoky

10x PBS (Sigma, D1408)

6x loading dye (60 % glycerol, 0.06 % bromofenylová modř, 60mM EDTA), (BioLabs New England B7024S)

Agarosa (Thermo Scientific, 16500500)

Ampicillin (Biotika)

Blasticidin (Sigma, 15205)

Bromfenolová modř (P-lab, R 15121)

Collagen R (Serva, 47256.01)

CutSmart pufr 10x (New England BioLabs, B7204S)

DMEM 10x (Sigma, D2429)

DNA Stain G (Serva, 3980301)

dNTPs 10mM (New England BioLabs, N04475)

Dodecylsírán sodný (SDS) (Sigma, L3771)

Doxycyklin (Sigma, D9891)

Ethanol 96% (EtOH) (Lach:ner, 20025-A96)

Fenol (Sigma, P1037)

Fenol/chloroform: fenol-Tris s CHCl_3 1:1 v/v

GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, SM0311)

Gentamicin (Sigma, G1272).

Glycerol (AppliChem, A1123)

Glykogen (Thermo Scientific, R0561)

HEPES (Sigma, H4034)

Hydrogenuhlčitan sodný (NaHCO_3) 7.5% (Sigma, S8761)

Hydroxid sodný (NaOH) (Penta, 11002006) nebo (Sigma, 59223C)

Chlorid lithný (LiCl) (Sigma, 203637)

Chlorid sodný (NaCl) (Sigma, S3014)

Chloroform (CHCl_3) (Lach:ner, 20034-AT1)

Isopropanol (Lach:ner, 20037-AT0)

Kultivační médium: směs Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM; Sigma, D6429) s 10 % fetálním bovinním sérem (FBS; Sigma, F7524) a gentamicinem (Sigma, G1272)

Lyzační roztok: 8.8 ml H_2O , 200 μl 10M NaOH , 1 ml 10% SDS

Magnetické kuličky na přečištění DNA: Magnetic beads AMPure XP

Médium SOC (New England BioLabs, B9020S)

Octan amonný (NH_4Ac) (P-lab, 01101)

Octan sodný (NaAc) (Sigma, S9513)

Polyethylenimin (PEI) (Polysciences, Inc., 23966)

Puromycin (Sigma, P7255)

Restrikční enzymový pufr 3.1 10x (New England BioLabs, B7203S)

SERVA DNA Stain G (SERVA 39803.01)

T4 DNA ligasa pufr 10x (Thermo Scientific, B69)

Taq polymerasa pufr 10x (New England BioLabs, M0273L)

TEG: 50 mM glukosa, 25mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0

GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, SM0311)

Tris- EDTA (TE) (Sigma, T9285)

Trypsin: Trypsin-EDTA solution 0.25 % (Sigma, T4049)

TBS (Tris Buffer Saline)

- Tris (pH=7,5) 50 mM
- NaCl 150 mM

TTBS (Tween Tris Buffer Saline)

- Tris 50 mM
- NaCl 150 mM
- Tween-20 0,05% (1 g/2 litry)

Zmrazovací směs: 90 % fetální bovinní sérum (FBS, Sigma, F7524), 10 % dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, D2650)

Protilátky:

- **P-Stat1** (Thermo Fisher Scientific; #MA5-15071)
- **P-Stat2** (CST; #88410), **P-Stat3** (CST; #9145)
- **Stat1** (Thermo Fisher Scientific; #MA5-15129)
- **Stat2** (CST; #72604), **Stat3** (CST; #12640)
- **IRF9** (CST; #76684), **Jak1** (CST; #3344)
- **GAPDH** (Thermo Fisher Scientific; #MA5-15738)

4.3. Enzymy

Klenow fragment (2000 U/ml) (Thermo Scientific, EP0054)

RNAsa A (Thermo Scientific, EN0531)

T4 DNA ligasa (5000 U/ml) (Thermo Scientific, EL0011)

Taq DNA polymerasa (5000U/ml) (New England BioLabs, M0273L)

4.4. Vektory

Vektorové mapy jsou v kapitole 9. Přílohy

4.5. Vybavení

Biosan Environmental Shaker Incubator ES-20

Eppendorf Centrifuge 5415 D

Eppendorf Centrifuge 5417 R

Eppendorf Centrifuge 5804 R

Flow cytometer BD LSR II

Heated chamber Ibidi Heating system, Universal Fit

Nikon-Eclipse TE2000-S

Nikon-Eclipse TS100

Spectrophotometer Shimadzu UV-1650PC

Thermoblock Major Science Dry Bath Incubator

Thermocycler BIOER-Gene Pro

5. METODY

5.1. Kultivace buněk

Savčí buňky byly kultivovány při standardní teplotě 37 °C a atmosféře s 5 % obsahem oxidu uhličitého. Buňky rostly v kultivačním médiu (viz podkapitola 4.1.2. Roztoky) na plastiku, jehož velikost byla zvolena podle množství daných buněk (viz kapitola 9. Přílohy: Tabulka 1). Všechny kultury byly každý den kontrolovány (světelným mikroskopem), kvůli možné kontaminaci a pro kontrolu jejich konfluence. Buňky byly pravidelně pasážovány, aby nedošlo k jejich přemnožení a následné změně vlastností nebo řízené buněčné smrti. Pokud buňky nebyly kultivovány v kultuře byly skladovány v tekutém dusíku (-196 °C) a nebo přechodně ve specializovaném mrazáku (-80 °C). V obou případech byly ve zmrazovací směsi.

5.1.1. Pasážování buněk

Buňky byly pasážovány obvykle každý 3.den, tak aby byla jejich konfluence přibližně 30-90 %. Poměr v jakém byly buňky pasážovány záležel na dané linii a konkrétní konfluenci. Postup:

1. nahřátí kultivačního média ve vodní lázni na teplotu 37 °C
2. nahřátí trypsinu při pokojové teplotě (room temperature, dále RT) zhruba 10 minut
3. přemístění buněk na plastiku do tkáňového boxu
4. odsátí kultivačního média z buněk na plastiku
5. opláchnutí buněk dostatečným množstvím PBS (zhruba 1/5 původního množství média)
6. odsátí PBS
7. přidání trypsinu (zhruba 1/10 původního množství média), lehké zakroužení plastikem, tak aby se trypsin rozlil po celém povrchu
8. přemístění buněk na plastiku s trypsinem do inkubátoru
9. inkubace buněk s trypsinem dokud nedojde k jejich oddělení od plastiku (doba trvání v závislosti na buněčné linii a konfluenci, zhruba 2-7 minut)
10. přemístění buněk na plastiku nazpět do tkáňového boxu
11. přidání média na neutralizaci trypsinu (stejně množství jako trypsinu)
12. převedení buněk do suspenze ve směsi média a trypsinu pomocí pipety a krouživých pohybů
13. odebrání dostatečného množství směsi (podle pasážovacího poměru dané linie a konkrétní konfluenci buněk)
14. doplnění dostatečného množství kultivačního média (viz kapitola 9. Přílohy: Tabulka 3) k buňkám na plastiku
15. přemístění pasážovaných buněk na plastiku zpět do inkubátoru.

5.1.2. Buněčné stabiláty

Buněčné stabiláty byly připravovány podle potřeby a úspěšnosti pokusů (konzervy byly připravovány průběžně při tvorbě stabilních linií). Následně byly přechodně skladovány ve specializovaném mrazáku (-80 °C) a poté dlouhodobě v tekutém dusíku (-196 °C).

Postup:

1. příprava zmrazovací směsi, 1 *ml* na 1 buněčný stabilát
2. příprava 15 *ml* zkumavek se 4 *ml* kultivačního média (množství zkumavek odpovídá množství buněčných linií)
3. nahřátí kultivačního média ve vodní lázni na teplotu 37 °C
4. nahřátí trypsinu při RT zhruba 10 minut
5. přemístění buněk na plastiku do tkáňového boxu
6. odsátí kultivačního média z buněk na plastiku
7. opláchnutí buněk dostatečným množstvím PBS (zhruba 1/5 původního množství média)
8. odsátí PBS
9. přidání trypsinu (zhruba 1/10 původního množství média), lehké zakroužení plastikem, tak aby se trypsin rozlil po celém povrchu
10. přemístění buněk na plastiku s trypsinem do inkubátoru
11. inkubace buněk s trypsinem dokud nedojde k jejich oddělení od plastiku (doba trvání v závislosti na buněčné linii a konfluenci, zhruba 2-7 minut)
12. přemístění buněk na plastiku nazpět do tkáňového boxu
13. přidání média na neutralizaci trypsinu (stejně množství jako trypsinu)
14. převedení buněk do suspenze ve směsi média a trypsinu pomocí pipety a krouživých pohybů
15. přenesení resuspendované směsi do připravené 15 *ml* zkumavky
16. odstředění směsi v centrifuze při RT a 1100 *rpm* na 4 minuty
17. příprava kryozkumavek (detailní popsání – linie, konstrukt, datum, iniciály experimentátora)
18. odsání supernatantu ze zkumavky
19. převedení sedimentu do suspenze se zmrazovací směsí
20. rozpipetování směsi do kryozkumavek (1 *ml* na 1 zkumavku)
21. přenesení kryozkumavek do chladicího kontejneru
22. přenesení kontejneru do specializovaného mrazáku (-80 °C) a po zhruba 2 dnech přenesení kryozkumavek do tekutého dusíku (-196 °C).

5.1.3. Rozmrazování buněčných stabilátů

Buněčné stabiláty jsou rozmrazovány podle potřeby tak, aby buňky nebyly pasážovány déle než měsíc.

Postup:

1. přenesení kryozkumavek z tekutého dusíku do laboratoře a jejich přemístění do vodní lázně, kde pomalu rozmrazají
2. připravení 15 ml zkumavky ve tkáňovém boxu s 10 ml kultivačního média
3. kvantitativní přenesení obsahu kryozkumavky do 15 ml zkumavky
4. odstředění směsi v centrifuze RT a 1100 rpm na 4 minuty
5. připravení 10 cm petriho misky s 10 ml kultivačního média a její důkladné popsání (linie, konstrukt, datum, iniciály experimentátora)
6. odsání supernatantu ze zkumavky
7. převedení sedimentu do suspenze asi v 1 ml kultivačního média
8. přenesení suspenze na petriho misku
9. promíchání média se směsí (krouživými pohyby plastiku)
10. přemístění buněk na plastiku do inkubátoru.

5.2. Analýza morfologie a chování buněk

5.2.1. Příprava kolagenů

Příprava kolagenů na hodnocení morfologie buněk se dá rozdělit na dvě fáze. První je příprava buněk na vysazení do kolagenu.

Postup:

1. příprava 15 ml zkumavek (množství zkumavek odpovídá množství buněčných linií)
2. nahřátí kultivačního média ve vodní lázni na teplotu 37 °C
3. nahřátí trypsinu při RT zhruba 10 minut
4. přemístění buněk na plastiku do tkáňového boxu
5. odsátí kultivačního média z buněk na plastiku
6. opláchnutí buněk dostatečným množstvím PBS (zhruba 1/5 původního množství média)
7. odsátí PBS

8. přidání trypsinu (zhruba 1/10 původního množství média), lehké zakroužení plastikem, tak aby se trypsin rozlil po celém povrchu
9. přemístění buněk na plastiku s trypsinem do inkubátoru
10. inkubace buněk s trypsinem dokud nedojde k jejich oddělení od plastiku (doba trvání v závislosti na buněčné linii a konfluenci, zhruba 2-7 minut)
11. přemístění buněk na plastiku nazpět do tkáňového boxu
12. přidání média na neutralizaci trypsinu (stejně množství jako trypsinu)
13. převedení buněk do suspenze ve směsi média a trypsinu pomocí pipety a krouživých pohybů
14. přenesení resuspendované směsi do připravené 15 ml zkumavky a doplnění kultivačním médiem na celkový objem 4 ml
15. důkladné promíchání zkumavky
16. odebrání asi 15 μ l směsi ze zkumavky a přenesení do Bürkerovy komory
 - i. spočítání buněk v jednotlivých čtvercích
 - ii. sečtení počtu všech buněk
 - iii. vydělení počtem čtverců
17. umytí Bürkerovy komory od buněčné směsi
18. odstředění směsi buněk v 15 ml zkumavce v centrifuze při RT a 1100 rpm na 4 minuty
19. odsátí supernatantu a převedení sedimentu do suspenze v příslušném množství kultivačního média

Druhou fází je příprava samotného kolagenu. Ta probíhá za neustálého chlazení, veškeré složky se tedy pipetují na ledu.

Postup:

1. příprava zkumavek o vhodné velikosti (velikost volíme podle objemu připravovaného kolagenu, počet zkumavek podle počtu zkoumaných podmínek a linií)
2. pipetování do zkumavek příslušné množství premixu a poté kolagenu
3. důkladné promíchání směsi pomocí pipety
4. přidání vhodného množství buněk suspendovaných v kultivačním médiu

5. důkladné promíchání pomocí pipety
6. přenesení směsi na plastik (obvykle 48 nebo 96 jamková destička)
2. umístění plastiku do inkubátoru dokud neztuhne kolagen (zhruba 30 minut)
3. příprava převrstvovacího média
4. pipetování převrstvovacího média (buď čistého nebo s přidanými látkami) nad ztuhlý kolagen
5. inkubace kolagenů po dobu 48 hodin v inkubátoru.

5.2.2. Vyhodnocování morfologie buněk ve 3D prostředí v kolagenu

Morfologie buněk byla vyhodnocována zpravidla po 48 hodinách v kolagenu. Na mikroskopu byly foceny jednotlivé jamky destičky, z kontroly a každé podmínky bylo pořízeno 10 až 15 fotografií (v závislosti na počtu buněk v kolagenu a jejich proliferaci) v několika rovinách gelu. Fotografie pak byly vyhodnocovány v programu ImageJ.

Postup:

1. otevření programu ImageJ a pluginu cell counter
2. rozdělení buněk podle předem stanovených kritérií (viz níže)
3. zopakování procesu pro tři biologická opakování
4. statistické vyhodnocení.

Kritéria pro určování morfologií buněk:

- počítají se jen buňky zaostřené v dané rovině
- buňka se musí v dané rovině nacházet celá
- pokud je buňka dvakrát delší než širší je počítána jako protažená a tedy mezenchymální.

5.2.3. Příprava sféroidů

Postup:

1. navážení 1 g agarosy do 100 ml erlenmeyerovy baňky
2. vyklávkování na suchý program po dobu 30 minut
3. přidání 50 ml sterilní soli 0,9 % (w/v) NaCl
4. rozehřání agarosy v mikrovlnce (po dobu 2 minut) a následné rozmíchání
5. přemístění erlenmeyerovy baňky s agarosou do tkáňového boxu

6. příprava 10 *cm* Petriho misky s potřebným množstvím umělohmotných 3D forem na tvorbu sféroidů (manipulace s formami pomocí vydesinfikované pinzety)
7. pipetování asi 500 μ l agarosy o teplotě asi 65 °C na 3D formu
8. tuhnutí agarosy při RT o dobu 3 minut v tkáňovém boxu
9. příprava 12 jamkové destičky s 2 *ml* kultivačního média v jamce (počet jamek se volí podle počtu 3D forem na výrobu sféroidů)
10. přemístění ztuhlé agarosy z 3D formy do jamek 12 jamkové destičky
11. inkubace agarosových odlitků v kultivačním médiu po dobu 15 minut v inkubátoru
12. po 15 minutách opatrné odsání kultivačního média z 12 jamkové destičky a přidání dalších 2 *ml* ke každému agarosovému odlitku
13. inkubace agarosových odlitků v kultivačním médiu po dobu 15 minut v inkubátoru
14. příprava buněk (analogická jako při přípravě kolagenů – viz podkapitola 5.2.1. Příprava kolagenů, postup pro přípravu buněk)
15. odsání kultivačního média z 12 jamkové destičky, opatrné odsání kultivačního média z agarosových odlitků
16. pipetování 200 μ l buněčné suspenze do vnitřní části agarosových odlitků
17. opatrné přemístění 12 jamkové destičky do inkubátoru na dobu 15 minut
18. po 15 minutách přidání 2 *ml* kultivačního média ke každému agarosovému odlitku (kultivační médium je potřeba přidávat opatrně a pipetovat ho po stěně jamky, aby nedošlo k vypláchnutí buněk)
19. inkubace 12 jamkové destičky do inkubátoru a inkubace při 37 °C po dobu 2 dní, aby došlo k úplnému zformování sféroidů
20. po dvou dnech se sféroidy vysazují do kolagenů
21. příprava 5 *ml* zkumavky pro přípravu kolagenové směsi
22. pipetování příslušného množství premixu a kolagenu (250 μ l směsi na 1 sféroid)
23. důkladné promíchání směsi pomocí pipety
24. pipetování 150 μ l kolagenové směsi do jamek 48 jamkové destičky (1 jamka na 1 sféroid)
25. přemístění 48 jamkové destičky do inkubátoru na dobu 30 minut (tak aby došlo ke ztuhnutí kolagenové směsi)

26. příprava 6 jamkové destičky s 2 ml kultivačního média v příslušném množství jamek (množství jamek podle počtu buněčných linií nebo podmínek, 1 jamka pro 1 agarosový odlitek)
27. odsání kultivačního média z 12 jamkové destičky s agarosovými odlitky
28. přemístění agarosových odlitků s vytvořenými sféroidy do jamek 6 jamkové destičky (pomocí vydesinfikované pinzety)
29. uvolnění sféroidů do kultivačního média v 6 jamkové destičce
30. přenesení 1 sféroidu do 1 jamky 48 jamkové destičky pipetou, tak aby byl sféroid ve středu ztuhlé kolagenové vrstvy
31. převrstvení sféroidu 150 μ l kolagenové směsi
32. inkubace 48 jamkové destičky se sféroidy v kolagenu v inkubátoru po dobu 30 minut
33. příprava převrstvovacího média
34. pipetování převrstvovacího média (buď čistého nebo s přidávanými látkami) nad ztuhlý kolagen
35. vyfocení sféroidů v kolagenu (čas $t = 0$)
36. inkubace sféroidů v kolagenu v inkubátoru po dobu 96 hodin
37. vyfocení sféroidů kolagenu (čas $t = 96$ h)

5.2.4. Kvantitativní analýza invazivity ze sféroidů

Invazivita sféroidů se vyhodnocuje pomocí softwaru ImageJ. Hodnotí se poměr buněčné plochy (area) a poměr takzvané kruhovitosti (circularity) před invazí v čase $t=0$ a po invazi v čase $t=96$ hodin.

5.3. Biochemické a molekulárně biologické metody

5.3.1. Příprava proteinových lyzátů

Postup:

1. odsání kultivačního média
2. opláchnutí buněk na plastiku pomocí PBS (asi 1/10 objemu odsátého média)
3. přidání lyzačního pufru (množství dle velikosti plastiku viz kapitola 9. Přílohy: Tabulka 3)
4. inkubace buněk s lyzačním pufrem po dobu asi 30 sekund

5. seškrábání směsi lyzačního pufru a zlyzovaných buněk pomocí plastové škrabky (předem omyté v ethanolu)
6. přenesení směsi pipetou z plastiku do 1,5 ml zkumavek
7. homogenizace směsi (pomocí injekční stříkačky s jehlou nebo homogenizátoru)
8. odstředění lyzovaných buněk v centrifuze při 4 °C a 13000 rpm na 15 minut
9. přenesení supernatantu do čistých 1,5 ml zkumavek (detailní popsání – linie, konstrukt, datum, jakékoliv změny v kultivačním médiu, iniciály experimentátora)
10. změření koncentrace lyzátů a jejich případné srovnání (viz 5.3.1.1.)
11. doplnění koncentrovaného lyzačního pufru, DTT a bromfenylové modři ve správných poměrech
12. inkubace směsi při 95 °C na termálním bločku po dobu 11 minut
13. zmražení hotových lyzátů případně jejich okamžité použití

5.3.1.1. Srovnání koncentrace proteinových lyzátů

Nejprve je třeba změřit koncentrace lyzátů. K tomu se využívá DC Protein Assay (Bio-Rad) a Microplate Assay Protocol.

Postup:

1. příprava dostatečného množství reagensie A', tedy 25 μ l pro každou jamku (do každého 1 ml reagensie A je třeba přidat 20 μ l reagensie S)
2. příprava ředící řady proteinového standardu a blanku
3. pipetování 5 μ l standardů a vzorků do suchých a čistých jamek mikrotitrační destičky (vše 3 krát)
4. přidání 25 μ l reagensie A' do každé jamky
5. přidání 200 μ l reagensie B do každé jamky
6. inkubace při RT v temnu po dobu 15 minut
7. změření absorbance vzorků při vlnové délce 750 nm
8. určení koncentrace proteinů ve vzorcích na základě lineární regrese standardní křivky.

Pokud se koncentrace výrazně liší je nutné je srovnat (alespoň v rámci jednoho biologického opakování) přidáním koncentrovaného lyzačního pufru, DTT a bromfenylové modři ve správných poměrech

5.3.2. SDS elektroforéza

Veškerá práce se provádí v rukavicích, protože nepolymerizovaný akrylamid je neurotoxin. Nejprve je třeba připravit gely.

Postup:

1. důkladné umytí skel, tak aby na nich nebyly žádné šmouhy
2. sestavení skel do nalévací aparatury a vyzkoušení těsnění (mezi skla se pipetuje voda – pokud nevyteče, skla jsou správně sestavena)
3. příprava 10 % separačního negradientového gelu (viz kapitola 9. Přílohy Tabulka 4)
4. opatrné pipetování separačního gelu mezi skla, do výšky zhruba dvou třetin
5. převrstvení pipetovaného gelu vodou
6. tuhnutí gelu po dobu asi 30 minut při RT (doba tuhnutí závisí na koncentraci APS)
7. příprava zaostřovacího gelu (viz kapitola 9. Přílohy Tabulka 4)
8. odlití převrstvovací vody
9. pipetování zaostřovacího gelu mezi skla na gel separační a přidání hřebínku pro vytvoření jamek gelu
10. tuhnutí zaostřovacího gelu po dobu asi 15 minut při RT
11. připravené gely je možné ihned použít a nebo je zabalit do fólie a uchovat v lednici k dalšímu použití (maximálně 3 dny).

Pak následuje sestavení aparatury, nanášení vzorků a samotná elektroforéza.

Postup:

1. sestavení aparatury
2. přidání dostatečného množství 1 x SDS pufru (do vnitřního oddílu až po okraj, do vnějšího zhruba do 1/3)
3. opatrné vytažení hřebínku z gelu
4. nejprve se do první jamky nanáší 2 μ l proteinového markeru

5. pak postupně jednotlivé vzorky (od každého 20 μ l), jsou nanášeny pomalu, tak aby celý objem vzorku zůstal v příslušné jamce
6. po nanesení všech vzorků je třeba aparaturu uzavřít a připojit ke zdroji
7. nejprve je třeba nastavit proud na 0,01 A (pro jeden gel), po dosažení hranice mezi zaostřovacím a separačním gelem se může proud zvýšit na 0,02 A (pro jeden gel)
8. zastavení elektroforézy (jakmile proteiny doputují na konec gelu)
9. rozebrání aparatury a opatrné oddělení zaostřovacího gelu
10. separační gel se využije pro další zpracování.

5.3.3. Western blot

Postup:

1. namočení membrány z nitrocelulózy a tkaniny do přenosového pufru na asi 10 minut
2. příprava kazety z TransBlotu – na spod je umístěna tkanina, na ni membrána, na ni gel (separační gel) a na něj znovu tkanina
3. jemné vytlačení bublin pomocí válečku a odlití přebytečného přenosového pufru nazpět do láhve
4. uzavření kazety víkem a zapnutí přístroje (konstantní proud 2,5 A, elektrické napětí 25 V, doba trvání 7 minut)
5. v mezidobě probíhá příprava blokačního roztoku – vždy čerstvě připravené 5 % odtučněné sušené mléko rozpuštěné v TTBS (viz kapitola 4.2. Roztoky)
6. po doběnutí western blotu se kazeta otevře a vrchní tkanina se dá na stranu (do vaničky s vodou), pokud se proteiny přenesly na membránu je možné gel vyhodit (kontrola pomocí markeru)
7. opatrné přemístění membrány do vaničky s TBS (viz kapitola 4.2. Roztoky), aby se odstranily zbytky přenosového pufru
8. odlití TBS a přidání roztoku Ponceau S (kontrola nanášky proteinů)
9. po zhruba 2 minutách přemístění membrány do vody, aby se odstranilo přebytečné Ponceau S a následné oskenování membrány
10. inkubace membrány v TBS, dokud nedojde k odbarvení Ponceau S
11. přemístění membrány do blokačního roztoku a následná inkubace při RT na kývačce po dobu 1 hodiny

12. přemístění membrány do roztoku s primární protilátkou (příprava podle konkrétní protilátky dle pokynů výrobce)
13. inkubace membrány v roztoku s primární protilátkou přes noc v lednici na kývačce
14. druhý den ráno odpipetování primární protilátky (dle typu protilátky lze roztok primární protilátky recyklovat – do protilátky se potom přidává azid ve finální koncentraci 0,02%)
15. promývání membrány v TTBS při RT na kývačce po dobu 10 minut (celkem 3 krát)
16. inkubace membrány v sekundární protilátce při RT na kývačce po dobu 1 hodiny
17. promývání membrány v TTBS při RT na kývačce po dobu 10 minut (2 krát)
18. propláchnutí membrány v TBS při RT na kývačce po dobu 10 minut
19. vyvolání membrány pomocí vhodného chemiluminiscenčního substrátu.

Po vyvolání je možné membránu uschovat nebo pomocí roztoku 200nM NaOH odstranit protilátky a znovu na membránu nanést nějakou primární a vše zopakovat. To je vhodné například pro zjištění množství nefosforylované formy proteinu nebo pro kontrolu nanášky proteinů pomocí vhodného proteinového standardu (např. GAPDH).

Postup:

1. inkubace membrány v roztoku 200nM NaOH na kývačce při 42 °C po dobu 10 minut
2. inkubace membrány v blokačním roztoku při RT na kývačce po dobu 1 hodiny
3. přemístění membrány do roztoku s primární protilátkou a zopakování celého postupu.

5.3.4. Agarosová elektroforéza

Nejprve je potřeba připravit gel.

Postup:

38. navážení 1 g agarosy do erlenmeyerovy baňky
39. přidání 100 ml 0,5 x TBE (viz kapitola 4.2. Roztoky)

40. ohřátí směsi v mikrovlnce po dobu 2 minut
41. příprava nalévací aparatury
42. ochlazení gelu v erlenmeyerově baňce pod proudem studené vody za stálého míchání
43. přidání 0,5 μ l barviva do gelu (SERVA DNA Stain G, SERVA 39803.01)
44. důkladné promíchání gelu
45. opatrné nalití gelu do aparatury a odstranění případných bublin pipetou
46. tuhnutí gelu při RT po dobu 20 minut.

Gel se buď ihned použije na elektroforézu nebo se přemístí do lednice, kde je při teplotě 4 °C uchováván maximálně po dobu 7 dnů.

Postup ELFO:

1. umístění gelu do aparatury s TBE pufrem, tak aby byl gel zcela ponořen
2. příprava vzorků
 - i. 4 μ l H₂O
 - ii. 1 μ l vzorku (200-1000 ng DNA)
 - iii. 1 μ l 6x loading dye 6 (BioLabs New England B7024S)
3. promíchání vzorků s vodou a barvivem pomocí pipety
4. pipetování vzorků do jamek gelu
5. nanesení markeru (2 μ l) GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, SM0311)
6. nasazení víka na aparaturu
7. spuštění elektroforézy (napětí 175 V, proud \leq 0,100 A)
8. po skončení elektroforézy přenesení gelu k transluminátoru
9. vyfocení gelu případně další zpracování (viz kapitola 5.4.5.2. Izolace DNA z gelu a přečištění izolátu)

5.4. Molekulární metody

5.4.1. Anylace

Postup:

1. smíchání anylační směsi (celkový objem 50 μ l)
 - i. 42 μ l H₂O
 - ii. 5 μ l 10 krát koncentrovaného pufru NEB 2

- iii. 1,5 μ l z každého oligonukleotidu
2. inkubace směsi na termálním bločku při 95 °C po dobu 4 minut
3. inkubace ve vodní lázni s teplotou 90 °C dokud voda v lázni nevychladne na RT.

5.4.2. Ligace

Postup:

9. smíchání jednotlivých složek ligační směsi (celkový objem 10 μ l)
 - i. 0,5 μ l roztoku otevřeného plasmidu (20-50 ng DNA)
 - ii. 0,5 μ l inzertu (50-500 ng DNA)
 - iii. 1 μ l 10x koncentrovaného ligačního pufru
 - iv. 0,4 μ l ligázy (kolik jednotek)
 - v. doplnění vodou do celkového objemu 10 μ l
10. inkubace při RT po dobu 30 minut
11. inaktivace ligázy teplem – inkubace na termálním bločku při 75 °C po dobu 15 minut
12. zamražení směsi při -20 °C do dalšího použití nebo rovnou transformace do bakterií.

5.4.3. Transformace bakterií heat-shockem

Postup:

4. přidání 7 μ l ligační směsi (viz kapitola 5.4.2. Ligace) do 50 μ l bakterií (práce probíhá na ledě)
5. inkubace směsi s bakteriemi při 42 °C na termálním bločku po dobu asi 40 sekund
6. inkubace směsi s bakteriemi na ledu po dobu 2 minut
7. přidání 200 μ l media SOC
8. přenesení bakterií na bakteriální misku s ampicilinem (případně jiným antibiotikem)
9. inkubace misky s bakteriemi přes noc při teplotě 37 °C.

5.4.4. Zaočkování bakterií

Vybrané kolonie bakterií z bakteriální misky jsou přemístěny do KB média (s příslušným antibiotikem). Kolonie jsou označeny na misce a ta je pak uchována v lednici při 4 °C pro případné další použití.

Postup:

1. zapnutí kahanu, aby se v okolí plamene desinfikoval vzduch
2. otevření láhve se zásobním KB médiem a přenesení vhodného množství pipetou do 50 ml zkumavek (množství média podle počtu vybraných kolonií – pro každou kolonii jsou potřeba 3 ml média)
3. přidání antibiotika do 50 ml zkumavky s KB médiem (antibiotikum se ředí 1000x)
4. důkladné promíchání směsi KB média s antibiotikem
5. přenesení směsi KB média s antibiotikem pipetou podle počtu vybraných kolonií do předem připravených bakteriálních 15 ml zkumavek
6. pečlivé popsání bakteriálních zkumavek
7. přidání bakterií z vybraných kolonií do příslušných zkumavek pomocí 100 μ l pipety
8. uzavření bakteriálních zkumavek, tak aby do zkumavky mohl pronikat vzduch
9. inkubace bakterií v KB médiu s antibiotikem při 37 °C za současného protřepávání přes noc
10. uklizení zásobního KB média do lednice
11. vypnutí kahanu.

5.4.5. Extrakce DNA

5.4.5.1. Extrakce DNA z plasmidových miniprepů

Plasmidové miniprepy se izolují z bakteriální kultury, ta je buď čerstvá (narostlá přes noc) a nebo uchovávaná v lednici při 4 °C, kde byla maximálně 12 dnů. Při používání starší kultury má extrahovaná DNA velmi nízkou koncentraci.

Postup:

1. centrifugace 1 ml bakteriální kultury na 13 200 rpm po dobu 1 minuty
2. odsání média pomocí vakuové pumpy
3. přidání 100 μ l TEG do zkumavek (roztok Tris, EDTA, Glukosa)
4. inkubace sedimentu s TEGem po dobu zhruba 5 minut
5. promíchání s využitím vortexu tak, aby byl sediment zcela resuspendován a vznikla homogenní suspenze

6. příprava čerstvého lyzačního roztoku do 15 ml zkumavky (8,8 ml vody, 200 μ l 10M NaOH, 1000 μ l 10% SDS)
7. lyzování bakterií přidáním 280 μ l lyzačního roztoku za současného promíchávání s využitím vortextu (1300 rpm), poté promíchávat dalších asi 5 sekund
8. inkubace suspenze s lyzačním roztokem po dobu asi 1 minuty
9. přidání 420 μ l 10M NH₄Ac za současného promíchávání s využitím vortextu (1300 rpm) pro neutralizaci
10. přemístění zkumavek do digestoře
11. přidání 280 μ l fenol/chloroformu
12. zkumavky protřepat v ruce a poté promíchat s využitím vortextu po dobu 10 sekund na maximální otáčky
13. centrifugace při 14 000 rpm po dobu 5 minut
14. přenesení horní bezbarvé fáze do čisté zkumavky
15. přidání dostatečného množství isopropanolu (0,7 krát objem přenesené horní fáze)
16. inkubace 10 minut při RT
17. centrifugace při 14 000 rpm po dobu 15 minut
18. odlití supernatantu do čisté kádinky (případně do dřezu)
19. přidání 600 μ l 80 % EtOH
20. Promíchání ethanolu se sedimentem převrácením zkumavky (tak, aby se sediment oddělil ode dna)
21. centrifugace při 14 000 rpm po dobu 1 minuty
22. odsání supernatantu pomocí vakuové pumpy
23. vysušení sedimentu při RT
24. rozpuštění sedimentu ve 20 μ l roztoku RNAsy, Tris, EDTA
25. inkubování po dobu asi 30 minut při teplotě 37 °C
26. zmražení směsi při teplotě -20 °C nebo přečištění DNA a další zpracování.

5.4.5.2. Izolace DNA z gelu a přečištění izolátu

Postup:

1. smíchání vzorku s 6 krát loading dye (BioLabs New England B7024S)
2. nanesení na agarosový gel a spuštění elektroforézy
3. po skončení elektroforézy přenesení gelu k transluminátoru
4. vyříznutí vybraných proužků pomocí skalpelu

5. přenesení daných kousků gelu do zkumavek
6. přidání 400 μ l fenol/Tris a inkubování v termálním bločku při 72 °C až do rozpuštění gelu
7. přidání 300 μ l TE pufru a 25 μ l 10M LiCl
8. promíchání směsi s využitím voxtextu po dobu asi 10 sekund
9. centrifugace při 13 000 *rpm* po dobu 10 minut
10. přenesení horní fáze do nové zkumavky
11. přidání 100 μ l 10M LiCl a 300 μ l fenol/chloroformu
12. promíchání směsi s využitím voxtextu po dobu asi 10 sekund
13. centrifugace při 13 000 *rpm* po dobu 5 minut
14. přenesení horní fáze do nové zkumavky
15. přidání 1 μ l glykogenu a 450 μ l isopropanolu
16. důkladné promíchání překlápěním zkumavek
17. inkubace při RT po dobu 10 minut
18. centrifugace při 13 000 *rpm* po dobu 15 minut
19. odsání supernatantu a opláchnutí sedimentu přidání 500 μ l 80 % EtOH
20. centrifugace při 13 000 *rpm* po dobu 1 minuty
21. odsání supernatantu a vysušení sedimentu při RT
22. rozpuštění sedimentu v H₂O, případně ihned pokračovat s ligací.

5.4.6. Restrikční štěpení

Pozn. postup je popisován pro restrikční štěpení při klonování.

Postup:

1. zvolení vhodné restriktasy
2. rozmražení roztoků DNA (plánovaných inzertů i plazmidu)
3. Promíchání roztoků s využitím voxtextu DNA a jejich odstředění po dobu asi 10 sekund
4. rozmražení vhodného restrikčního pufru a jeho promíchání převrácením zkumavky
5. smíchání složek pro restrikční reakci (celkový objem 30 μ l)
 - i. 5 μ g inzertu a 2 μ g vektoru
 - ii. restrikční pufr
 - iii. H₂O
 - iv. restriktasa (3-5 U)

6. promíchání směsi s využitím vortexu
7. inkubace přes noc při 37 °C
8. zamražení při -20 °C do dalšího použití.

5.4.7. Přechystování DNA pomocí AMPure XP beads

Postup:

1. zapnutí termálního bločku na 65 °C
2. pipetování magnetických kuliček ke vzorku (1,8 krát objem vzorku)
3. inkubování po dobu 5 minut při RT
4. umístění zkumavek na magnetický stojan
5. po zhruba 2 minutách se magnetické kuličky spolu s navázanou DNA přilepí na stěnu zkumavky a tekutina se projasní
6. odsání pufry a 2 krát propláchnutí 600 μ l 70 % EtOH
7. odsání ethanolu
8. sušení kuliček s navázanou DNA asi 5 minut při RT
9. přidání asi 20 μ l vody a resuspendování magnetických kuliček
10. inkubace zkumavek při 65 °C po dobu 10 minut na termálním bločku
11. přemístění zkumavek zpět na magnetický stojan
12. po zhruba dvou minutách přepipetování tekutiny (voda s uvolněnou DNA) do nových zkumavek (detailní popis – název, datum, iniciály experimentátora, koncentrace)
13. změření koncentrace na spektrometru
14. zmražení DNA nebo její další použití na sekvenování nebo přímou transfekci buněk.

5.4.8. Příprava stabilních linií

5.4.8.1. Transfekce buněk

Postup pro transfekci buněk HEK293:

1. příprava transfekční směsi z média bez séra a bez antibiotik, PEI, tzv. „pakážovacích“ plazmidů a plazmidu cílového (viz kapitola 9. Přílohy Tabulka 5)
2. jemné promíchání s využitím vortexu směsi po dobu 10 sekund
3. inkubace směsi při RT po dobu 15 minut

4. opatrné nakapání směsi na tzv. „pakážovací“ buňky (v tomto případě HEK293)
5. jemné zakroužení plastikem, tak, aby se transfekční směs rovnoměrně promíchala s kultivačním médiem
6. inkubace přes noc v inkubátoru při teplotě 37 °C
7. druhý den ráno výměna kultivačního média.

Postup pro transfekci buněk Phoenix:

1. příprava transfekční směsi z média bez séra a bez antibiotik, PEI a plazmidu cílového (viz kapitola 9. Přílohy Tabulka 5)
2. jemné promíchání s využitím vortexu směsi po dobu 10 sekund
3. inkubace směsi při RT po dobu 15 minut
4. opatrné nakapání směsi na tzv. „pakážovací“ buňky (v tomto případě Phoenix)
5. jemné zakroužení plastikem, tak, aby se transfekční směs rovnoměrně promíchala s kultivačním médiem
6. inkubace přes noc v inkubátoru při teplotě 37 °C
7. druhý den ráno výměna kultivačního média.

Postup pro siRNA transfekci (práce probíhá na ledu):

1. výměna média na buňkách, které chci transfekovat ($\frac{1}{2}$ původního množství kultivačního média)
2. smíchání siRNA a transfekčního pufru (viz kapitola 9. Přílohy Tabulka 6)
3. smíchání transfekčního činidla GenMute a transfekčního pufru (viz kapitola 9. Přílohy Tabulka 6)
4. smíchání dvou směsí
5. inkubace při RT po dobu 15 minut
6. opatrné nakapání směsi na cílové buňky
7. jemné zakroužení plastikem, tak, aby se transfekční směs rovnoměrně promíchala s kultivačním médiem
8. inkubace přes noc v inkubátoru při teplotě 37 °C
9. následující den se buňky dál zpracovávají na proteinové lyzáty nebo na kontrolu morfologie.

5.4.8.2. Infekce buněk

Nejprve je potřeba připravit buňky na infekci. Příprava se provádí ráno, samotná infekce odpoledne.

Postup:

1. nahřátí kultivačního média ve vodní lázni na teplotu 37 °C
2. nahřátí trypsinu při RT zhruba 10 minut
3. přemístění buněk na plastiku do tkáňového boxu
4. odsátí kultivačního média z buněk na plastiku
5. opláchnutí buněk dostatečným množstvím PBS (zhruba 1/5 původního množství média)
6. odsátí PBS
7. přidání trypsinu (zhruba 1/10 původního množství média), lehké zakroužení plastikem, tak aby se trypsin rozlil po celém povrchu
8. přemístění buněk na plastiku s trypsinem do inkubátoru
9. inkubace buněk s trypsinem dokud nedojde k jejich oddělení od plastiku (doba trvání v závislosti na buněčné linii a konfluenci, zhruba 2-7 minut)
10. přemístění buněk na plastiku nazpět do tkáňového boxu
11. přidání média na neutralizaci trypsinu (stejné množství jako trypsinu)
12. převedení buněk do suspenze ve směsi média a trypsinu pomocí pipety a krouživých pohybů
13. rozdělení směsi na plastik vhodné velikosti (podle toho, na jakém plastiku jsou transfekované buňky)
14. doplnění dostatečného množství kultivačního média
15. pečlivé popsání plastiku
16. přemístění buněk na plastiku zpět do inkubátoru

Odpoledne následuje infekce buněk.

Postup:

1. přemístění transfekovaných buněk a buněk připravených na infekci z inkubátoru do tkáňového boxu
2. odsátí transfekovaného média pomocí injekční stříkačky

3. přefiltrování transfekovaného média přes filtr (velikost pórů 45 μm)
4. odsání média z buněk připravených na infekci
5. jeho nahrazení přefiltrovaným transfekovaným médiem
6. doplnění kultivačního média na transfekované buňky
7. přemístění všech buněk do inkubátoru
8. stejný postup se zopakuje při druhé infekci následující den
9. po druhé infekci se transfekované buňky zasavují
10. třetí den se u infikovaných buněk vymění infikované médium za kultivační médium a buňky se dál kultivují případně vytřídí s použitím průtokové cytometrie.

5.4.8.3. Třídění buněk s použitím průtokové cytometrie

Postup:

1. nahřátí kultivačního média ve vodní lázni na teplotu 37 °C
2. nahřátí trypsinu při RT zhruba 10 minut
3. přemístění buněk na plastiku do tkáňového boxu
4. odsátí kultivačního média z buněk na plastiku
5. opláchnutí buněk dostatečným množstvím PBS (zhruba 1/5 původního množství média)
6. odsátí PBS
7. přidání trypsinu (zhruba 1/10 původního množství média), lehké zakroužení plastikem, tak aby se trypsin rozlil po celém povrchu
8. přemístění buněk na plastiku s trypsinem do inkubátoru
9. inkubace buněk s trypsinem dokud nedojde k jejich oddělení od plastiku (doba trvání v závislosti na buněčné linii a konfluenci, zhruba 2-7 minut)
10. přemístění buněk na plastiku nazpět do tkáňového boxu
11. přidání média na neutralizaci trypsinu (stejně množství jako trypsinu)
12. převedení buněk do suspenze ve směsi média a trypsinu pomocí pipety a krouživých pohybů
13. příprava 15 ml zkumavek se 4 ml kultivačního média (množství zkumavek odpovídá množství buněčných linií)
14. přenesení resuspendované směsi do připravené 15 ml zkumavky

15. odstředění směsi buněk v 15 ml zkumavce v centrifuze při RT a 1100 rpm na 4 minuty
16. odsátí supernatantu a převedení sedimentu do suspenze v příslušném množství média bez séra (3 ml na 10 cm miskou)
17. příprava 15 ml zkumavek se 4 ml kultivačního média na přenesení buněk vytríděných pomocí průtokové cytometrie

5.4.9. qPCR

Práce se vzorky probíhá na ledu, aby nedošlo k jejich degradaci.

Postup:

1. rozmražení vzorků a následné promíchání s využitím vortexu po dobu asi 5 sekund
2. odstředí vzorků na stolní centrifuze po dobu asi 5 sekund
3. rozmražení primerů při RT a jejich následné promíchání s využitím vortexu
4. přenesení zkumavek s primery na led
5. rozmražení qPCR master mixu a následné promíchání překlápěním zkumavky
6. přenesení zkumavky s qPCR master mixem na led
7. příprava a důkladné popsání dostatečného množství mikrozkušavek (stejně množství jako je plánovaný počet dvojic primerů)
8. rozpipetování vzorků na destičku a přidání všech potřebných složek pro reakci
9. lehké bouchnutí destičkou o stůl tak, aby vzorky klesly na dno jamičky
10. zalepení destičky fólií a následná kontrola, zda fólie opravdu drží
11. promíchání vzorků v destičce s využitím vortexu (na vortex se přiloží prst a o něj se opře hrana destičky)
12. odstředění destičky na centrifuze po dobu tří minut (RPM = 1500)
13. vložení destičky do cycléru
14. vyhodnocení dat

5.5. Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pro všechny morfologické pokusy, pro data získaná pomocí qPCR a pro výsledky invazivity sferoidů.

Při morfologických pokusech byly analyzovány 3 biologicky nezávislá opakování. V rámci každého z nich bylo analyzováno minimálně 100 buněk pro každou podmínku. Pro statistickou analýzu vlivu interferonů na morfologii buněk byl využit test one-way ANOVA, pro analýzu morfologie buněk s inducibilními SOCS proteiny byl využit nepárový t test.

Expese proteinu IRF9 vztažená na GAPDH byla vytvořena ze 4 vzájemně nezávislých opakování. Pro statistickou analýzu byl využit t test.

Data získaná z qPCR byla analyzována v GraphPad Prism 6. Pro analýzu dat získaných ze vzorků buněčné linie HT1080 s inducibilní expresí RhoA byl použit párový oboustranný t test, analyzovala se data minimálně ze 3 biologicky nezávislých opakování. Pro data buněčné linie WM3629 byl využitý test one-way ANOVA, analyzovala se data minimálně ze 3 biologicky nezávislých opakování.

Pro analýzu dat invazivity sféroidů melanomových linií byl využit GraphPad Prism 6a test one-way ANOVA. Do analýzy byla zahrnuta data ze 3 biologicky nezávislých opakování. V rámci každého opakování se vyhodnocovala data alespoň ze 4 sféroidů pro každou podmínku.

6. VÝSLEDKY

Moje diplomová práce vychází z předchozích výsledků laboratoře získaných pomocí transkriptomické a proteomické studie mezenchymálně-améboidního přechodu u buněčné linie HT1080 (Čermák, Gandalovičová et al. 2020). Pro studium mezenchymálně-améboidního přechodu bylo využito dvou experimentálních přístupů – indukce exprese konstitutivně aktivního RhoA pomocí doxycyklinu a použití inhibitoru Src kinázy dasatinibu. Přidání dasatinibu, nebo zvýšená exprese RhoA vedou u linie HT1080 k mezenchymálně-améboidnímu přechodu u více než 90 % buněk (**Fig. 5**). Výzkum se zaměřil také na to, které geny jsou více exprimovány v buňkách s améboidní morfologií. Ukázalo se, že v buňkách linie HT1080 s inducibilním RhoA i v buňkách linie HT1080 kultivovaných s dasatinibem je upregulovaná řada takových stejných genů, které naznačují, že améboidní buňky mají zvýšenou zánětlivou odpověď.

Pro ověření výsledků byly připraveny nové vzorky a pomocí kvantitativní PCR byla analyzována exprese vybraných genů při přechodu z mezenchymálního na améboidní fenotyp.

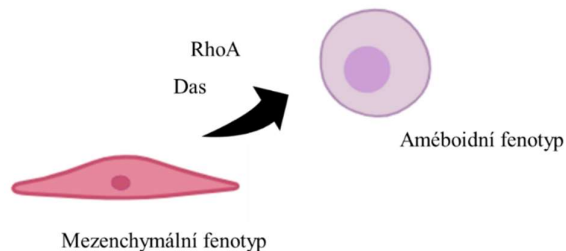


Fig. 5 – Schematické znázornění efektu Dasatinibu a RhoA na fenotyp buněk (vytvořeno pomocí softwaru biorender.com)

Jedním z genů se zvýšenou expresí byl gen pro STAT1, tedy protein, který se účastní signální dráhy spouštěné interferony. Rozhodly jsme se proto otestovat expresi genů IRF9, STAT1, STAT2 a STAT3, které kódují proteiny podílející se na interferonové signalizaci v linii HT1080 s indukovatelnou expresí RhoA. Buňky byly po dobu 48 hodin kultivovány v čistém médiu, v médiu s přídavkem doxycyklinu a v médiu s přídavkem dasatinibu a pak byla u daných vzorků pomocí qPCR testována exprese našich cílových genů (pozn. vzorky připravil Mgr. Ladislav Merta). Jako kontrolu jsme využily geny pro GAPDH a EIF4h. Očekávaly jsme, že u vzorků buněk, které byly kultivovány s přídavkem doxycyklinu nebo dasatinibu bude vyšší exprese

genů pro IRF9, STAT1, STAT2 i STAT3 oproti vzorkům buněk kultivovaných v čistém médiu (**Fig. 6**).

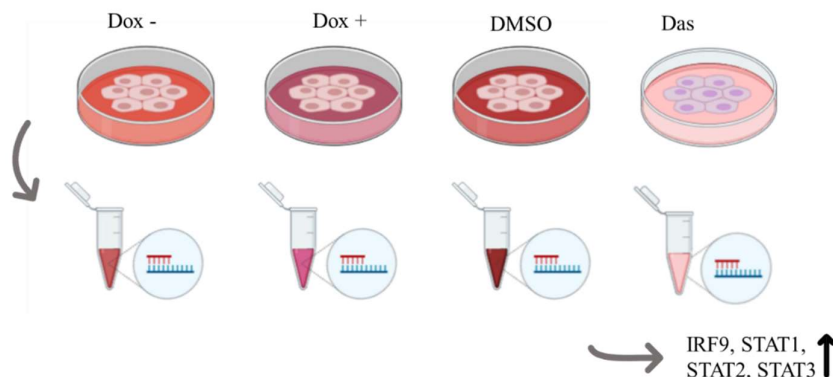


Fig. 6 – Schematické znázornění očekávaných výsledků qPCR u buněčné line HT1080 s inducibilní expresí RhoA (vytvořeno pomocí softwaru biorender.com)

K dispozici jsme měly 4 biologická opakování od každé dvojice vzorků (čisté médium, médium s přidavkem dané látky), u vzorků s doxycyklinem bylo vyřazeno první opakování, protože vzorky byly špatně připraveny. Celkově výsledky vyšly podle očekávání – u vzorků z buněk kultivovaných s přidavkem doxycyklinu nebo dasatinibu byla zvýšená exprese genů pro IRF9, STAT1, STAT2 i STAT3 oproti kontrolnímu vzorku z buněk kultivovaných v čistém médiu (**Fig. 7**), největší nárůst exprese byl u genu pro STAT1. Výsledky jsou statisticky signifikantní.

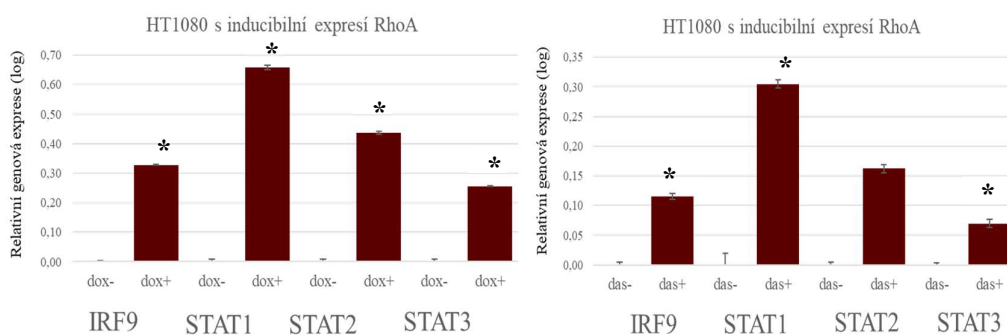


Fig. 7 – Grafické znázornění výsledků qPCR pro linii HT1080 s inducibilní expresí RhoA; na levém grafu jsou znázorněny exprese genů před přidáním a po přidání doxycyklinu, data jsou průměrem ze 3 opakování, na pravém grafu exprese

genů před přidáním a po přidání dasatinibu, data jsou průměrem ze 4 opakování, p-hodnoty: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

6.1. Vliv IFN β na morfologii buněk

Vzhledem ke zjištěné zvýšené expresi genů souvisejících s interferonovou signalizací při mesenchymálně- améboidním přechodu jsme se rozhodly studovat souvislost přechodu a interferonové signalizace podrobněji. Moje kolegyně Mgr. Aneta Gandalovičová zároveň pozorovala, že u melanomových buněk dochází k přechodu od mesenchymální k améboidní morfologii, pokud jsou vystaveny působení interferonů. Do kultivačního média buněk melanomové smíšené linie WM3629 byly nejprve na dobu 48 hodin přidány interferony prvního (IFN β , IFN ω) a druhého typu (IFN γ). Poté jsme buňky melanomové smíšené linie WM3629 vysadily do kolagenu a k převrstvovacímu médiu jsme přidaly dané interferony. Po inkubaci trvající 48 hodin jsme vyhodnocovaly morfologie buněk. Při inkubaci s IFN β došlo u buněk oproti kontrole k nárůstu zastoupení améboidního fenotypu o 33 procent. Pokud byly buňky inkubovány s druhým zástupcem interferonů prvního typu – tedy IFN ω , k žádné změně morfologie nedošlo. Inkubace s IFN γ naopak vedla k vyššímu zastoupení buněk s mesenchymální morfologií (Fig. 8).

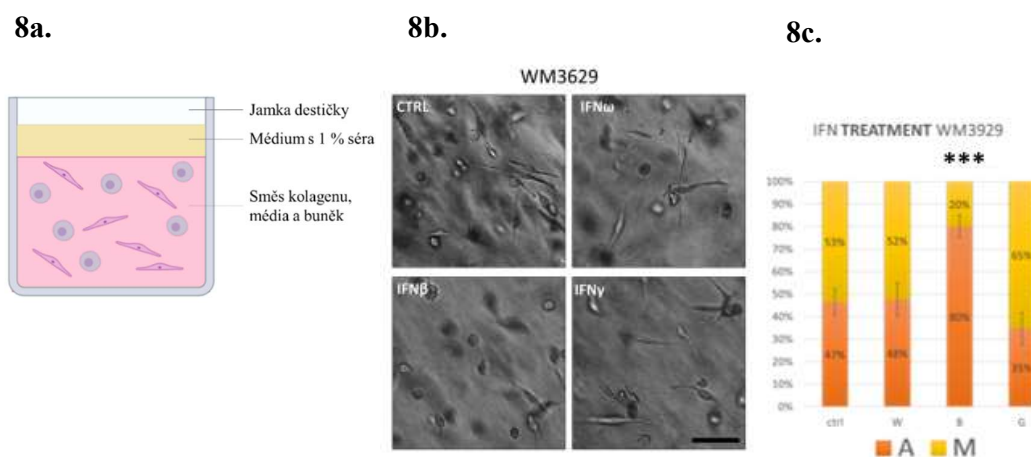


Fig. 8 – Morfologie ve 3D kolagenu linie u buněk WM3629 po stimulaci interferony; 8a. Schematické znázornění buněk v kolagenu; **8b.** Buňky byly inkubovány v inkubátoru 48 h. CTRL – kontrola, nad kolagenem bylo čisté převrstvovací médium. V ostatních jamkách byly přidány interferony (v koncentraci 10 ng/ml), scale bar = 100 μ m; **8c.** Zastoupení dvou typů fenotypu v procentech. A –

améboidní, M – mezenchymální, W – IFN ω , B – IFN β , G – IFN γ , p-hodnoty: *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

Došli jsme tedy k závěru, že pozorovaný efekt, tedy vyvolání mezenchymálně améboidního přechodu by mohl být specifický pro IFN β . Otestovaly jsme proto efekt inkubace s IFN β i na dalších buněčných liniích, a ověřily, že pozorovaný efekt není omezený na buněčnou linii WM3629 (**Fig. 9**).

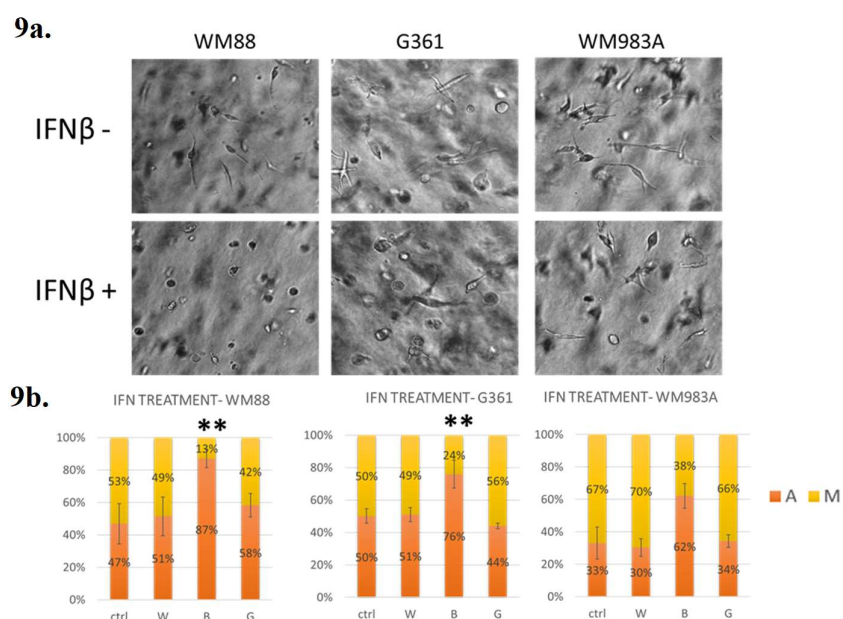


Fig. 9 – Morfologie ve 3D kolagenu u vybraných buněčných linií; 9a.

Buňky byly inkubovány v inkubátoru 48 h. CTRL – kontrola, nad kolagenem bylo čisté převrstvovací médium. Ve spodní řadě obrázků byl přidán IFN β (v koncentraci 10 ng/ml); **9b.** Zastoupení dvou typů fenotypu v procentech u linií WM88, G361, WM983A. A – améboidní, M – mezenchymální, W – IFN ω , B – IFN β , G – IFN γ , grafy jsou vytvořeny po zprůměrování výsledků tří biologických opakování, p-hodnoty: *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

Pro další experimenty jsme se na základě mých výsledků a výsledků Mgr. Anety Gandalovičové rozhodly použít lidské melanomové linie WM3629 a G361.

6.2. Ověřování aktivace signalizace přes IFN β v améboidních melanomových buňkách na úrovni proteinů a mRNA

Zajímalo nás, proč se odpověď buněk na jednotlivé interferony liší. Rozhodly jsme se proto detekovat hladiny proteinů STAT1, STAT2, STAT3 (fosforyovaných i nefosforyovaných forem) pomocí western blotu.

Buňky linie WM3629 jsme nejdřív inkubovaly po dobu 48 hodin ve 3D prostředí kolagenu s přidanými interferony (celkem jsme měly 3 podmínky – IFN β , IFN ω a IFN γ a jednu kontrolu) a pak z nich pomocí lyzačního roztoku vyrobily proteinové lyzáty, které jsme nanesly na 10 % gel a rozdělené proteiny jsme poté detekovaly (**Fig. 10**). Nejvyšší exprese proteinů STAT1, STAT2 a hladina fosforylované formy STAT2 byla ve vzorku buněk, inkubovaných s IFN β . Nejvyšší hladina fosforylované formy proteinu STAT1 byla u buněk inkubovaných s IFN γ , hladiny STAT3 a p-STAT3 byly srovnatelné napříč všemi vzorky. Jako kontrolu nanášky vzorků jsme využily protein GAPDH, na jehož koncentracích je vidět, že vzorky byly nanесeny rovnoměrně a nezkrslují tak výsledky. Rozhodly jsme se také ověřit si tyto výsledky pomocí kvantitativní PCR, kterou provedl Mgr. Ladislav Merta. Data opět ukázala, že nejvyšší hladina mRNA pro STAT1 a STAT2 je v buňkách inkubovaných s IFN β . Výsledky jsou signifikantní.

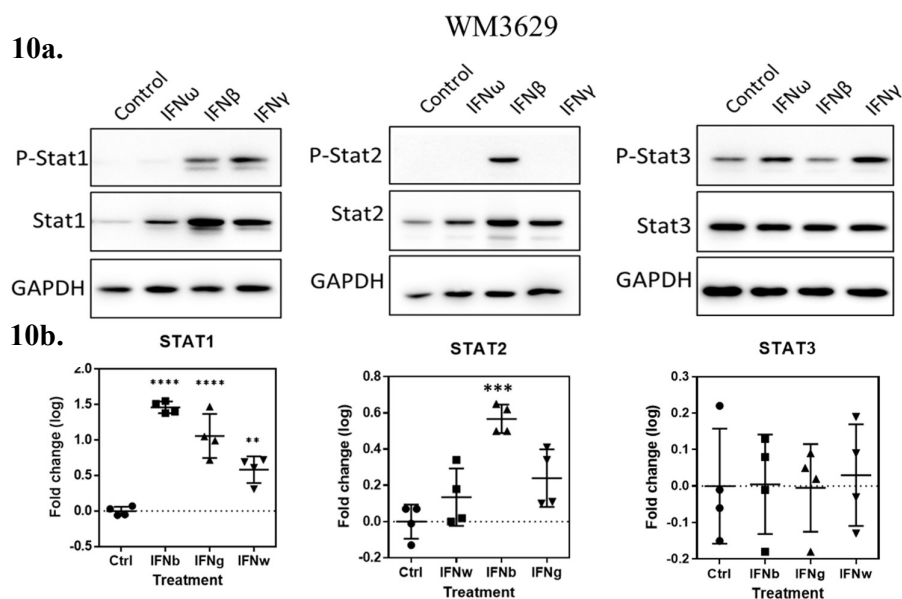
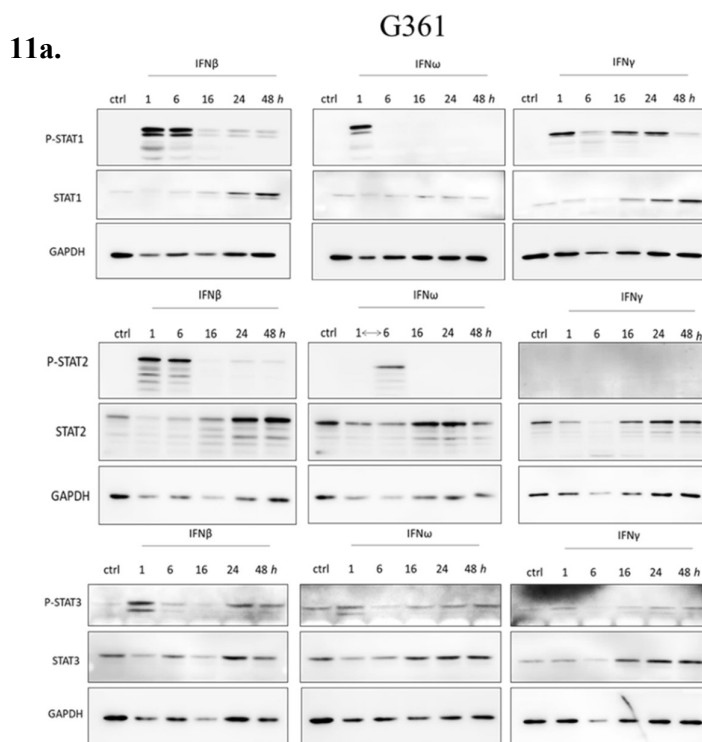


Fig. 10 – Ověření aktivace interferonové signalizace v melanomových buňkách na úrovni proteinů a exprese mRNA; 10a. Western

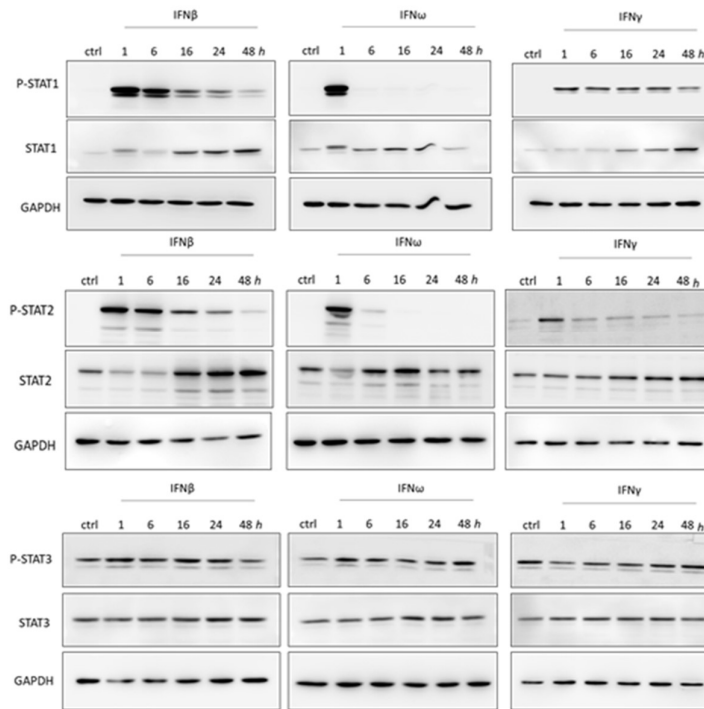
bloty pro buněčnou linii WM3629 po stimulaci interferony IFN β , IFN ω a IFN γ po dobu 48 h ve 3D podmínkách, detekovaly jsme proteiny p-STAT1, p-STAT2, p-STAT3, STAT1, STAT2, STAT3, jako kontrolu nanášky jsme použily protein GAPDH; **10b.** Výsledky qPCR pro buněčnou linii WM3629 po stimulaci interferony IFN β , IFN ω a IFN γ po dobu 48 h ve 3D podmínkách, stanovovaná byla exprese mRNA pro STAT1, STAT2 a STAT3, p-hodnoty: *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

Pro podrobnější analýzu signalizace jsme se rozhodly podívat se i na časový průběh signalizace na úrovni proteinů STAT1, STAT2 a STAT3. Připravily jsme si proto proteinové lyzáty z buněk kultivovaných s interferony (IFN β , IFN ω , IFN γ – pozn. jako druhého zástupce interferonů prvního typu jsme vybraly interferon omega protože interferon alfa má několik poddruhů a také proto, že interferon omega jsme již měli zakoupený v laboratoři) v různých časových intervalech (1h, 6h, 16h, 24h, 48h) a pomocí western blotu jsme detekovaly cílové proteiny v daném čase (**Fig. 11**).



11b.

WM3629



11c.

WM3629

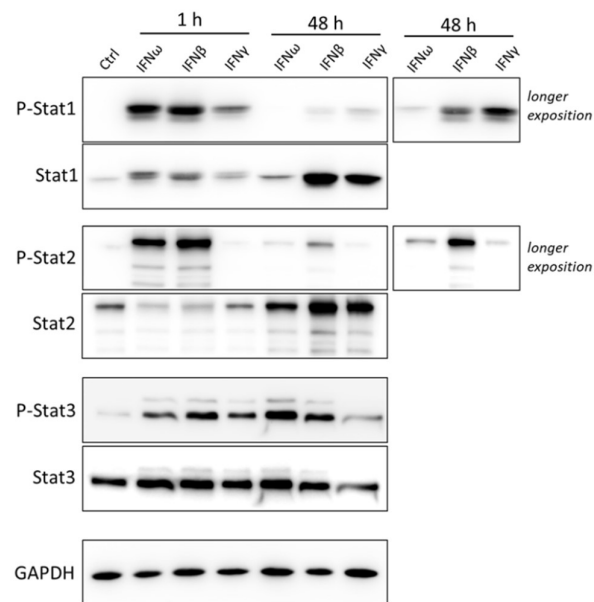


Fig. 11 – Western bloty z analýzy časového průběhu interferonové signalizace v melanomových buňkách; 11a. Western bloty pro buněčnou linii G361 po stimulaci interferony IFN β , IFN ω a IFN γ v časových intervalech 1, 6, 16, 24 a 48 hodin; **11b.** Western bloty pro buněčnou linii WM3629 po stimulaci interferony IFN β ,

IFN ω a IFN γ v časových intervalech 1, 6, 16, 24 a 48 hodin; **11c.** Western bloty pro buněčnou linii WM3629 po stimulaci interferony IFN β , IFN ω a IFN γ v intervalech 1h a 48h, u p-STAT1 a p-STAT2 byla nastavena vyšší expozice pro vzorky inkubované po dobu 48h; U obou linií jsme detekovaly proteiny p-STAT1, p-STAT2, p-STAT3, STAT1, STAT2, STAT3, jako kontrolu nanášky jsme použily protein GAPDH

Na western blotech buněčné linie G361 můžeme po stimulaci IFN β pozorovat krátkodobý nárůst koncentrace fosforylovaných proteinů STAT1 a STAT2, který v čase mezi 6 a 16 hodinou končí, a stoupá množství nefosforylovaných forem proteinů. Signalizace spuštěná inkubací buněk s IFN β vede k nárůstu nejen fosforylovaných forem Stat1 a Stat2, ale i k akumulaci jejich celkového množství, což je typické pro pozdní odpověď. Stejně výsledky jsme získaly i u linie WM3629.

Pro přehlednost jsme pokus se vzorky buněčné linie WM3629 zopakovaly i v jiném uspořádání, tak abychom ukázaly rozdíl v krátkodobé a dlouhodobé aktivaci jednotlivých proteinů. Na základě analýzy časového průběhu aktivace interferonové signalizace v uvedených předchozích experimentech jsme si potvrdily, že pozorovaný efekt na morfologii melanomových buněk je specifický pro IFN β . Rozhodly jsme se proto zjistit, jaké signální mechanismy jsou za pozorovaný efekt IFN β zodpovědné.

Na základě uvedených výsledků a dostupné literatury jsme usoudily, že pozorovaný efekt IFN β na morfologii melanomových buněk může být zprostředkován heterodimerem proteinů STAT1-STAT2, který se váže s proteinem IRF9 a tvoří komplex ISGF3, který následně translokuje do jádra. Rozhodly jsme se tedy tuto hypotézu ověřit pomocí detekce IRF9 v buňkách stimulovaných IFN β . Znovu jsme proto udělaly western blot a qPCR a ve shodě s naší hypotézou jsme zjistily, že koncentrace proteinu IRF9, stejně jako exprese mRNA pro IRF9 je nejvyšší u buněk stimulovaných IFN β (**Fig. 12**).

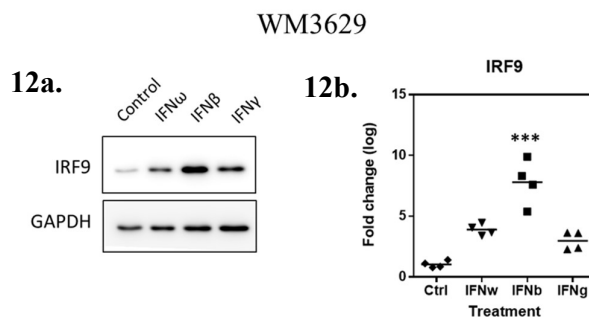


Fig. 12 – Detekce proteinu a mRNA pro IRF9 v melanomových buňkách;
12a. Western bloty pro buněčnou linii WM3629 po stimulaci interferony IFN β , IFN ω a IFN γ po dobu 48 h, detekovaly jsme protein IRF9, jako kontrolu nanášky jsme použily protein GAPDH; **12b.** Výsledky qPCR pro buněčnou linii WM3629 po stimulaci interferony IFN β , IFN ω a IFN γ po dobu 48 h, stanovovaná byla genová exprese proteinu IRF9, p-hodnoty: *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

6.3. Ověření důležitosti signalizace přes IFN β pro morfologii melanomových buněk

Následně jsme se rozhodli testovat, zda uvedená signální dráha hraje roli v mesenchymálně-améboidním přechodu, indukovaném IFN β . Nejprve jsme plánovaly testovat, jak se změní morfologie melanomových buněk po umlčení exprese genů pro klíčové proteiny interferonové signalizace. Vypnout expresi genů pro STAT1 ani STAT2 by nemuselo být účinné, protože při signalizaci IFN β mohou vznikat i jiné heterodimery nebo homodimery a STAT proteiny se mohou v některých případech vzájemně nahrazovat. Prvním cílem proto bylo pomocí RNA-interference, konkrétně pomocí siRNA eliminovat expresi celého heterodimeru STAT1-STAT2. To se nám ale bohužel nepovedlo, protože pokus se nedařilo optimalizovat (výsledky tedy nejsou prezentovány).

Poté jsme se proto rozhodly pro eliminaci proteinu IRF9, bez kterého nemůže vznikat komplex ISGF3. K dispozici jsme měly 2 různé siRNA a obě se ukázaly jako účinné u 3 melanomových linií – WM3629, WM88 a G361 (**Fig. 13**). Pouze u linie WM3629 byl ale patrný i efekt na morfologii buněk, oproti kontrolní siRNA pro luciferázu klesl počet buněk s améboidním fenotypem zhruba o 20 procent. U linie WM88 došlo ke snížení viability buněk a u linie G361 nebyla změna morfologie signifikantní.

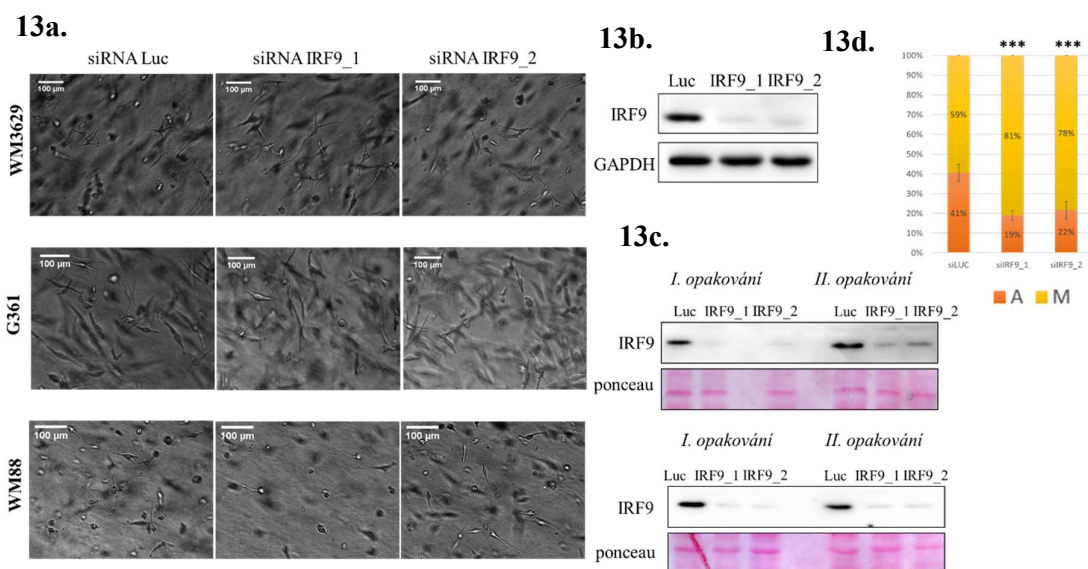


Fig. 13 – Snížení exprese proteinu IRF9 pomocí shRNA v melanomových buněčných liniích; 13a. Morfologie transfekovaných buněk linií WM3629, G361 a WM88 ve 3D v kolagenu, buňky jsou transfekovány siRNA pro Luciferázu, která slouží jako kontrola, siRNA pro IRF9_1 a IRF9_2; **13b.** Western blot pro buněčnou linii WM3629 po transfekci siRNA pro Luciferázu, IRF9_1 a IRF9_2, detekovaly jsme protein IRF9, jako kontrolu nanášky jsme použily protein GAPDH; **13c.** Western bloty pro buněčné linie G361 a WM88 po transfekci siRNA pro Luciferázu, IRF9_1 a IRF9_2 při dvou biologických opakováních, detekovaly jsme protein IRF9, jako kontrolu nanášky jsme využily barvení pomocí Ponceau; **13d.** Zastoupení jednotlivých fenotypů v procentech u linie WM3629 po transfekci siRNA pro Luciferázu, IRF9_1 a IRF9_2, A – améboidní, M – mezenchymální, graf je vytvořen po zprůměrování výsledků tří biologických opakování, p-hodnoty: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Efekt siRNA ale není trvalý a proto jsme nemohly otestovat, jaký vliv by na buňky se sníženou genovou expresí IRF9 měla inkubace s IFN β a tím pádem dále ověřit naši hypotézu, že klíčový je právě komplex ISGF3. Zároveň jsme chtěly otestovat vliv absence IRF9 i na morfologii buněčné linie WM88, pro které se siRNA jeví jako toxické.

Rozhodly jsme se proto vytvořit stabilní buněčnou linii s možností inducibilního snížení exprese genu pro IRF9. Využily jsme inducibilní lentivirový systém, který byl navržen tak, aby buňky přestaly produkovat IRF9 po inkubaci s doxycyklinem a zároveň začaly produkovat červený fluorescenční protein (RFP), což

umožňuje ověření inkorporace dané sekvence do DNA buněk. Navržený plasmid jsme pomocí pakážovacích plasmidů VSVG a Δ RB2 transfekovaly do buněk HEK293. Médiem z těchto buněk jsme pak infikovali naše cílové buňky. Pro snazší optimalizaci celého systému jsme nejprve pracovali s buňkami HT1080, které lze snadněji transfekovat a které rostou rychleji než buňky melanomových linií, což nám umožnilo rychlejší ověření správnosti celého postupu.

Nejdřív jsme testovaly shRNA, kterou nám pomohl vybrat Mgr. Michal Dibus. Cílové buňky HT1080 jsme infikovali přefiltrovaným médiem z transfekovaných buněk HEK293 a po přidání doxycyklinu jsme je vytřídily pomocí průtokové cytometrie a poté nechaly dorůst na misce o průměru 10 cm do plné konfluence. Buňky po přidání doxycyklinu vykazovaly červenou fluorescenci, ale na western blotu bylo snížení exprese proteinu IRF9 jen nepatrné. To se potvrdilo i při druhém opakování pokusu (**Fig. 14**).

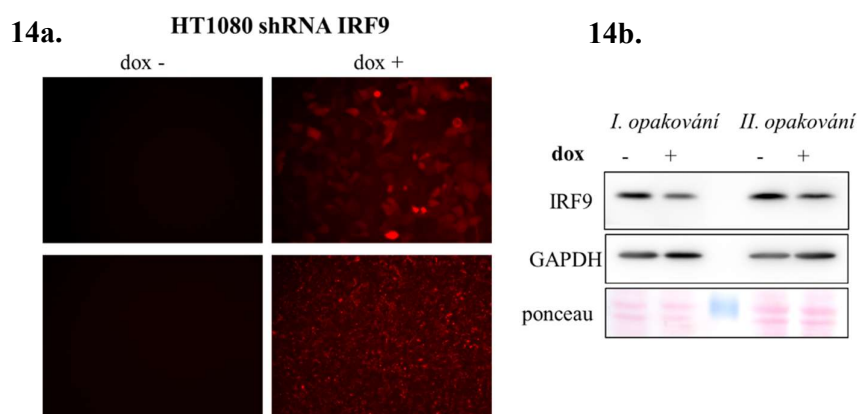


Fig. 14 – První pokus o snížení exprese proteinu IRF9 pomocí shRNA v buňkách HT1080; 14a. Kontrola úspěšné transfekce buněčné linie HT1080 pomocí analýzy fluorescence daných buněk pod fluorescenčním mikroskopem; **14b.** Western bloty pro buněčnou linii HT1080 s indukibilní expresí proteinu IRF9, buňky byly stimulovány doxycyklinem po dobu 24 hodin, detekovaly jsme protein IRF9, pro kontrolu nanášky jsme použily GAPDH a barvení pomocí Ponceau.

Snížení exprese proteinu IRF9 nebylo pro naše další plánované pokusy dostatečné, a tak jsme se rozhodly vyzkoušet jiné shRNA. Mgr. Aneta Gandalovičová proto vybrala dvě jiné shRNA, které jsme se rozhodly otestovat. Postup byl stejný protože transfekce jako taková byla úspěšná a problematická byla jen původní shRNA. Obě nové shRNA jsme testovaly najednou. Pod fluorescenčním mikroskopem svítily

po transfekci pakážovací buňky HEK293 i cílové buňky HT1080. Při použití druhé testované shRNA (označuji ji jako IRF9_2) se nám povedlo snížit expresi proteinu IRF9 na dostatečně nízkou úroveň – pokus jsme proto považovali za úspěšný. První testovaná shRNA (označuji jako IRF9_1) ale podle western blotu zcela zamezila expresi proteinu IRF9 a to i bez přidání doxycyklinu. Výsledky jsme nejprve přisuzovali chybnému zpracování proteinových lyzátů, nebo záměně vzorků. Nicméně experiment vyšel stejně i při druhém opakování (**Fig. 15**).

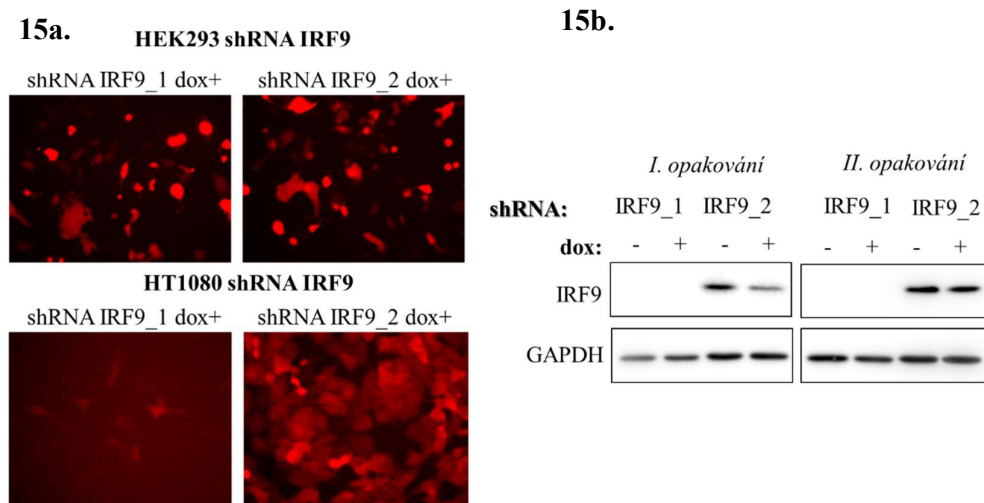


Fig. 15 – Druhý pokus o snížení exprese proteinu IRF9 pomocí shRNA v buňkách HT1080; 15a. Kontrola úspěšné transfekce buněčných linií HEK293 a HT1080 pomocí analýzy fluorescence daných buněk pod fluorescenčním mikroskopem; **15b.** Western bloty pro buněčnou linii HT1080 s inducibilní expresí proteinu IRF9, buňky byly stimulovány doxycyklinem po dobu 24 hodin, detekovaly jsme protein IRF9, pro kontrolu nanášky jsme použily GAPDH.

Zajímalo nás proč buňky transfekované shRNA IRF9_1 přestaly produkovat protein IRF9 bez ohledu na přidání (respektive nepřidání) doxycyklinu do inkubačního média. Provedly jsme proto analýzu morfologie daných buněk. Transfekované buňky linie HT1080 měly úplně jinou morfologii než buňky linie HT1080, které transfekci nepodstoupily i než buňky HT1080 transfekované druhou shRNA (**Fig. 16**).

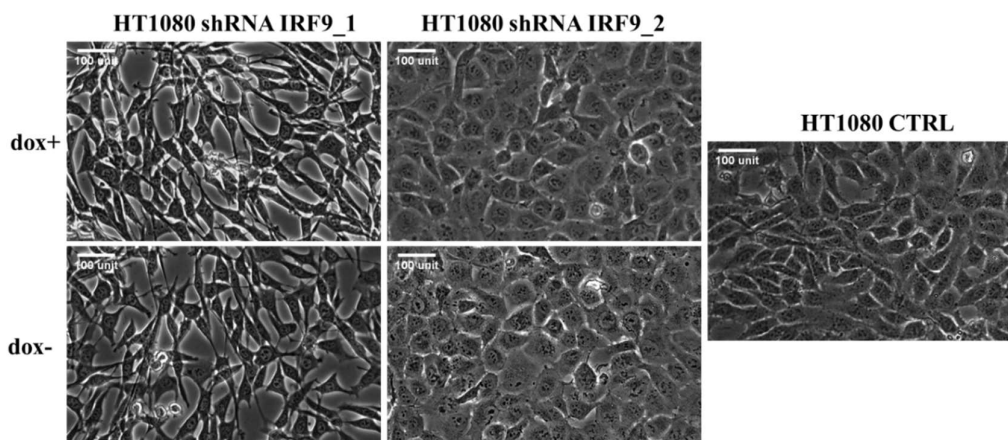


Fig. 16 – Srovnání morfologií buněčné linie HT1080 po transfekci shRNA pro IRF9 a před ní ve 2D; Buňky byly inkubovány buď v čistém kultivačním médiu a nebo s přidaným doxycyklinem, buňky s transfekovanou shRNA pro IRF9_1 mají jinou morfologii než buňky s transfekovanou shRNA pro IRF9_2 nebo buňky bez transfekce a to bez ohledu na to, v jakém médiu byly kultivovány.

Došlo zřejmě k jiné, rozsáhlejší změně DNA daných buněk. Buňky jsme proto dál netestovali a pro transfekci melanomových buněk linie WM3629 jsme vybraly shRNA IRF9_2. Transfekovanou linii WM3629 se nám ale bohužel nikdy nepodařilo kultivovat. Při třídění buněk průtokovou cytometrií jsme vždy získaly jen nepatrné množství buněk, které měly dlouhou dobu zdvojení a vysokou úroveň apoptózy. Bohužel se nám tedy nepovedlo vytvořit stabilní buněčnou linii s inducibilní expresí proteinu IRF9 a nemohly jsme provést další plánované experimenty.

Jak/STAT signalizace je negativně regulována mimo jiné SOCS proteiny. Zajímalo nás, jaký vliv má zvýšená exprese SOCS proteinů na morfologii melanomových nádorových buněk a zda dokáže potlačit efekt IFN β vedoucí k améboidní morfologii buněk. Připravily jsme proto stabilní buněčné linie melanomových buněk WM3629 a G361 s inducibilní expresí SOCS, SOCS3 a zeleného fluorescenčního proteinu EGFP po přidání doxycyklinu.

Inkorporaci sekvence do cílových buněk jsme zkontrolovaly na fluorescenčním mikroskopu. U obou buněčných linií je po indukci exprese SOCS1 i SOCS3 na western blotech patrný pokles množství fosforylovaných proteinů STAT1 a STAT2 a to i po stimulaci buněk pomocí IFN β . Efekt na morfologii buněk byl patrný pouze u

linie WM3629 po indukci exprese proteinu SOCS1 – zvýšil se podíl buněk s mezenchymální morfologií (**Fig. 17**).

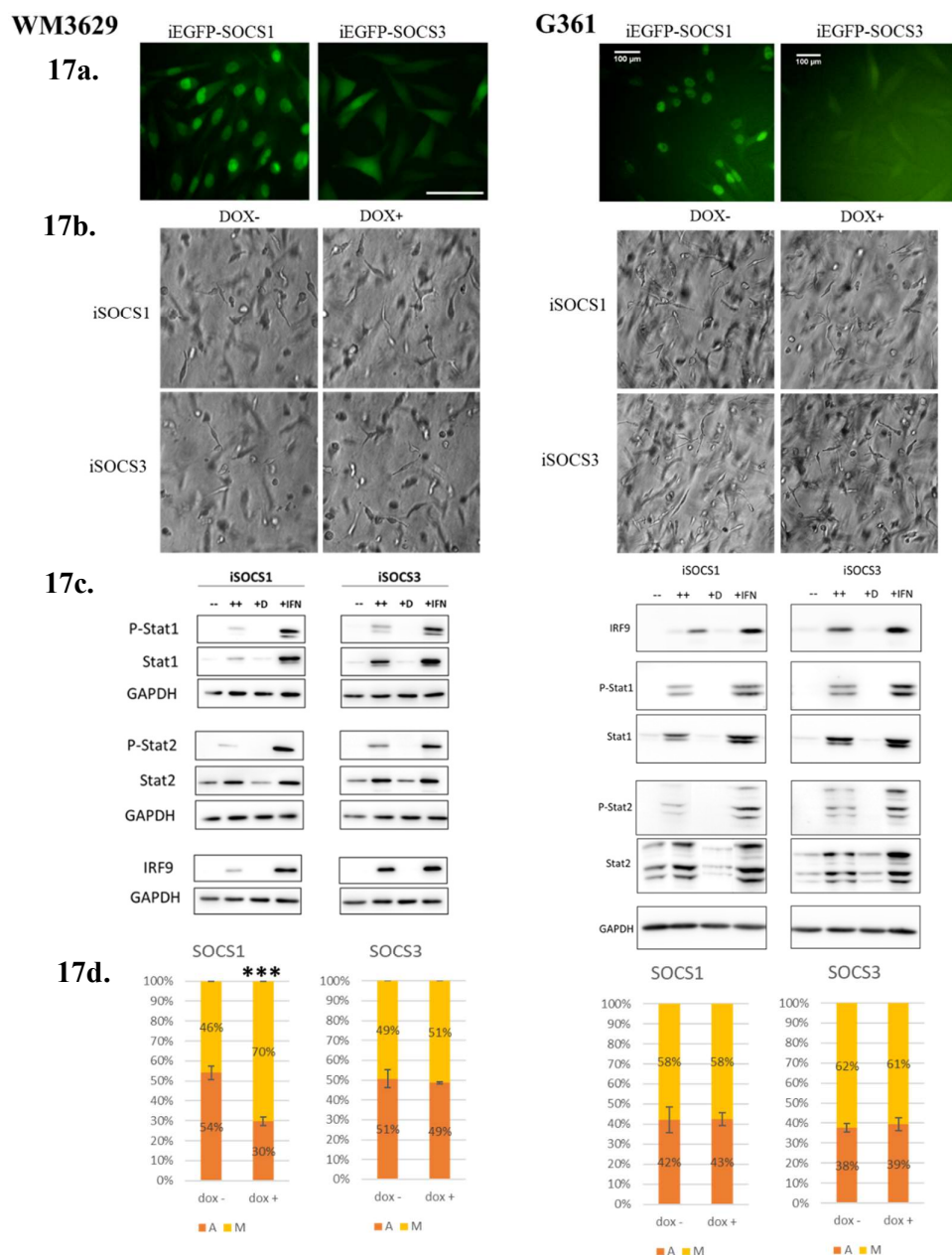


Fig. 17 – Vliv proteinů SOCS1, SOCS3 na morfologii a interferonovou signalizaci u modifikovaných buněčných linií WM3629 a G361; 17a. Kontrola úspěšné transfekce buněčných linií WM3629 a G361 pomocí analýzy fluorescence daných buněk pod fluorescenčním mikroskopem; **17b.** Morfologie transfekovaných buněk linií WM3629, G361 bez a s přidaným doxycyklinem ve 3D v kolagenu; **17c.** Western bloty pro buněčné linie WM3629 iEGFP-SOCS1, WM3629 iEGFP-SOCS3,

G361 iEGFP-SOCS1, G361 iEGFP-SOCS3, buňky byly stimulovány doxycyklinem a IFN β v různých kombinacích po dobu 24 hodin, detekovaly jsme proteiny P-STAT1, STAT1, P-STAT2, STAT2 a IRF9, pro kontrolu nanášky jsme použily GAPDH; **17d**. Zastoupení jednotlivých fenotypů v procentech u linií WM3629 iSOCS1, WM3629 iSOCS3, G361 iSOCS1, G361 iSOCS3, A – améboidní, M – mezenchymální, graf je vytvořen po zprůměrování výsledků tří biologických opakování, p-hodnoty: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

6.4. Ověření důležitosti signalizace přes IFN β pro invazivitu melanomových buněk

Pro ověření důležitosti signalizace přes IFN β pro invazivitu melanomových buněk jsme vytvořily buněčné sféroidy, které svým uspořádáním částečně imitují nádory.

Z buněk byly vytvořeny sféroidy a ty byly kultivovány po dobu 48 hodin v čistém médiu a nebo v médiu s přidaným IFN β . Poté byly sféroidy přeneseny do kolagenu a vyfoceny. Po inkubaci (buď 48 hodin nebo 96 hodin) byly znovu vyfoceny a zanalyzovány. Sféroidy jsme vytvořily ze 4 různých melanomových linií – G361, WM3629, WM88 a WM983A. Analyzovaly jsme ale nakonec pouze sféroidy vytvořené z buněčné linie WM3629 a to po 96 hodinách. Sféroidy vytvořené ze zbylých linií se totiž začaly samovolně rozpadat už v průběhu 48 hodin a analyzovat invazivitu by tak bylo bezvýznamné a výsledky by byly zkreslené.

U sféroidů vytvořených z buněčné linie WM3629 se po 96 hodinách inkubace téměř nezměnila celková velikost (area) sféroidu a to ani u sféroidů, které byly předtím kultivovány v médiu s přidaným IFN β . Po 96 hodinách se ale snížila míra „kruhovitosti“ (circularity) sféroidů, které byly vystaveny působení IFN β , což naznačuje, že IFN β podporuje invazivitu nádorových buněk (**Fig.18**).

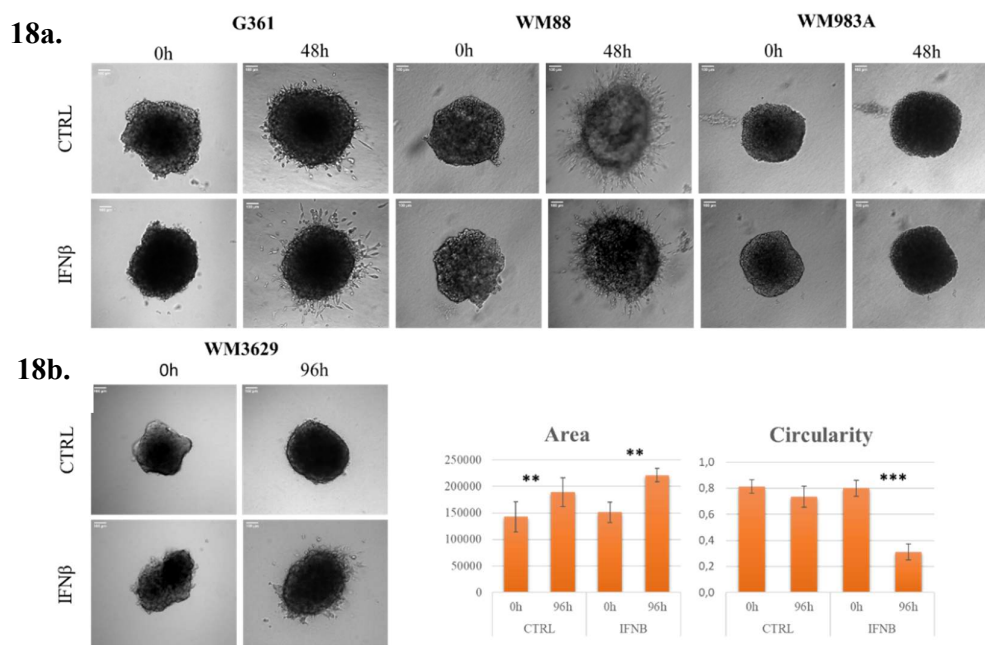


Fig. 18 – Analýza vlivu signalizace přes IFN β na invazitu melanomových buněk linie WM3629; 18a. Sféroidy z buněčných linií G361, WM88 a WM983A po 48 hodinové inkubaci ve 3D prostředí kolagenu; **18b.** Sféroidy z buněčné linie WM3629 po 96 hodinové kultivaci ve 3D prostředí kolagenu a vyhodnocení invazivity, p-hodnoty: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Během všech pokusů jsme do kultivačního média k melanomovým nádorovým buňkám linií G361 a WM3629 přidávaly IFN β . Chtěly jsme proto zjistit, jaká je úroveň exprese proteinů IRF9, STAT1 a STAT2 pokud do kultivačního média buněk IFN β nepřidáváme. Zajímalo nás, jak se exprese těchto proteinů liší pokud jsou buňky kultivované ve 2D prostředí petriho misky a pokud jsou kultivované ve 3D prostředí ve formě sféroidů. Připravily jsme proto proteinové lyzáty z buněk buněčné linie WM3629 kultivovaných ve 2D prostředí a z buněk kultivovaných ve 3D prostředí – v rámci obou podmínek bylo přibližně stejné množství buněk (**Fig.19**).

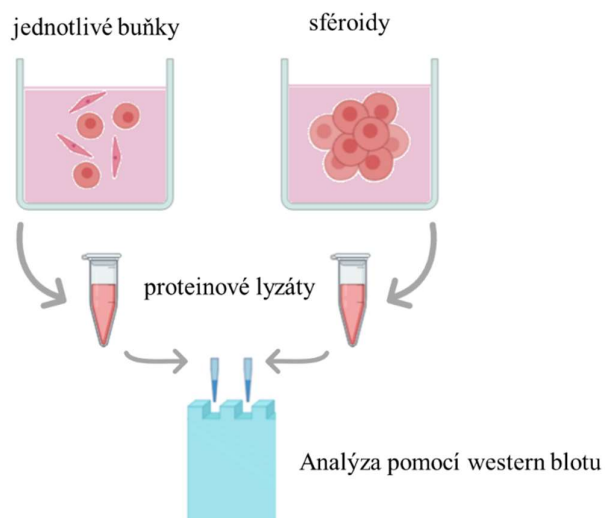


Fig.19 – Schematické znázornění pokusu se sféroidy a 2D buněčnou kulturou, (vytvořeno pomocí softwaru biorender.com)

Množství proteinů IRF9, STAT1, STAT2 jsme určovaly pomocí western blotu. Vzorky se lišily jen v množství proteinu IRF9 (**Fig. 20**). Provedly jsme celkem 4 biologicky nezávislá opakování. Výsledky se mezi jednotlivými opakování nelišily a byly signifikantní. Zvýšená exprese proteinu IRF9 v buňkách kultivovaných ve 3D prostředí sféroidu byla prokázána i u buněk kolorektálního karcinomu (Edsbäcker, Serviss et al. 2019).

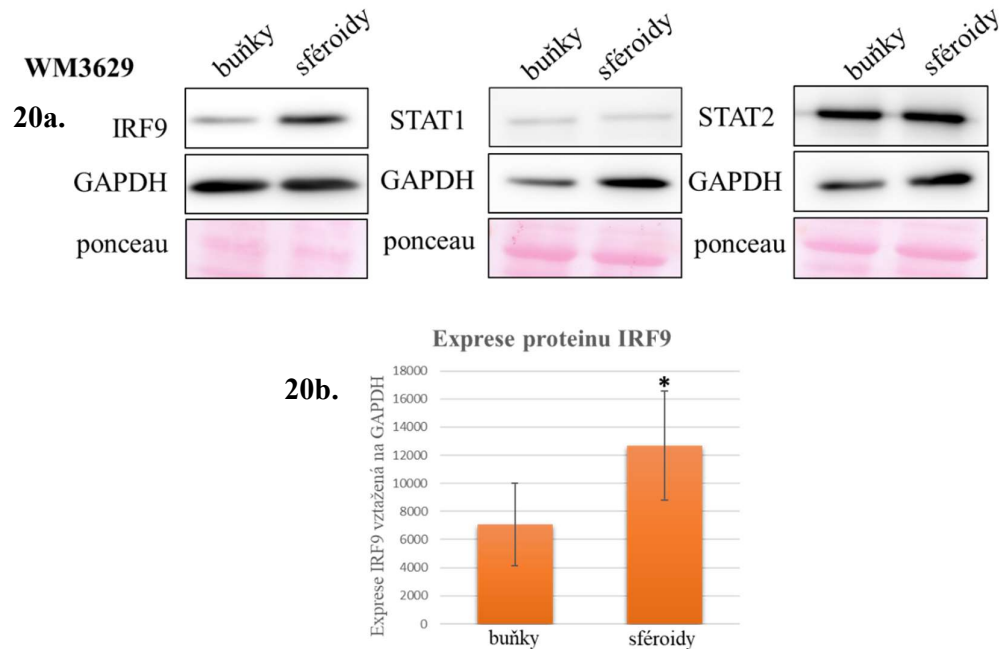


Fig. 20 – Množství proteinů účastnících se interferonové signalizace v melanomových buňkách WM3629 kultivovaných ve 2D a ve 3D prostředí; 20a. Western bloty pro buňky linie WM3629, kultivované ve 2D a 3D prostředí , detekovaly jsme proteiny STAT1, STAT2 a IRF9, pro kontrolu nanášky jsme použily GAPDH a barvivo ponceau; **20b.** Expresa proteinu IRF9 vztažená na GAPDH v buňkách linie WM3629, kultivovaných ve 2D a 3D prostředí, graf ukazuje průměr 4 nezávislých opakování, p-hodnoty: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Z našich výsledků vyplývá, že stimulace lidských melanomových buněk interferonem beta vede k MAT u těchto buněk. Améboidní morfologie je zřejmě indukovaná díky udržování vysoké hladiny komplexu ISFG3, který vzniká po aktivaci Jak/Stat dráhy a je složený z proteinů STAT1, STAT2 a IRF9. Pokud je Jak/Stat dráha zablokována, tak dojde k návratu lidských melanomových buněk k mezenchymální morfologii.

7. DISKUZE

Zánět je jedním z imunologických faktorů, které ovlivňují vznik i progresi nádorových onemocnění. Zánětlivá signalizace ovlivňuje také způsob migrace nádorových buněk. Například cytokinová signalizace přes TGF β (Cantelli, Orgaz et al. 2015) nebo signalizace IL-6 přes Jak1 a Stat3 (Sanz-Moreno, Gaggioli et al. 2011) vedou ke zvýšenému zastoupení améboidního fenotypu u melanomových buněk. Přesná role jednotlivých komponent podílejících se na zánětlivé signalizaci v ovlivňování fenotypu a chování nádorových buněk zatím není zcela prozkoumána.

Naše výsledky ukazují, že interferonová signalizace spuštěná stimulací melanomových lidských buněk linií WM3629, WM88, WM983A a G361 interferonem β posouvá buňky směrem k améboidní morfologii (**Fig. 8, 9**). Stimulace melanomových buněk IFN β navíc vede k akumulaci nefosforylovaných forem proteinů STAT1 a STAT2 (**Fig. 10, 11**), což v důsledku udržuje zánětlivou signalizaci (Michalska, Blaszczyk et al. 2018). IFN β zároveň u buněčné linie WM3629 ovlivňuje i invazivitu a migraci z místa primárního nádoru do sekundárního nádorového ložiska (**Fig. 18**). U linie G361 se nám tento efekt bohužel potvrdit nepodařilo. Sféroidy vytvořené z buněk linie G361, které měly simulovat nádor se samovolně rozpadaly a nebylo tak možné určit, jaký vliv má jejich inkubace s IFN β .

Vliv IFN β na morfologii a invazivitu melanomových buněk je zprostředkován zřejmě díky udržování velkého množství komplexu ISGF3, který je složený z heterodimeru STAT1 a STAT2 a z proteinu IRF9. Komplex ISGF3 se přemísťuje do jádra buněk a váže se na regulační sekvenci ISRE a tím pádem přímo aktivuje transkripci ISG.

Klíčovou roli komplexu ISGF3 jsme se rozhodly ověřit utlumením exprese jeho jednotlivých složek. Testovaly jsme celkem 3 různé přístupy – dočasné omezení exprese klíčových proteinů pomocí siRNA, trvalé omezení exprese klíčových proteinů pomocí shRNA a regulace Jak/STAT dráhy pomocí SOCS proteinů. Pomocí siRNA se podařilo snížit expresi proteinu IRF9 v buňkách linií WM3629, WM88, G361. Efekt poklesu exprese IRF9 na morfologii byl ale signifikantní jen u buněčné linie WM3629. U buněk došlo k zablokování MAT a zvýšil se podíl buněk s mezenchymálním fenotypem (**Fig. 13**). Pokusy s shRNA proti proteinu IRF9 byly úspěšné jen částečně. Podařilo se nám vytvořit stabilní linie buněk, které po indukci

doxycyklinem přestaly produkovat protein IRF9 (**Fig. 15**) ale linii se nám nedařilo dál kultivovat a další pokusy jsme s ní proto nedělaly. Regulace dráhy pomocí vytvoření stabilní linie melanomových buněk WM3629 a G361 s inducibilní expresí proteinů SOCS1 a SOCS3 ukázala že efekt na morfologii buněk je jen u linie WM3629 s inducibilní expresí proteinu SOCS1. U těchto buněk došlo ke zvýšení podílu buněk s mezenchymální morfologií. Proč stejným způsobem neovlivňuje morfologii buněk i protein SOCS3 zatím jasné není. Působení proteinů SOCS1 a SOCS3 se u linie WM3629 nicméně liší ve vlivu na množství proteinů STAT1 a IRF9. Pouze protein SOCS1 jejich množství v buňkách snižuje (**Fig. 17**). Z výsledků je patrné, že množství komplexu ISGF3 a tím pádem i jeho jednotlivých komponent se tak podílí na regulaci migračního fenotypu melanomových buněk.

Role IFN β v rozvoji nádorů není zcela jednoznačná – na jednu stranu je spojován s protinádorovým působením protože vede k nižší proliferaci buněk (**shrnutí Medrano** (Medrano, Hunger et al. 2017)), na stranu druhou zřejmě působí jako pro-tumorigenní faktor ve fibromatóze (Tjandra, Hsu et al. 2007). Rostoucí množství publikací navíc poukazuje na to, že upregulace interferonové signalizace v nádorových buňkách může vést k rezistenci nádorových buněk na léčbu. Například proteiny STAT1, STAT2 a IRF9 aktivované signalizací IFN β vedou k rezistenci nádorových buněk vůči poškození DNA a virové infekci (Cheon, Holvey-Bates et al. 2013).

Nejednoznačná je i role proteinu STAT1 v nádorové progresi. Ten podle studií v některých typech nádorů funguje jako tumor-supresor a v jiných jako tumor-promotor a například u karcinomu prsu nebo leukémie byly ukázány oba efekty v závislosti na genetických faktorech a faktorech prostředí, které působily na dané pacienty (**shrnutí Zhang** (Zhang and Liu 2017)). Podílí se na růstu nádorů, metastazování a rezistenci vůči chemoterapii nebo radioterapii.

Jedním z velkých omezení našich experimentů je fakt, že probíhaly v podmínkách *in vitro* na vysoce zjednodušených modelech, které nereflektují komplexitu nádorového mikroprostředí. Interferon β jsme k melanomovým buňkám přidávaly uměle. Důležité tedy bude zjistit v jakých kontextech a koncentracích se IFN β reálně vyskytuje v nádorovém mikroprostředí melanomů.

Nádory se musí v těle vypořádat s celou řadou překážek, které buňkám nádoru způsobují neustálý stres. Nedostatek kyslíku, nedostatečné a chaotické

prokrvení nádorů, nedostatečný přísun živin, poškození DNA vlivem chemoterapie a další účinky různých typů protinádorové léčby. Všechny tyto faktory, které na nádorové buňky kontinuálně působí vedou ke zvýšení signalizace spojené se stresem, což vede k tomu, že buňky produkují a sekretují řadu molekul včetně IFN β (Cheon, Borden et al. 2014). V recentní publikaci bylo prokázáno, že epitelální buňky, které jsou ve stresujících podmínkách v hypoxickém prostředí, mění svůj způsob migrace z kolektivní migrace na migraci individuální s améboidní morfologií (Lehmann, Te Boekhorst et al. 2017). Což opět naznačuje, že pokud jsou nádorové buňky ve stresovém prostředí, tak u nich dochází k řadě změn, které mohou vést k změně migrační strategie, díky které se jim podaří uniknout ze stresovaného (například hypoxického) prostředí do příznivějších podmínek.

Exprese IFN β může být zvýšená v rámci interakcí v nádorového mikroprostředí. Při kontaktu fibroblastů asociovaných s nádory (CAFs) s nádorovými buňkami dochází k transferu dvouvláknové DNA (dsDNA) z nádorových buněk do CAFs. Tato dsDNA pak přes cGAS-STING spouští expresi IFN β v CAFs (Iriarte, Arwert et al. 2018). Exprese IFN β pak může vést ke tvorbě komplexu ISGF3 a v důsledku k migraci nádorových buněk v améboidním módu.

Zvýšená exprese proteinu IRF9 byla pozorována u buněk kolorektálního karcinomu kultivovaných ve 3D prostředí sféroиду oproti buňkám kultivovaných ve 2D prostředí na Petriho misce (Edsbäcker, Serviss et al. 2019). Stejný efekt prostředí na expresi proteinu IRF9 jsme ukázaly i na melanomových buňkách linie WM3629 (**Fig. 20**).

Pokud jsou proteiny IRF9 a STAT2 nadměrně exprimovány v buňkách, které nemají pro svůj růst dostatečně prostoru – typicky v nekoordinovaně proliferující nádorové tkáni, mohou vést k rezistenci vůči chemoterapeutickým látkám (Kolosenko, Fryknäs et al. 2015). Vysoká exprese IRF9 v buňkách karcinomu prsu vedla k rezistenci nádorových buněk na léky cílící na mikrotubuly (Luker, Pica et al. 2001). U buněk adenokarcinomu plic vedla zvýšená exprese IRF9 k vyšší proliferaci i migraci buněk a to v podmínkách *in vitro* i *in vivo* (Brunn, Grimminger et al. 2018), naopak pokud byla exprese proteinu IRF9 snížena pomocí shRNA snížila se i proliferace a migrace nádorových buněk.

IFN β ovlivňuje v nádorovém mikroprostředí i expresi pro-zánětlivých cytokinů – jako je například IL-6. Zvýšení exprese IL-6 v nádorových buňkách může být zprostředkováno kooperací proteinu IRF9, nefosforylovaného STAT2 a NF- κ B (Nan, Wang et al. 2018). IL-6 je jedním ze zásadních cytokinů nádorového mikroprostředí, je nadměrně exprimován téměř u všech typů nádorů.

Podporuje nádorovou progresi řadou různých mechanismů – například podporuje spolu s IL-8 invazivitu nádorových buněk (Jobe, Živicová et al. 2018). Pokud byly receptory pro IL-6 a IL-8 u myšího modelu inhibovány, tak došlo ke snížení exprese proteinů WASF3 a Arp2/3 a ke snížení míry migrace nádorových buněk (Jayatilaka, Tyle et al. 2017). Další práce zase ukázala, že IL-6 může být v nádorovém prostředí produkován i fibroblasty asociovanými s nádory (Jobe, Rösel et al. 2016). Zablokování interleukinů IL-6 a IL-8 pomocí neutralizačních protilátek vedlo k inhibování migrace melanomových buněk. IL-6 se zároveň podílí i na ochraně buněk před apoptózou, poškozením DNA nebo oxidačním stresem (**shrnula Kumari** (Kumari, Dwarakanath et al. 2016). Právě vliv IFN β na expresi IL-6 může vysvětlovat proč mohou být nádory se zvýšenou expresí proteinu IRF9 a nefosforylovaným STAT2 rezistentní vůči léčbě.

IFN β může také pomáhat nádorovým buňkám unikat imunitnímu dohledu. Účastní se totiž v procesech, které zvyšují expresi PD-L1 v glioblastomech (Silginer, Nagy et al. 2017) a buňkách karcinomu plic (Morimoto, Kishida et al. 2018). Ligand PD-L1 interaguje s receptorem PD-1 na povrchu T-lymfocytů a spouští tak inhibiční signál, který zabrání cytotoxické reakci vůči nádorovým buňkám.

Nádorové buňky zřejmě využívají interferonové signalizace jako prostředku, který jim umožní zaujmout améboidní morfologii a pomocí individuální migrace unikají z nepříznivých podmínek daného nádorového mikroprostředí (hypoxie, nedostatek živin...). Je nicméně ještě celá řada věcí, které o vlivu interferonové signalizace v nádorovém mikroprostředí nevíme. Efekt IFN β na morfologii migrujících buněk je nutné prozkoumat na komplexnějších modelech *in vitro* – takovým modelem může být třeba sféroid vyrobený z různých buněčných typů, který by lépe napodobil heterogenní nádorové mikroprostředí. Následně by byl vhodná analýza na dobře charakterizovaných nádorových tkáních z pacientů a experimenty *in vivo*.

8. ZÁVĚR

V rámci mé diplomové práce jsme ověřily hypotézu, že IFN β způsobuje u lidských melanomových buněk mesenchymálně-améboidní přechod a že je tento efekt specifický pro IFN β . Zároveň jsme zjistily, které signální mechanismy jsou za mezenchymálně-améboidní přechod zprostředkovaný IFN β zodpovědné.

Porovnal jsme vlivy vybraných interferonů prvního a druhého typu na několika buněčných liniích odvozených od melanomů. Z výsledků vyplývá, že pouze IFN β posouvá melanomové buňky k améboidní morfologii, tento efekt byl přitom pozorován u vícero buněčných linií. Testovaly jsme také vliv IFN β na invazivitu nádorových buněk pomocí 3D sféroidů. Výsledky byly zatím analyzované pouze pro buněčnou linii WM3629 a ukázaly, že stimulace buněk IFN β podporuje jejich invazivitu z místa primárního nádoru. Signální mechanismy jsme ověřily pomocí několika různých přístupů – například western blotů, qPCR, siRNA.

Zjistily jsme, že vliv IFN β je zprostředkován zřejmě udržováním zvýšené tvorby komplexu ISGF3, který je složený z heterodimeru STAT1 a STAT2 a z proteinu IRF9. Komplex ISGF3 se přemísťuje do jádra buněk a váže se na regulační sekvenci ISRE a tímto způsobem přímo aktivuje transkripci ISG. Ty potom v důsledku způsobují mesenchymálně-améboidní přechod u melanomových buněk.

9. PŘÍLOHY

Tabulka 3 – Důležité informace o různých typech plastiků na kultivaci buněk

Plastik	S [cm²]	V_{kultivačního média} [ml]	Průměrný počet buněk při 100 % konfluenci	V_{lyzačního pufru} [μl]
10 cm miska	55	10	8,8 x 10 ⁶	1000
6 cm miska	21	5	3,2 x 10 ⁶	800
6-jamková destička	9	3	1,2 x 10 ⁶	400
12-jamková destička	4	1,5	0,4 x 10 ⁶	200
24-jamková destička	2	0,5	0,2 x 10 ⁶	100

Tabulka 4 – Objemy jednotlivých složek separačního a zaostřovacího gelu pro SDS elektroforézu (uváděno pro 1 gel)

Separační gel		Zaostřovací gel	
H₂O	4,17 ml	H₂O	3,10 ml
Protogel (30% AA / 0,8 % BIS)	3,33 ml	Protogel (30% AA / 0,8 % BIS)	0,65 ml
4x Tris, SDS (pH=8,8)	2,50 ml	4x Tris, SDS (pH=6,8)	1,25 ml
TEMED	6,7 μl	TEMED	5,0 μl
APS	33,0 μl	APS	25,0 μl

Tabulka 5 – Objemy jednotlivých složek pro buněčnou transfekci

6 cm plastik	médium [μl]	PEI [μl]	shRNA [μl]	Pakážovací plazmidy [μl]
<i>HEK 293</i>	800	5	2,75	psPAX2 / VSVG 1,65 pMD2G / ΔRB2 1,1
<i>Phoenix</i>	800	6,25	6,25	---

Tabulka 6 – Objemy jednotlivých složek pro siRNA transfekci (převzato z manuálu SignaGen Laboratories)

Plastik	V_{kultivačního média} [ml]	V_{transfekčního pufu} [μl]	V_{siRNA} [μl]	V_{transfekčního činidla GenMute} [μl]
10 cm miska	10	800	40	33
6 cm miska	5	300	15	12
6-jamková destička	3	100	5	4
12-jamková destička	1,5	75	3,75	3,3
24-jamková destička	0,5	50	2,5	2

Seznam shRNA sekvencí

IRF9

- Top strand

5' TCGA GAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG AGCACACACTGGCTG
GTGGAGATAGTGAAGCCACAGATGTATCTCCACCAGCCAGTGTGTGCG
TGCCTACTGCCTGG 3'

- Bottom strand

3' AATT CCGAGGCAGTAGGCACGCACACACTGGCTGGTGGAGATACATC
TGTGGCTTCACTATCTCCACCAGCCAGTGTGTGCTCGCTCACTGTCAAC
AGCAATATACCTTC 5'

IRF9_1

- Top Strand

5' TCGA GAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG AACTCAACAAGAGTT
 CTGAATT TAGTGAAGCCACAGATGTAAATTCAGA AACTCTTGTTGAGTGT
 GCCTACTGCCTCGG 3'

- Bottom strand

3' AATT CCGAGGCAGTAGGCACACTCAACAAGAGTTCTGAATTTACATC
 TGTGGCTTCACTA AATTCAGA AACTCTTGTTGAGTT CGCTCACTGTCAAC
 AGCAATATACCTTC 5'

IRF9_2

- Top strand

5' TCGA GAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG CCCTGTCCTCTTTGTG
 ATAATT TAGTGAAGCCACAGATGTAAATTATCACAAAGAGGACAGGTT
 GCCTACTGCCTCGG 3'

- Bottom strand

3' AATT CCGAGGCAGTAGGCAACCTGTCCTCTTTGTGATAATTTACATCT
 GTGGCTTCACTA AATTATCACAAAGAGGACAGGG CGCTCACTGTCAAC
 AGCAATATACCTTC 5'

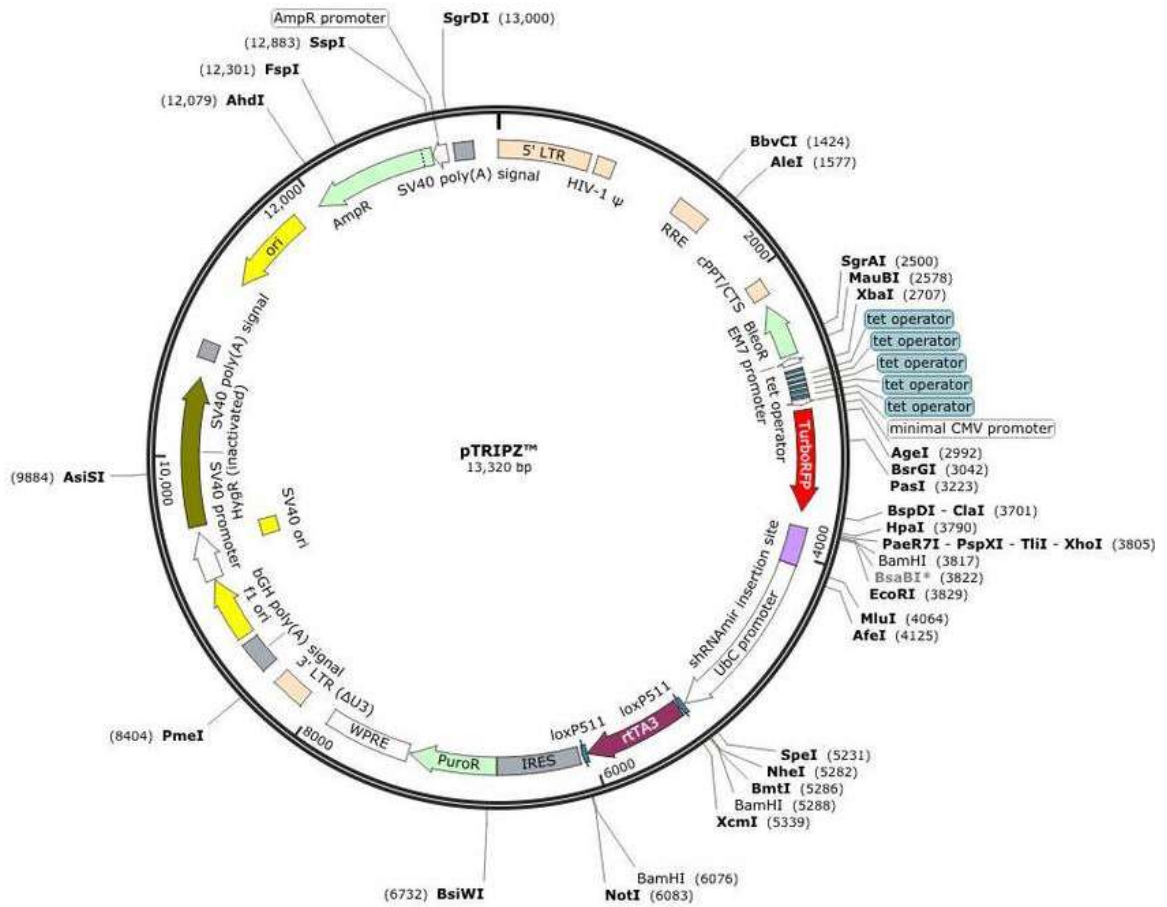
Tabulka 7 – Seznam primerů pro qPCR

Geny	Forward primer	Reverse primer
STAT1	CTGAATTTGCGCACCTGCAAT	GCTCTTCAGTAACGATGAGAGGA
STAT2	GGGACTTTGGTTACCTGACTCT	CAGTTCCTCTGTCCACACCTAGT
STAT3	AGTGTGCATTGACAAAGACTCT G	CGTTGTTGGATTCTTCCATGTTC
IRF9	AGCTCTTCAGAACCGCCTAC	CAGTGTTACCTGGAACCTCGGT
GAPDH	GCATGGACTGTGGTCATGAG	CTGCACCACCAACTGCTTAG
EIF4H	CCTTCTGGCTACGGGAACCAT	CTTCGACACCTACGACGATCG

Vektory pro tvorbu stabilních linií

- Pro tvorbu stabilních linií s inducibilním snížením exprese IRF9 byl využit p-tripz systém

- Použité restrikční enzymy: XhoI, EcoRI



- Pro tvorbu stabilních linií s indukibilní expresí proteinů SOCS1 a SOCS3 byl využit lentivirový systém

- Použité restrikční enzymy: MluI, BamHI

10. POUŽITÁ LITERATURA

- Abdel-Malek, Z., I. Suzuki, A. Tada, S. Im and C. Akcali (1999). "The melanocortin-1 receptor and human pigmentation." Ann N Y Acad Sci **885**: 117-133.
- Abdel-Malek, Z., V. B. Swope, I. Suzuki, C. Akcali, M. D. Harriger, S. T. Boyce, K. Urabe and V. J. Hearing (1995). "Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1789-1793.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison and M. F. Clarke (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-3988.
- Alexander, S., G. E. Koehl, M. Hirschberg, E. K. Geissler and P. Friedl (2008). "Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model." Histochem Cell Biol **130**(6): 1147-1154.
- Amann, K. J. and T. D. Pollard (2001). "The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments." Nat Cell Biol **3**(3): 306-310.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura and K. Kaibuchi (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." J Biol Chem **271**(34): 20246-20249.
- Barker, N., R. A. Ridgway, J. H. van Es, M. van de Wetering, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, A. R. Clarke, O. J. Sansom and H. Clevers (2009). "Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer." Nature **457**(7229): 608-611.
- Bataille, V. (2009). "Early detection of melanoma improves survival." Practitioner **253**(1722): 29-32, 23.
- Becker, A., B. K. Thakur, J. M. Weiss, H. S. Kim, H. Peinado and D. Lyden (2016). "Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis." Cancer Cell **30**(6): 836-848.
- Bonapace, L., M. M. Coissieux, J. Wyckoff, K. D. Mertz, Z. Varga, T. Junt and M. Bentires-Alj (2014). "Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis." Nature **515**(7525): 130-133.
- Brenner, D. R., Y. Ruan, E. Shaw, D. O'Sullivan, A. E. Poirier, E. Heer, P. J. Villeneuve, S. D. Walter, C. M. Friedenreich, L. Smith and P. De (2019). "Age-standardized cancer-incidence trends in Canada, 1971-2015." CMAJ **191**(46): E1262-E1273.
- Brenner, M. and V. J. Hearing (2008). "The protective role of melanin against UV damage in human skin." Photochem Photobiol **84**(3): 539-549.
- Bronsert, P., K. Enderle-Ammour, M. Bader, S. Timme, M. Kuehs, A. Csanadi, G. Kayser, I. Kohler, D. Bausch, J. Hoepfner, U. T. Hopt, T. Keck, E. Stickeler, B. Passlick, O. Schilling, C. P. Reiss, Y. Vashist, T. Brabletz, J. Berger, J. Lotz, J. Olesch, M. Werner and U. F. Wellner (2014). "Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface." J Pathol **234**(3): 410-422.
- Brunn, D., F. Grimminger, W. Seeger and R. Savai (2018). Interferon Regulatory Factor 9 Mediated Regulation of Lung Cancer Progression and Metastasis. A110.

- Novel mechanisms and targets in lung cancer progression, American Thoracic Society: A2687-A2687.
- Brábek, J., C. T. Mierke, D. Rösel, P. Veselý and B. Fabry (2010). "The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion." Cell Commun Signal **8**: 22.
- Bulliard, J. L., B. Cox and J. M. Elwood (1994). "Latitude gradients in melanoma incidence and mortality in the non-Maori population of New Zealand." Cancer Causes Control **5**(3): 234-240.
- Califano, J. and M. Nance (2009). "Malignant melanoma." Facial Plast Surg Clin North Am **17**(3): 337-348.
- Cantelli, G., J. L. Orgaz, I. Rodriguez-Hernandez, P. Karagiannis, O. Maiques, X. Matias-Guiu, F. O. Nestle, R. M. Marti, S. N. Karagiannis and V. Sanz-Moreno (2015). "TGF- β -Induced Transcription Sustains Amoeboid Melanoma Migration and Dissemination." Curr Biol **25**(22): 2899-2914.
- Carr, I., M. Levy and P. Watson (1986). "The invasive edge: invasion in colorectal cancer." Clin Exp Metastasis **4**(2): 129-139.
- Chaffer, C. L. and R. A. Weinberg (2011). "A perspective on cancer cell metastasis." Science **331**(6024): 1559-1564.
- Chao, L. X., S. S. L. Patterson, A. W. Rademaker, D. Liu and R. V. Kundu (2017). "Melanoma Perception in People of Color: A Targeted Educational Intervention." Am J Clin Dermatol **18**(3): 419-427.
- Charras, G. and E. Paluch (2008). "Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(9): 730-736.
- Cheon, H., E. C. Borden and G. R. Stark (2014). "Interferons and their stimulated genes in the tumor microenvironment." Semin Oncol **41**(2): 156-173.
- Cheon, H., E. G. Holvey-Bates, J. W. Schoggins, S. Forster, P. Hertzog, N. Imanaka, C. M. Rice, M. W. Jackson, D. J. Junk and G. R. Stark (2013). "IFN β -dependent increases in STAT1, STAT2, and IRF9 mediate resistance to viruses and DNA damage." The EMBO journal **32**(20): 2751-2763.
- Choudhury, G. G. (2004). "A linear signal transduction pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase Cepsilon, and MAPK in mesangial cells regulates interferon-gamma-induced STAT1alpha transcriptional activation." J Biol Chem **279**(26): 27399-27409.
- Clarke, M. F., J. E. Dick, P. B. Dirks, C. J. Eaves, C. H. Jamieson, D. L. Jones, J. Visvader, I. L. Weissman and G. M. Wahl (2006). "Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells." Cancer Res **66**(19): 9339-9344.
- Crombie, I. K. (1979). "Variation of melanoma incidence with latitude in North America and Europe." Br J Cancer **40**(5): 774-781.
- Deb, D. K., A. Sassano, F. Lekmine, B. Majchrzak, A. Verma, S. Kambhampati, S. Uddin, A. Rahman, E. N. Fish and L. C. Plataniias (2003). "Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma." J Immunol **171**(1): 267-273.

Dennis, L. K. (1999). "Analysis of the melanoma epidemic, both apparent and real: data from the 1973 through 1994 surveillance, epidemiology, and end results program registry." Arch Dermatol **135**(3): 275-280.

Edsbäcker, E., J. T. Serviss, I. Kolosenko, C. Palm-Apergi, A. De Milito and K. P. Tamm (2019). "STAT3 is activated in multicellular spheroids of colon carcinoma cells and mediates expression of IRF9 and interferon stimulated genes." Scientific Reports **9**(1): 536.

Eide, M. J. and M. A. Weinstock (2005). "Association of UV index, latitude, and melanoma incidence in nonwhite populations--US Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program, 1992 to 2001." Arch Dermatol **141**(4): 477-481.

Elwood, J. M., J. A. Lee, S. D. Walter, T. Mo and A. E. Green (1974). "Relationship of melanoma and other skin cancer mortality to latitude and ultraviolet radiation in the United States and Canada." Int J Epidemiol **3**(4): 325-332.

Everett, M. A., E. Yeagers, R. M. Sayre and R. L. Olson (1966). "Penetration of epidermis by ultraviolet rays." Photochem Photobiol **5**(7): 533-542.

Fasler-Kan, E., A. Pansky, M. Wiederkehr, M. Battegay and M. H. Heim (1998). "Interferon-alpha activates signal transducers and activators of transcription 5 and 6 in Daudi cells." Eur J Biochem **254**(3): 514-519.

Ferlay, J., M. Colombet, I. Soerjomataram, C. Mathers, D. M. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor and F. Bray (2019). "Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods." Int J Cancer **144**(8): 1941-1953.

Filippi, A. R., P. Fava, S. Badellino, C. Astrua, U. Ricardi and P. Quagliano (2016). "Radiotherapy and immune checkpoints inhibitors for advanced melanoma." Radiother Oncol **120**(1): 1-12.

Follain, G., D. Herrmann, S. Harlepp, V. Hyenne, N. Osmani, S. C. Warren, P. Timpson and J. G. Goetz (2019). "Fluids and their mechanics in tumour transit: shaping metastasis." Nat Rev Cancer.

Friedl, P. (2004). "Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 14-23.

Friedl, P., J. Locker, E. Sahai and J. E. Segall (2012). "Classifying collective cancer cell invasion." Nat Cell Biol **14**(8): 777-783.

Friedl, P., K. Maaser, C. E. Klein, B. Niggemann, G. Krohne and K. S. Zänker (1997). "Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins and CD44." Cancer Res **57**(10): 2061-2070.

Friedl, P., P. B. Noble, E. D. Shields and K. S. Zänker (1994). "Locomotor phenotypes of unstimulated CD45RA^{high} and CD45RO^{high} CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in three-dimensional collagen lattices." Immunology **82**(4): 617-624.

Friedl, P., P. B. Noble, P. A. Walton, D. W. Laird, P. J. Chauvin, R. J. Tabah, M. Black and K. S. Zänker (1995). "Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro." Cancer Res **55**(20): 4557-4560.

Friedl, P. and K. Wolf (2009). "Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process." Cancer Metastasis Rev **28**(1-2): 129-135.

- Gandini, S., F. Sera, M. S. Cattaruzza, P. Pasquini, D. Abeni, P. Boyle and C. F. Melchi (2005). "Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi." Eur J Cancer **41**(1): 28-44.
- Gandini, S., F. Sera, M. S. Cattaruzza, P. Pasquini, O. Picconi, P. Boyle and C. F. Melchi (2005). "Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure." Eur J Cancer **41**(1): 45-60.
- Gandini, S., F. Sera, M. S. Cattaruzza, P. Pasquini, R. Zanetti, C. Masini, P. Boyle and C. F. Melchi (2005). "Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors." Eur J Cancer **41**(14): 2040-2059.
- Geiger, T. R. and D. S. Peeper (2009). "Metastasis mechanisms." Biochim Biophys Acta **1796**(2): 293-308.
- Giampieri, S., C. Manning, S. Hooper, L. Jones, C. S. Hill and E. Sahai (2009). "Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility." Nat Cell Biol **11**(11): 1287-1296.
- Giri, A., S. Bajpai, N. Trenton, H. Jayatilaka, G. D. Longmore and D. Wirtz (2013). "The Arp2/3 complex mediates multigeneration dendritic protrusions for efficient 3-dimensional cancer cell migration." FASEB J **27**(10): 4089-4099.
- Greten, F. R. and S. I. Grivennikov (2019). "Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences." Immunity **51**(1): 27-41.
- Grigore, A. D., M. K. Jolly, D. Jia, M. C. Farach-Carson and H. Levine (2016). "Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT." J Clin Med **5**(5).
- Haeger, A., K. Wolf, M. M. Zegers and P. Friedl (2015). "Collective cell migration: guidance principles and hierarchies." Trends Cell Biol **25**(9): 556-566.
- Hagerty, L., D. H. Weitzel, J. Chambers, C. N. Fortner, M. H. Brush, D. Loisel, H. Hosoya and T. A. Haystead (2007). "ROCK1 phosphorylates and activates zipper-interacting protein kinase." J Biol Chem **282**(7): 4884-4893.
- Halaoui, R. and L. McCaffrey (2015). "Rewiring cell polarity signaling in cancer." Oncogene **34**(8): 939-950.
- Hegerfeldt, Y., M. Tusch, E. B. Bröcker and P. Friedl (2002). "Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies." Cancer Res **62**(7): 2125-2130.
- Huttenlocher, A. and A. R. Horwitz (2011). "Integrins in cell migration." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(9): a005074.
- Hüsemann, Y., J. B. Geigl, F. Schubert, P. Musiani, M. Meyer, E. Burghart, G. Forni, R. Eils, T. Fehm, G. Riethmüller and C. A. Klein (2008). "Systemic spread is an early step in breast cancer." Cancer Cell **13**(1): 58-68.
- Iriarte, A., E. Arwert, E. Milford, P. Chakravarty, A. Melcher, K. Harrington and E. Sahai (2018). "1853P Interaction between cancer associated fibroblasts and cancer cells influence immune infiltrate and is modulated by therapeutic agents." Annals of Oncology **29**.

- Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 258-267.
- Isaacs, A., J. Lindenmann and R. C. Valentine (1957). "Virus interference. II. Some properties of interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 268-273.
- Ito, M., T. Nakano, F. Erdodi and D. J. Hartshorne (2004). "Myosin phosphatase: structure, regulation and function." Mol Cell Biochem **259**(1-2): 197-209.
- Jayatilaka, H., P. Tyle, J. J. Chen, M. Kwak, J. Ju, H. J. Kim, J. S. H. Lee, P. H. Wu, D. M. Gilkes, R. Fan and D. Wirtz (2017). "Synergistic IL-6 and IL-8 paracrine signalling pathway infers a strategy to inhibit tumour cell migration." Nat Commun **8**: 15584.
- Jobe, N. P., D. Rösel, B. Dvořánková, O. Kodet, L. Lacina, R. Mateu, K. Smetana and J. Brábek (2016). "Simultaneous blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness." Histochem Cell Biol **146**(2): 205-217.
- Jobe, N. P., V. Živicová, A. Mifková, D. Rösel, B. Dvořánková, O. Kodet, H. Strnad, M. Kolář, A. Šedo, K. Smetana, K. Strnadová, J. Brábek and L. Lacina (2018). "Fibroblasts potentiate melanoma cells in vitro invasiveness induced by UV-irradiated keratinocytes." Histochem Cell Biol **149**(5): 503-516.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.
- Kolosenko, I., M. Fryknäs, S. Forsberg, P. Johnsson, H. Cheon, E. G. Holvey-Bates, E. Edsbäcker, P. Pellegrini, H. Rassoolzadeh, S. Brnjic, R. Larsson, G. R. Stark, D. Grandér, S. Linder, K. P. Tamm and A. De Milito (2015). "Cell crowding induces interferon regulatory factor 9, which confers resistance to chemotherapeutic drugs." Int J Cancer **136**(4): E51-61.
- Kopfstein, L. and G. Christofori (2006). "Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment." Cell Mol Life Sci **63**(4): 449-468.
- Kosary, C. L., S. F. Altekruse, J. Ruhl, R. Lee and L. Dickie (2014). "Clinical and prognostic factors for melanoma of the skin using SEER registries: collaborative stage data collection system, version 1 and version 2." Cancer **120 Suppl 23**: 3807-3814.
- Kristof, A. S., J. Marks-Konczalik, E. Billings and J. Moss (2003). "Stimulation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)-dependent gene transcription by lipopolysaccharide and interferon-gamma is regulated by mammalian target of rapamycin." J Biol Chem **278**(36): 33637-33644.
- Kumari, N., B. S. Dwarakanath, A. Das and A. N. Bhatt (2016). "Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance." Tumour Biol **37**(9): 11553-11572.
- Lamouille, S., J. Xu and R. Derynck (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(3): 178-196.
- Lancaster, H. O. (1956). "Some geographical aspects of the mortality from melanoma in Europeans." Med J Aust **43**(26): 1082-1087.
- Lancaster, H. O. and J. Nelson (1957). "Sunlight as a cause of melanoma; a clinical survey." Med J Aust **44**(14): 452-456.

- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri and J. E. Dick (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-648.
- Lee, J. A. and J. Scotto (1993). "Melanoma: linked temporal and latitude changes in the United States." Cancer Causes Control **4**(5): 413-418.
- Lehmann, S., V. Te Boekhorst, J. Odenthal, R. Bianchi, S. van Helvert, K. Ikenberg, O. Ilina, S. Stoma, J. Xandry, L. Jiang, R. Grenman, M. Rudin and P. Friedl (2017). "Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells." Curr Biol **27**(3): 392-400.
- Lerner, A. B. and J. S. McGuire (1964). "Melanocyte-stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone. Their relation to pigmentation." N Engl J Med **270**: 539-546.
- Li, W. Q., E. Cho, M. A. Weinstock, H. Mashfiq and A. A. Qureshi (2016). "Epidemiological Assessments of Skin Outcomes in the Nurses' Health Studies." Am J Public Health **106**(9): 1677-1683.
- Li, W. Q., A. A. Qureshi, J. Ma, A. M. Goldstein, E. L. Giovannucci, M. J. Stampfer and J. Han (2013). "Personal history of prostate cancer and increased risk of incident melanoma in the United States." J Clin Oncol **31**(35): 4394-4399.
- Linder, S. (2009). "Invadosomes at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 17): 3009-3013.
- Linder, S., C. Wiesner and M. Himmel (2011). "Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 185-211.
- Linos, E., S. M. Swetter, M. G. Cockburn, G. A. Colditz and C. A. Clarke (2009). "Increasing burden of melanoma in the United States." J Invest Dermatol **129**(7): 1666-1674.
- Liu, Q., H. Zhang, X. Jiang, C. Qian, Z. Liu and D. Luo (2017). "Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to "seed and soil" hypothesis." Mol Cancer **16**(1): 176.
- Liu, Y., Y. Gu, Y. Han, Q. Zhang, Z. Jiang, X. Zhang, B. Huang, X. Xu, J. Zheng and X. Cao (2016). "Tumor Exosomal RNAs Promote Lung Pre-metastatic Niche Formation by Activating Alveolar Epithelial TLR3 to Recruit Neutrophils." Cancer Cell **30**(2): 243-256.
- Longo, C., C. Rito, F. Beretti, A. M. Cesinaro, J. Piñeiro-Maceira, S. Seidenari and G. Pellacani (2011). "De novo melanoma and melanoma arising from pre-existing nevus: in vivo morphologic differences as evaluated by confocal microscopy." J Am Acad Dermatol **65**(3): 604-614.
- Lorentzen, A., J. Bamber, A. Sadok, I. Elson-Schwab and C. J. Marshall (2011). "An ezrin-rich, rigid uropod-like structure directs movement of amoeboid blebbing cells." J Cell Sci **124**(Pt 8): 1256-1267.
- Luker, K. E., C. M. Pica, R. D. Schreiber and D. Piwnica-Worms (2001). "Overexpression of IRF9 confers resistance to antimicrotubule agents in breast cancer cells." Cancer Res **61**(17): 6540-6547.

- Macara, I. G. and L. McCaffrey (2013). "Cell polarity in morphogenesis and metastasis." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **368**(1629): 20130012.
- Magnus, K. (1977). "Incidence of malignant melanoma of the skin in the five Nordic countries: significance of solar radiation." Int J Cancer **20**(4): 477-485.
- Malanchi, I., A. Santamaria-Martínez, E. Susanto, H. Peng, H. A. Lehr, J. F. Delaloye and J. Huelsken (2011). "Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization." Nature **481**(7379): 85-89.
- Malmgaard, L. (2004). "Induction and regulation of IFNs during viral infections." J Interferon Cytokine Res **24**(8): 439-454.
- Manning, C. S., S. Hooper and E. A. Sahai (2015). "Intravital imaging of SRF and Notch signalling identifies a key role for EZH2 in invasive melanoma cells." Oncogene **34**(33): 4320-4332.
- Markovic, S. N., L. A. Erickson, R. D. Rao, R. H. Weenig, B. A. Pockaj, A. Bardia, C. M. Vachon, S. E. Schild, R. R. McWilliams, J. L. Hand, S. D. Laman, L. A. Kottschade, W. J. Maples, M. R. Pittelkow, J. S. Pulido, J. D. Cameron, E. T. Creagan and M. S. G. o. t. M. C. C. Center (2007). "Malignant melanoma in the 21st century, part I: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis." Mayo Clin Proc **82**(3): 364-380.
- Martens, M. C., C. Seebode, J. Lehmann and S. Emmert (2018). "Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies: An Update." Anticancer Res **38**(2): 1153-1158.
- Matikainen, S., T. Sareneva, T. Ronni, A. Lehtonen, P. J. Koskinen and I. Julkunen (1999). "Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells." Blood **93**(6): 1980-1991.
- Medrano, R. F. V., A. Hunger, S. A. Mendonça, J. A. M. Barbuto and B. E. Strauss (2017). "Immunomodulatory and antitumor effects of type I interferons and their application in cancer therapy." Oncotarget **8**(41): 71249-71284.
- Michalska, A., K. Blaszczyk, J. Wesoly and H. A. R. Bluysen (2018). "A Positive Feedback Amplifier Circuit That Regulates Interferon (IFN)-Stimulated Gene Expression and Controls Type I and Type II IFN Responses." Front Immunol **9**: 1135.
- Moan, J. and A. Dahlback (1992). "The relationship between skin cancers, solar radiation and ozone depletion." Br J Cancer **65**(6): 916-921.
- Moan, J., M. Grigalavicius, Z. Baturaite, A. Dahlback and A. Juzeniene (2015). "The relationship between UV exposure and incidence of skin cancer." Photodermatol Photoimmunol Photomed **31**(1): 26-35.
- Morimoto, Y., T. Kishida, S. I. Kotani, K. Takayama and O. Mazda (2018). "Interferon- β signal may up-regulate PD-L1 expression through IRF9-dependent and independent pathways in lung cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **507**(1-4): 330-336.
- Nabeshima, K., T. Inoue, Y. Shimao, H. Kataoka and M. Koono (1999). "Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets." Histol Histopathol **14**(4): 1183-1197.

- Nabeshima, K., T. Inoue, Y. Shima, Y. Okada, Y. Itoh, M. Seiki and M. Kono (2000). "Front-cell-specific expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A during cohort migration of colon carcinoma cells induced by hepatocyte growth factor/scatter factor." Cancer Res **60**(13): 3364-3369.
- Nagano, M., D. Hoshino, N. Koshikawa, T. Akizawa and M. Seiki (2012). "Turnover of focal adhesions and cancer cell migration." Int J Cell Biol **2012**: 310616.
- Nair, J. S., C. J. DaFonseca, A. Tjernberg, W. Sun, J. E. Darnell, B. T. Chait and J. J. Zhang (2002). "Requirement of Ca²⁺ and CaMKII for Stat1 Ser-727 phosphorylation in response to IFN-gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 5971-5976.
- Nalbant, P., L. Hodgson, V. Kraynov, A. Touthkine and K. M. Hahn (2004). "Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells." Science **305**(5690): 1615-1619.
- Nan, J., Y. Wang, J. Yang and G. R. Stark (2018). "IRF9 and unphosphorylated STAT2 cooperate with NF-κB to drive IL6 expression." Proceedings of the National Academy of Sciences **115**(15): 3906.
- Nelson, W. J. (2009). "Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(1): a000513.
- Oskarsson, T., S. Acharyya, X. H. Zhang, S. Vanharanta, S. F. Tavazoie, P. G. Morris, R. J. Downey, K. Manova-Todorova, E. Brogi and J. Massagué (2011). "Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs." Nat Med **17**(7): 867-874.
- Padovese, V., G. Franco, M. Valenzano, L. Pecoraro, M. Cammilli and A. Petrelli (2018). "Skin cancer risk assessment in dark skinned immigrants: the role of social determinants and ethnicity." Ethn Health **23**(6): 649-658.
- Paget, S. (1889). "The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889." The Lancet **133**(3421): 571-573.
- Parmar, S. and L. C. Plataniias (2003). "Interferons: mechanisms of action and clinical applications." Curr Opin Oncol **15**(6): 431-439.
- Parsons, J. T., A. R. Horwitz and M. A. Schwartz (2010). "Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 633-643.
- Pestka, S., C. D. Krause and M. R. Walter (2004). "Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors." Immunol Rev **202**: 8-32.
- Petrie, R. J., N. Gavara, R. S. Chadwick and K. M. Yamada (2012). "Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration." J Cell Biol **197**(3): 439-455.
- Pinner, S. and E. Sahai (2008). "Imaging amoeboid cancer cell motility in vivo." J Microsc **231**(3): 441-445.
- Plataniias, L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." Nat Rev Immunol **5**(5): 375-386.
- Plataniias, L. C. and E. N. Fish (1999). "Signaling pathways activated by interferons." Exp Hematol **27**(11): 1583-1592.

- Prall, F., H. Nizze and M. Barten (2005). "Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma." *Histopathology* **47**(1): 17-24.
- Prokunina-Olsson, L., B. Muchmore, W. Tang, R. M. Pfeiffer, H. Park, H. Dickensheets, D. Hergott, P. Porter-Gill, A. Mumy, I. Kohaar, S. Chen, N. Brand, M. Tarway, L. Liu, F. Sheikh, J. Astemborski, H. L. Bonkovsky, B. R. Edlin, C. D. Howell, T. R. Morgan, D. L. Thomas, B. Rehmann, R. P. Donnelly and T. R. O'Brien (2013). "A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus." *Nat Genet* **45**(2): 164-171.
- Qian, B. Z., J. Li, H. Zhang, T. Kitamura, J. Zhang, L. R. Campion, E. A. Kaiser, L. A. Snyder and J. W. Pollard (2011). "CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis." *Nature* **475**(7355): 222-225.
- Qureshi, A. A., F. Laden, G. A. Colditz and D. J. Hunter (2008). "Geographic variation and risk of skin cancer in US women. Differences between melanoma, squamous cell carcinoma, and basal cell carcinoma." *Arch Intern Med* **168**(5): 501-507.
- Raftery, N. and N. J. Stevenson (2017). "Advances in anti-viral immune defence: revealing the importance of the IFN JAK/STAT pathway." *Cell Mol Life Sci* **74**(14): 2525-2535.
- Renauld, J. C. (2003). "Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators." *Nat Rev Immunol* **3**(8): 667-676.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons and A. R. Horwitz (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." *Science* **302**(5651): 1704-1709.
- Rigel, D. S. and J. A. Carucci (2000). "Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century." *CA Cancer J Clin* **50**(4): 215-236; quiz 237-240.
- Rusinova, I., S. Forster, S. Yu, A. Kannan, M. Masse, H. Cumming, R. Chapman and P. J. Hertzog (2013). "Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes." *Nucleic Acids Res* **41**(Database issue): D1040-1046.
- Sanz-Moreno, V., G. Gadea, J. Ahn, H. Paterson, P. Marra, S. Pinner, E. Sahai and C. J. Marshall (2008). "Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement." *Cell* **135**(3): 510-523.
- Sanz-Moreno, V., C. Gaggioli, M. Yeo, J. Albregues, F. Wallberg, A. Viros, S. Hooper, R. Mitter, C. C. Féral, M. Cook, J. Larkin, R. Marais, G. Meneguzzi, E. Sahai and C. J. Marshall (2011). "ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma." *Cancer Cell* **20**(2): 229-245.
- Sarasin-Filipowicz, M., X. Wang, M. Yan, F. H. Duong, V. Poli, D. J. Hilton, D. E. Zhang and M. H. Heim (2009). "Alpha interferon induces long-lasting refractoriness of JAK-STAT signaling in the mouse liver through induction of USP18/UBP43." *Mol Cell Biol* **29**(17): 4841-4851.
- Schoggins, J. W., S. J. Wilson, M. Panis, M. Y. Murphy, C. T. Jones, P. Bieniasz and C. M. Rice (2011). "A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response." *Nature* **472**(7344): 481-485.

- Seebode, C., J. Lehmann and S. Emmert (2016). "Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies." Anticancer Res **36**(3): 1371-1378.
- Sheetz, M. P., D. P. Felsenfeld and C. G. Galbraith (1998). "Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes." Trends Cell Biol **8**(2): 51-54.
- Silginer, M., S. Nagy, C. Happold, H. Schneider, M. Weller and P. Roth (2017). "Autocrine activation of the IFN signaling pathway may promote immune escape in glioblastoma." Neuro Oncol **19**(10): 1338-1349.
- Sleman, J. and P. S. Steeg (2010). "Cancer metastasis as a therapeutic target." Eur J Cancer **46**(7): 1177-1180.
- Sommereyns, C., S. Paul, P. Staeheli and T. Michiels (2008). "IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo." PLoS Pathog **4**(3): e1000017.
- Tamariz, E. and F. Grinnell (2002). "Modulation of fibroblast morphology and adhesion during collagen matrix remodeling." Mol Biol Cell **13**(11): 3915-3929.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang and M. A. Nieto (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **139**(5): 871-890.
- Thrift, A. P. and F. J. Gudenkauf (2019). "Melanoma incidence among non-Hispanic whites in all 50 United States from 2001 through 2015." J Natl Cancer Inst.
- Tjandra, S. S., C. Hsu, Y. I. Goh, I. Goh, A. Gurung, R. Poon, P. Nadesan and B. A. Alman (2007). "IFN- β signaling positively regulates tumorigenesis in aggressive fibromatosis, potentially by modulating mesenchymal progenitors." Cancer Res **67**(15): 7124-7131.
- Tolde, O., D. Rösel, P. Veselý, P. Folk and J. Brábek (2010). "The structure of invadopodia in a complex 3D environment." Eur J Cell Biol **89**(9): 674-680.
- Tsatmali, M., J. Ancans and A. J. Thody (2002). "Melanocyte function and its control by melanocortin peptides." J Histochem Cytochem **50**(2): 125-133.
- Uddin, S., A. Sassano, D. K. Deb, A. Verma, B. Majchrzak, A. Rahman, A. B. Malik, E. N. Fish and L. C. Platanius (2002). "Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727." J Biol Chem **277**(17): 14408-14416.
- Visvader, J. E. and G. J. Lindeman (2008). "Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions." Nat Rev Cancer **8**(10): 755-768.
- Wang, C., K. Jiang, X. Kang, D. Gao, C. Sun, Y. Li, L. Sun, S. Zhang, X. Liu, W. Wu, P. Yang, K. Guo and Y. Liu (2012). "Tumor-derived secretory clusterin induces epithelial-mesenchymal transition and facilitates hepatocellular carcinoma metastasis." Int J Biochem Cell Biol **44**(12): 2308-2320.
- Wen, Z. and J. E. Darnell (1997). "Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3." Nucleic Acids Res **25**(11): 2062-2067.
- Wen, Z., Z. Zhong and J. E. Darnell (1995). "Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation." Cell **82**(2): 241-250.

- Wolf, K., I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U. H. von Andrian, E. I. Deryugina, A. Y. Strongin, E. B. Bröcker and P. Friedl (2003). "Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis." *J Cell Biol* **160**(2): 267-277.
- Wolf, K., Y. I. Wu, Y. Liu, J. Geiger, E. Tam, C. Overall, M. S. Stack and P. Friedl (2007). "Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion." *Nat Cell Biol* **9**(8): 893-904.
- Wu, S., J. Han, R. A. Vleugels, R. Puett, F. Laden, D. J. Hunter and A. A. Qureshi (2014). "Cumulative ultraviolet radiation flux in adulthood and risk of incident skin cancers in women." *Br J Cancer* **110**(7): 1855-1861.
- Wu, Y., Y. Wang, L. Wang, P. Yin, Y. Lin and M. Zhou (2019). "Burden of melanoma in China, 1990-2017: Findings from the 2017 global burden of disease study." *Int J Cancer*.
- Yamazaki, D., S. Kurisu and T. Takenawa (2009). "Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates." *Oncogene* **28**(13): 1570-1583.
- Yoshimura, A., T. Naka and M. Kubo (2007). "SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation." *Nat Rev Immunol* **7**(6): 454-465.
- Yoshio, S., T. Kanto, S. Kuroda, T. Matsubara, K. Higashitani, N. Kakita, H. Ishida, N. Hiramatsu, H. Nagano, M. Sugiyama, K. Murata, T. Fukuhara, Y. Matsuura, N. Hayashi, M. Mizokami and T. Takehara (2013). "Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon- λ in response to hepatitis C virus." *Hepatology (Baltimore, Md.)* **57**(5): 1705-1715.
- Zhang, M., A. A. Qureshi, A. C. Geller, L. Frazier, D. J. Hunter and J. Han (2012). "Use of tanning beds and incidence of skin cancer." *J Clin Oncol* **30**(14): 1588-1593.
- Zhang, Y. and Z. Liu (2017). "STAT1 in cancer: friend or foe?" *Discov Med* **24**(130): 19-29.
- Čermák, V., A. Gandalovičová, L. Merta, K. Harant, D. Rösel and J. Brábek (2020). "High-throughput transcriptomic and proteomic profiling of mesenchymal-amoeboid transition in 3D collagen." *Scientific Data* **7**(1): 160.