

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



Diplomová práce

**Stanovení markerů epiteliálně mezenchymální tranzice (EMT) u
buněk *in vitro***

Vedoucí diplomové práce: Prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svým školitelkám RNDr. Věře Králové, Ph.D., RNDr. Veronice Hanušové, Ph.D. a Prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení, podnětné připomínky, rady a ochotu v průběhu vypracování této diplomové práce. Rovněž děkuji i ostatním pracovníkům Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za vstřícnost a ochotu.

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové 2017

Petr Špaček

1	Obsah	
1	Obsah	4
2	ABSTRAKT	7
3	ABSTRACT.....	8
4	Úvod.....	9
5	Metastatická kaskáda a role EMT.....	10
6	Buňky v procesu EMT	11
6.1	Epiteliální buňka	11
6.2	Mezenchymální buňka	11
7	Úloha mezibuněčných spojení v metastatickém procesu	12
7.1	Těsná spojení - zonula occludens.....	12
7.2	Adhezní spojení – zonula adherens.....	12
7.2.1	Kadherin/katenin komplex.....	13
7.2.2	Nektin/afadin komplex	13
7.3	Desmozomy (macula adherens).....	13
7.4	Hemidesmozomy.....	13
8	Epiteliálně - mezenchymální tranzice.....	14
9	Indukce EMT	16
10	Markery EMT	17
10.1	E-Kadherin/N-Kadherin	17
10.1.1	Stavba E-kadherinu.....	18
10.2	Snail.....	18
10.3	β -Katenin	19
10.4	Vimentin.....	19
10.5	Twist.....	19
10.6	ZEB 1,2.....	20

10.7	Matrixová metaloproteináza-2.....	20
11	MikroRNA.....	21
11.1	MikroRNA se supresorovou aktivitou.....	21
11.2	MikroRNA s indukční aktivitou.....	22
12	Klinický význam EMT.....	23
12.1	EMT a léková rezistence.....	23
13	Cíle.....	25
14	Metodika.....	26
14.1	Chemikálie.....	26
14.2	Přístroje a pomůcky.....	27
14.2.1	Přístroje.....	27
14.2.2	Pomůcky.....	27
14.3	Buněčné linie.....	28
14.4	Indukce EMT.....	28
14.5	Real-Time PCR (RT-PCR).....	29
14.6	Stanovení koncentrace bílkoviny.....	31
14.7	Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu.....	32
14.8	Western Blotting (Imunobloting).....	36
14.9	Detekce proteinů.....	37
14.10	Stanovení migrace v reálném čase.....	38
15	Imunofluorescenční detekce E-kadherinu a N-kadherinu.....	39
16	Výsledky.....	41
16.1	Detekce markerů pomocí metody RT-PCR.....	41
16.1.1	E-Kadherin a N-Kadherin.....	41
16.1.2	ZEB 1 a ZEB 2.....	42
16.1.3	MMP-2.....	42
16.1.4	Twist.....	43

16.1.5	Vimentin	43
16.1.6	MikroRNA	44
16.2	Detekce markerů pomocí Western blotu	45
16.3	Schopnost migrace buněk	47
16.4	Imunofluorescenční detekce E-kadherinu a N-kadherinu	48
17	Diskuze	49
18	Závěr	52
19	Seznam zkratk	53
20	Seznam obrázků	54
21	Citace obrázků	55
22	Citovaná literatura	56

2 ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Petr Špaček

Školitel: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení markerů epiteliálně mezenchymální tranzice (EMT) u buněk *in vitro*

Epiteliálně mezenchymální tranzice (EMT) je proces, během kterého vznikají pohyblivé mezenchymální buňky z nepohyblivých epiteliálních buněk. Fyziologicky, EMT hraje důležitou roli během embryonálního vývoje a hojení ran. Ztráta kontroly nad tímto mechanismem může vést k fibróze a nádorové progresi. Pohyblivé mezenchymální buňky mohou pronikat přes bazální mebránu, dostávají se do krevního řečiště a jsou tak zánášeny do dalších tkání. Tranzice je regulována EMT markery. Tyto markery obsahují široké spektrum proteinů zahrnujících povrchové proteiny (E-kadherin, N-kadherin), cytoskeletální proteiny (vimentin), mikroRNA (miR 200) a transkripční faktory (Snail, Twist). V této studii byla exprese EMT markerů měřena pomocí RT-PCR a Western blottingu. Schopnost migrovat byla hodnocena v reálném čase analýzou za použití systému x-CELLigence. Dva známé spouštěče EMT, StemXVivo™ EMT Inducing Media Supplement (IS) a TGF- β , byly porovnávány na lidských orálních nádorových buněčných liniích DOK a H376. TGF- β se ukázal jako více efektivní, zejména v koncentraci 5 ng/ml, v porovnání s IS. Citlivější k TGF- β indukci byla nádorová buněčná linie DOK.

3 ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Petr Špaček

Supervisor: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Consultant: RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Detection of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers in cells *in vitro*

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process during which motile mesenchymal-like cells develop from non-motile parent epithelial cells. Physiologically, EMT plays important roles during embryonic development and wound healing. Loss of control over this mechanism can lead to fibrosis and cancer progression. Motile mesenchymal-like cells can pass through the basal lamina, get into the blood vessels and spread to distant tissues. Transition is regulated by EMT biomarkers. The biomarkers comprise wide spectrum of proteins, including cell surface proteins (E-cadherin, N-cadherin), cytoskeletal proteins (vimentin), microRNA (miR 200) and transcription factors (Snail, Twist). In this study, expression of EMT biomarkers was evaluated using RT-PCR and Western blotting. The ability to migrate was assessed using real-time analysis with the x-CELLigence system. Two known triggers of EMT, the StemXVivo™ EMT Inducing Media Supplement (IS) and TGF- β , were compared in human oral cancer cell lines DOK and H376. TGF- β has been shown as more effective, especially in 5 ng/ml concentration, in comparison with IS. More sensitive to the TGF- β treatment was the cancer cell line DOK.

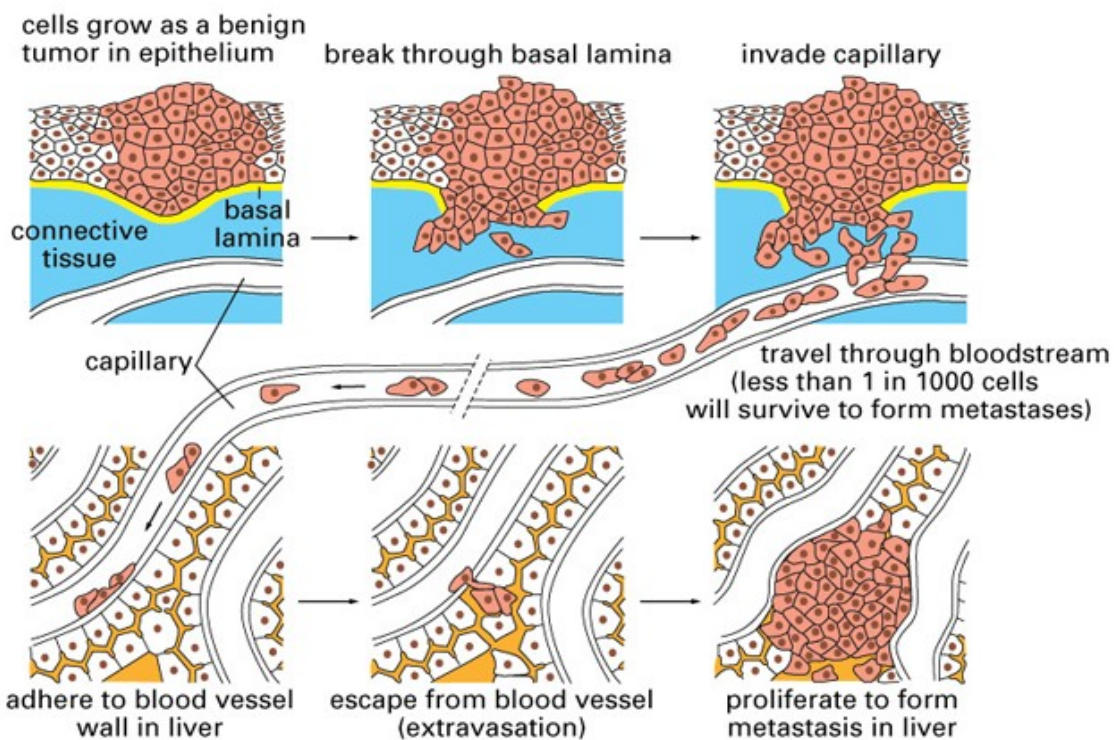
4 Úvod

Nádorové onemocnění je charakterizované nekontrolovaným množením buněk. Na rozdíl od normálních buněk, nádorové buňky nereagují na regulační signály z okolí a je u nich potlačena programovaná buněčná smrt (apoptóza). Takto pozměněné buňky ztrácejí svou primární funkci a vytvářejí nádorovou tkáň. Nádory stále rostou a ohrožují funkci jednotlivých tkání a orgánových systémů. Mohou také uvolňovat hormony narušující funkci těla. Pokud zůstávají na původním místě a jsou charakterizovány omezeným růstem, tak se obecně považují za benigní. Mnohem nebezpečnější jsou nádory maligní. Jsou agresivnější a je pro ně typický rychlý růst a šíření do dalších částí těla. Oproti benigním nádorům je u nich také větší pravděpodobnost znovuoobjevení po jejich odstranění. V současnosti rozeznáváme více než 100 různých typů rakoviny, z nichž je každý klasifikován podle typu tkáně, která byla na počátku (1) (2) (3).

Celosvětově, i v rámci České republiky, je rakovina, po onemocněních kardiovaskulárního systému, druhou nejčastější příčinou úmrtí. Podle statistik WHO jí v roce 2015 podlehl na 8,8 milionů lidí (4) (5). K snížení těchto statistik by mohlo napomoci pochopení nádorového procesu. Znalost molekul a signálních drah, podílejících se na onkogenezi, slibuje zlepšení včasného odhalení a vývoj nových léčebných metod u některých typů nádorů.

5 Metastatická kaskáda a role EMT

Tvorba sekundárních nádorů (metastáz) je definována jako šíření rakovinných buněk primárního nádoru do tkání a orgánů nespojených s místem vzniku primárního nádoru. V době diagnózy rakoviny má alespoň polovina pacientů již zjizitelné metastázy. Průběh vzniku metastáz popisuje metastatická kaskáda. Ta se skládá z několika po sobě následujících kroků (Obr. 1). Předpokládá se, že celý děj iniciuje epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT). EMT je proces, během něhož se epiteliální buňky mění v buňky podobné mezenchymálním. Mezi první kroky metastatické kaskády patří uvolnění buňky od okolí (od sousedících buněk a extracelulární matrix). EMT signály narušují pevná buněčná spojení mezi buňkami a pomáhají zvyšovat nezávislost buněk vůči okolním buňkám a schopnost migrace. Následně se EMT také podílí na důležité degradaci bazální membrány v epitelech a překonání cévních stěn nádorovými buňkami. Nádorové buňky pak přestupují do lumenu cév, kde jsou unášeny krevním nebo lymfatickým řečištěm do dalších tkání. V cílové tkáni pak adherují k endotelu cév a dochází k jejich extravazaci do tkáně. Na tomto místě pak podstupují opačný proces od EMT, tedy mezenchymálně-epiteliální tranzici (MET). Dále proliferují a vytvářejí potenciál pro tvorbu sekundárních nádorů (6).



Obr. 1- Proces vzniku metastáz (Zdroj:1)

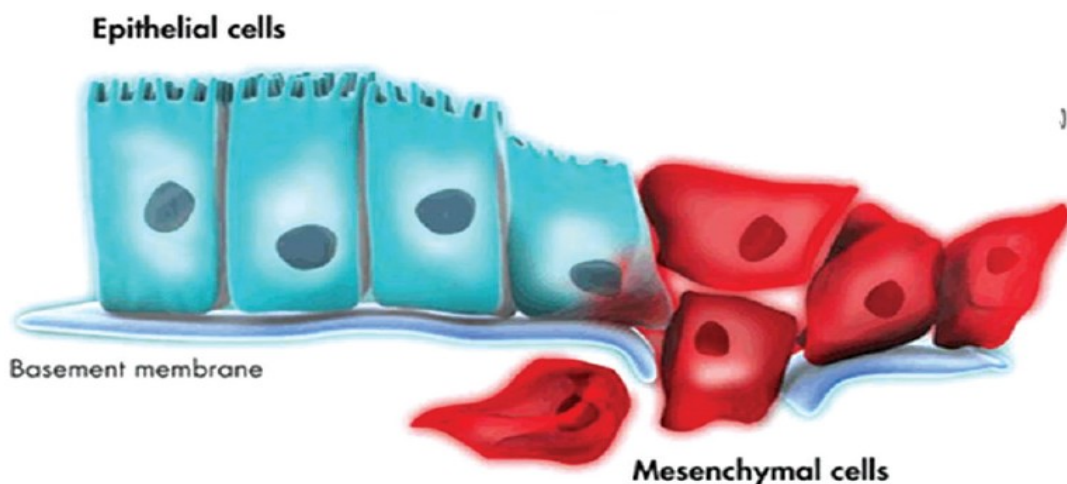
6 Buňky v procesu EMT

6.1 Epiteliální buňka

Epiteliální buňky tvoří epiteliální tkáň, která kryje volné povrchy nebo vystýlá dutiny v organismu. Strukturální integrita je klíčovou vlastností epiteliální tkáň. Pevným spojením buněk získává epitel funkci bariéry a odděluje tak kompartmenty na obou stranách mající odlišné chemické složení. Pro epiteliální buňky je charakteristická apikálně-bazální polarita a výskyt epiteliální cytoskeletální matrix (cytokeratinová a aktinová síť intermediálních filament). Typická je také přítomnost bazální membrány, která odděluje epitel od okolních tkání. Komunikace s okolními buňkami je zajištěna pomocí mezerových spojů. Epitel má v těle funkci bariéry a hraje důležitou roli v absorpci, sekreci a difuzi látek (7) (8) (9).

6.2 Mezenchymální buňka

Mezenchymální buňky oproti epitelům mají jednodušší stavbu. Buňky mezi sebou tvoří slabá nebo žádná mezibuněčná spojení. Obsahují vysoce rozvinutou cytoskeletální síť s intermediárním filamentem vimentinem. Rovněž u nich není zachována apikálně bazální polarita. Mohou produkovat látky remodelující extracelulární matrix, což jim umožňuje snadněji procházet přes bazální membránu do jiných kompartmentů (Obr. 2). Tyto rozdíly dávají mezenchymálním buňkám zvýšenou pohyblivost a schopnost migrace (10) (11).



Obr. 2 - Změna fenotypu buněk v procesu EMT (Zdroj:2)

7 Úloha mezibuněčných spojení v metastatickém procesu

Epiteliální buňky vytváří souvislou vrstvu, mají omezenou pohyblivost a jsou ukotveny k bazální membráně. Tyto vlastnosti jsou zajišťovány spojením mezi buňkami spojením buněk s bazální membránou. Udržení buněk pospolu zabezpečují mezibuněčná spojení. Jedná se hlavně o adhezní a těsná spojení tvořící spojovací komplexy. Spojení buněk slouží jako místo dvousměrného přenosu signálů propojující cytoskelet, intracelulární signalizaci a genovou expresi s extracelulárním prostředím. EMT signály tato spojení narušují. Buňky získávají zvýšenou pohyblivost a autonomii na okolí. Tento krok je nezbytný pro začátek metastatické kaskády (12) (13).

7.1 Těsná spojení - zonula occludens

Těsná spojení (TJ) jsou nejvíce apikální složkou spojovacích komplexů a slouží jako bariéra mezi prostředími. Představuje nejsilnější spojení buněk. TJ komplexy se zdají býti dynamickými a regulovanými strukturami. TJ tvoří nejméně 40 proteinů zahrnujících transmembránové a vnitřní adaptorové proteiny. Mezi transmembránové proteiny utvářející pevná spojení patří okcludin, kladiny a proteiny JAM (junkční adhezní molekuly). Okcludin a kladiny prostupují čtyřikrát buněčnou membránu a mají schopnost vazby na molekulu okcludinu/kladinu sousední buňky. Změny v podílu okcludinu korelují s vaskulární permeabilitou, a proto nejspíše řídí otevírání a zavírání pevného spojení. Kladiny řídí vstup malých molekul s nábojem a iontů. Pod buněčnou membránou se nacházejí adaptorové proteiny, které mají podpůrnou funkci a řídí cytoskeletální ukotvení pevného spojení. Jde o proteiny zonula occludens (ZO-1,2,3) (12) (13).

7.2 Adhezní spojení – zonula adherens

Vytváří souvislý pás vyskytující se povětšinou na apikální straně buňky pod těsným spojením. Adhezní spojení se skládají ze dvou základních adhezních jednotek: kadherin/katenin a nektin/afadin komplexů. Oba komplexy jsou přímo či nepřímo spojené s aktinovým cytoskeletem. Rovněž tyto komplexy mají extracelulární doménu, která produkuje signály ovlivňující dynamiku aktinového cytoskeletu (zapínají a vypínají adhezivní funkce) (12) (14).

7.2.1 Kadherin/katenin komplex

Skládá se z E-kadherinu (popř N-kadherinu), β -kateninu a α -kateninu. Kadheriny poskytují vazbu se sousedními buňkami, zatímco kateniny celý komplex ukotvují k aktinovým vláknům (12) (13).

7.2.2 Nektin/afadin komplex

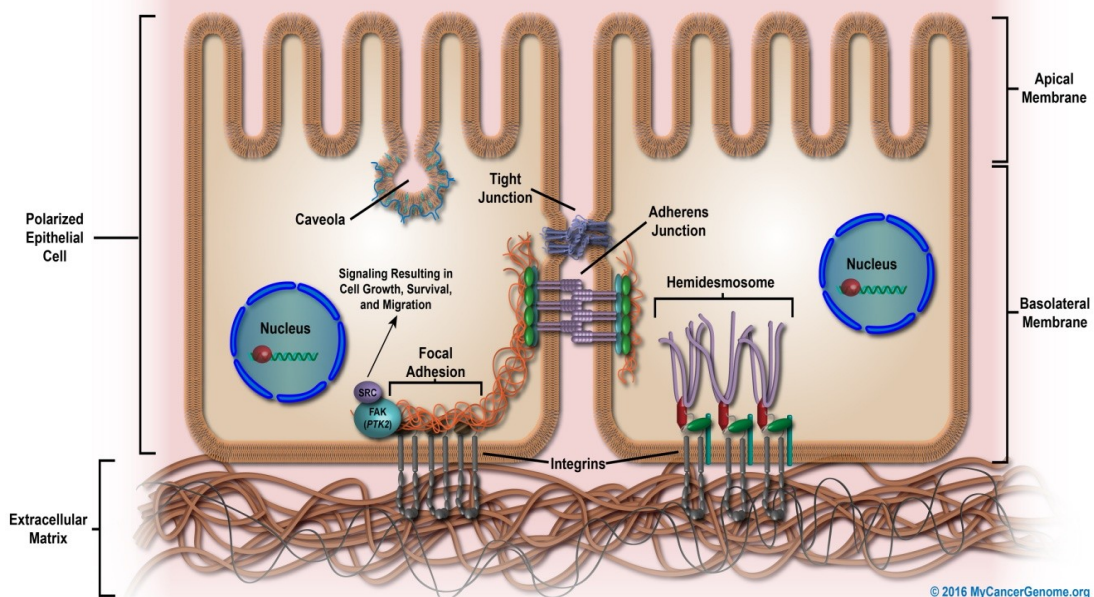
Nektin patří mezi imunoglobulinové adhezní molekuly. Extracelulární domény obsahují tři IgG podobné smyčky a vytváří heterotypické, ale i homotypické vazby s protilehlými nektiny. Cytoplazmatickou doménu tvoří aktin vázající protein afadin (12) (13).

7.3 Desmozomy (macula adherens)

Obsahují strukturně podobné proteiny jako adhezní spoje. Neváží se však na aktinová vlákna, ale na síť intermediárních filament cytokeratinu nebo vimentinu. Díky tomu zajišťují silnou soudržnost mezi buňkami, které tak mohou odolávat mechanickému stresu. Extracelulární část tvoří proteiny patřící do kadherinové rodiny desmoglein a desmokolín. Intracelulární část se skládá z proteinů plakofilinu a plakoglobinu, které dodávají stabilitu komplexu. Patří sem rovněž protein desmoplakin, který slučuje komplex s intermediálními filamenty (15).

7.4 Hemidesmozomy

Hemidesmozomy jsou multiproteinové komplexy ukotvující epitel k bazální membráně. Adhezi zajišťují transmembránové proteiny integriny. Integriny umožňují také fokální adhezi s jinou buňkou nebo mimobuněčnou hmotou. Zabezpečují také přenos signálu mezi buňkou a extracelulárním prostředím (15) (16).



Obr. 3 - Typy mezibuněčných spojení (Zdroj:3)

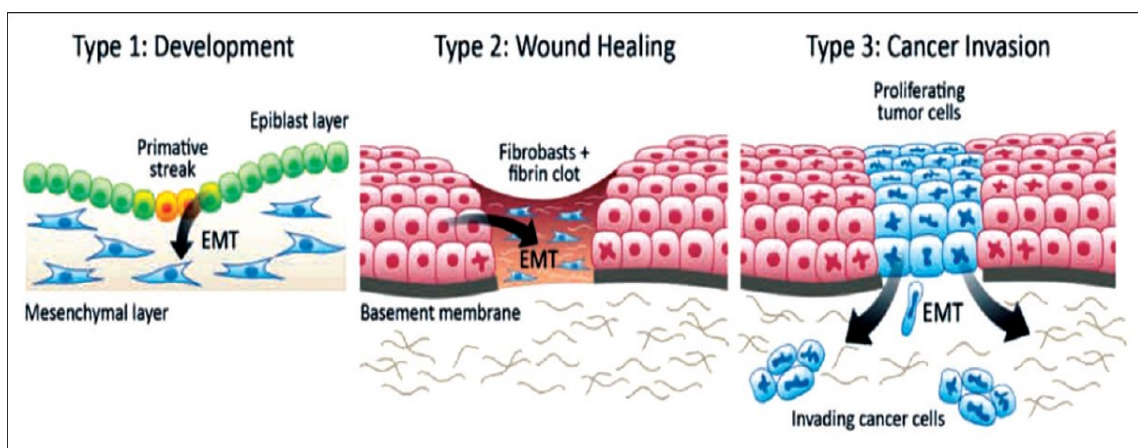
8 Epiteliálně - mezenchymální tranzice

Epiteliálně - mezenchymální tranzice (EMT) je dynamický reverzibilní proces, při kterém se z nepohyblivých epiteliálních buněk stávají pohyblivé buňky s mezenchymálním fenotypem. Fyziologicky EMT hraje důležitou roli v průběhu embryonálního vývoje a hojení ran. Ztráta kontroly nad tímto procesem může vést k fibróze a umožňuje nádorovým buňkám tvořit metastázy. EMT je koordinovaná destabilizace mezibuněčných kontaktů s příslušnými změnami v genové expresi. Buňky získávají migrační a invazivní vlastnosti mezenchymálního fenotypu. Kromě motility a invazivity je důsledkem EMT rezistence buňky k apoptóze a možná rezistence k protinádorovým lékům (17) (18).

Jako EMT I. typu nebo také vývojová EMT jsou souhrnně označovány všechny tranzice, které se odehrávají v průběhu vývoje zárodku. Tento děj zaznamenáváme už v období gastrulace, kdy dochází ke ztrátě bazální membrány pod epiblastem. Dochází k narušení buněčných spojů způsobenému ztrátou E-kadherinu. Migrující buňky entodermu pak zakládají mezoderm a po reverzi MET i entoderm. Vývojová EMT se podílí také na zakládání neurální trubice, na formování srdečních chlopní a vývoji nefronů a končetinového svalstva (17) (19) (56).

EMT II. typu je spojena s procesem, který napomáhá hojení ran, regeneraci tkání, ale může také způsobovat fibrózu. EMT je spuštěna zánětlivou odpovědí těla způsobenou poškozením tkáně. Důsledkem je tvorba buněk (fibroblasty) podílejících se na reparaci tkáně. Děj je poté zakončen utlumením zánětlivé reakce. Pokud není zánětlivý program ukončen, hromadí se v tkáni zánětlivé buňky a fibroblasty. Program EMT tedy stále pokračuje. Zdravá tkáň je postupně ničena a nahrazována fibrózní. EMT II. typu je v tomto případě vícestupňový proces. Buňky pod tlakem zánětlivé reakce podstoupí několik prvních kroků k změně svého fenotypu tzv. dílčí EMT. Poté opustí epiteliální vrstvu, projdou bazální membránou a začnou se hromadit v inersticiu tkáně, kde nakonec dochází ke ztrátě i zbylých epiteliálních znaků a převládne u nich plně fibroblastický fenotyp (17) (19) (24) (56).

Jak bylo výše zmíněno, EMT se podílí na iniciaci metastatické kaskády. Toto zapojení se popisuje jako EMT III. typu. Aktivace EMT napomáhá uvolnění mezibuněčných spojů a odpoutání buněk od bazální membrány. Takovéto aktivované buňky se vyskytují hlavně na okrajích nádoru. Produkují mezenchymální markery (vimentin) zajišťující potřebné vlastnosti pro přestup do krevního oběhu a k následné extravazi do jiných tkání. V krevním řečišti panují jiné podmínky a rozdílné tlaky, než na které jsou epiteliální buňky uzpůsobeny. Důležitá je tedy kromě migrace i zvýšená mechanická odolnost (17) (19) (56).



Obr. 4 – Typy EMT (Zdroj:2)

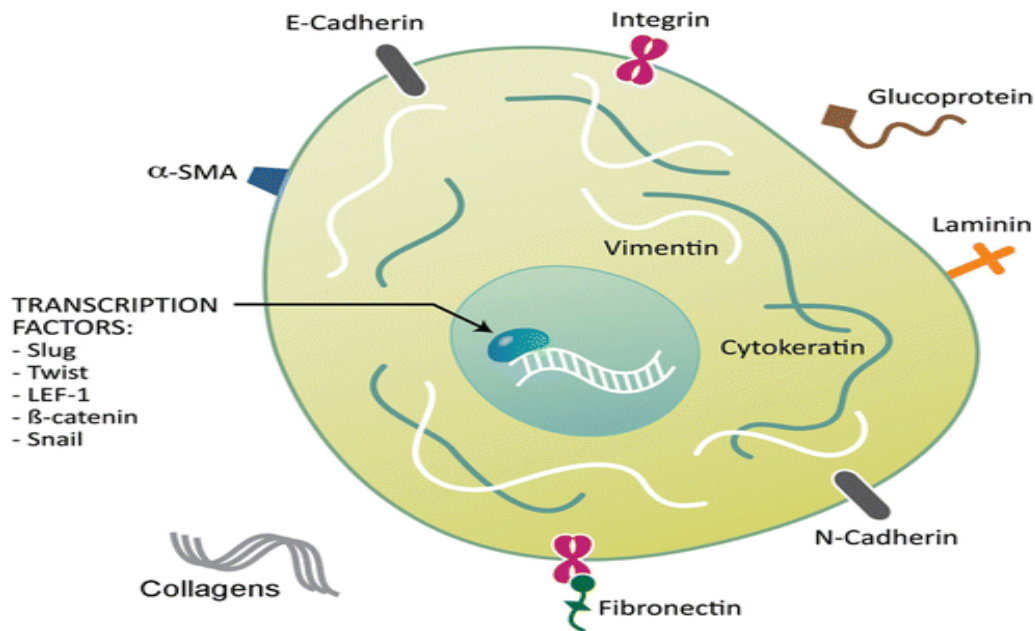
9 Indukce EMT

Bylo popsáno mnoho indukčních a signalizačních molekul podílejících se na iniciaci procesu EMT v nádorové tkáni, přesto celý mechanismus aktivace a jeho průběh zůstává nejasný. Nejčastěji se předpokládá vliv genetických a epigenetických změn v nádorových buňkách na citlivost pro signály indukující EMT. V této práci bylo EMT indukováno pomocí jednoho z hlavních a nejlépe charakterizovaných induktorů EMT a to transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β). TGF- β je silný pleiotropní cytokin regulující vývoj, diferenciaci a homeostázu v podstatě u všech typů buněk a tkání. Zároveň je TGF- β důležitým supresorem epitelové buněčné proliferace, čímž zabraňuje vzniku primárních nádorů. Za patofyziologických podmínek slouží však jako pozitivní regulátor progresu nádoru a metastáz (19) (20) (21).

TGF- β indukovaná signalizace zahrnuje jak aktivaci genově nezávislé (typ I), tak i genově závislé dráhy (typ II). U dráhy I. typu TGF- β reaguje s okludinem, jenž je součástí komplexů pevných spojů a fosforyluje PAR6 protein. Jeho fosforylace vede k degradaci RHOa (malá rodina GTPáz odpovědná za polaritu a junkční stabilitu buněk). Tyto důležité reakce vedou ke ztrátě apikálně bazální polarity a uvolnění pevných spojů mezi buňkami. Dráha II. typu dále ovlivňuje expresi Slug proteinů, které inhibují tvorbu desmozomových proteinů desmoplakinu a plakoglobinu. Kromě toho je indukována exprese represorů E-kadherinu mezi něž patří transkripční faktory Twist, „Zinc finger E-box binding homeobox 1/2“ (ZEB1/2), Snail 1 a Snail 2 (Slug). Také je podporována tvorba N-kadherinu a vimentinu, proteinů typických pro mezenchymální buňku. Spolu s výše uvedenými reakcemi se tak dotváří transformace epiteliálního fenotypu na mezenchymální typ (19) (22).

10 Markery EMT

Markery EMT představují široké spektrum molekul zahrnujících adhezni proteiny nacházející se na povrchu buněk (E-kadherin, N-kadherin), intermediární filamenta (vimentin, cytokeratin), popřípadě transkripční faktory (Snail, Twist, ZEB). Můžeme je rozdělit na markery epiteliální a mezenchymální podle znalosti fenotypů obou druhů buněk (Obr. 5) (23) (24).



Obr. 5 - Markery EMT (Zdroj:4)

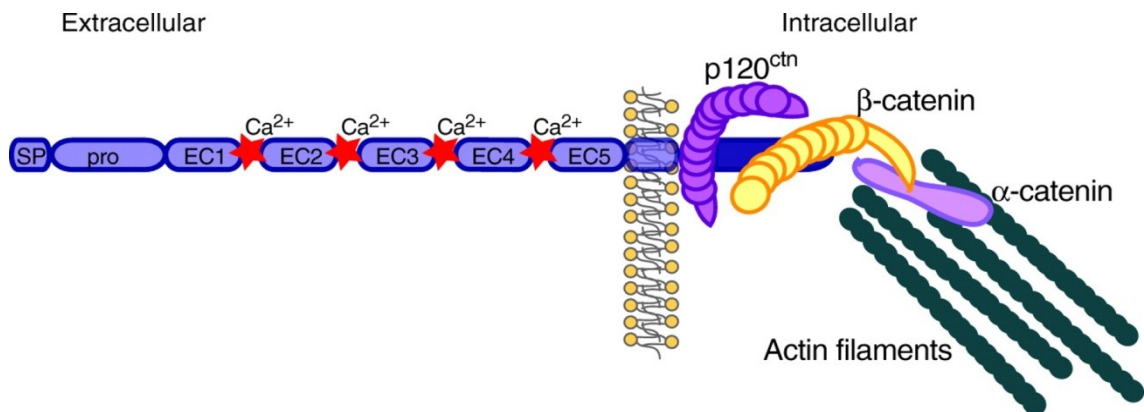
10.1 E-Kadherin/N-Kadherin

E-Kadherin patří mezi nejdůležitější molekuly mezibuněčné adheze v epiteliálních tkáních. Jedná se o transmembránový protein, který je lokalizován na povrchu epiteliálních buněk v oblastech adhezni mezibuněčných spojů. Více pohyblivé a méně polarizované mezenchymální buňky produkují N-kadherin. I přes strukturní podobnost s N-kadherinem, není spojení E-kadherinu a N-kadherinu možné. Postupné snížení E-kadherinové produkce, vůči produkci mezenchymálního N-kadherinu, je typickým dějem v procesu EMT. Jedná se o tzv. „kadherinový switch“. Jedním z úkolů přepínání kadherinů je umožnit vybrané populaci buněk se oddělit od svých sousedů - například během procesů gastrulace. Snížená E-kadherinová tvorba je nejčastěji způsobena metylací jeho promotoru nebo zvýšenou tvorbou transkripčních represorů (Snail, Slug). N-Kadherin produkovaný epiteliálními buňkami zvyšuje motilitu, invazivitu a celkovou přeměnu buněk na mezenchymální fenotyp. N-Kadherin dále stimuluje buněčný růst a potlačuje apoptické signály. Pokles hladiny E-kadherinu

a nárůst N-kadherinu slouží jako jeden z hlavních ukazatelů EMT (25) (26) (27) (28) (29).

10.1.1 Stavba E-kadherinu

E-Kadherin lze rozdělit na mimobuněčnou a cytoplazmatickou část (Obr.6). Jeho extracelulární část, skládající se z pěti vápník-vázajících domén, zajišťuje mezibuněčný kontakt se sousedícími buňkami. Tyto interakce jsou homotypické (spojení mezi stejnými molekulami) a poskytují vazbu s mimobuněčnými doménami protilehlých kadherinů. První doména kadherinů (extracelulární kadherin doména 1; EC1) má klíčovou úlohu v rozpoznávání a vytvoření vazby mezi kadheriny. Dvě EC1 domény spolu vytváří dimer, který je základem pro adhezní vazbu. Cytoplazmatická část je spojena s kateniny (α -katenin, β -katenin, p120-katenin) vázajícími se na aktinový cytoskelet. Ukotvením komplexu k cytoskeletu je zajištěna stabilita adhezních mezibuněčných spojů. Cytoplazmatická doména se váže na p120-katenin (p120ctn) v blízkosti plazmatické membrány. α -Katenin se váže na β -katenin a připojuje kadherinový komplex na aktinový cytoskelet. E-Kadherinové a N-kadherinové doménové struktury jsou si vzájemně podobné, stejně jako jejich interakce s kateniny(12) (30).



Obr. 6: Stavba E- kadherinu (Zdroj:5)

10.2 Snail

Marker Snail řadíme mezi transkripční faktory regulující různé aspekty EMT programu. Přímou potlačuje produkci E-kadherinu a snižuje tvorbu desmoplakinu. Dále podporuje tvorbu dalších mezenchymálních markerů (vimentin). Snail také zprostředkovává blokaci buněčného cyklu a přispívá k buněčnému pohybu. Mezi jeho další cíle patří

geny regulující buněčnou polaritu a apoptózu. Nedávné studie ukázaly, že pomocí Snail indukované EMT se urychluje vznik metastáz prostřednictvím vyvolání imunosuprese. Potlačení markeru Snail se výrazně inhibuje růst nádoru a metastáz zvýšením nádor infiltrujících lymfocytů a systémové imunitní odpovědi. Z tohoto důvodu je Snail efektivní cíl pro prevenci metastáz (31) (32).

10.3 β -Katenin

β -Katenin je obvykle lokalizován na vnitřní straně buněčné membrány a ukotvuje E-kadherin k cytoskeletálnímu aparátu. Po ztrátě buněčné adheze je E-kadherin endocytován a β -katenin uvolněn z vazby. V buňkách, které procházejí EMT, se β -katenin vyskytuje v cytoplazmě (úměrně k úbytku E-kadherinu). Tento volný cytosolický β -katenin se přemísťuje do jádra, kde podporuje transkripci genů indukující EMT. Nukleární β -katenin funguje jako transkripční ko-aktivátor, který kontroluje transkripci Snail. Nález nukleárního β -kateninu koreluje se špatnou prognózou u pacientů (17) (24).

10.4 Vimentin

Vimentin je intermediární filamentum, které hraje roli v buněčné elongaci a vytváří cytoskeletální aparát u mezenchymálních buněk. Vimentin je také rozhodující pro recyklaci endocytovaných buněčných adhezních receptorů a integrinů, což může vést k neřízené buněčné migraci. Podle studií bylo dokázáno, že snížením hladiny vimentinu je snížena proliferace, migrace a invaze metastatických buněk ve srovnání s kontrolními buňkami (24) (33).

10.5 Twist

Twist-1 protein (také nazývaný Twist) patří mezi transkripční faktory, který se řadí do rodiny helix-loop-helix (bHLH) proteinů. Je tvořen dvěma α -helixy spojenými krátkým řetězcem aminokyselin. Twist se podílí na mezodermální diferenciaci. V buňkách aktivuje EMT, jak ve fyziologických procesech, tak i v průběhu karcinogeneze, kdy je exprese zvýšena. Twist proteiny fungují jako transkripční represory (E-kadherin) nebo jako aktivátory (N-kadherin). Podle studií se dále podílejí na inhibici apoptózy (34) (35).

10.6 ZEB 1,2

ZEB 1, 2 proteiny jsou řazeny mezi transkripční faktory EMT. Tyto proteiny přímo potlačují tvorbu nejen E-kadherinu, ale i dalších epiteliálních markerů (komponenty desmozomů a pevných spojení). ZEB 1 a ZEB 2 zvyšují také agresivitu a metastatickou aktivitu nádorů. Kromě toho ZEB 1 sehrává významnou roli v progresi nádoru a slouží, jako potvrzení špatného klinického výsledku u pacientů s rakovinou. Jedná se o specifický induktor EMT, který dává charakteristické vlastnosti nádorovým kmenovým buňkám, jako jsou léková rezistence a radiorezistence. ZEB 2 přímo potlačuje vznik TJ proteinů kladinu-4 a zona occludens 3. Také snižuje expresi desmozomového proteinu plakofilinu-2 a indukuje mezenchymální markery vimentin, N-kadherin a matrixové metaloproteinázy-2 (MMP-2) prostřednictvím dosud neznámého mechanismu. Bylo popsáno, že cytoplazmatický ZEB 2 je důležitým faktorem v raných fázích malignity, a také předpovídá špatné celkové přežití (23) (36).

10.7 Matrixová metaloproteináza-2

Matrixovou metaloproteinázu-2 (MMP-2) řadíme mezi zinek-dependentní endopeptidázy, které degradují kolagen v extracelulární matrix bazální membrány. Extracelulární matrix (ECM) je komplexně strukturální a funkční síť, a obecně se předpokládá, že aktivní rozpad bazální membrány nebo okolní pojivové tkáně podporuje invazi nádorových buněk do krevního oběhu a následný vznik metastáz (37) (38).

11 MikroRNA

MikroRNA (miR) jsou jednovláknové řetězce nekódující RNA o délce 21-23 nukleotidů, které posttranskripčně kontrolují genovou expresi degradací mRNA nebo inhibicí translace. V posledních letech byl prokázán jejich velký význam v procesu nádorového onemocnění. MiR v programu EMT fungují jako onkogeny nebo tumor supresory transkripčních faktorů. Exprese miR je tkáňově a nádorově specifická, přičemž abnormální hladiny miR v různých typech nádorů mají zásadní konsekvence pro jejich biologické chování i klinické projevy. MiR nejsou efektorovými molekulami, ale regulačními prvky, jejichž podíl na nádorovém procesu je úzce spjat s funkcí cílových mRNA, které regulují. Onkogenní miR má v nádorové buňce zvýšenou hladinu a snižuje produkci tumor supresorů, zatímco exprese nádorově supresorové miR je v nádoru snížena (42) (54).

11.1 MikroRNA se supresorovou aktivitou

miR 16 – Funguje jako nádorový supresor. Svým zacílením na proapoptický protein Bcl-2 pomáhá indukovat buněčnou smrt u chronické lymfatické leukémie (39).

miR 125b – Fyziologicky funguje jako tumor supresor. Nízké množství miR 125b bylo naměřeno v nádorech vaječníků. V současnosti se má za to, že miR 125b má důležitou roli při snižování invazivní a migrační schopnosti ovariálních nádorových buněk (40) (54).

miR 200a,b – Podílejí se na represi EMT aktivací tvorby metastatických supresorových proteinů a potlačují vznik transkripčních faktorů ZEB1 a ZEB2. Pokud dochází k jejich zvýšené produkci, dochází ke zvýšené tvorbě E-kadherinu. Rodina miR 200 dále zeslabuje indukční signály TGF- β . Při snížené produkci naopak slouží jako přímý cíl TGF- β a ZEB1/2 faktorů. Toto propojení mezi TGF- β , miR 200 a ZEB, může vysvětlovat reverzibilitu mezenchymálního fenotypu (42) (47) (54).

miR 145 – Podílí se na regulaci různých buněčných procesů, jako jsou například buněčný cyklus, proliferace nebo apoptóza, jenž jsou cílem mnoha onkogenů. Snížená exprese miR 145 je spojená s horší prognózou u mnoha typů rakoviny. Bylo prokázáno, že vyšší hladiny miR 145 zvýšily senzitivitu pacientů k radioterapii. Dále byla potvrzena zvýšená citlivost žaludečních nádorových buněk na 5-fluorouracil v kombinaci s miR 145. Kombinace miR 145 a chemo- nebo radiační terapie představuje novou protinádorovou strategii (41).

11.2 MikroRNA s indukční aktivitou

miR 9 – Je identifikována jako onkogen, ale i jako tumor supresor, v závislosti na různých typech rakoviny. Onkogeneticky inhibuje přímou expresi E-kadherinu a podporuje tvorbu mezenchymálního vimentinu například u rakoviny mozku. U rakoviny prsu oproti tomu nadměrná exprese miR 9 indukuje antiproliferativní, anti-invazivní a pro-apoptickou aktivitu (43) (56).

miR 21 – Zvyšuje aktivitu degradačních enzymů inhibicí tumor supresorů. Početné studie rovněž prokázaly, že zvýšená exprese miR 21 koreluje s klinickým stádiem onemocnění a pacienti s vyšší hladinou této miR mají větší riziko rozvoje vzdálených metastáz a tudíž i horší prognózu. Výzkumy dále udávají, že tato miR výrazně podporuje novotvorbu cév (44) (54).

miR 31 – Nadměrná hladina miR 31 byla změřena především v pokročilých nádorech kolorektálního karcinomu. Stejně jako u miR 21 i tato miR se podílí na angiogenezi. U miR 31 bylo navíc pozorováno častější metastatické šíření lymfatickým systémem (45) (54).

12 Klinický význam EMT

Úspěšnost konvenčních protinádorových chemoterapeutik je často omezena nádorovou specificitou, závažnou toxicitou nebo vývojem rezistence, což podmiňuje hledání nových terapeutických přístupů. Zacílení na různé molekulové cíle se objevuje v inovačních strategiích léčby rakoviny kvůli zvýšení nádorové specifity a snížení systémové toxicity. Detekce produkce EMT markerů, spojených se špatnou prognózou pacienta, je předmětem mnoha studií a výzkumů. Uvedeme-li pár příkladů z praxe, tak bylo zjištěno, že nadměrná exprese markeru Twist je spojena se špatnou prognózou u mnoha druhů rakoviny, jako je rakovina močového měchýře, prsu nebo rakovina děložního čípku. Zvýšená produkce Snail je spojena se špatnou prognózou přežití pacienta u rakoviny prsu, vaječníků a tlustého střeva. Tvorba vimentinu u karcinomů koreluje s jejich růstem a schopností metastazovat, což by se mohlo stát indikátorem špatné prognózy pro mnoho druhů rakoviny. Podle těchto dat by detekce EMT markerů mohla být vhodná pro předpověď růstu nádoru či identifikaci možných terapeutických cílů. Rovněž znalost signálních drah indukujících EMT se jeví jako vhodná možnost léčby rakoviny. Problém je ovšem správné načasování terapie. Během počáteční fáze onemocnění může léčba způsobit diferenciaci mezenchymálních buněk v nádoru. V pozdější fázi pak stejná léčba může uspišit proces MET, a tím růst již přítomných metastatických ložisek (33) (46) (48) (56).

12.1 EMT a léková rezistence

Rezistence k cytostatikům je jedním z nejzávažnějších problémů moderní onkologie. Situaci komplikuje fakt, že mnoho nádorů je složených z buněk různých morfologických a molekulárně biologických vlastností. Kromě toho, buňky s různými molekulárními vlastnostmi v rámci stejného nádoru reagují odlišně na protinádorovou terapii, což může vést k vyvolání lékové rezistence. Lékovou rezistenci mohou také zhoršovat adaptivní změny rakovinových buněk po terapii. V epiteliálních nádorech tyto adaptivní změny mohou zahrnovat, alespoň z části, EMT a MET přechody buněk. Proces EMT produkuje buňky podobné kmenovým nádorovým buňkám. Takovéto nádorové buňky mají vysokou schopnost sebeobnovy a bývají rezistentní vůči chemoterapeutikům (56). V praxi bylo pozorováno, že zvýšení Snail a TGF- β v nádorových buňkách vede ke zvýšení rezistence na 5-fluorouracil. Zvýšená produkce Twist může zapříčiňovat rezistenci nádorových buněk na mikrotubulární cytostatika taxol a vinkristin (35). Předmětem zkoumání jsou ale i změny působící proti progresi

nádoru či zvětšující jeho chemosenzitivitu vůči cytostatikům. Příkladem budiž zesílení chemosenzitivity pankreatických buněk na gemcitabin, díky zvýšení produkce E-kadherinu a zeslabení ZEB signálů. Podrobnější studium EMT a nádorových kmenových buněk by mohlo vést ke snížení chemorezistence, zavedení nových prognostických faktorů a vývoji různých forem cílené terapie (46) (48).

13 Cíle

Náplní mé diplomové práce bylo optimalizovat podmínky pro stanovení specifických markerů EMT v dysplastické linii DOK a v nádorové linii H376.

Pro studium EMT byly porovnávány:

- vhodné induktory EMT a jejich koncentrace
- časový interval od podání induktorů

Hledání vybraných markerů na úrovni:

- mikroRNA
- mRNA
- proteinů

Porovnání vlastností buněk před a po indukci EMT:

- Migrační schopnost

14 Metodika

14.1 Chemikálie

- Ambion, Life Technologies
- akrylamid (BIO-RAD)
- APS (BIO-RAD)
- Bis-Akrylamid (BIO-RAD)
- Blokovací mléko (BIO-RAD)
- Bovinní sérový albumin 96% (BSA – Sigma Aldrich)
- D – PBS (PAN Biotech)
- DEPC voda (Invitrogen)
- Destilovaná voda
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma Aldrich)TRIzol reagent
- dodecylsulfát sodný (SDS – Sigma Aldrich)
- EGF (epidermální růstový faktor) (Sigma aldrich)
- Etanol (RNDr. Kulich)
- FBS (fetální bovinní sérum) (Gibco, Thermo Fisher Scientific)
- Forward primer a Reverse primer pro cílenou mRNA (10mM)
- glycin (Sigma Aldrich)
- Chloroform (SERVA)
- Isobutanol (PENTA)
- Isopropanol (100% bez RNA) (SERVA)
- Kit pro přípravu cDNA (Thermo Scientific):
- Kit pro stanovení bílkoviny BCA (kyselina bicinchoninová) kit (Sigma Aldrich)
- kyselina chlorovodíková (PENTA)
- Master mix (Roche):
- Metanol (RNDr. Kulich)
- M-MULV Reverzní Transkriptáza
- Paraformaldehyd (BIO-RAD)
- Primární protilátky (Cell signaling technologies)
- Randomizovaný hexametrický primer 5xreakční pufr 10mM dNTP mix

- RiboLock RNase inhibitor
- Sekundární protilátky (DAKO)
- SYBR®GREEN
- TRISMA-Base (Sigma Aldrich)
- Tween 20 (Sigma Aldrich)

14.2 Přístroje a pomůcky

14.2.1 Přístroje

- Buněčný inkubátor (Sanyo, MCO-18AIC (UV))
- Cellometer AutoT4 (Nexcelom Bioscience)
- Centrifuga (Jouan MR23; Eppendorf 5415R)
- Epiluoescenční mikroskop (Nikon Eclipse E400)
- Laminární box (Thermo Scientific, MSC Advantage)
- Laminární box na PCR (Captair Bio, Erlab)
- Magnetická míchačka (IKA, RCT Basic)
- Nanodrop (Thermo Scientific)
- PCR cyklér (Corbett Research PCR Rotogene 6000)
- Spektrofotometr (Tecan Infinite M200 PRO)
- Termoblok (Major Science)
- Třepačka (IKA, M+S 2/4 Digital)
- Třepačka vortex (IKA MS2)
- X-celligence (RTCA DP, Roche)
- Zdroj stejnosměrného napětí (BIO-RAD)
- Zobrazovací systém pro gely a bloty (Gel Logic 2200 PRO, Carestream)

14.2.2 Pomůcky

- 96ti-jamkové mikrotitrační destičky s kulatým dnem (NUNC, Thermo scientific)
- Běžné laboratorní vybavení
- Hřeben, filtrační papír, blotovací houbičky (BIO-RAD)
- Injekční stříkačky, jehly (Braun)
- Migrační komůrky (Roche)
- Mikrozkuřavky (Thermo Scientific)
- Nástavce pro kultivaci a barvení buněk na podložních sklíčkách

- Pipetovací nástavce
- Pipety (Finnpipete; Eppendorf)
- Plastové nádoby s víčkem (TPP)
- Podložní a krycí sklíčka
- Pomůcky na přípravu gelu – nalévací stojánek, sklo, sklo se spacerem, stojany,
- PVDF membrána (polyvinyliden difluoridová membrána – GE Healthcare)
- Sterilní pipety (TPP)
- Stojany
- Škrabky (TPP)
- Špičky různého rozsahu (Finntip; Eppendorf)
- Vanička na elektroforézu (BIO-RAD)

14.3 Buněčné linie

- **H376**

Získána z dlaždicovitého karcinomu dolního patra úst 40-leté pacientky. Tato buněčná linie je dle údajů poskytovatele (Sigma Aldrich) velmi citlivá na TGF- β (transformující růstový faktor).

- **DOK**

Dysplastické orální keratinocytové buněčné linie DOK byly izolované z kusu zadní části jazyku 57-letého muže, který byl těžký kuřák. Po odstranění dlaždicovitých buněk karcinomu byla zbývající dysplazie následně odstraněna a použita k iniciování primárních kultur vedoucí k vytvoření linie DOK (57).

14.4 Indukce EMT

- **TGF- β (transformující růstový faktor β)** – rekombinantní, produkují ho CHO buňky *in vitro* (CHO = chinese hamster ovary)
- **The StemXVivo™ EMT Inducing Media Supplement (IS)** – obsahuje známé induktory a inhibitory regulačních drah EMT (anti-human E-Cadherin, anti-human sFRP-1, anti-human Dkk-1, recombinant human Wnt-5a, a recombinant human TGF- β)

14.5 Real-Time PCR (RT-PCR)

Princip

RT-PCR (kvantitativní PCR) je metodika založená na polymerázové řetězové reakci (PCR). V klasické PCR je amplifikovaný produkt (amplikon) detekován po skončení reakce elektroforeticky. Naproti tomu real-time PCR umožňuje měření zmnoženého produktu v průběhu reakce, tzn. v reálném čase (real time). Detekce produktů reakce je umožněna využíváním fluorescenčních molekul, které odpovídají množství amplifikované DNA v každém cyklu. Tyto fluorescenční chemikálie mohou být barviva vázající se na DNA, anebo sekvenčně specifické primery či sondy. Protože hledaná sekvence DNA může být stanovena, jak kvalitativně, tak i kvantitativně (počet kopií DNA), je real-time PCR označována také jako kvantitativní PCR (qRT-PCR). V této práci bylo použito fluorescenční barvivo SYBR®-Green, které se interkalačně váže na dvouřetězcovou DNA (49) (50).

Příprava vzorků RNA izolací pomocí kolonek

Ke vzorkům buněk lyzovaných v TRIzol reagentu bylo přidáno stejné množství etanolu (95-100%) a směs byla překlápním několikrát promíchána. Tato směs byla přenesena na kolonky vložené do větších spodních zkumavek a centrifugována (13000 rpm, 30 s, 4°C). Kolonky byly přeneseny do nových zkumavek a spodní zkumavky s TRIzolem byly vyhozeny.

Dále bylo přidáno 400 µl příslušného pufru (RNA Wash buffer) do kolonek a ty byly opět centrifugovány (13000 rpm, 30 s, 4°C). V nové zkumavce byla připravena směs DNazy a příslušného pufru (DNA Digestion Buffer), byla promíchána a nechána 15 min při laboratorní teplotě. Následně bylo připipetováno do kolonek 400 µl příslušného pufru (Direct Zol RNA PreWash) a vše bylo opět centrifugováno (13000 rpm, 30 s, 4°C). Poslední krok byl ještě jednou zopakován. Do kolonek bylo přidáno 700 µl příslušného pufru (RNA Wash buffer) a byly centrifugovány (13000 rpm, 2 min, 4°C). Po centrifugaci byly kolonky přeneseny do nových zkumavek. K vymytí RNA z kolonky bylo přidáno 30-50 µl DEPC¹ vody přímo na kolonku, podle množství

¹ DEPC voda – voda bez nukleáz, sterilně filtrovaná s přísávkem DEPC (dietyl pyrokarbonát) a autoklávaná

buněčné suspenze a vzorky byly centrifugovány (13000 rpm, 30 s, 4°C). Koncentrace a čistota takto připravené RNA byla měřena na spektrofotometru Nanodrop.

Příprava cDNA

Po změření koncentrace RNA na Nanodropu bylo vypočteno ředění RNA na množství 1 µg.

Přidáním následujících reagensů do sterilní nukleázy prosté zkumavky v následujícím pořadí byla vytvořena směs A (11 µl)

Naředěné vzorky RNA	10 µl
Randomizovaný hexametr primer	1 µl

Směs byla promíchána pipetou a stočena v centrifuze. Dále byla inkubována při 70°C 5 minut a následně znovu krátce stočena. Směs byla poté zchlazena. Dalším krokem byla příprava směsi B (pro 1 vzorek):

5x reakční pufr	4 µl
10 mM dNTP mix	2 µl
RiboLock RNase inhibitor (20 U/µl)	1 µl
M-MULV Reverzní Transkriptáza (20 U/µl)	2 µl

K 9 µl směsi B bylo přidáno 11 µl směsi A. Opatrným promícháním vzniká směs A+B. Nově vzniklá směs byla nechána 5 min při pokojové teplotě a poté inkubována 60 min při 37 °C v inkubátoru. Reakce byla zakončena zahřáním na 70 °C po dobu 5 minut.

PCR Amplifikace jednovláknové cDNA

Vzorky směsi A+B byly zředěny v poměru 1:5 pro cílovou mRNA amplifikaci. To znamená, že ke každému vzorku směsi A+B (20 µl) bylo přidáno 80 µl DEPC vody. Pro kontrolu amplifikace bylo k 2 µl směsi A+B přidáno 198 µl DEPC vody. Dalším krokem byla připravena směs C.

SYBR Green	25 µl
Forward primer pro cílovou mRNA (10 mM)	1 µl
Reverse primer pro cílovou mRNA (10 mM)	1 µl
H2O	13 µl

20 µl směsi C bylo pipetováno do nových sterilních (bez nukleáz) zkumavek o objemu 0,2 ml, v duplikátech pro každý vzorek. Bylo napipetováno 5 µl směsi A+B. Po promíchání byly vzorky vloženy do Corbet Rotorgene Real Time PCR cyklu a byl zvolen vhodný program.

Jako housekeepingový gen pro kontrolu mRNA amplifikace byl použit referenční gen GAPDH, který má ve sledovaných buněčných liniích prokázanou konstantní expresi nezávislou na okolních podmínkách. Místo vzorku byla v negativní kontrole použita DEPC voda.

14.6 Stanovení koncentrace bílkoviny

Princip

Metoda využívá kyseliny bicinchoninové (BCA) ke spektrofotometrickému stanovení celkových proteinů. BCA stanovení bílkoviny je založeno na alkalické redukci měďnatého iontu na měďný a následné chelataci měďného iontu kyselinou bicinchoninovou za vzniku fialového zbarvení. Bicinchoninová metoda je velmi citlivá na podmínky provedení: závisí na době a teplotě inkubace, na charakteru proteinu použitého k standardizaci atd (53).

Použité roztoky pro stanovení:

- Roztok A: NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH
- Roztok B: 4% CuSO₄ · 6 H₂O
- Roztok C: smíchání roztoku A s roztokem B v poměru 50:1

Kalibrační křivka

Jako standard pro vytvoření kalibrační křivky byl použit 1% roztok albuminu (BSA). Koncentrace určované bílkoviny byla v rozmezí 0 – 1000 µg/ml.

	Koncentrace	Roztok 1% BSA	Destilovaná voda
1	0 µg/ml	0 µl	500 µl
2	200 µg/ml	10 µl	490 µl
3	400 µg/ml	20 µl	480 µl
4	600 µg/ml	30 µl	470 µl
5	800 µg/ml	40 µl	460 µl
6	1000 µg/ml	50 µl	450 µl

Postup

Všechny vzorky byly 5x naředěny (10 µl vzorku a 40 µl destilované vody) a byly připraveny v duplikátech. Tyto duplikáty byly poté napipetovány do 96-jamkové destičky po 10 µl a bylo k nim přidáno 200 µl roztoku C.

Destička se vzorky byla následně inkubována 30 min při 37°C. V dalším kroku byla změřena absorbance při 562 nm proti destilované vodě. Poté co byl od vzorků odečten průměr slepých vzorků, byly srovnány hodnoty absorbance vzorků s kalibrační křivkou a určena koncentrace vzorků.

14.7 Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS) je další elektroforetický způsob separace na základě velikosti molekul separovaných látek, jehož použití však je vymezeno speciálně pro bílkoviny. SDS je anionaktivní detergent, který nese poměrně vysoký náboj, a proto ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin a ty se pohybují v gelu jen podle velikosti. Všechny bílkoviny totiž váží SDS v konstantním poměru, asi 1,4 g SDS na 1g bílkoviny, a tím charakteristicky mění svou konformaci. Výsledné komplexy SDS-bílkovina pak mají stejnou hodnotu povrchového náboje a jejich konformace se do té míry unifikuje, že relativní molekulová hmotnost bílkoviny odpovídá velikosti jejího komplexu s SDS (55).

Experimentálně byla prokázána přímá úměrnost elektroforetické pohyblivosti komplexů SDS-bílkovina v polyakrylamidovém gelu a logaritmu relativní molekulové hmotnosti. Takto stanovené hodnoty relativní molekulové hmotnosti se obecně uznávají pro účely charakterizace bílkovinného preparátu. Je však třeba počítat s tím, že SDS obvykle inaktivuje biologicky aktivní látky, zejména enzymy, a proto po elektroforetické separaci již nelze enzym specifickým způsobem (tj. na základě své katalytické aktivity) prokázat (55).

Zásobní roztoky

- 4 M HCl
- Zásobní roztok AA + bisAA
- Tris-HCl pufr, pH 8,8
- 0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8
- 10% SDS

- Koncentrovaný elektrodotový pufr
- Isobutanol nasycený vodou
- Zásobní roztoky na ředění vzorků

Zásobní roztoky na ředění vzorků

4xSDS vzorkový pufr

Složka (konečná koncentrace)	Koncentrace zásobního roztoku	Pipetované množství
200 mM Tris/ HCl pH 6,8	1M	4 ml
40% glycerol	85%	9,41 ml
6% SDS	prášek	1,2 g
0,2 M DTT	prášek	0,617 g
0,1 g bromfenolová modř	prášek	špetka
Redest. H ₂ O		20 ml

Lyzační pufr

Složka (konečná koncentrace)	Koncentrace zásobního roztoku	Pipetované množství
50 mM Tris/ HCl pH 7,4	1M	50 ml
150 mM NaCl	prášek	8,766 g
10% glycerol	85%	117,65 ml
1% Triton X-100	100%	10 ml
2 mM EDTA	prášek	0,58 g
2 mM EGTA	prášek	0,76 g
40 mM β-glycerolfosfát	prášek	8,52 g
50 mM fluorid sodný	prášek	2,09 g
10 mM pyrofosfát sodný	prášek	4,46 g
2 mM dithiotreitol	prášek	0,3085 g
200 μM vanadičnan sodný	prášek	0,03678 g
H ₂ O		Doplnit objem na 1 l

Pracovní roztoky

10% APS

Těsně před použitím bylo rozpuštěno 25 mg persíranu amonného ve 250 μ l redestilované vody.

Separační gel (spodní)

	7,5% – 2 gely; 1,5 mm	10% - 2 gely; 1,5 mm
Redestilovaná voda	9,8 ml	8,1 ml
Pufř 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	5 ml	5 ml
Roztok AA+bis AA	5 ml	6,7 ml
10% SDS	0,2 ml	0,2 ml
Iniciace polymerace		
Roztok APS	200 μ l	200 μ l
TEMED	16 μ l	16 μ l

Zaostřovací gel 4% (horní)

	2 gely; 1,5 mm	4 gely; 1,5 mm
Redestilovaná voda	6,1 ml	12,2 ml
Pufř 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml	5 ml
Roztok AA+bis AA	1,3 ml	2,6 ml
10% SDS	0,1 ml	0,2 ml
Iniciace polymerace		
Roztok APS	200 μ l	400 μ l
TEMED	16 μ l	32 μ l

Elektrodový pufř

Zásobní elektrodový pufř o objemu 70 ml byl smíchán se 280 ml redestilované vody.

Ředění vzorku

Dle obsahu bílkoviny byl vzorek naředěn tak, aby výsledná koncentrace byla 1 μ g/ μ l. Vzorek byl ředěn 4xSDS vzorkovým pufřem a lyzačním pufřem s roztokem inhibitorů.

Postup

Příprava gelu

Prvním krokem bylo nachystání nalévacího stojánku, skla, skla se spacerem, spon a hřebenu. Skla byla přiložena na sebe a spojena sponami. Spojená skla byla postavena na gumovou podložku v nalévacím stojánku a přichycena vrchním kolíkem. Dále byl namíchán roztok na spodní gel, který po promíchání byl nalit mezi skla do výšky cca 4,5 cm od spodního okraje. Následně byl gel převrstven isobutanolem nasyceným vodou (cca 200 μ l) a nechán 30 - 60 minut polymerovat.

Poté byl odlit isobutanol a byl namíchán roztok na zaostřovací gel. Ten byl nalit mezi skla na spodní gel a byl do něj zasunut hřeben až po drážky. Gel byl pak nechán polymerovat po dobu 30 min.

Elektroforéza

Naředěné vzorky byly povařeny v předehřátém termobloku na 5 minut při 95°C. Gely byly uvolněny ze stojánku a opatrně z nich byl vyndán hřeben. Skla s gelem pak byla vložena do připraveného stojánku na elektroforézu, tak aby byla silná skla na vnější straně.

Stojánek byl vložen do vaničky a do vnitřního elektrodového prostoru byl nalit elektrodový pufr tak, aby byl ponořen celý gel. Do vnějšího elektrodového prostoru byl nalit elektrodový pufr tak, aby hladina pufru byla nad elektrodou.

Dále bylo nanášeno 30 μ l vzorku do každé jamky (tj. 30 μ g bílkoviny). Do krajních jamek byl pipetován 1xSDS pufr a do jedné jamky byl nanášen molekulární standard v objemu 5 μ l. Vanička byla přiklopená víkem a položena do ledové lázně. Následně k ní byl připojen zdroj a nastaveno napětí 120 V.

14.8 Western Blotting (Imunobloting)

Tato metoda se používá pro přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na pevnou nosnou membránu. Detekce hledaných proteinů je zajištěna použitím pro ně specifických protilátek (51).

Zásobní roztoky

- Blotovací pufr

Postup

Nejprve byl do rohu PVDF membrány napsán název proteinu, případně i buněčná linie. Takto popsána membrána byla aktivována ponořením na 5 min do metanolu. Pomocí zelených klímků bylo rozevřeno sklo. Zaostřovací gel a gel od spacerů byl odříznut. U separačního gelu byla odříznuta dolní část se zbytkem vzorků obarvených nanášecím pufrem.

Separací gel byl oddělen od spodního skla a vložen do blotovacího pufru. K němu byla ponořena i metanolem aktivovaná PVDF membrána. V blotovacím pufru byl namáčen také tlustý filtrační papír (2ks pro jeden gel) a blotovací houbičky pro sestavení blotovacího „sendviče“ po dobu 20 minut.

Jednotlivé části byly do blotovacího sendviče skládány v tomto pořadí: (začátek skládání vždy na černé straně blotovacího „sendviče“)

- 1 blotovací houbička
- 1 silný filtrační papír
- Gel (marker = žebříček na pravé straně) – gel byl rukama lehce uhlazen, aby byly odstraněny bubliny
- PVDF membrána byla na gel položena tak, aby byl nápis dole a na stejné straně jako marker. Membrána byla znovu uhlazena kvůli odstranění bublin.
- 1 silný filtrační papír, který byl od středu uhlazen pro odstranění bublin
- 1 blotovací houbička

Blotovací sendvič byl poté uzavřen a vložen do blotovacího nástavce, který byl do vany vložen tak, aby kolíky byly uprostřed. Do volného prostoru vany bylo vloženo ledítko.

Celá vana byla vložena do ledové lázně a byla připojena přes víko s kabely ke zdroji. Zdroj byl nastaven na 100 V a 0,25 A a spuštěn.

Po uplynutí 90 minut byly membrány opatrně vyjmuty pomocí pinzety a pokračovalo se dle postupu uvedeného v kapitole „Detekce proteinů“.

14.9 Detekce proteinů

Zásobní roztoky

- 0,1 M TRIS pufr, pH 8,0
- 10xTBS
- TBST

Primární protilátky

Podle instrukcí výrobce byla zásobní protilátka zředěna TBST pufrům s 5% BSA, nebo 5% sušeného mléka bez tuku.

Sekundární protilátky

Podle instrukcí výrobce byla zásobní protilátka zředěna (1:10 000 – 1:20 000) TBST pufrům s 2% BSA.

Postup

Do plastové misky s víčkem byla pinzetou přenesena membrána. V této misce probíhalo veškeré oplachování a inkubace. Do misky byla nalita destilovaná voda a membrána v ní byla kývavým pohybem opláchnuta. Na membránu byl dále nalit roztok 5% mléka v TBST pufru (do jedné krabičky cca 15 ml). Krabičky byly umístěny na kývačku po dobu 1 – 2 hodin. Po odlití mléka byla membrána opláchnuta a následně inkubována s primární protilátkou přes noc.

Druhý den byla slita primární protilátka. Membrána pak byla oplachována TBST pufrům (6x5 minut) a byla inkubována 1-2 hodiny se sekundární protilátkou. Potom opět následovalo oplachování membrány TBST pufrům (6x5 minut).

Chemiluminiscenční detekce

Z krabičky s membránou byl vylit TBST pufr. Na povrch membrány bylo napipetováno tolik substrátu, aby byla pokrytá celá membrána, která byla dále inkubována 5 min. Membrána byla po vyndání ze substrátu přenesena do přístroje na detekci blotů - Gel Logic. Doba expozice byla měněna podle typu protilátky. Pro detekci byl použit program Carestream.

14.10 Stanovení migrace v reálném čase

Princip

Analýza buněčné migrace v reálném čase pomocí přístroje x-CELLigence funguje na principu Boydenovy komůrky. Přístroj se skládá zjednodušeně řečeno ze 2 komor. Buňky jsou nanášeny do horní komory a migrují skrz porézní membránu do dolní komory s chemoatraktantem, kde přicházejí do kontaktu s elektrickými senzory a jejich počet je přímo úměrný měřené impedanci (komplexní veličina popisující zdánlivý odpor součástky při průchodu střídavého elektrického proudu) (52).

Postup

Byla připravena suspenze buněk kontrolních (kultivovaných po dobu 48 h v médiu DMEM bez séra) a ovlivněných 5 ng/ml TGF- β v médiu DMEM bez séra po dobu 48 h.

Horní komůrka byla naplněna 130 μ l předehřátého bezsérového média. Spodní komůrka byla naplněna 175 μ l předehřátého média obsahujícího 10% FBS. Komůrky byly poté spojeny dohromady a z horní komůrky bylo odebráno 100 μ l. Destička byla vložena do inkubátoru a ponechána 1 hodinu v inkubátoru, aby došlo k dosažení rovnováhy na membráně. Následně bylo změřeno pozadí.

Do horní komůrky bylo přidáno 100 μ l buněčné suspenze o koncentraci 30 000 bk/jamku. Destička s buňkami byla vložena zpět do inkubátoru a nechána 30 minut, dokud si buňky nesednou na membránu, a pak změřena migrace po dobu 24 hodin v 5 – 10 minutových intervalech.

15 Imunofluorescenční detekce E-kadherinu a N-kadherinu

Blokovací pufr:

- PBS + 1% BSA + 0,3% Triton X-100

Primární protilátky

- monoklonální protilátka proti E-kadherinu (E-kadherin (4A2) Mouse mAb, 14472, Cell Signaling) ředěna v blokovacím pufru v poměru 1 : 50
- monoklonální protilátka proti N-kadherinu (N-kadherin (D4R1H)XP Rabbit mAb, 13116, Cell Signaling) ředěna v blokovacím pufru v poměru 1 : 200

Sekundární protilátky

- Anti-Mouse IgG AlexaFluor 488 conjugate, 4408 Cell Signaling
- Anti-Rabbit IgG AlexaFluor 594 conjugate, 8889 Cell Signaling
- obě ředěny v blokovacím pufru v poměru 1 : 250

DAPI (Sigma-Aldrich) – fluorescenční barvivo k dobarvení jader

Postup

Buňky DOK byly nasazeny do cytospinových komůrek v hustotě 8×10^3 buněk na komůrku, v mediu DMEM + 10% FBS a byly inkubovány 24 h v inkubátoru (37°C, 5% CO₂). Poté bylo vyměněno medium - v kontrolách za DMEM bez séra, v ostatních za DMEM bez séra + 10 ng/ml TGF-β. Následovala inkubace dalších 72 h v inkubátoru (37°C, 5% CO₂). Buňky byly dále fixovány přidáním 0,5 ml 2% paraformaldehydu v PBS 15 min při pokojové teplotě.

Vzorky byly opláchnuty 3 x 1 ml PBS. V dalším kroku bylo přidáno 300 μl blokovacího pufru a necháno 1 h při pokojové teplotě. Vzorky byly poté inkubovány s roztokem primárních protilátek (100 μl roztoku na komůrku) a nechány v lednici přes noc. Následovalo znovu opláchnutí tentokrát 5 x 1 ml PBS. Vzorky byly inkubovány s roztokem sekundárních protilátek (100 μl roztoku na komůrku) 1 hod při pokojové teplotě. Opět byly opláchnuty 5 x 1 ml PBS. Vzorky byly dále barveny roztokem DAPI v koncentraci 1 μg/ml (100 μl roztoku na komůrku) po dobu 5 min a opláchnuty 3 x 1 ml PBS. Komůrky byly poté rozebrány a buňky byly přikryty krycím sklem. Fotografie

byly pořízeny na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E 400 (Nikon Corporation, Japan).

16 Výsledky

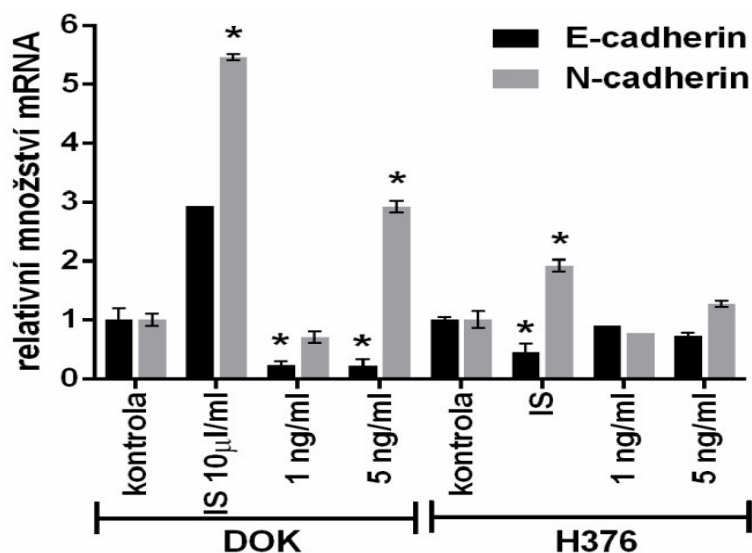
16.1 Detekce markerů pomocí metody RT-PCR

Jako první byly stanovovány markery pomocí metody RT-PCR na úrovni mRNA. Stanovení markerů probíhalo na buněčných liniích DOK a H376. EMT byla indukována pomocí známých induktorů TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) a indukčním suplementem (IS) (koncentrace 10 μ l/ml) po dobu 5 dní. Měřili jsme zde změny množství mRNA markerů oproti kontrolním indukci neovlivněným vzorkům.

Naměřené hodnoty byly porovnávány statisticky metodou Two-way ANOVA a Bonferroniho testem v programu Graph Pad Prism. * $p < 0,0001$

16.1.1 E-Kadherin a N-Kadherin

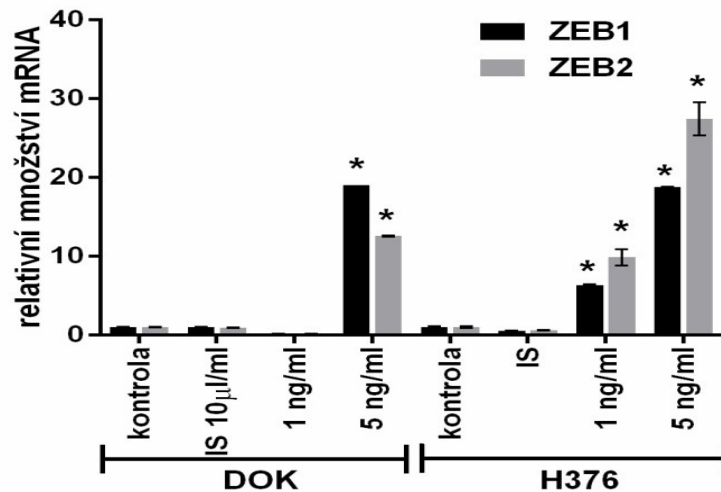
Ke statisticky významným nárůstům množství mRNA u linie DOK došlo pouze u metastatického markeru N-kadherinu a to hlavně po indukci IS a TGF- β při koncentraci 5 ng/ml. Epiteliální marker E-kadherin je u DOK linie oproti kontrole významně snížen po indukci TGF- β při obou použitých koncentracích. U linie H376 statisticky významná data zaznamenáváme pouze po indukci IS po dobu 5 dní. Je zde opět pozorován nárůst N-kadherinu a pokles E-kadherinu vůči kontrole.



Obr. 7: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi genu pro E-kadherin a N-kadherin u buněčných liniích DOK a H376. * $p < 0,0001$; N=3

16.1.2 ZEB 1 a ZEB 2

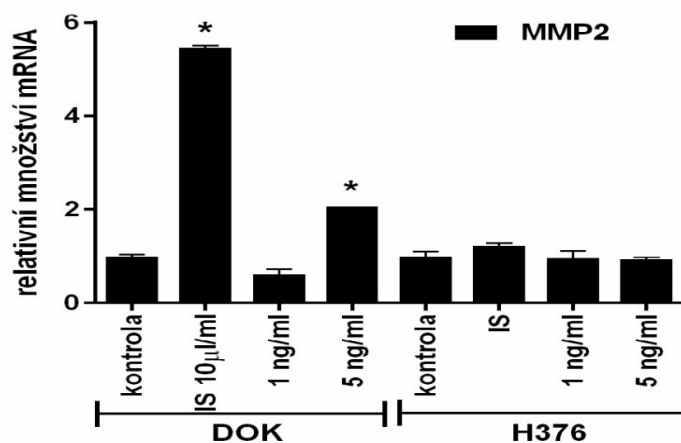
U transkripčních faktorů ZEB1 a ZEB2 jsou signifikantní změny pozorovány pouze po indukci TGF- β a to při použití koncentrace 5 ng/ml na obou testovaných liniích. U koncentrace 1 ng/ml je nárůst mRNA sledován pouze u linie H376.



Obr. 8: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi genu pro ZEB1 a ZEB2 u buněčných linií DOK a H376. * p < 0,0001; N=3

16.1.3 MMP-2

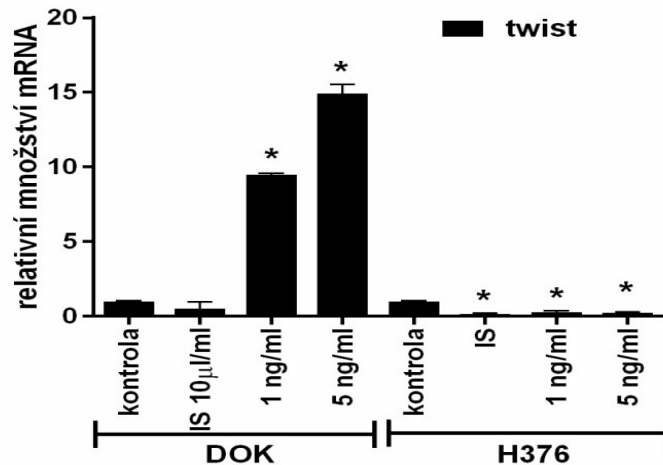
U MMP-2 můžeme pozorovat významný vzestup hladiny mRNA vůči kontrole pouze u buněčné linie DOK po indukci IS a TGF- β při koncentraci 5 ng/ml.



Obr. 9: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi genu pro MMP-2 u buněčných linií DOK a H376. * p < 0,0001; N=3

16.1.4 Twist

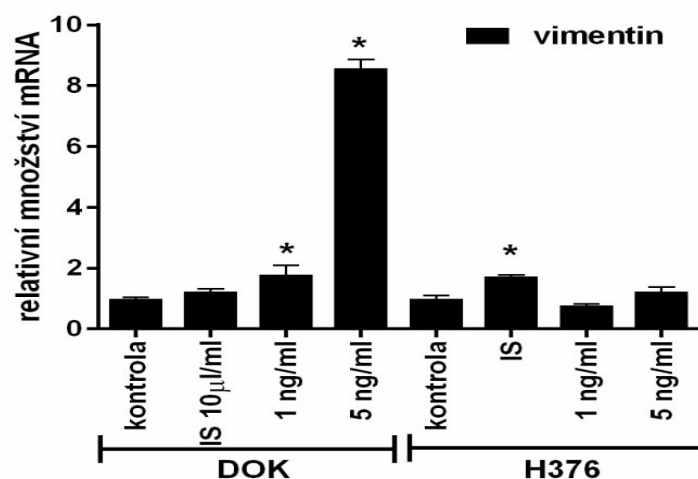
Transkripční faktor Twist je na linii DOK podstatně zvýšen po indukci TGF- β u obou koncentrací. Statisticky významný pokles oproti kontrole sledujeme u linie H376 po indukci TGF- β i IS.



Obr. 10: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi genu pro Twist u buněčné linie DOK a H376. * p < 0,0001; N=3

16.1.5 Vimentin

U vimentinu statisticky významné změny pozorujeme hlavně po indukci TGF- β u linie DOK, kde nejvyšší nárůst je zaznamenán u koncentrace 5 ng/ml. U linie H376 statistický nárůst sledujeme pouze po indukci IS.

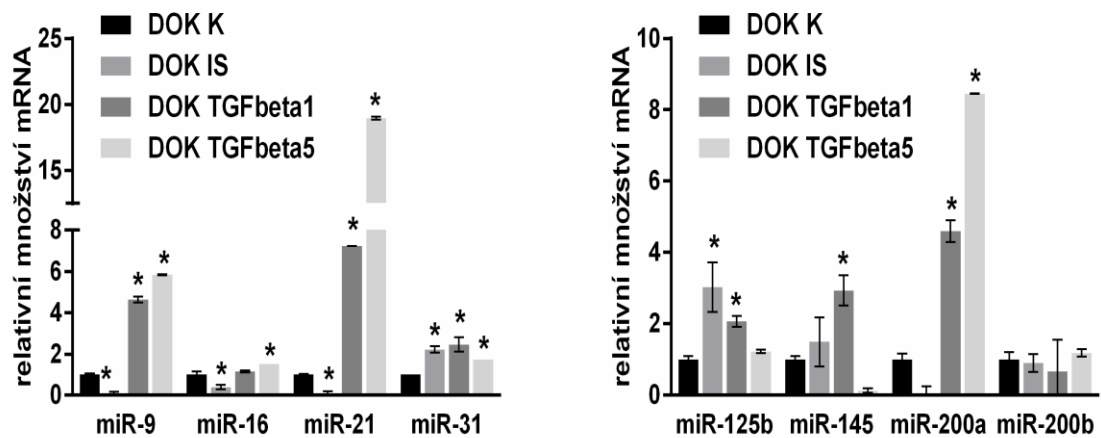


Obr. 11: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi genu pro vimentin u buněčných linií DOK a H376. * p < 0,0001; N=3

16.1.6 MikroRNA

Na základě výsledků získaných z analýzy mRNA markerů jsme expresi mikroRNA stanovovali už pouze u linie DOK, která lépe reagovala na indukci EMT.

Významné statistické nárůsty hladiny mikroRNA byly naměřeny hlavně po indukci TGF- β . Nejvyšší přírůstek množství miR je pozorován u miR 21 a miR 200 a to po indukci TGF- β o koncentraci 5 ng/ml. Signifikantní změny po indukci IS byly zaznamenány např. u miR 9, kde došlo k významnému snížení hladiny, naopak po indukci TGF- β byl naopak zaznamenán nárůst. Ke snížení hladiny po indukci IS došlo i u miR 16.

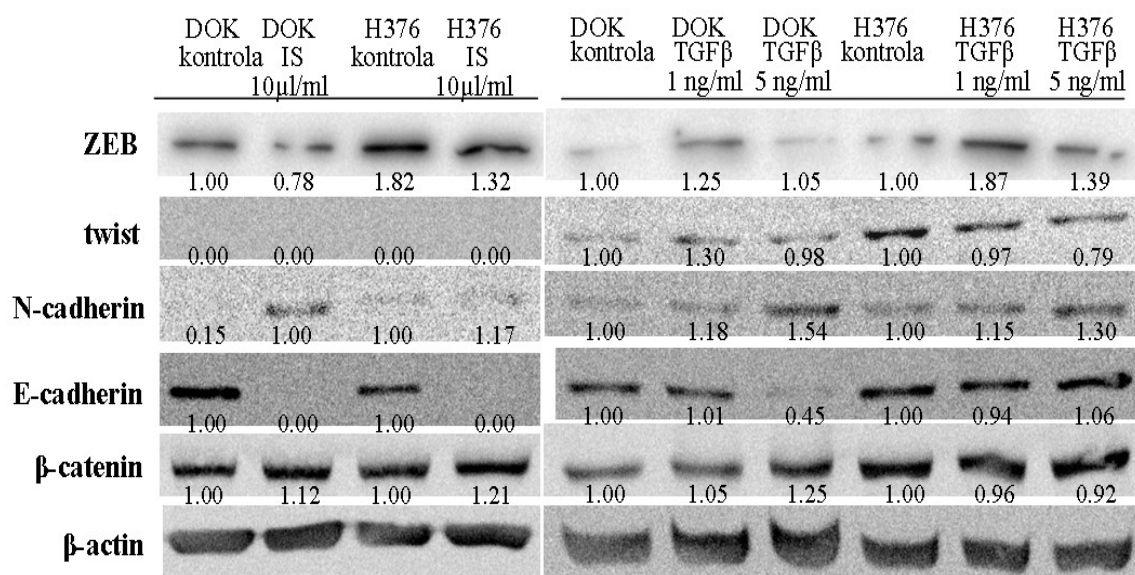


Obr. 12: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi mikroRNA u buněčné linie DOK. * $p < 0,0001$; N=3

16.2 Detekce markerů pomocí Western blotu

EMT markery jsme dále stanovovali na úrovni proteinů pomocí imunoblotu (Western blot). Detekovali jsme markery ZEB, Twist, E-kadherin, N-kadherin, vimentin, β -katenin. Stanovení makerů probíhalo na buněčných liniích DOK a H376, které byly indukovány IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) po dobu 5 dní. Pod jednotlivými bloty jsou uvedeny hodnoty poměru density (tloušťky pruhu) daného proteinu (např. N-kadherinu) vůči hodnotě β -aktinu, který je zde použit jako referenční protein. Výsledky byly porovnávány vůči kontrolním neovlivněným vzorkům u obou buněčných linií.

Po indukci IS lze sledovat nárůst hladiny markerů N-kadherinu a β -kateninu u obou buněčných linií. Naopak mírné snížení množství lze pozorovat u transkripčního faktoru ZEB na DOK i H376 liniích. Významný pokles množství proteinu oproti kontrole můžeme sledovat u E-kadherinu. U koncentrace TGF- β 1 ng/ml největší vzestup hladiny proteinů sledujeme na transkripčním faktoru ZEB u H376 i DOK liniích. Přírůstek proteinů je také zaznamenán u markeru Twist u DOK linie. Indukce pomocí TGF- β při koncentraci 5 ng/ml se nejvíce projevila zvýšením množství u N-kadherinu a β -kateninu na DOK liniích a markeru ZEB na H376 liniích. Pokles množství lze opět sledovat hlavně u E-kadherinu.

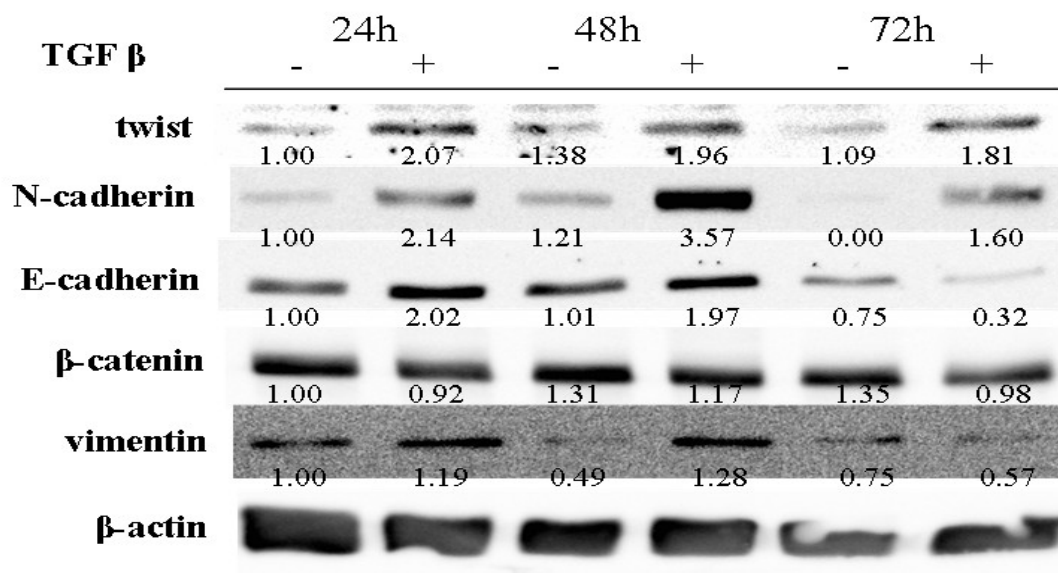


Obr. 13: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi proteinů u buněčných linií DOK a H376.

Na základě výsledků z RT-PCR a Western blotu jsme se rozhodli dále pokračovat v testování pouze s induktorem TGF- β při koncentraci 5ng/ml a buněčnou linií DOK.

Pomocí Western blotu jsme se rovněž snažili detekovat změny v expresi proteinů jednotlivých markerů EMT v odstupe 24, 48 a 72 hodin po indukci vůči kontrolním vzorkům. Vzorky ovlivněné indukci jsou označeny znaménkem +, kontrolní vzorky znaménkem - .

Vzestup hodnot markerů N-kadherinu a Twist je zaznamenán ve všech časových intervalech od indukce. Největší přírůstek množství lze pozorovat u N-kadherinu 48 hodin od indukce. Hladina vimentinu a E-kadherinu roste pouze první dva časové intervaly, pak zaznamenáváme její pokles. Hodnoty β -kateninu jsou ve všech časových intervalech nižší oproti kontrole.

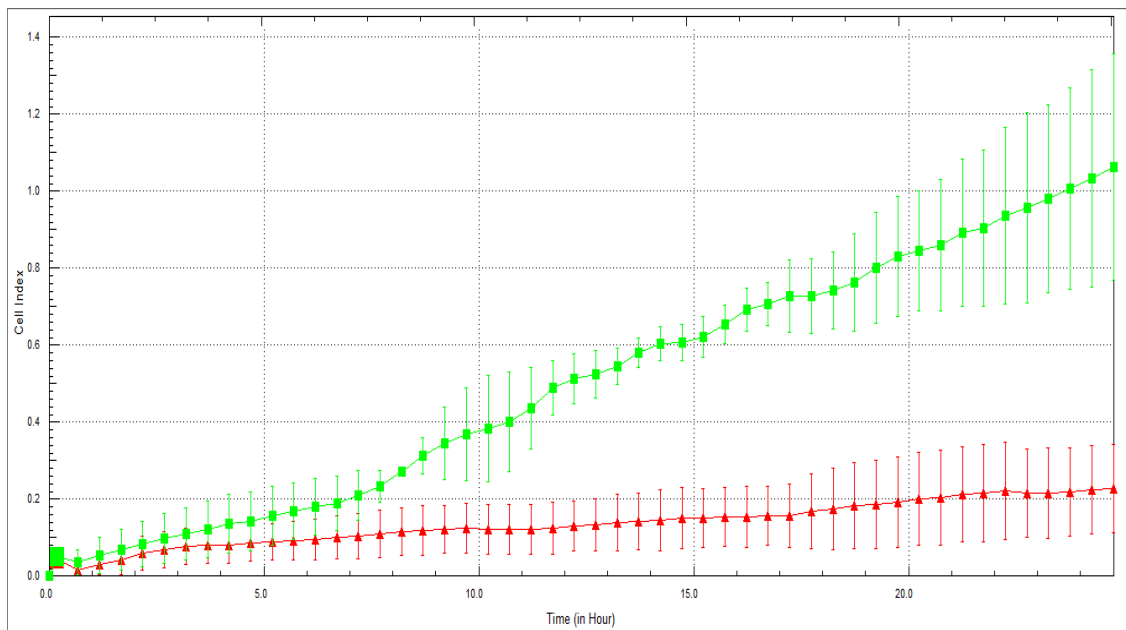


Obr. 14: Porovnání vlivu indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi proteinů u buněčných linií DOK a H376 v různých časových intervalech (24h, 48h, 72h).

16.3 Schopnost migrace buněk

Schopnost migrace buněk byla zjišťována v reálném čase pomocí systému x-CELLigence u buněčné linie DOK po indukci TGF- β po dobu 48 h při koncentraci 5 ng/ml. Migrace byla sledována po dobu 24 h.

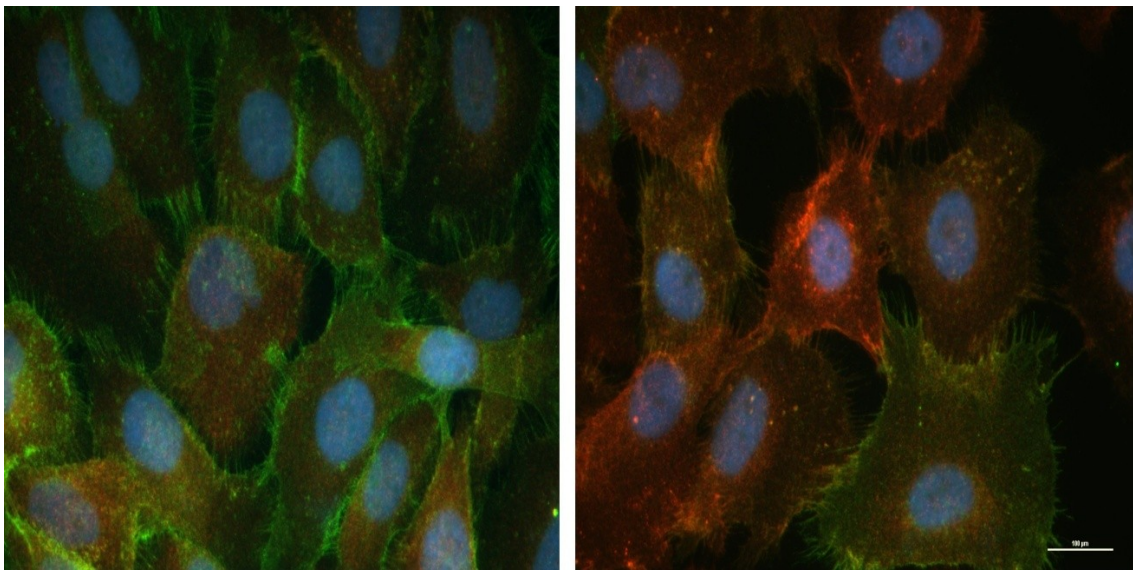
Na Obr. 15 jsou vidět 2 křivky, z nichž červená odpovídá kontrole a zelená buňkám po indukci EMT. Lze pozorovat výrazný nárůst migrace u indukovaných buněk oproti kontrolním neindukovaným buňkám.



Obr. 15 : Porovnání migrace buněk indukovaných TGF- β o koncentraci 5ng/ml (zelená křivka), vůči neovlivněným buňkám (červená křivka) na liniích DOK po dobu 24 h.

16.4 Imunofluorescenční detekce E-kadherinu a N-kadherinu

Pro vizuální potvrzení „kadherinového switchu“ jsme použili metodu imunofluorescence. Detekce probíhala na buněčné linii DOK po indukci TGF- β v koncentraci 10 ng/ml. Obrázek vlevo zobrazuje kontrolní (indukcí neovlivněný) vzorek a obrázek vpravo indukovaný vzorek po 48 hod od indukce. U kontrolních buněk je E-kadherin lokalizován v mezibuněčných spojích (zelená fluorescence), zatímco N-kadherin se barví slabě v cytoplazmě (červená fluorescence). V ovlivněném vzorku lze pozorovat znatelný úbytek E-kadherinu vůči N-kadherinu a přesun N-kadherinu do buněčných membrán.



Obr. 16: Imunofluorescenční detekce E-kadherinu a N-kadherinu; Obrázek vlevo - DOK kontrola; Obrázek vpravo – DOK indukované TGF- β 10 ng/ml po 48 hod od indukce; E-kadherin je barven zeleně, N- kadherin barven červeně, jádra jsou barvena modře pomocí DAPI.

17 Diskuze

Metastazování, relaps a rezistence k chemoterapii patří mezi hlavní příčiny většiny úmrtí na malignitu. Metastatický děj je vysoce organizovaný a orgánově specifický. Mechanismus metastatické kaskády není přesně znám, ale má se zato, že se na jeho vzniku podílí program EMT (56). EMT je proces měnící nepohyblivé epiteliální buňky na pohyblivé mezenchymální buňky. V lidském těle má důležitou funkci během embryogeneze a hojení ran. Patofyziologickou změnou epiteliálního fenotypu na mezenchymální ovšem také napomáhá progresi nádorů a vzniku sekundárních ložisek. Detekce vhodných EMT markerů je jedním z důležitých faktorů sloužících k potvrzení proběhnuvší tranzice. Jak bylo v textu výše zmíněno, markery obsahují širokou skupinu molekul zahrnující molekuly charakteristické pro jednotlivé fenotypy buněk (E-kadherin, N-kadherin) či transkripční faktory drah indukující EMT (ZEB, Twist) (23) (24).

V této práci jsme markery stanovovali na úrovni mikroRNA, mRNA a proteinů. Zajímalo nás také, jak se projeví indukce EMT na schopnosti migrace buněk. Pro navození EMT byly použity dva známé induktory TGF- β a IS. Měření probíhalo na buněčných liniích DOK a H376.

E-Kadherin patří mezi důležité povrchové adhezní proteiny. Je součástí adhezních spojení mezi epitelovými buňkami udržujícími soudržnost epitelové tkáně a zabraňujícími migraci buněk. Snížená tvorba E-kadherinu byla potvrzena u řady nádorů (58). Ve studii zkoumající expresi E-kadherinu v invazivním orálním karcinomu, byly naměřeny signifikantně snížené hladiny mRNA E-kadherinu v invazivní části nádoru oproti kontrole a jiným částem nádoru (59). Další studie měřila expresi E-kadherinu v různých stádiích nádorů štítné žlázy. V I. a II. stádiu nádorů byla exprese E-kadherinu zvýšena a ve III. a IV. stádiu rapidně snížena. Podle jejich výsledku vyšší množství E-kadherinu koreluje s nízkou invazivitou a schopností metastazovat (60). U našich měření byl pozorován signifikantní úbytek E-kadherinu na úrovni mRNA i proteinů u obou buněčných linií. Podle výsledku Western blotu začaly hladiny E-kadherinu významně klesat až po 72 hod od indukce.

Opačnou funkci než E-kadherin má transmembránový protein N-kadherin. N-Kadherin netvoří silná adhezní spojení a zvyšuje motilitu buněk. Jeho zvýšená tvorba je pozorována hlavně u mezenchymálních a nádorových buněk. Pokles epiteliálního

E-kadherinu oproti vzrůstu mezenchymálního N-kadherinu značí tzv. „kadherinový switch“, který je jedním z poznávacích znaků EMT (29). V této studii se povedlo „kadherinový switch“ detekovat opět na úrovni mRNA i proteinů u linie DOK i H376. Potvrzují jej i fotografie z imunofluorescence, kde lze navíc pozorovat změnu lokalizace N-kadherinu, který je u ovlivněných buněk přesunut do plazmatické membrány. Pomocí Western blotu bylo zvýšené množství N-kadherinu naměřeno ve všech časových intervalech od indukce EMT.

β -Katenin se stává mezenchymálním markerem až po uvolnění se z kadherin/kateninového komplexu. Volný β -katenin pak přestupuje z cytosolu do jádra, kde indukuje EMT vlastní signální drahou (17). Studie zabývající se vlivem β -kateninu v orofaryngeálním nádoru naměřila vyšší hodnoty β -kateninu pomocí metod RT-PCR a Western blotu. Tyto výsledky byly spojeny s horší prognózou u pacientů (61). V této práci byl β -katenin měřen na úrovni proteinů, kde jeho hladina byla přibližně na úrovni kontroly. Téměř nezměněné hodnoty by mohly být následkem jeho izolace, jelikož izolován byl pouze volný cytosolický β -katenin obsažený v supernatantu. Do těchto měření tedy není započítán jaderný β -katenin.

Transkripční faktory ZEB a Twist se podílí na inhibici produkce E-kadherinu. ZEB proteiny navíc represivně působí na miR 200 blokující EMT signály (62) (63). Ve studii, která porovnávala množství ZEB a E-kadherinu v nádoru dutiny ústní bylo zjištěno, že vyšší hodnoty ZEB vůči E-kadherinu znamenají horší predikci onemocnění (64). Naše studie zaznamenala signifikantně vyšší množství ZEB a Twist zejména na úrovni mRNA. Výsledky z Western blotu navíc ukázaly zvýšené hodnoty Twist ve všech časových intervalech od indukce.

Intermediární filamentum vimentin je součástí cytoskeletálního aparátu nádorových a mezenchymálních buněk a pomáhá navozovat EMT (33). Naše výsledky ukázaly, že vimentin měl signifikantně zvýšenou expresi mRNA pouze u buněčné linie DOK. Nárůst množství proteinu byl pozorován v intervalech 24 hod a 48 hod od indukce EMT.

MikroRNA mají v ději EMT úlohu jak supresorovou, tak indukční. Mezi významné supresory patří rodina miR 200. Pokud jsou tyto miR v nadbytku, potlačují indukční dráhy EMT, podporují tvorbu E-kadherinu a zabraňují expresi ZEB. Hlavním cílem TGF- β dráhy a ZEB proteinů je naopak snížená exprese miR 200 (63). Tento příklad

uvádí studie zkoumající vliv miR 200a na pankreatických kmenových nádorových buňkách (43). Naše výsledky RT-PCR tato tvrzení nepodporují, protože vysoké hladiny můžeme pozorovat u ZEB, ale rovněž i u miR 200a.

Pomocí RT-PCR byl v této studii pozorován signifikantní vzrůst množství onkogenních miR zvláště miR 21. MiR 21 podporuje tvorbu matrix metaloproteinázy-2 (MMP-2), která degraduje extracelulární matrix okolo buňky a pomáhá tak přestupu nádorové buňky do krve (54). Podle studie zabývající se hodnotami miR v buňkách kolorektálního karcinomu nadměrné hladiny miR 21 souvisejí s vyšší incidencí vzniku metastáz (45). Hodnoty MMP-2 byly v naší studii rovněž statisticky významně zvýšeny na úrovni mRNA. Další charakteristikou u řady metastazujících solidních nádorů je zvýšena exprese miR 9. MiR 9 podporuje EMT a buněčnou invazivitu přímo potlačením E-kadherinu (54). V našich experimentech došlo ke snížení hladiny této miR po indukci IS, kdy zároveň došlo ke statisticky významnému nárůstu hladiny E-kadherinu. Naopak po ovlivnění TGF- β byl pozorován statisticky významný nárůst hladiny miR 9, což koreluje se sníženou hladinou E-kadherinu na úrovni mRNA. Z těchto výsledků vyplývá, že hladina E-kadherinu by mohla být v těchto buňkách regulována přes dráhu miR 9.

Schopnost migrace je klíčovou vlastností nádorových buněk pro zakládání sekundárních ložisek nádorů. Metody používané pro zjištění schopnosti migrace pracují na různých principech. Například rychlosti zacelení ran, kdy rychlost uzavření rány a migrace buněk lze kvantifikovat mikroskopem v několika časových intervalech. Na základě různých porovnávacích studií byla vybrána metoda fungující na schopnosti buněk reagovat na určitý chemoatraktant a migrovat přes fyzickou bariéru směrem k němu (66). Pro detekci migrace buněk v reálném čase byl v naší studii použit systém x-CELLigence vycházející z této metody. Naše výsledky potvrzují zvýšenou schopnost migrace u DOK buněk indukovaných EMT oproti kontrolním buňkám.

Shrme-li všechny výsledky, tak indukce EMT byla nejlépe demonstrována na tvorbě adhezních molekul E-kadherinu a N-kadherinu. Vhodnější modelovou buněčnou linií se jevila prekancerózní linie DOK, než nádorová linie H376, u které se předpokládaly výraznější znaky mezenchymálního fenotypu. EMT byla vyvolána na úrovni mikroRNA, mRNA i proteinů a celkově potvrzena zvýšenou schopností migrace buněk.

18 Závěr

- Jako vhodná modelová linie pro studium EMT byla vyhodnocena buněčná linie DOK, přičemž optimálním induktorem EMT se jeví TGF- β při koncentraci 5 ng/ml .
- Optimální časový interval pro navození indukce EMT a pro detekci markerů nebyl přesně určen. V intervalu 48 hodin od indukce dochází k největšímu nárůstu mezenchymálních markerů vůči kontrole na úrovni proteinů, ale ještě neklesá hladina E-kadherinu. Snížené množství E-kadherinu je měřitelné až po 72 hod od indukce.
- EMT byla potvrzena na úrovni mikroRNA, mRNA, proteinů i zvýšenou migrací buněk. Dále byl potvrzen kadherinový switch na úrovni mRNA i proteinů. Základní markery EMT, jako oba kadheriny a transkripční faktory ZEB a Twist se podařilo stanovit.

19 Seznam zkratek

- AA - akrylamid
- AJ – Adhezivní spojení (Adhesive junction)
- APS – persíran amonný
- BCA – kyselina bicinchoninová (bicinchoninic acid)
- bis AA – bis-akrylamid
- BM – bazální membrána
- BSA – hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
- cDNA – komplementární DNA (complementary DNA)
- DAPI – fluorescenční barvivo (4',6-diamidino-2-fenylindol) (104)
- DEPC - diethylpyrokarbonát
- DEPC voda – voda bez nukleáz
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DOK – dysplastické orální keratinocyty
- DTT – dithiotreitol
- ECM – extracelulární matrix
- EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová
- EGF – epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
- EGTA – kyselina ethylenglykoltetraoctová (ethylene glycol tetraacetic acid)
- EMT – epiteliálně-mezenchymální tranzice
- FBS – fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
- FGF – růstový faktor pro fibroblasty
- GAPDH – referenční gen kódující proteiny z rodiny glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáz
- HCl – kyselina chlorovodíková
- JAM – junkční adhesivní molekuly
- miR - mikroRNA
- MMPs – matrixové metaloproteinázy
- mRNA – messenger RNA
- MET – mezenchymálně – epiteliální tranzice
- NaCl – chlorid sodný
- PBS – fosfátový pufr s fyziologickým pH (Phosphate Buffered Saline)
- PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
- PET - polyetylentereftalát
- PVDF membrána – polyviniliden difluoridová membrána
- RNA – ribonukleová kyselina
- RT-PCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-Time PCR)
- SDS – dodecylsírán sodný
- TBST pufr – směs TRIS pufovaného fyziologickým roztokem a Tween
- TJ – Těsné spojení (Tight junction)
- TNF- β – tumor-nekrotizující faktor beta
- TRIS - Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- ZO – zonula occludens proteiny

20 Seznam obrázků

Obr. 1- Proces vzniku metastáz (Zdroj:1)

Obr. 2: Změna fenotypu buněk v procesu EMT (Zdroj:2)

Obr. 3: Typy mezibuněčných spojení (Zdroj:3)

Obr. 4 – Typy EMT (Zdroj:4)

Obr. 5: Markery EMT (Zdroj:5)

Obr. 6: Stavba E- kadherinu (Zdroj:6)

Obr. 7: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi genu pro E-kadherin a N-kadherin na buněčných liniích DOK a H376. * $p < 0,0001$: N=3

Obr. 8: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi genu pro ZEB1 a ZEB2 na buněčných liniích DOK a H376. * $p < 0,0001$: N=3

Obr. 9: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi genu pro MMP-2 na buněčné linii DOK a H376. * $p < 0,0001$: N=3

Obr. 10: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi genu pro Twist na buněčné linii DOK a H376. * $p < 0,0001$: N=3

Obr. 11: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi genu pro vimentin na buněčných liniích DOK a H376. * $p < 0,0001$: N=3

Obr. 12: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi mikroRNA na buněčné linii DOK. * $p < 0,0001$: N=3

Obr. 13: Vliv indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi proteinů u buněčných liniích DOK a H376.

Obr. 14: Porovnání vlivu indukce IS (koncentrace 10 μ l/ml) a TGF- β (koncentrace 1 ng/ml a 5 ng/ml) na expresi proteinů u buněčných liniích DOK a H376 v různých časových intervalech (24h, 48h, 72h)-

Obr. 15 : Porovnání migrace buněk indukovaných TGF- β o koncentraci 5ng/ml (zelená křivka), vůči indukci neovlivněným buňkám (červená křivka) na liniích DOK po dobu 24 h.

Obr. 16: Imunofluorescenční detekce E-kadherinu a N-kadherinu; Obrázek vlevo - DOK kontrola; Obrázek vpravo – DOK indukované TGF- β 10 ng/ml) po 48 hod od indukce; E-kadherin je barven zeleně, N- kadherin barven červeně, jádra jsou barvena modře pomocí DAPI.

21 Citace obrázků

Zdroj:1 – Hofmanová, J. Invazivita a tvorba metastáz. Genotoxicita a karcinogeneze. [Online]ÚEB Biol, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita.[Citace: 15. únor 2016.]Dostupné:http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/10_meta_stazy.html

Zdroj:2 – Angadi, P. V., & Kale, A. D.Epithelial-mesenchymal transition-A fundamental mechanism in cancer progression. *Indian Journal of Health Sciences*. [Online]2015.[Citace: 15. únor 2016.]
Dostupné: <http://www.ijournalhs.org/article.asp?issn=2349-5006;year=2015;volume=8;issue=2;spage=77;epage=84;aulast=Angadi>

Zdroj:3 – Cellular Architecture and Microenvironment. [Online]My Cancer Genome. [Citace:28.3.2016.]Dostupné:<https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/pathways/cellular-architecture-and-microenvironment>

Zdroj:4 – Scanlon, C. S., Van Tubergen, E. A., Inglehart, R. C., & D'Silva, N. J. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. NCBI. [Online]2012.[Citace:15.1.2017.]Dostupné:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3545688/>

Zdroj:5 – Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R. Cadherin switching. *NCBI* [Online]2008.[Citace:22.2.2017]Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322269>

22 Citovaná literatura

1. Crosta, P. Cancer: Facts, Causes, Symptoms and Research. *MedicalNewsToday*. [Online]2015.[Citace:16. 4. 2017]
Dostupné:<http://www.medicalnewstoday.com/info/cancer-oncology>
2. Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*. [Online]2004.[Citace:16. 4. 2017]
Dostupné:<http://www.nature.com/nm/journal/v10/n8/abs/nm1087.html>
3. Nguyen, D. X.; Bos, P. D. Massagué, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer*. [Online]2004.[Citace:16.4.2017]
Dostupné:<http://www.nature.com/nrc/journal/v9/n4/abs/nrc2622.html>
4. Cancer: Key Facts. WHO.[Online]2017.[Citace:16.4.2017]
Dostupné: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
5. Zemřelí. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR*. [Online]2015.[Citace: 16. 4 .2017.]Dostupné: <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/zemreli>
6. Hofmanová, J. Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy. Genotoxicita a karcinogeneze. [Online] *ÚEB Biol, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita*. [Citace:12.1.2016.]Dostupné:https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/w eb/pages/10_metastazy.html#kaskada
7. Čihák, R. Anatomie 1. 2. vyd. Praha: Grada, 2001. 497 s. ISBN 80-7169-970-5. [Citace:13.1.2017]
8. Radisky, D. C. Epithelial-mesenchymal transition. *Journal of cell science*. [Online]2005.[Citace:13.1.2017]
Dostupné: <http://jcs.biologists.org/content/118/19/4325.short>
9. Ku, N. O., Zhou, X., Toivola, D. M., & Omary, M. B. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. [Online]1999.[Citace:13. 1. 2017]
Dostupné: <http://ajpgi.physiology.org/content/277/6/G1108>
10. Kalluri, R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *NCBI*. [Online]2009.[Citace:20.1.2017]
Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2689122>
11. Chai, J., Modak, C., Mouazzen, W., Narvaez, R., & Pham, J. Epithelial or mesenchymal: where to draw the line?. *NCBI* [Online]2010.[Citace:20. 1. 2017]
Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592463>

12. Niessen, Carien M. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *NCBI*. [Online]2007. [Citace:12.2.2017]
Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934504>
13. Hartsock, A., Nelson, W. J. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *ScienceDirect*. [Online] 2008. [Citace:12. 2. 2017] Dostupné: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273607002714>
14. Harris, T. JC, Tepass, U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. [Online]2010. [Citace:12. 2. 2017] Dostupné: <http://www.nature.com/nrm/journal/v11/n7/full/nrm2927.html>
15. Dubash, A. D., Green, K. J. Desmosomes. *Current Biology*. *ScienceDirect*. [Online]2011. [Citace:15.2.2017]
Dostupné: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982211004775>
16. Walko, G., Castañón, M. J., Wiche, G. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *NCBI*. [Online]2011. [Citace:15.2.2017]
Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4452579/>
17. Scanlon, C. S., Van Tubergen, E. A., Inglehart, R. C., & D'Silva, N. J. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *NCBI*. [Online]2012. [Citace:15.1.2017] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3545688/>
18. Guarino, M. Epithelial–mesenchymal transition and tumour invasion. *ScienceDirect*. [Online]2007. [Citace:24.1.2017]
Dostupné: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272507002488>
19. Wendt, M. K., Tian, M., Schiemann, W. P. Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF- β -induced EMT during cancer progression. *NCBI*. [Online]2012. [Citace:25.1.2017] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3723118/>
20. Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Nature*. [Online]2009. [Citace:25.1.2017] Dostupné: <http://www.nature.com/cr/journal/v19/n2/abs/cr20095a.html>
21. Tsuji, T., Ibaragi, S., Hu, G. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *NCBI*. [Online]2009. [Citace:25.1.2017]
Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2760965/>

22. Kalluri, R., Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *NCBI*. [Online]2009. [Citace:28.1.2017] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2689101/>
23. Liu, F., Gu, L. N., Shan, B. E., Geng, C. Z., & Sang, M. X. Biomarkers for EMT and MET in breast cancer. *NCBI*. [Online]2016. [Citace:28.1.2017] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28105194>
24. Zeisberg, M., Neilson, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *NCBI*. [Online]2009. [Citace:17.2.2017] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2689132/>
25. Larue, L.; Bellacosa, A. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Nature*. [Online]2005. [Citace:17.2.2017] Dostupné: <http://www.nature.com/onc/journal/v24/n50/full/1209091a.html>
26. Pečina-Šlaus, Nives. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *NCBI* [Online]2003. [Citace:5.3.2017] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC270068/>
27. Canel, M., Serrels, A., Frame, M. C., & Brunton, V. G. (2013). E-cadherin–integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *Journal of Cell Science* [Online]2013. [Citace:5. 3. 2017] Dostupné: <http://jcs.biologists.org/content/126/2/393.long>
28. Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *NCBI*. [Online]2014. [Citace:8.3.2017] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24556840>
29. Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R. Cadherin switching. *NCBI* [Online]2008. [Citace:8.3.2017] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322269>
30. Harris, T. JC, Tepass, U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature reviews*. [Online]2010. [Citace:8. 3. 2017] Dostupné: <http://www.nature.com/nrm/journal/v11/n7/full/nrm2927.html>
31. Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., & P Zhou, B. The role of Snail in EMT and tumorigenesis. *Current cancer drug targets*. *NCBI*. [Online]2013. [Citace:12.2.2017] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4004763>
32. Nieto, M. A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature reviews*. [Online]2002. [Citace:12.2.2017] Dostupné: <http://www.nature.com/nrm/journal/v3/n3/full/nrm757.html>

33. Paccione, R. J., Miyazaki, H., Patel, V., Waseem, A., Gutkind, J. S., Zehner, Z. E., & Yeudall, W. A. Keratin down-regulation in vimentin-positive cancer cells is reversible by vimentin RNA interference, which inhibits growth and motility. *NCBI*. [Online] 2008. [Citace: 12.2.2017]
Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18790770>
34. Kang, Y.; Massagué, J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *ScienceDirect*. [Online] 2004. [Citace: 15. 2. 2017]
Dostupné: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867404007020>
35. Puisieux, A., Valsesia-Wittmann, S., & Ansieau, S. Twist for survival and cancer progression. *British journal of cancer*. *NCBI*. [Online] 2006. [Citace: 15. 2. 2017] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16306876>
36. Huang, R. Y. J., Guilford, P., & Thiery, J. P. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science*. [Online] 2012. [Citace: 15.2.2017] Dostupné: <http://jcs.biologists.org/content/125/19/4417.figures-only>
37. Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *NCBI*. [Online] 2010. [Citace: 17.2.2017]
Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2862057/>
38. Talvensaaari-Mattila, A., Pääkkö, P., & Turpeenniemi-Hujanen, T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *British journal of cancer*. [Online] 2003. [Citace: 17. 2. 2017] Dostupné: <http://jultika.oulu.fi/files/isbn9789526204505.pdf>
39. Calin, G. A., Cimmino, A., Fabbri, M., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Shimizu, M., & Alder, H. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [Online] 2008. [Citace: 9. 3. 2017]
Dostupné: <http://www.pnas.org/content/105/13/5166.full>
40. Lee, M., Eun J. K, Myung J. J. MicroRNAs 125a and 125b inhibit ovarian cancer cells through post-transcriptional inactivation of EIF4EBP1. *NCBI*. [Online] 2015. [Citace: 9.3.2017] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4891000>
41. Cui, S. Y., Wang, R., & Chen, L. B. MicroRNA-145: a potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathways. *Journal of cellular and molecular medicine*, *NCBI*. [Online] 2014. [Citace: 9.3.2017] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4244007/>

42. Park, S. M., Gaur, A. B., Lengyel, E., & Peter, M. E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & development*. [Online]2008.[Citace:20.3.2017]Dostupné:<http://genesdev.cshlp.org/content/22/7/894.short>
43. Coolen, M., Katz, S., Bally-Cuif, L. MiR-9: a versatile regulator of neurogenesis. *NCBI*. [Online]2013.[Citace:21.3.2017]Dostupné:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834235/>
44. Si, M. L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., & Mo, Y. Y. MiR-21-mediated tumor growth. *Nature*. [Online]2007.[Citace:23.3.2017]Dostupné: <http://www.nature.com/onc/journal/v26/n19/abs/1210083a.html>
45. Slaby, O., Svoboda, M., Fabian, P., Smerdova, T., Knoflickova, D., Bednarikova, M., & Vyzula, R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. [Online]2007.[Citace:25.3.2017]Dostupné:<http://www.karger.com/Article/Abstract/113489>
46. Bartáková, A., et al. Nádorové kmenové buňky – možnosti cílené terapie karcinomu ovaria? *Karolinum*. [Online]2012.[Citace:1.4.2017]Dostupné:http://karolinum.cz/ink2_stat/dload.jsp?prezMat=54258
47. Guttilla, I. Mechanism and regulation of epithelial–mesenchymal transition in cancer. *Dovepress*. [Online]2015.[Citace:1.4.2017]Dostupné:<https://www.dovepress.com/mechanism-and-regulation-of-epithelialndashmesenchymal-transition-in-c-peer-reviewed-article-CHC>.
48. Pasquier, J., Abu-Kaoud, N., Al Thani, H., & Rafii, A. Epithelial to mesenchymal transition in a clinical perspective. *Journal of oncology*. [Online]2015.[Citace:3.4.2017]Dostupné:<https://www.hindawi.com/journals/jo/2015/792182/>
49. Kvantitativní real-time PCR. *Labguide* [Online][Citace:12.4.2017]Dostupné: <http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>
50. Průša, R. Základy analytických metod v klinické molekulární biologii. *Lékařská fakulta UK a LAMBDA BIO-MED*[Online]1997 [Citace:12. 4. 2017]Dostupné: <http://stary.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-dna/pdf/skripta.pdf>

51. Westernblot. *Virtual Amrita Laboratories Universalizing Education*[Online][Citace:20.4.2017]Dostupné:<http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=187&sim=1331&cnt=1>
52. Kovaříková, P., Michalová, E., Knopfová, L., & Bouchal, P. Metody studia buněčné migrace a invazivity. *Linkos* [Online] 2014.[Citace:23.4.2017.]Dostupné:<http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186/4472.pdf>. ISSN 1802-5307.[Citace:23.4.2017.]
53. Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O. Laboratorní techniky biochemie. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2, 2006.
54. Slabý, O. et al. MikroRNA v onkologii. Galén, 324 s. ISBN 978-80-7262-5871.2012. [Citace:23.4.2017.]
55. Elektrofóreza. *Biochemie*. [Online][Citace:25.4.2017.]Dostupné:<http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>
56. Matějka, V. M., Fínek, M. J., & Králíčková, M. Epitelo–mezenchymální tranzice v nádorové tkáni a její role při metastatickém šíření karcinomů. *Klinická onkologie*. [Online]2017.[Citace:25.4.2017.]Dostupné:<http://redakce.ambitmedia.cz/ko/article/view/869>
57. Chang, S. E., Foster, S., Betts, D., & Marnock, W. E. DOK, a cell line established from human dysplastic oral mucosa, shows a partially transformed non-malignant phenotype. *International journal of cancer*. [Online]1992.[Citace:28.4.2017.] Dostupné: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.2910520612/full>
58. Hajra, K. M., Fearon, E. R. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *NCBI*. [Online]2017.[Citace:28.4.2017.]Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007186>
59. Wang, X., Zhang, J., Fan, M., Zhou, Q., Deng, H., Aisharif, M. J., & Chen, X. The expression of E-cadherin at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR analysis with clinicopathological correlation. *Oral Surgery*. [Online] 2009.[Citace:28.4.2017.] Dostupné: [http://www.oooojournal.net/article/S1079-2104\(08\)00874-3/fulltext](http://www.oooojournal.net/article/S1079-2104(08)00874-3/fulltext)
60. Ivanova, K., Ananiev, J., Aleksandrova, E., Ignatova, M. M., & Gulubova, M. Expression of E-Cadherin/Beta-Catenin in Epithelial Carcinomas of the Thyroid Gland. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. [Online]2017.[Citace:28.4.2017.]Dostupné: <http://www.idpress.eu/mjms/article/view/oamjms.2017.043>

61. Papagerakis, P., Pannone, G., Shabana, A. H., Depondt, J., Santoro, A., Ghirtis, K. & Papagerakis, S. Aberrant β -Catenin and Lef1 Expression May Predict the Clinical Outcome for Patients with Oropharyngeal Cancer. *NCBI*. [Online] 2012. [Citace:28.4.2017.] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507326>
62. Peinado, H., David O., Amparo C. "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?." *Nature Reviews Cancer*. [Online] 2017. [Citace:29.4.2017.] Dostupné: <http://www.nature.com/nrc/journal/v7/n6/abs/nrc2131.html>
63. Gregory, P. A., Bracken, C. P., Smith, E., Bert, A. G., Wright, J. A., Roslan, S., ... & Lindeman, G. J. An autocrine TGF- β /ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *NCBI*. [Online] 2011. [Citace:29.4.2017.] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3093321/>
64. Yao, X., Sun, S., Zhou, X., Zhang, Q., Guo, W., & Zhang, L. "Clinicopathological significance of ZEB-1 and E-cadherin proteins in patients with oral cavity squamous cell carcinoma." *NCBI*. [Online] 2017. [Citace:29.4.2017.] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5315354/>
65. Lu, Y., Lu, J., Li, X., Zhu, H., Fan, X., Zhu, S., & Zhu, M. MiR-200a inhibits epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer stem cell. *BMC cancer*. [Online] 2014. [Citace:29.4.2017.] Dostupné: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-85>
66. Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. In vitro cell migration and invasion assay. *NCBI*. [Online] 2014. [Citace:29.4.2017.] Dostupné: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4186330/>