

Svoluji k zapůjčení své disertační práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně citovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Denisa Kovářová

Epigenetické regulace genové exprese při nádorové progresi a latenci viru HIV-1

Epigenetic regulation of gene expression in cancer progression and HIV-1 latency

Disertační práce

Školitel: RNDr. Jiří Hejnar, CSc.

Konzultantka: Mgr. Kateřina Trejbalová, Ph.D.

Oddělení virové a buněčné genetiky

Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky v. v. i.

Praha, 2022

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, 1.března 2022

.....

Mgr. Denisa Kovářová

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mě během celého doktorského studia podporovali profesně ale i v osobním životě. Velké díky patří mé školitelce-konzultantce Mgr. Kateřině Trejbalové, Ph.D., která mě provázela vědeckým světem již od začátku magisterského studia a podporovala mě i mimo pracovní život. Dále děkuji svému školiteli RNDr. Jiřímu Hejnarovi CSc. za cenné rady a odborné vedení. Děkuji, že mě přijal do laboratoře nejen na začátku univerzitních studií, ale také po delší kariéerní odmlce. Oběma výše zmiňovaným a také ostatním členům laboratoře děkuji za vytváření skvělé pracovní atmosféry, díky níž se každý den těším do práce. Děkuji Prof. RNDr. Ivanu Hirschovi, CSc. a Růženě Stránské, Ph.D., že mi umožnili rozšířit pracovní obzory. V neposlední řadě děkuji svým rodičům za velkou podporu během celého studia, i když je jim můj obor profesně velmi vzdálený a jen matně tuší, čím se v práci zabývám. Svým dětem děkuji, že mi dodávají životní nadhled.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (číslo projektu 43-251236 a 148910), Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (číslo projektu LC06061), Grantovou agenturou České Republiky (číslo projektu P304/12/1736 a 13-3700S), Akademií věd České Republiky (číslo projektu RVO68378050). Také děkuji Francouzskému institutu a nadaci “Nadání, Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových” za poskytnutí cestovního stipendia na stáž v laboratoři Prof. RNDr Ivana Hirsche, CSc. v Marseille (2015).

Abstrakt

Epigenetické mechanismy transkripční regulace a modulace genové exprese pomocí RNA interference se staly významnými nástroji pro studium řady buněčných mechanismů včetně nádorové progresy a virové latence

Pokroky v profilování genové exprese poskytují nástroj k detekci kandidátních genů zúčastněných v tomto komplexním procesu a přináší další možnosti v diagnostice a specifické léčbě nádorových onemocnění. V této práci porovnávám pomocí mikročipové technologie expresní profily metastázující a nemetastázující linie buněk transformovaných genem *v-src*. Transkripční faktor homeodomain only protein X (*HOPX*) byl identifikován jako jeden z diferencially exprimovaných genů. Aktivita genu *HOPX* v různých typech nádorů bývá kontrolována zejména metylací jeho promotoru. Roli *HOPX* v metastatickém procesu jsem potvrdila inokulací buněk s modulovanou expresí *HOPX* do syngenních kuřat. Po snížení exprese *HOPX* pomocí shRNA vykazovala původně metastázující linie menší metastatickou kapacitu *in vivo*. Další genomová analýza identifikovala soubor genů ovlivněných sníženou expresí *HOPX*. Tato data demonstrují, že *HOPX* je gen asociovaný s metastázováním a snížení jeho exprese vede k potlačení metastatické aktivity buněk transformovaných genem *v-src* změnou expresních vzorců.

Ve druhém projektu jsem se věnovala latenci viru HIV-1. Antiretrovirová terapie (ART) efektivně zastavuje replikaci viru HIV-1. Nicméně virus HIV během ART perzistuje v transkripčně umlčené ale replikačně kompetentní formě díky dlouho žijícím a proliferujícím latentně infikovaným CD4⁺ T-buňkám. Jedna ze strategií k odstranění viru HIV-1 je aktivovat virovou transkripci s použitím látek revertujících latenci a potenciálně spustit cytolýzu nebo odstranění infikovaných buněk prostřednictvím imunitní odpovědi. Metylace CpG a přítomnost represivní histonové modifikace je pravděpodobně významným krokem ve vytvoření umlčeného stavu proviru. V této studii využíváme buněčný klon nesoucí latentní mini-provirus HIV-1, jehož reaktivace může být měřena dle procenta buněk pozitivních na GFP. Tento klon vykazuje vysoký stupeň metylace DNA na prvním ostrově CpG 5'LTR a latentní provirus je zde rezistentní k reaktivaci. V této modelové buněčné linii jsem pomocí siRNA snížila expresi DNA metyltransferázy 1 a 3B (*DNMT1* a *DNMT3B*), nebo histonové deacetylázy 2 (*HDAC2*) a analyzovala reaktivaci proviru HIV-1 pomocí látek spouštějící signální dráhu NF- κ B a stupeň metylace DNA na 5'LTR. Prokázala jsem, že snížené množství DNMT1, nikoli DNMT3B či HDAC2, přispívá k částečnému úbytku metylace na 5'LTR.

Třetí studie je zaměřená na metylaci DNA na 5'LTR lokusu endogenního retroviru ERVWE1 kódující lidský fúzogenní glykoprotein *Syncytin-1*. Tento gen se účastní diferenciaci placentálního syncytiotrofoblastu. Nicméně zvýšená exprese *Syncytinu-1* byla prokázána i v seminomech. Seminomy patří do skupiny tumorů testikulárních zárodečných buněk (TGCT), které vznikají z primordiálních zárodečných buněk, jež prošly procesem celkové demethylace. Předpokládáme, že obnovená exprese ERVWE1 může být přímým důsledkem hypomethylace genomu v buňkách seminomu. Analyzovala jsem proto hladinu 5-metylcytosinu (5-mC) a demetylačního intermediátu 5-hydroxymetylcytosinu (5-hmC) na promotoru ERVWE1 pomocí bisulfitového a oxidativního bisulfitového sekvenování v několika vzorcích seminomů. Z výsledků vyvozují, že demethylace DNA na promotoru *ERVWE1* v seminomech předchází expresi *Syncytinu-1*.

Klíčová slova: metastázování, HOPX, transforance *v-src*, latence viru HIV-1, antiretrovirová terapie, DNA metyltransferáza 1, Syncytin-1, 5-metylcytosin, 5-hydroxymetylcytosin, seminomy

Abstract

Epigenetic mechanisms of transcriptional regulation and modulation of gene expression using RNA interference have become a powerful tool for studying various cellular mechanisms, including tumor progression and viral latency.

Advances in expression profiling have provided technology to detect candidate genes implicated in this complex process and bring other possibilities in the diagnosis and treatment of tumor diseases. In this work, I compare the gene expression profiles of *v-src*-transformed metastatic and nonmetastatic cells using microarray chip technology. Transcription factor homeodomain only protein X (*HOPX*) was identified as one of the differentially expressed genes. Activity of *HOPX* gene in several cancer types is usually controlled by promoter methylation. The role *HOPX* in metastatic formation was assessed by inoculation of cells with modulated expression of *HOPX* in a syngeneic chicken model system. After *HOPX* knockdown using shRNA, originally metastatic line showed decreased *in vivo* metastatic capacity. Further genomic analyses identified a cadre of genes affected by *HOPX* knockdown. These data demonstrate that *HOPX* is a metastasis-associated gene and that its knockdown decreases the metastatic activity of *v-src*-transformed cells through altered gene expression patterns.

In the second project, I focused on HIV-1 latency. Antiretroviral therapy (ART) effectively suppresses HIV replication, but HIV persists during ART due to long lived and proliferating latently infected CD4⁺ T-cells in transcriptionally silent but replication competent form. One strategy to eliminate virus HIV-1 is to activate virus transcription using latency reversing agents and potentially trigger cytolysis or immune-mediated clearance. CpG methylation accompanied by repressive histone code seems to be the ultimate step in the development of the silent state of the provirus. In this study, I employed cellular clone harboring a latent HIV-1 mini-provirus, whose reactivation can be monitored according to the percentage of EGFP-positive cells. The clone displays a high level of 5'LTR DNA methylation of the first CpG island and the latent provirus is resistant to reactivation. We knocked down the expression of DNA methyltransferase 1 and 3B (*DNMT1* and *DNMT3B*) or histone deacetylase 2 (*HDAC2*) by siRNA in model cell line and analyzed the HIV-1 provirus reactivation by NF- κ B inducers and 5'LTR DNA methylation level. I demonstrated that the depletion of DNMT1, but not DNMT3B or HDAC2, contributed to a partial loss of 5'LTR methylation in our model cell line with hypermethylated 5'LTR DNA of the first CpG island.

Our third study is focused on 5'LTR DNA methylation of the endogenous retroviral loci *ERVWE1* encoding human fusogenic glycoprotein *Syncytin-1*, that contribute to the

differentiation of placental syncytiotrophoblast. However it was reported, that in seminoma, *Syncytin-1* expression is increased. Seminomas are subtypes of testicular germ cell tumors (TGCT) that emerged from the primordial germ cells, which have undergone a process of global demethylation. I assume that *ERVWE1* derepression could be the direct consequence of the genome hypomethylation in seminoma cells. I therefore explored the levels of 5-methylcytosine (5-mC) and demethylation intermediate 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) at the *ERVWE1* promoter using bisulfite and oxidative bisulfite sequencing in several samples of seminomas. I conclude that DNA demethylation of the *ERVWE1* promoter in seminomas is a prerequisite for Syncytin-1 derepression.

Key words: metastatic disease, HOPX, *v-src* transformation, HIV-1 latency, antiretroviral therapy, DNA methyltransferase 1, Syncytin-1, 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine, seminomas

1	Úvod.....	21
2	Cíle.....	23
3	Literární přehled.....	26
3.1.	Epigenetické regulace genové exprese, metylace DNA.....	26
3.2.	Progrese nádorů a metastázování.....	29
3.2.1.	Sarkomy a jejich souvislost s <i>v-src</i> a <i>c-src</i>	29
3.2.2.	Metastatická kaskáda.....	30
3.2.2.1.	Epitelově-mezenchymový přechod (EMT).....	31
3.2.2.2.	Cirkulující nádorové buňky (CTC).....	32
3.2.2.3.	Extravazace.....	33
3.2.2.4.	Mezenchymově-epitelový přechod (MET).....	34
3.2.2.5.	(Ne)účinnost tvorby metastáz.....	34
3.2.2.6.	Změny genové exprese vedoucí k tvorbě metastáz.....	37
3.2.3.	Interakce nádoru s imunitním systémem.....	39
3.2.4.	Epigenetické mechanismy v progresi nádorů.....	40
3.2.5.	Transkripční faktor <i>HOPX</i>	44
3.3.	Proces replikace HIV-1 a možnosti terapie.....	47
3.3.1.	HIV-1 a jeho interakce s CD4+ T-lymfocyty.....	47
3.3.2.	Epigenetické mechanismy regulující latenci provirů HIV-1.....	48
3.3.3.	Antiretrovirová terapie.....	52
4	Materiál a metody.....	55
4.1.	Zvířecí model.....	55
4.2.	Kuřecí buněčné kultury.....	55
4.3.	Lidské buněčné kultury.....	55
4.4.	Lidské vzorky tkání.....	56
4.5.	Konstrukty DNA.....	56
4.6.	Transfekce siRNA a vektoru do buněk H12 a 2D12.....	58
4.7.	Analýza růstu primárního nádoru a metastáz v kuřecím modelu.....	58
4.8.	Kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR).....	58
4.9.	Bisulfitová analýza metylace cytosinu.....	59
4.10.	Oxidativní bisulfitová analýza hydroxymethylace cytosinu.....	60
4.11.	Mikročipová analýza a zpracování dat.....	60

4.12.	Analýza proteinů pomocí Western Blotu (WB).....	61
4.13.	Migrační test.....	61
4.14.	Test na 3D kolagenovou invazivitu.....	62
4.15.	Test adhezivity.....	62
4.16.	Analýza organizace aktinového cytoskeletu.....	63
4.17.	Analýza času zdvojení a buněčného cyklu.....	63
4.18.	Analýza průtokovým cytometrem.....	63
4.19.	Primery použité ve studii.....	64
5	Výsledky.....	67
5.1.	Kuřecí modelový systém pro studium metastázování.....	67
5.2.	Expresní analýza genů v metastázující linii PR9692 a nemetastázujícím subklonu PR9692-E9 a výběr kandidátních genů...	68
5.3.	Kandidátní geny <i>HOPX</i> , <i>LSP1</i> , <i>AQP1</i> a <i>UPP1</i>	71
5.3.1.	<i>LSP1</i> - Lymphocyte Specific Protein 1.....	71
5.3.2.	<i>AQP1</i> - Aquaporin 1 a <i>UPP1</i> – Uridine Phosphorylase 1.....	73
5.3.3.	Transkripční faktor <i>HOPX</i> – Homeodomain-Only Protein.....	74
5.3.4.	Vliv <i>HOPX</i> na buněčnou migraci, proliferaci a invazivitu <i>in vitro</i>	76
5.3.5.	Role genu <i>HOPX</i> v metastatických vlastnostech buněk <i>in vivo</i>	79
5.4.	Analýza diferenciálně exprimovaných genů v liniích PR9692-shMOCK a PR9692-shHOPX.....	81
5.5.	Snížená exprese genu <i>ITGA4</i> vede k inhibici buněčné adhezivity a migrace.....	85
5.6.	Snížená exprese genu <i>ITGA4</i> vede k inhibici metastázování.....	88
5.7.	Modelové buněčné linie pro studium latence HIV-1 a vývoj metylace DNA proviru HIV-1.....	90
5.8.	Vliv <i>DNMT1</i> a <i>DNMT3B</i> na reaktivovatelnost proviru HIV-1.....	92
5.9.	Vliv <i>HDAC1</i> a <i>HDAC2</i> na reaktivovatelnost proviru HIV-1.....	97
5.10.	Rozdílná exprese <i>Tat</i> v buňkách H12 a 2D12 a její vliv na reaktivovatelnost proviru HIV-1.....	99
5.11.	Vliv oxidu arsenitého (As_2O_3) na reaktivovatelnost proviru HIV-1.....	103
5.12.	Analýza metylace a hydroxymethylace CpG promotoru <i>ERVWE1</i> v seminomech.....	104
6	Diskuze.....	108

6.1.	Identifikace kandidátních genů asociovaných s metastázováním a role <i>HOPX</i> v incidenci metastáz.....	108
6.2.	Modulace exprese vybraných genů pro studium latence viru HIV-1....	121
6.3.	Analýza metylace promotoru <i>ERVWE1</i> v seminomech.....	126
7	Závěry.....	128
8	Podíl autora na výsledcích obsažených v disertační práci.....	129
9	Použitá literatura.....	130
10	Seznam příloh.....	152

Seznam použitých zkratk

HIV-1	virus lidské imunodeficiency 1	human immunodeficiency virus
5-aza-dC	5-aza-2' deoxycytidin	5-aza-2' deoxycytidine
5-caC	5-karboxylycytosin	5-carboxylcytosine
5-fC	5-formylcytosin	5-formylcytosine
5-hmC	5-hydroxymethylcytosin	5-hydroxymethylcytosine
5-mc	5-methylcytosin	5-methylcytosine
A	adenin	adenine
ADC	adenokarcinom	adenocarcinoma
ADCY7	adenylát cykláza 7	adenylate cyclase 7
ADP	adenosin difosfát	adenosine diphosphate
ALV-J	ptačí leukózní vir podskupiny J	avian leukosis virus subgroup J
AMP	adenosin monofosfát	adenosine monophosphate
AQP1	aquaporin 1	aquaporine 1
ARHGDIB		Rho GDP Dissociation Inhibitor Beta
ART	antiretrovirová terapie	antiretroviral therapy
ASCT2	Alanin, Serin, Cystein Transportér 2	Alanine, Serine, Cysteine Transporter 2
ASLV	ptačí sarkomové a leukózní viry	avian sarcoma leukosis virus
ATP	adenosintrifosfát	adenosine triphosphate
BAC	umělý bakteriální chromozóm	bacterial artificial chromosome
BAF	ATP dependentní faktor asociovaný s BRG1/BRM	ATP-dependent BRG1/BRM associated factor
BAMBI		BMP And Activin Membrane Bound Inhibitor
BSA	hovězí sérový albumin	Bovine serum albumin
C	cytosin	cytosine
CAF	fibroblasty asociované s nádorem	cancer-associated fibroblast
CCR5	C-C chemokinový receptor typu 5	C-C chemokine receptor type 5
CD4+	diferenciační antigen 4	cluster of differentiation 4+
CDK9	cyklin-dependentní kináza 9	cyclin-dependent kinase 9
cDNA	DNA kopie RNA	copy DNA
CMV	cytomegalovirus	cytomegaloviruse
CpG	5'-cytosin-fosfát-guanin-3'	5'-cytosine-phosphate-guanin-3'

CRISPR/Cas-9			clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein 9
CSH1	choriový somatomamotropin 1	hormon	chorionic somatomamotropin hormone 1
CTC	cirkulující nádorové buňky		circular tumor cells
CTIP2			Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2
CXCR4	C-X-C chemokinový receptor typu 4		C-X-C chemokine receptor type 4
dCTP	2'-deoxycytidine trifosfát		2'-deoxycytidine triphosphate
ddPCR			Droplet digital PCR
dhmCTP	5-Hydroxymetyl-2'-deoxycytidin		5-Hydroxymethyl-2'-deoxycytidine
DMEM/F12	Dulbeccoem modifikované Egelovo médium		Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	deoxyribonukleová kyselina		deoxyribonucleic acid
DNM1	dynamin 1		dynamin 1
DNMT	DNA metyl transferáza		DNA methyl transferase
DNMT1	DNA metyl transferáza 1		DNA methyl transferase 1
DNMT3A	DNA metyl transferáza 3A		DNA methyl transferase 3A
DNMT3B	DNA metyl transferáza 3B		DNA methyl transferase 3B
DNMT2	DNA metyl transferáza 2		DNA methyl transferase 2
DNMT3L	DNA metyl transferáza 3L		DNA methyl transferase 3L
dNTP	2'-deoxyribonukleosid trifosfát		2'-deoxyribonucleosidtriphosphate
DTC	diseminované nádorové buňky		disseminated tumor cells
E16.5	16,5 denní embrya		embryonic day 16,5
EBV	virus Epsteina-Barrové		Epstein-Barr virus
ECM	extracelulární síť		extracellular matrix
EGFP	protein se zesílenou zelenou fluorescencí		enhanced green fluorescent protein
EGR1			early growth response 1
E-cadherin	epitelový cadherin		epithelial cadherin
ELF5			E74-like factor 5
EMT	epitelově-mezenchymový přechod		epithelial-mesenchymal transition
Env	obalový glykoprotein		envelope glycoprotein
EPB41L3			Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1 Like 3

EPC1		enhancer of polycomb 1
EpCAM	epitelová adhezivní molekula	epithelial cell adhesion molecule
ERVWE1	lokus kódující obalový glykoprotein rodiny W, člen 1	locus coding Env glycoprotein, chromosome 7q 21-22, family W, member 1
FACS	fluorescenčně aktivované třídění buněk	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FITC	fluorescein isothiokyanái	fluorescein isothiocyanate
FOXG1		Forkhead Box G1
FSCN1		Fascin Actin-Bundling Protein 1
G protein	guanin nukleotid-vazebný protein	guanine nucleotide-binding protein
Gag	prekurzor virových strukturních proteinů	group-specific antigen
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GATA3		transcription factor GATA3
GFPT2	Glutamine-fructóza-6-fosfát transamináza 2	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2
GTPáza	GTP fosfohydroláz	GTP phosphohydrolase
H3K4 me3	tri-metylace na 4. lysinovém zbytku proteinu histonu H3	tri-methylation of lysine 4 on histone H3 protein
H3K27 me3	tri-metylace na 27. lysinovém zbytku proteinu histonu H3	tri-methylation of lysine 27 on histone H3 protein
H3K36 me3	tri-metylace na 36. lysinovém zbytku proteinu histonu H3	tri-methylation of lysine 36 on histone H3 protein
H3K9 me3	tri-metylace na 9. lysinovém zbytku proteinu histonu H3	tri-methylation of lysine 9 on histone H3 protein
HAT	histonová acetyltransferáza	histone acetyltransferase
HDAC	histonová deacetyláza	histon deacetylase
HDAC1	histonová deacetyláza 1	histon deacetylase 1
HDAC2	histonová deacetyláza 2	histon deacetylase 2
HDACi	inhibitor histonových deacetyláz	histon deacetylase inhibitor
HDR	homologní oprava DNA	Homologous DNA repair
HERV-W	lidský endogenní retrovirus, rodina W	human endogenous retrovirus, family W
HMEM	Hankovo minimální esenciální médium	Hank's Minimum Essential Medium
HOPX	transkripční faktor homeodomain-only protein	homeodomain-only protein

HRP-2	protein bohatý na histidin 2	histidine-rich protein 2
HSV-1	virus herpes simplex typu 1	herpes simplex virus 1
IFN- γ	interferon gamma	interferon gamma
IL-1	interleukin 1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6	interleukin 6
IL-7	interleukin 7	interleukin 7
IMDM	Iscovem modifikované Dulbeccovo médium	Iscove's modified Dulbecco's minimal essential medium
ITGA4	integrin alfa 4	integrin alpha 4
ITPR3	Receptor inositol 1,4,5-Trisfosfátu typu 3	Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 3
IVM	intravitální mikroskopie	intravital microscopy
LAMB1	podjednotka lamininu beta 1	Laminin Subunit Beta 1
Lck	protein-tyrosinová kináza specifická pro lymfocyty	Lymphocyte Cell-Specific Protein-Tyrosine Kinase
LEDGF/p75	růstový faktor odvozený od epitelu oční čočky	Lens epithelium-derived growth factor/p75
LEPREL1		leprecan-like 1
LSP1		lymphocyte-specific protein 1
LTR	dlouhé koncové repetice	long terminal repeats
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinová kináza	mitogen activated protein kinase
MBD2	Metyl-CpG vazebný protein 2	Methyl-CpG-binding domain protein 2
MET	mezenchymově-epitelový přechod	mesenchymal-epithelial transition
miRNA	mikro RNA	micro RNA
M-MLV	Moloneyho virus myší leukemie	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	RNA sloužící jako předloha pro translaci	messenger RNA
NCAM1	adhezivní molekula neurálních buněk 1	Neural Cell Adhesion Molecule 1
NECC1	gen neexprimovaný v choriokarcinomu, klon 1	Not Expressed In Choriocarcinoma Clone 1
NF- κ B	nukleární faktor kappa B	nuclear factor kappa B
NFAT	nukleární faktor aktivovaných T buněk	nuclear factor of activated T cells
NGS	sekvenace nové generace	next generation sequencing
NHEJ	nehomologní spojování konců	Non-homologous end joining

NK buňky	buňky "přirození zabíječi"	natural killer cells
Nuc	nukleozóm	nucleosome
NUDT14	nudix hydroláza 14	Nudix Hydrolase 14
OCT4		Octamer-binding transcription factor 4
PACSIN3		Protein Kinase C And Casein Kinase Substrate In Neurons 3
PCR	polymerázová řetězová reakce	polymerase chain reaction
PE	fykoerytrin	Phycoerythrin
PGC	primordiální zárodečné buňky	primordial germ cells
PIC	preintegrační komplex	preintegration complex
PMA	forbol 12- myristát 13-acetát	phorbol-12-myristate-13-acetate
PML	protein promyelocytické leukémie	Promyelocytic leukemia protein
Pol	prekurzor virové reverzní transkriptázy	polymerase
POSTN	periostin	periostin
P-TEFb	pozitivní transkripční elongační faktor	positive transcription elongation factor
PVDF	Polyvinylidenfluorid	Polyvinylidene fluoride
qRT-PCR	kvantitativní PCR v reálném čase	quantitative real-time PCR
R	opakující se sekvence	repeat sequence
Ras	gen Ras	rat sarcoma
RelA		V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A
RGS20	regulátor G proteinové signalizace 20	Regulator Of G Protein Signaling 20
RHOF	Ras homolog člen rodiny F	Ras Homolog Family Member F
RIAM	Rap1-GTP-interagující adaptorová molekula	Rap1-GTP-Interacting Adaptor Molecule
RNA	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid
RNA pol II	RNA polymeráza II	RNA polymerase II
RNA pol III.	RNA polymeráza III	RNA polymerase III
RNA-seq	sekvenování RNA	RNA sequencing
ROS	reaktivní formy kyslíku	reactive oxygen species
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institut médium 1640	Roswell Park Memorial Institute médium 1640
RSV	virus Rousova sarkomu	Rous sarcoma virus
		Spalt Like Transcription Factor 3

SALL3		
SALL4		Spalt Like Transcription Factor 4
SAMHD1		Sterile Alpha Motif and Histidine-Aspartic acid domain containing protein 1
SDS	dodecylsírán sodný	sodium dodecyl sulfate
sgRNA		single-guide RNA
shAQP1	krátká vlásenka AQP1	short hairpin AQP1
shHOPX	krátká vlásenka HOPX	short hairpin HOPX
shITGA4	krátká vlásenka ITGA4	short hairpin ITGA4
shLSP1	krátká vlásenka LSP1	short hairpin LSP1
shRNA	krátká vlásenková RNA	short hairpin RNA
shUPP1	krátká vlásenka UPP1	short hairpin UPP1
siRNA	malá interferující RNA	small interfering RNA
SLC16A10		Solute Carrier Family 16 Member 10
SNAIL2	transkriční represor 2 rodiny snail	snail family transcriptional repressor 2
SRF	faktor odpovídající na sérum	serum response factor
STAT3	signální přenašeče a aktivátory transkripce 3	signal transducers and activators of transcription 3
SYK	slezinová tyrosin kináza	spleen tyrosine kinase
T	thymin	thymin
TALEN		Transcription activator-like nuclease
TAR	transaktivační reakční element	transactivating response region
Tat	transaktivátor transkripce	transcriptional transactivator
TET1	TET translokáza 1	ten-eleven translocation 1
TGCT	testikulární tumor zárodečných buněk	testicular germ cell tumor
TGF-β	transformující růstový faktor beta	transforming growth factor beta
TGF-β1	transformující růstový faktor beta 1	transforming growth factor beta 1
TNC	tenascin C	tenascin C
TNF-α	faktor nádorové nekrózy alfa	tumor necrosis factor alpha
TXN	thioredoxin	thioredoxin
U	uracil	uracil

U3	jedinečná sekvence pro 3'konec RNA	unique 3'end sequence of viral RNA
U5	jedinečná sekvence pro 5'konec RNA	unique 5'end sequence of viral RNA
UDP	uridin difosfát	uridine diphosphate
UMP	uridin monofosfát	uridine monophosphate
UPP1	uridin fosforyláza	uridine phosphorylase 1
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor	vascular endothelial growth factor
v-src	virová protein-tyrosin kináza src	viral sarcoma kinase
WHO	Světová zdravotnická organizace	world health organisation
α -CA	srdeční aktin alfa	alpha cardiac actin
Δ VII-Ets-1	sestřihová varianta homologu onkogenu viru ptačí erythroblastózy E26	splicing variant avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1

1 Úvod

Tato práce využívá společných přístupů ke studiu metastázování, latence viru lidské imunodeficiencie 1 (HIV-1) a epigenetických regulací v seminomech.

První a zároveň nejrozsáhlejší téma se věnuje hledání nových genů, které se účastní metastatické kaskády. Metastázování zahrnuje několik kroků včetně úniku buněk z primárního nádoru, lokální invazi, intravazaci/extravazaci a kolonizaci vzdálené tkáně. I přes značné úsilí jsou molekulární mechanismy řídící metastázování stále málo známé. Předpokládá se, že metastázování je důsledkem kumulativních genetických mutací doprovázených epigenetickými změnami. Zúčastněné geny pravděpodobně nesdílí stejné molekulární dráhy. Spíše reprezentují heterogenní skupinu genů, které zvyšují pravděpodobnost úspěšného zvládnutí jednoho nebo více kroků v procesu metastázování modulací onkogenních signálních drah, které byly využity v počátečních stádiích nádorové progresi (Oskarsson, Batlle, and Massague 2014; Valastyan and Weinberg 2011). Zatímco primární nádory mohou být ve většině případů odstraněny chirurgicky, metastázy jsou často neléčitelné. Identifikace genů a drah zúčastněných v nádorové progresi může přispět nejen k poznání mechanismů tohoto procesu, ale může odhalit nové cíle pro včasnou diagnostiku a léčbu. S využitím kuřecího modelového systému sestávajícího z parentální metastatické linie a jejího nemetastatického subklonu hledáme geny účastnící se metastatické kaskády. Obě linie jsou transformované genem pro virovou protein-tyrosin kinázu *src* (*v-src*) a v inbrední linii kuřat tvoří sarkomy, liší se pouze schopností tvořit metastázy (Plachy and Hejnar 2002). Pomocí microarray technologie porovnáváme transkripční programy obou linií. Předpokládáme, že snížením exprese genu/genů se zvýšenou expresí v metastatické linii pomocí RNA interference, docílíme potlačení metastatického potenciálu buněk. Tento předpoklad ověřujeme inokulací buněk s modulovanou expresí do inbredních kuřat. Sledujeme velikost a množství metastáz ze sarkomu, které se v tomto kuřecím modelu utvářejí v plicích.

V druhé části disertační práce se zabýváme latencí viru HIV-1. Ta dovoluje viru perzistovat v buněčných rezervoárech v transkripčně umlčené formě, která je ustanovena a udržována mimo jiné epigenetickými změnami (Kumar et al. 2015). Latentní virové rezervoáry tvořené dlouho žijícími buňkami s integrovanou DNA HIV-1 unikají imunitnímu dohledu a zároveň reprezentují hlavní bariéru v eradikaci HIV z organismu prostřednictvím ART (Barton, Winckelmann, and Palmer 2016). Jedna z hlavních strategií k odstranění virových rezervoárů spočívá v aktivaci latentních rezervoárů v infikovaných buňkách v kombinaci s intenzivní antiretrovirovou léčbou (Bisgrove et al. 2005). V tomto projektu využíváme dvě modelové linie

odvozené od linie lidských imortalizovaných CD4⁺ T-lymfocytů Jurkat, které v sobě nesou replikačně nekompetentní latentní provirus HIV-1 (Blazkova et al. 2009). Parentální linie vykazuje nízkou hladinu metylace DNA na 5'LTR a latentní provirus je zde snadno reaktivovatelný různými agens. Oproti tomu její subklon vykazuje vysokou hladinu metylace DNA na 5'LTR a latentní provirus je v těchto buňkách rezistentní k reaktivaci. Zaměřili jsme se proto na geny metyltransferáz a histonových deacetyláz a prostřednictvím RNA interference chceme pozorovat efekt snížené exprese vybraných genů na metylaci 5'LTR a s tím související reaktivovatelnost proviru.

Také ve třetím projektu věnovanému charakterizaci seminomů jsme se zaměřili na metylaci DNA, v tomto případě metylaci genu *ERVWE1*. Zatímco je celková incidence testikulárních tumorů zárodečných buněk, do nichž se seminomy řadí, nízká, tvoří nejčastější nádorové onemocnění mužů ve věku 15-35 let (Tourne, Radulescu, and Allory 2019). Gen *ERVWE1* kóduje retrovirový obalový glykoprotein Syncytin-1. Za fyziologických podmínek je jeho exprese v lidských tkáních, s výjimkou placenty, potlačena prostřednictvím metylce promotoru *ERVWE1*. Zvýšená exprese *ERVWE1* však byla nalezena např. v buňkách seminomů (Gimenez et al. 2010; Trejbalova et al. 2011). Nabízí se tedy otázka, zdali je zvýšená exprese *ERVWE1* v seminomech důsledkem ztráty metylace DNA na svém promotoru.

2 Cíle

Cílem práce bylo přispět ke stavu poznání epigenetických regulací nezbytných pro řadu procesů v organismu, zde konkrétně pro vznik metastatické kapacity sarkomových buněk, pro udržení latence viru HIV-1 v CD4+ T-buňkách a pro vlastnosti seminomů.

První projekt týkající se tvorby metastáz vychází z výsledků mikročipové analýzy, která odhalila významné expresní rozdíly mezi metastatickými a nemetastatickými buňkami. Naším cílem bylo s využitím syngenní kuřecí linie definovat geny, které jsou klíčové pro vytvoření metastáz. Mezi kandidátní geny jsme zařadily transkripční faktor HOPX, u kterého byla prokázána jeho snížená exprese v různých typech karcinomů ve srovnání se zdravou tkání (Asanoma et al. 2003; Yamaguchi et al. 2009; Ooki et al. 2010; Harada et al. 2011; Waraya et al. 2012; Chen, Yang, et al. 2015). K transkripčnímu umlčení *HOPX* v karcinomech dochází pomocí hypermetylace promotoru *HOPX* (Ooki et al. 2010; Harada et al. 2011; Waraya et al. 2012; Chen, Yang, et al. 2015). Zajímavé je, že v lidských keratinocytech pravděpodobně nedochází k umlčení exprese *HOPX* vlivem metylace DNA (Yang et al. 2010). Naším cílem bylo zjistit, je-li exprese HOPX v sarkomových buňkách řízená metylací DNA jeho promotoru. V této části projektu, jsme se vzhledem k dosaženým výsledkům týkajících se genu *HOPX* od původního záměru studovat epigenetické regulace kandidátních genů odklonili a zaměřili jsme se na bližší prozkoumání vlivu *HOPX* na invazivitu nádorových buněk, jelikož role *HOPX* v tvorbě metastáz ze sarkomu nebyla doposud studována. Pomocí modulace jeho exprese za použití RNA interference jsme chtěli odhalit vliv změněné hladiny HOPX na migrační a invazivní vlastnosti buněk *in vitro* a tvorbu metastáz *in vivo*.

Jelikož bylo prokázáno, že HOPX interaguje s transkripčním faktorem SRF (Chen et al. 2002) a HDAC2 (Trivedi et al. 2010), zajímal nás vliv jeho snížené hladiny v metastázující linii PR9692 na expresi dalších genů, které by mohly být asociované s metastázováním. Naším cílem bylo porovnat expresní změny vedoucí ke spontánnímu vzniku nemetastázujícího subklonu PR9692-E9 a ke vzniku linie PR9692-shHOPX se sníženou hladinou HOPX. Srovnáním těchto expresních změn jsme chtěli určit další kandidátní geny, které se pravděpodobně účastní metastatického procesu a doposud nebyly v souvislosti s metastázováním studovány. S cílem verifikovat náš výběr jsme se zaměřili na gen integrin alfa 4 (*ITGA4*), o jehož účasti na tvorbě metastáz není pochyb (Meerschaert and Furie 1994).

V druhém projektu týkajícím se latence viru HIV-1 jsme se zaměřili na studium mechanismů, kterými kandidátní geny ovlivňují reaktivaci latentního proviru. Existence latentního rezervoáru v pacientech léčených ART je hlavní překážkou v kompletní eradikaci viru z těla (Sagot-Lerolle et al. 2008). Naším cílem bylo, stejně jako v předchozím projektu, modulovat expresi vybraných genů (*DNMT1*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*) v modelových buňkách odvozených od CD4+ T-lymfocytů s využitím RNA interference. Chtěli jsme pozorovat vliv kandidátních genů na reaktivovatelnost proviru HIV-1 v modelových buňkách. Dále jsme se zaměřili na virem kódovaný transkripční protein Tat s cílem studovat vliv jeho ektopické exprese v modelových buňkách na reaktivaci proviru HIV-1. V neposlední řadě jsme chtěli zjistit, jestli vybrané geny regulují metylaci promotoru HIV-1 a zda má případná změna této metylace přímý dopad na reaktivaci HIV-1.

Ve třetím projektu jsme se zabývali epigenetickými mechanismy, které ovlivňují expresi *ERVWE1* v seminomech. Aberantní exprese *ERVWE1* byla nalezena v testikulárních tumorech (Gimenez et al. 2010), které zahrnují seminomy (Stephenson et al. 2019). Seminomy jsou charakteristické nízkou mírou metylace genomu (Netto et al. 2008; Peltomaki 1991), která koreluje se zvýšenou expresí demetylačního enzymu TET1 (Benesova et al. 2017). Cílem této práce bylo zjistit, zdali zvýšená exprese *ERVWE1* souvisí s demetylací jeho promotoru a jestli bude na promotoru *ERVWE1* přítomen intermediát aktivní demetylase, 5-hydroxymetylcytosin (5-hmC).

Jednotlivé cíle této práce:

I. Studium nádorové progresse

1) Identifikovat kandidátní geny asociované s metastázováním na modelu kuřecích sarkomových buněk PR9692 a PR9692-E9

2) Modulovat expresi vybraných genů pomocí RNA interference se zaměřením na gen *HOPX* a jeho epigenetické regulace

3) Sledovat vliv rozdílné exprese vybraných genů na invazivní vlastnosti modelových buněk *in vitro* a tvorbu metastáz *in vivo*

II. Studium virové latence

1) Vybrat kandidátní geny ovlivňující reaktivovatelnost proviru HIV-1 na modelových CD4+ T-buňkách H12 a 2D12

- 2) Moduloval expresi genů *DNMT1*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2* a *Tat*

- 3) Sledovat vliv rozdílné exprese vybraných genů na reaktivovatelnost proviru HIV-1 a na metylaci promotoru proviru HIV-1

III. Studium metylace promotoru *ERVWE1*

- 1) Analyzovat metylaci promotoru *ERVWE1* bisulfitovou metodou

- 2) Analyzovat hydroxymetylaci promotoru *ERVWE1* kombinací bisulfitové a oxidativní bisulfitové metody

3 Literární přehled

Úvodní část literárního přehledu je věnovaná epigenetickým mechanismům regulace exprese genů, které propojují tři projekty této disertační práce – studium metastázování ze sarkomu, latence viru HIV-1 a vlastnosti seminomů.

V tomto projektu využíváme modelový systém metastázování sarkomu a přibližujeme roli některých kandidátních genů účastnících se metastatické kaskády. Problematika sarkomu, metastázování a dosavadní poznatky o kandidátním genu *HOPX* jsou součástí druhé kapitoly.

Poslední kapitola popisuje interakci HIV-1 s hostitelskou buňkou a s tím související možnosti ART.

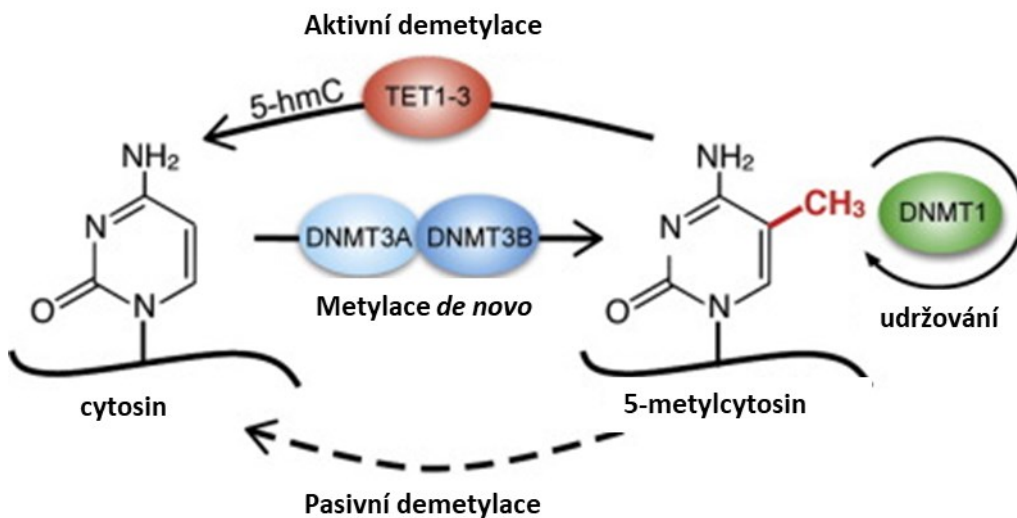
3.1. Epigenetické regulace genové exprese, metylace DNA

Epigenetické regulace zahrnují indukci stabilních změn genové exprese a organizace chromatinu, které jsou nezávislé na změnách sekvence DNA a jsou udržitelné během buněčného dělení (Herceg et al. 2013). Bylo navrženo několik možných molekulárních mechanismů epigenetické dědičnosti. Jedna z nejlépe charakterizovaných je metylace cytosinu DNA (Ferguson-Smith 2011). Druhým mechanismem molekulárních alterací, které přispívají k udržení transkripčního programu, jsou kovalentní modifikace histonů. Nicméně zatím není zcela jasné, jak jsou tyto modifikace udržované během replikace (Jenuwein and Allis 2001). V neposlední řadě patří mezi epigenetické regulace poměrně málo charakterizovaná funkce nekódujících RNA (Sabin, Delas, and Hannon 2013). Stabilní transkripční program může být udržován bez specifických dědičných změn v metylaci DNA nebo chromatinu prostřednictvím autoregulačních transkripčních drah, které si po indukci udržují svou vlastní aktivitu a mohou být kritické i pro udržení nádorového/metastatického fenotypu (Ptashne 2007).

Metylační vzorec dinukleotidů CpG ovlivňuje aktivitu genů. Hypermetylace CpG promotorových oblastí obvykle vede k inaktivaci chromatinových regionů. Metylace DNA je zajištěna DNA metyltransferázami a děje se na pozici C5 v cytozinu za vzniku 5-metylcytosinu (5-mC), což je jediná kovalentní modifikace DNA u metazoi. Malá rodina DNA metyltransferáz je tvořena enzymy DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, které připojují metylovou skupinu přednostně kontextu dinukleotidů CpG. DNMT1 preferenčně metyluje hemimetylovanou DNA a je pravděpodobně zodpovědná za udržování metylačního vzorce DNA (Hermann, Gowher, and Jeltsch 2004). Nedávno bylo prokázáno, že za pomoci kofaktoru

Uhrfl může tvořit nové metylační vzorce (*de novo* metylace) (Haggerty et al. 2021). DNMT3A a 3B mají *de novo* metyltransferázovou aktivitu (Hermann, Gowher, and Jeltsch 2004). Do rodiny DNMT3 patří také DNMT3L, která nemá metyltransferázovou aktivitu, ale reguluje metylaci DNA *de novo* prostřednictvím DNMT3A v zárodečných buňkách (Veland et al. 2019). DNMT2 je homologní k ostatním DNMT, ale jejím substrátem je RNA (Hermann, Gowher, and Jeltsch 2004; Goll et al. 2006).

Frekvence dinukleotidů CpG je v lidském genomu menší, než by se očekávalo. Nedostatek CpG v lidském genomu je pravděpodobně zapříčiněn spontánní deaminací v zárodečné linii během evoluce. Nicméně asi polovina promotorů lidských genů obsahuje oblasti bohaté na CpG. Tyto oblasti mohou být dlouhé 500 bází až několik kilobází a označují se jako CpG ostrovy. Přestože většina z nich je asociovaná s udržovacími (housekeeping) geny, polovina z tkáňově specifických genů také obsahuje ve svém promotoru CpG ostrovy (Bird 1986). Distribuce metylovaných a nemetylovaných CpG v genomu je spjatá s vývojovým stádiem a procesy buněčné diferenciací (Schubeler 2015). Dvě hlavní vlny změn v metylaci CpG se odehrávají během počátečních stádií embryogeneze a v primordiálních zárodečných buňkách. Zahrnují genomovou demetylaci DNA a opětovnou metylaci. Další méně rozsáhlé změny metylačního vzorce doprovázejí vývoj specifických buněčných linií a formování tkání (Guibert, Forne, and Weber 2009). Demetylace může být buď pasivní proces, doprovázející replikaci DNA, nebo aktivní proces pravděpodobně regulovaný enzymy rodiny TET (ten eleven translocation protein), které katalyzují po sobě jdoucí oxidace 5-mC na 5-hmC, 5-formylcytosin (5-fC) a 5-karboxylcytosin (5-caC) (Obr.1.). Tyto produkty oxidace 5-mC představují intermediáty v dráze aktivní demetylaci DNA (He et al. 2011; Ito et al. 2011). Thymin DNA glykozyláza pak provede odstranění 5caC a 5fC z řetězce DNA následované vložením nemetylovaného cytosinu prostřednictvím reparačního mechanismu DNA (Rasmussen and Helin 2016).



Obr. 1. Schéma metylace/demetylace DNA. Upraveno podle (Ambrosi, Manzo, and Baubec 2017).

Charakteristickým příkladem uplatnění demetylace DNA je utváření savčí placenty. Jedním z genů zasažených ztrátou 5-mC je *Syncytin-1*, který hraje kritickou roli během formování placentálních syncytiotroblastů prostřednictvím fúze buněk. *Syncytin-1* je kódovaný genem pro obalový protein lidského endogenního retroviru HERV-W a jeho specifická exprese v trofoblastech je kontrolována zejména epigenetickými mechanizmy (Mi et al. 2000). V neplacentálních tkáních je jeho exprese potlačena hypermetylací promotoru. Hypometylovaný, aktivní *Syncytin-1* najdeme kromě placentálních trofoblastů i v některých typech nádorů (Matouskova et al. 2006; Huang et al. 2014). Právě roli *Syncytinu-1* ve fenotypových vlastnostech seminomů se v jedné z našich studií zabýváme a dílčí část výsledků je uvedena i v této práci.

Epigenetické mechanizmy regulace exprese bezpochyby hrají významnou roli i v procesu nádorové transformace, které se věnuje následující část literárního přehledu, stejně jako v latenci HIV-1, která je rozebrána v části závěrečné.

3.2. Progrese nádorů a metastázování

3.2.1. Sarkomy a jejich souvislost s v-src a c-src

Slovo sarkom vzniklo z řeckého „sarcoma“, jehož literární význam je masitý (*sarcos*) nádor (*oma*) (Helman and Meltzer 2003). Sarkomy jsou poměrně vzácná, ale různorodá skupina maligních tumorů vznikajících z mezenchymových tkání jako jsou kosti, svaly či tuková tkáň. Jejich sporadický výskyt vyvažuje fakt, že tvoří až 20% nově diagnostikovaných maligních nádorů u dětí a mezi ostatními typy nádorů představují největší riziko úmrtí v dětském nebo mladistvém věku (Albritton 2005).

Jedním z nejdéle studovaných sarkomů jsou ty, jež vznikají po infekci virem Rousova sarkomu (RSV). Peyton Rous, mladý patolog pracující v Rockefellerově institutu v New Yorku, si povšimnul, že nebuněčné filtráty získané ze spontánních kuřecích sarkomů mohou přenášet onemocnění na další jedince a v roce 1911 postuloval hypotézu o virovém přenosu sarkomu (Rous 1911; Javier and Butel 2008). Transformující gen viru RSV, virový onkogen *src* (*v-src*), je aktivovaná protein-tyrozinová kináza, která je zodpovědná za řadu událostí v buňce včetně některých fenotypových změn pozorovatelných u transformovaných buněk (Blume-Jensen and Hunter 2001). Tyto specifické změny buněčné morfologie a proliferace jsou doprovázeny změnami genové exprese. Různé studie identifikovaly specifické geny, které jsou na transkripční úrovni indukované nebo naopak reprimované onkogenem *v-src* (Howard et al. 1978; Fagan et al. 1981; Frankfort and Gelman 1995). Transformace buněk *in vitro* nebo nádory indukované virem RSV představují cenný experimentální model nádorové progresy.

Buněčný protějšek *v-src*, označovaný jako *c-src*, byl první identifikovaný protoonkogen (Bishop et al. 1978). Rozdíl v patogenní aktivitě mezi těmito dvěma proteiny spočívá v jejich struktuře a regulaci. *c-Src* je udržován v neaktivní formě několika intramolekulárními interakcemi. Mutace vedoucí k přerušení těchto interakcí mají za následek vznik konstitutivně aktivní kinázy. To je nejlépe dokumentováno právě na onkogenu *v-Src*, který má zkrácenou negativně regulační oblast na svém C-konci (Brown and Cooper 1996). Přestože *v-src* způsobuje nádory v kuřatech, jako původce lidských nádorů nebyl identifikován. Jeho buněčný protějšek (*c-src*) je běžně exprimovaný v mnoha tkáních zejména v nervové, kostní a krevních destičkách (Parsons and Parsons 2004). Studie deficiencie *c-src* na myším modelu prokázala, že tyto myši trpí osteopetrózou, která se projevuje narušenou resorpcí kostí a sníženou činností osteoklastů. Zajímavé je, že takto deficientní myši nevykazují další detekovatelné abnormality

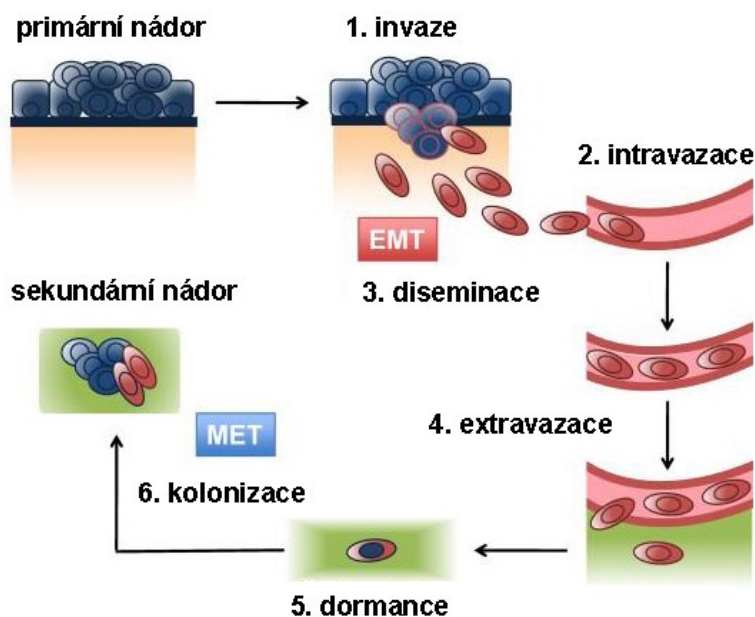
ani ve tkáních s přirozeně vysokou expresí *c-src* a to pravděpodobně díky funkční redundanci ostatních příbuzných kináz (Soriano et al. 1991). Opačná studie dokládá, že vložení *v-src* do normálních buněk vede k transformovanému fenotypu a k aktivaci několika signálních drah jako je STAT3 nebo Ras/MAPK. *v-Src* zde narušuje mezibuněčné spoje stabilizované E-cadherinem (Behrens et al. 1993), který je v komplexu s beta-cateninem kinázou *v-Src* fosforylován, beta-catenin následně disociuje a translokuje do jádra, kde spouští transkripční řadu genů. Mezi ně patří i geny zapojené v procesu epitelově-mezenchymové tranzice (EMT), který je blíže popsán v kapitole 3.2.2.1. Tento proces je po inhibici *v-Src* opět revertován (Boyer, Bourgeois, and Poupon 2002). *c-Src* je regulován fosforylací a defosforylací klíčových tyrozinových oblastí jako odpověď na přítomnost růstových faktorů, cytokinů, buněčnou adhezi a aktivaci antigenních receptorů (Brown and Cooper 1996). Jeho deregulovaná aktivita je zodpovědná za různé typy nádorové transformace (Aleshin and Finn 2010).

Histologicky se sarkomy dělí do dvou hlavních skupin. Zaprvé kostní sarkomy, kam patří osteosarkom nebo Ewingův sarkom a zadruhé sarkomy měkkých tkání, což je souhrnný název pro sarkomy vytvořené v tukové a svalové tkáni, krevních cévách, podkoží, nervech, vazech a v synoviální tkáni okolo kloubů (Helman and Meltzer 2003).

I přes svůj mezenchymový charakter tvoří sarkomy metastázy poměrně zřídka. Nejčastěji dochází k indukci metastázování u sarkomů končetin. Pacienti se sarkomy měkkých tkání v končetinách rozvinou plicní metastázy asi ve 20% případů (Songur et al. 2003).

3.2.2. Metastatická kaskáda

Sled kroků, které vedou k rozšíření buněk z primárního nádoru do vzdálené tkáně se označuje jako metastatická kaskáda. Začíná invazí okolní tkáně a pokračuje vstupem do krevního nebo lymfatického systému nazývaným intravazace, přežitím během cirkulace, opuštěním cév (extravazace) a konečně kolonizací a proliferací v místě sekundárního nádoru (Valastyan and Weinberg 2011). Zjednodušené schéma metastatické progresse nádoru je na obrázku 2. Řada studií dokládá, že v případě karcinomů (nádory pocházející z epitelů) je osvojení schopností dovolující buňce zahájit tyto kroky doprovázeno procesem EMT.



Obr. 2. Zjednodušené schéma metastatické progresse. Upraveno podle (Scheel and Weinberg 2012)

3.2.2.1. Epitelově-mezenchymový přechod (EMT)

Naše tělo se z velké části skládá z epitelových a mezenchymových buněk, které mají definované rozdíly spojené s fyziologickými funkcemi podle toho, kde rostou. Epitelové buňky zahrnují všechny vnější a hlavně vnitřní povrchy tubulárních a žlázových struktur v lidském těle. Jejich funkce jsou budování ochranné bariéry proti vnějšímu prostředí, usnadnění transportu látek přes epitel a zprostředkování sekrece ze žláz. (Joshi et al. 1986; Stingl et al. 2001; Frisch 1997). Naproti tomu se mezenchymové buňky, včetně fibroblastů a buněk hladké svaloviny, nacházejí v pojivových tkáních a od epitelových buněk jsou odděleny bazální membránou. Tyto typy buněk zajišťují opravy a přestavby tkání během nichž musí být pohyblivé a také mají podpůrné a kontraktilní funkce (Wu et al. 2007; Uccelli, Moretta, and Pistoia 2008) .

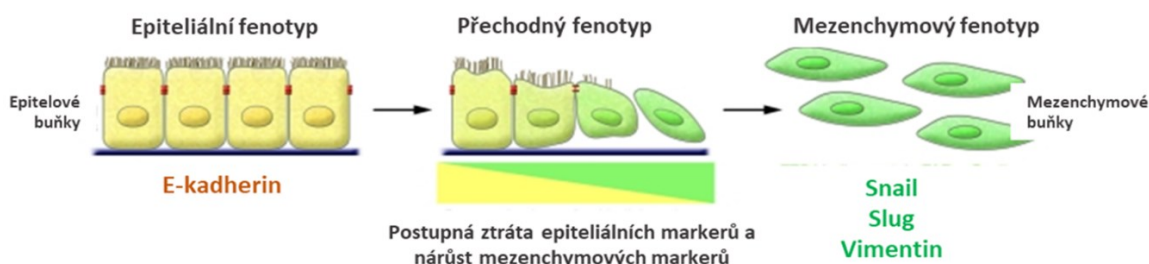
V průběhu vývoje se epitelové buňky přeměňují na mezenchymu podobné buňky prostřednictvím epitelově-mezenchymového přechodu. Cykly EMT a jemu reverzního mezenchymově-epitelového přechodu (MET) jsou potřebné pro správnou tvorbu embrya (Kerosuo and Bronner-Fraser 2012). Avšak EMT může být opět aktivován v patologických procesech včetně kancerogeneze nebo fibrózy (Thiery et al. 2009). Během EMT ztrácejí epitelové buňky apikálně-basální polaritu a adhezi k sousední epitelové buňce, mění se na

mezenchymu podobné buňky, které jsou charakteristické předo-zadní polaritou, jenž dovoluje buňce migrovat ve zvoleném směru extracelulární sítě (ECM) (Obr. 3) (Kalluri and Weinberg 2009). V buněčné kultuře je EMT pod mikroskopem viditelný proces, kde epitelové buňky získávají vřetenovitou mezenchymovou morfolonii. Na molekulární úrovni EMT indukuje změny v uspořádání cytoskeletálních proteinů, proteinů buněčných spojů a polarizačního komplexu a zvyšují expresi matrixových metaloproteáz, které jsou schopny štěpit ECM (Lamouille, Xu, and Derynck 2014; De Craene and Berx 2013). Existují markery EMT, jako jsou transkripční faktory z rodiny Snail a Slug, které jsou represory tumor-supresorového genu pro *E-cadherin* a jsou považovány za jedny z hlavních iniciátorů EMT (Hajra, Chen, and Fearon 2002; Casas et al. 2011). Mezi další markery patří protein intermediálních filament Vimentin, který je hojně exprimovaný v normálních mezenchymových buňkách a jeho zvýšená exprese byla nalezena v různých epitelianích nádorech. Další známkou EMT může být ztráta adhezivní molekuly E-cadherinu (Thiery et al. 2009; Celia-Terrassa et al. 2012) (Obr. 2.3.). Ve snaze definovat rozdíly buněk před a po EMT je hojně využívané transkripční profilování. Změny v expresi buněk během nádorové progresse jsou podrobněji popsány v kapitole 3.2.2.6.

Proces EMT zvyšuje migrační a invazivní vlastnosti karcinomových buněk. Umožňuje intravazaci a přežití cirkulujících nádorových buněk (CTC) v krevním oběhu. Následný proces MET je zodpovědný za kolonizaci vzdálené tkáně buňkami CTC (Hugo et al. 2007).

3.2.2.2. Cirkulující nádorové buňky (CTC)

Jelikož většina buněk využívá ke své diseminaci krevní cévy a jen malé procento lymfatický systém, je možné izolovat a charakterizovat CTC z krve na základě jejich biologických a fyzikálních vlastností (Pennacchioli et al. 2012; Gronchi et al. 2010). Využívá se jejich větší velikosti ve srovnání s krevními buňkami a přítomnosti specifických povrchových antigenů, zejména epitelové adhezivní molekuly (EpCAM) (Allard et al. 2004). CTC izolované z periferní krve pacientů slouží jako prognostický marker u pacientů s metastázami karcinomu prsu, tlustého střeva či prostaty (Cristofanilli et al. 2004; Cohen et al. 2009; de Bono et al. 2008). Každý den se z primárního nádoru může uvolnit až 10^6 CTC/g nádorové masy. Většina z těchto buněk zahyne a jen malé procento, asi 0,01%, přežije a pokračuje v invazivní diseminaci (Zhe, Cher, and Bonfil 2011).



Obr. 3. Schéma účasti EMT na metastatické progresi. Upraveno podle (Kalluri and Weinberg 2009)

Pouze málo studií se zabývá CTC odvozenými od sarkomu, což souvisí s menší incidencí sarkomů oproti jiným druhům nádorů. Cirkulující buňky pozitivní na EpCAM byly detekovány u pacientů se sarkomem měkkých tkání a expresní genová analýza dokládá, že molekuly mRNA EpCAM jsou v různých typech sarkomů přítomny. Navíc imunohistochemické barvení odhalilo proteinovou expresi EpCAM v angiosarkomu, leiomyosarkomu či osteosarkomu (Ward et al. 2015). Větší velikosti nádorových buněk oproti leukocytům k izolaci a charakterizaci CTC ze sarkomu poprvé využil Chinen *et al.* (Chinen et al. 2014). Tato studie na jedenácti pacientech s invazivním sarkomem měkkých tkání dokládá přítomnost CTC v jejich krvi. K charakterizaci CTC mimo jiné použil i protilátku proti vimentinu, tedy jednomu z hlavních ukazatelů EMT, který je dnes využíván jako biomarker k detekci CTC z krve pacientů s karcinomem či sarkomem (Satelli and Li 2011).

3.2.2.3. Extravazace

Aby mohly cirkulující buňky invadovat do vzdálenějších míst, musí opustit krevní řečiště a vstoupit do parenchymu sekundární tkáně. Extravazace zahrnuje průchod buněk cévní stěnou nazývaný transendoteliální migrace, a průchod subendoteliální bazální laminou. Předpokládá se, že si nádorová buňka osvojí některé vlastnosti podobné leukocytům, které jí dovolí adherovat na endoteliální buňky specifickými dynamickými povrchovými interakcemi. Nádorové buňky různého histologického původu vykazují expresi povrchových proteinů důležitých pro extravazaci leukocytů, včetně adhezivních či chemokinových receptorů, které interagují s příslušnými ligandy na lumenálnímu povrchu endotelia. Charakter těchto proteinů ovlivňuje orgánový tropismus metastáz (Miles et al. 2008; Strell and Entschladen 2008).

3.2.2.4. Mezenchymově-epitelový přechod (MET)

EMT je považován za proces podporující progresi epitelového nádoru do vzdálených orgánů. Vzhledem k tomu, že sarkomy jsou mezenchymového původu, buňky nepodstupují proces EMT, ale pravděpodobně využívají jemu reverzní proces MET, který podstoupí cirkulující buňky, aby v sekundárních orgánech mohly prosperovat jako epitelové nádorové buňky (Wells, Yates, and Shepard 2008). Bylo prokázáno, že různé typy sarkomů včetně leiomyosarkomu či osteosarkomu vykazují epitelovou diferenciaci na základě epitelových markerů včetně E-cadherinu (Sato et al. 1999). Procesy EMT a MET, tedy dva odlišné reverzibilně regulované mechanismy využívané nádorovými buňkami by tedy mohly být považované za pojítka mezi karcinomy a sarkomy.

3.2.2.5. (Ne)účinnost tvorby metastáz

Jak bylo výše zmíněno, agresivní nádory uvolní tisíce cirkulujících buněk do krevního oběhu denně, přesto většina pacientů vytvoří pouze malé množství metastáz (Zhe, Cher, and Bonfil 2011). To naznačuje, že je proces metastázování velmi neefektivní. Přítomnost CTC v cirkulaci je limitována a u pacientů s prsním karcinomem bylo zjištěno, že poločas života CTC je 1-2.4 h (Meng et al. 2004). Většina CTC umírá, pravděpodobně kvůli ztrátě signálů k přežívání nebo kvůli toku krevního řečiště. Konstantní pohyb krve cévami je doprovázen mnoha dynamickými silami, zejména změny tlaku a smykové síly působící na povrchu plochy. Buňky cévního systému jsou takovým silám dobře přizpůsobené. Například endoteliální buňky v závislosti na těchto silách mění svoji genovou expresi a přežívání (Malek and Izumo 1992). Podobný vliv mají tyto síly také na cirkulující nádorové buňky. Je možné, že si nádorové buňky osvojí mechanismy typicky používané leukocyty nebo endoteliálními buňkami, aby přežily v dynamickém prostředí cirkulace (Avvisato et al. 2007). Hlavní limitující okolností pro tvorbu metastáz je tedy přežití v cirkulaci, extravazace a kolonizace sekundárních orgánů, kde navíc dochází k produkci faktorů inhibujících růst nádorových buněk (Vanharanta and Massague 2013; Labelle and Hynes 2012; Kienast et al. 2010).

Počet CTC v krvi pacientů ne vždy koreluje se špatnou prognózou nebo metastázováním. Nízký počet cirkulujících buněk před operačním zákrokem předpovídá dobré prognózy pro pacienty s karcinomem prsu s nízkou pravděpodobností návratu nemoci (Cristofanilli et al. 2004). Naopak pacienti s ovariálním karcinomem s miliony uvolněných CTC denně mají incidenci metastáz poměrně malou a vyšetě buňky jsou schopny přežít v dormantním stavu po desetiletí (Karrison, Ferguson, and Meier 1999).

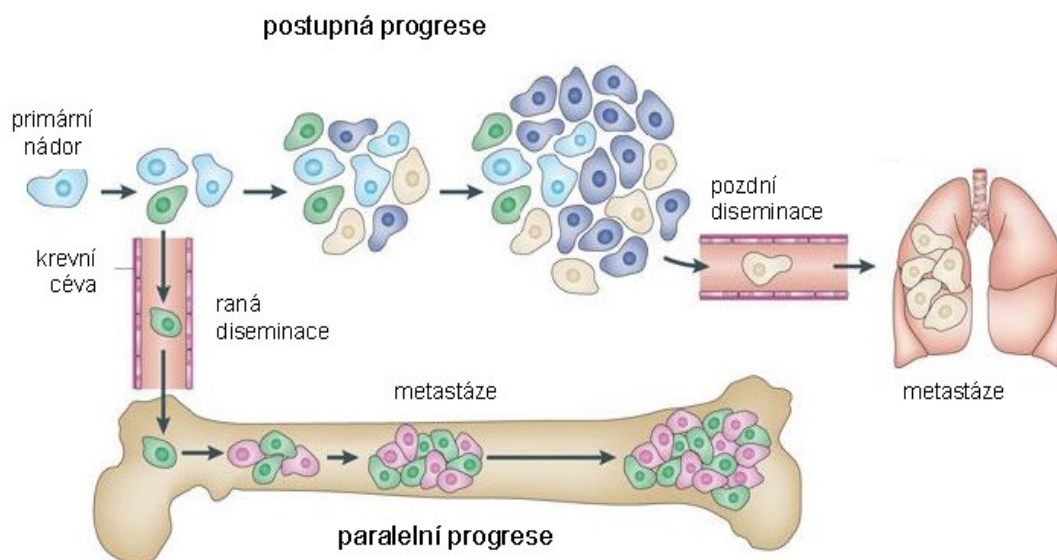
Osud CTC je předurčen i charakterem nového mikroprostředí, které vykazuje určitou lokaci, buněčný typ a přítomnost extracelulární sítě proteinů podporující přežití a množení diseminovaných nádorových buněk (DTC) (Oskarsson, Batlle, and Massague 2014). Někdy mohou CTC přejít do dormantního stavu a perzistovat ve vzdálených místech roky či desetiletí. Jak je taková dormantní buňka udržována v klidovém stavu a co ji aktivuje, zatím není přesně známo (Goss and Chambers 2010; Pantel and Alix-Panabieres 2014). Ghajar *et al.* prokázali na myším modelu, že dormantní DTC setrvávají v mikrovaskulatuře plicní tkáně, kostní dřene a mozku. Takové buňky jsou udržovány v klidovém stavu díky přítomným endoteliálním buňkám a bazální membráně. Tato tumor-supresivní povaha mikrovaskulárního endotelu je ztracena v závislosti na zvýšené expresi TGF- β 1 (Ghajar et al. 2013).

Důležitá otázka je také načasování, kdy CTC vstupují do cirkulace. Dva hypotetické modely metastázování navrhuji, že buď probíhá paralelní progresse, kdy se nádorová diseminace odehrává v rané fázi, nebo že jsou metastázy vytvářeny až v pozdních fázích klinicky diagnostikovatelného nádorového onemocnění (Marusyk, Almendro, and Polyak 2012). Schematické zobrazení těchto procesů je znázorněno na obrázku 4. Pantel a Brakenhoff (Pantel and Brakenhoff 2004) navrhli, že nádorová buňka může opustit primární nádor velmi brzy během svého vzniku a že si tyto buňky zatím nevytvořily vlastnosti pro zformování metastáz. Jejich hypotéza byla podpořena i jinými pracemi, které ukazují, že se nádorové buňky mohou diseminovat skutečně velmi brzy, dokonce dříve než je primární nádor zjevně invazivní (Sanger et al. 2011; Husemann et al. 2008) . Další důkaz přinesla studie využívající kvantifikaci ojedinelých CTC *in vivo*. Po injekci nádorově specifického ligandu a s využitím multifotonové intravitální mikroskopie byly pozorovány CTC plující krevním řečištěm myšího modelu. Takové CTC mohly být detekovány týdny před incidencí metastáz (He et al. 2007).

Stále však není jasné, jestli jsou tyto brzy diseminované buňky schopny zformovat klinicky patrné metastázy. V duktálním karcinomu *in situ* je objevení se metastáz velmi vzácné, přesto jsou diseminované buňky, které již vystoupily z cirkulace detekovány u 20-30% pacientů (Husemann et al. 2008). To napovídá, že se časně vyseté nádorové buňky málokdy přeměňují v buňky tvořící metastázy a přestože CTC můžou vstoupit do oběhu v celém průběhu choroby, je možné, že později diseminované buňky mají lepší vlastnosti pro vytvoření metastáz (Vanharanta and Massague 2013). Lze očekávat, že vzhledem k obrovské variabilitě charakteru, klinických projevů a průběhu onemocnění u lidských nádorů, představují popsané modely podpořené experimenty na myších pouze dva krajní scénáře, přičemž vývoj individuálních klinických případů se může více blížit jednomu nebo druhému.

Pouze malé množství buněk je schopno přežít nepříznivé podmínky jednotlivých kroků metastatické kaskády, zachovat si počáteční metastatický potenciál a progradovat z mikrometastázy na sekundární nádor – makrometastázu. Tato přeměna z mikro- na makrometastázy je podmíněna interakcí nádoru a imunitního systému (Laughney et al. 2020), stavem dormance (Aguirre-Ghiso 2007) a vhodnými podmínkami nádorového mikroprostředí (Levental et al. 2009). Toto prostředí může progresi nádoru buď podporovat nebo může mít naopak protinádorovou aktivitu (Ostman 2012). Nádorové mikroprostředí je soubor různorodých buněčných a strukturních složek včetně vaskulatury, buněk imunitního systému, ECM a fibroblastů. Poslední jmenované fibroblasty se za normálních podmínek účastní vývoje, oprav tkání a zánětlivých odpovědí. Nicméně během nádorové progresi mohou poskytovat vhodné prostředí pro proliferaci a přežívání nádorových buněk a remodelováním ECM mohou podporovat růst nádoru a invazivitu nádorových buněk (Kalluri and Zeisberg 2006; Bhowmick, Neilson, and Moses 2004). Jiná studie navrhuje, že zdrojem takových fibroblastů asociovaných s nádorem (CAF) nejsou pouze normální fibroblasty ale i mesenchymální kmenové buňky, buňky hladké svaloviny, endoteliální buňky a samy nádorové buňky, které prošly procesem EMT (Madar, Goldstein, and Rotter 2013).

Všechny procesy metastatické kaskády způsobují zánětlivou reakci a vyžadují remodelaci ECM. Podobně jako procesy vyžadované pro hojení ran. V roce 1986 Harold Dvorak nazval nádory jako „nikdy se nehojící rány“ („wounds that do not heal“) (Dvorak 1986). Genomická nestabilita způsobuje chronickou zánětlivou signalizaci samotných nádorových buněk, která funguje jako všudypřítomný hnací motor metastázování (Wu and Zhou 2009). Přírozený proces hojení ran je charakteristický velkým množstvím pozitivních a negativních zpětnovazebných mechanismů. Tyto regulační mechanismy zajišťují, že proces hojení ran pokračuje až do konce, jakmile je zahájen, a zároveň zabraňují nadměrné regeneraci a abnormálnímu buněčnému růstu. Zánětlivá signalizace generovaná ze samotných nádorových buněk narušuje tuto souhru a vytváří nekontrolovanou pozitivní zpětnovazebnou smyčku, která vede k metastatické progresi (Deyell, Garris, and Laughney 2021).



Obr. 4. Schematické znázornění diseminace buněk během metastatické progresse.
Upraveno dle (Marusyk, Almendro, and Polyak 2012).

3.2.2.6. Změny genové exprese vedoucí k tvorbě metastáz

Progrese z časných fází růstu nádoru k tvorbě metastáz je desítky let trvající evoluční proces, který zahrnuje akumulaci mutací a klonální selekci. Program genové exprese metastázující buňky může být odhadnut porovnáním genové exprese mezi metastázujícími a nemetastázujícími buňkami. Proto se mikročipová technologie nebo sekvenace nové generace ukázala jako cenný zdroj k určení kandidátních genů asociovaných s metastázováním (Haqq et al. 2005; Yamasaki et al. 2007; Ku et al. 2007). Takovéto studie dokládají, že velká část populace nádorových buněk má vlastnosti, které je předurčují k vytvoření metastáz. Metastatické charakteristiky naznačují, že je velmi nepravděpodobné, že vzácná mutace je hnacím motorem tvorby metastáz. Pohonem je spíše více genomických a epigenomických změn, které v každém kroku vedou k selekční výhodě (Vanharanta and Massague 2013). Existují mutace opakující se v metastatických vzorcích, které jsou navíc běžně přítomné v primárních nádorech (Yachida et al. 2010; Gerlinger et al. 2012). Genetické změny, které se vyskytují také u primárních nádorů, mohou být obohaceny v metastatických klonech, což může vést k různé frekvenci mutantních alel mezi primárním nádorem a metastázami (Navin et al. 2011). Důsledkem je, že CTC nemusí reprezentovat celou populaci primárního nádoru, ale pouze jeho část a různé CTC se mohou lišit ve schopnosti kolonizovat specifické orgány (Nguyen, Bos, and Massague 2009; Campbell et al. 2010) (Obr. 4).

V normálních buňkách je díky tkáňově specifickým transkripčním faktorům udržována rovnováha mezi buněčnou diferenciací, migrací a dělením. Deregulace těchto faktorů je spojována s metastázováním. Jsou to například transkripční faktory GATA3 a ELF5, které regulují diferenciaci mamárních luminálních a alveolární buněk. Jejich snížená exprese byla detekována v prsním karcinomu. Zvýšená exprese GATA3 byla dostatečná k indukci diferenciaci a redukcii plicních metastáz (Kouros-Mehr et al. 2008). GATA3 indukuje expresi miR-29b, která ovlivňuje remodelaci kolagenové sítě, epitelovou plasticitu či angiogenezi (Chou et al. 2013). ELF5 inhibuje metastázování zejména prostřednictvím transkripční represe SNAIL2, zodpovědného za EMT a regulaci normálních a maligních mamárních kmenových buněk (Chakrabarti et al. 2012; Guo et al. 2012). Ztráta faktorů regulujících diferenciaci kmenových buněk, jako je dráha WNT- β -catenin, Notch či Hedgehog (Nguyen et al. 2009; Oskarsson et al. 2011; Pratap et al. 2008) je dalším příkladem deregulace exprese vedoucí k metastázování. Faktory v mikroprostředí kmenových buněk mohou iniciovat metastázování aktivací drah kmenových buněk v DTC. Periostin (POSTN), složka ECM, která je sekretována fibroblasty v normální tkáni a kmenovými buňkami v primárním prsním karcinomu, byl identifikován jako iniciátor metastázování v DTC. V místě tvorby metastáz totiž blokuje ligandy WNT (Malanchi et al. 2012). Také tenascin C (TNC), další složka ECM, ovlivňuje formování mikrometastáz. TNC může být produkován nádorovými buňkami a podporovat jejich přežívání (O'Connell et al. 2011) nebo ovlivňovat charakter kmenových buněk prostřednictvím signalizace Notch a WNT (Oskarsson et al. 2011). Poznatek, že TNC může interagovat s kolagenem typu I a s POSTN, který se váže na fibronectin, naznačuje, že mikroprostředí faktorů ECM může zvyšovat pravděpodobnost vytvoření metastáz nejen vytvářením specifické struktury ECM ale také spoluprací v signální transdukcii (Reticker-Flynn et al. 2012).

Metastatický proces může být ovlivněn v různých fázích také molekulami na povrchu buňky, jako jsou integriny, které zprostředkovávají interakce buňka-buňka nebo buňka-ECM a jsou důležité pro přežití nádorových buněk a jejich diseminaci. Integriny podporují homotypickou adhezi nádorových buněk a regulují matrixové metaloproteázy, které nádorové buňce usnadňují pohyb přes ECM (Huhtala et al. 1995). ITGA4 může regulovat směřování nádorových buněk do orgánových kompartmentů, kde jsou exprimovány ligandy ITGA4, a v závislosti na typu nádoru indukovat tvorbu metastáz. ITGA4 na buňkách melanomu nebo sarkomu po jejich vstupu do krevního oběhu podporuje jejich šíření do vzdálenějších orgánů interakcí s ligandy exprimovanými na povrchu endoteliálních buněk, krevními destičkami a specifickými proteiny ECM, což podporuje tvorbu metastáz (Gehlsen, Davis, and Sriramarao

1992), (Holzmann, Gossler, and Bittner 1998). ITGA4 svou interakcí s endoteliálními buňkami stimuluje adhezi nádorové buňky k cévní stěně a ulehčuje tak transendoteliální migraci (Meerschaert and Furie 1994). ITGA4 může také ovlivňovat přežívání buněk ve vzdálených orgánech. Zvýšením jeho exprese v lymfomových T-buňkách došlo k redukci metastáz po intravenózní injekci buněk v myším modelu. ITGA4 zde inhibuje kolonizaci sekundární tkáně a má v tomto typu nádoru a v této fázi metastatického procesu vliv negativní (Gossler et al. 1996).

3.2.3. Interakce nádoru s imunitním systémem

Nádorové buňky úzce interagují s imunitním systémem a obě zúčastněné strany podléhají společné evoluci. Imunitní odpověď může chránit organismus před nádory mechanizmy vedoucími ke smrti nádorových buněk, na druhé straně může také modifikovat nádorové buňky tak, že jim pomáhá v úniku před imunitním dohledem (Dunn et al. 2002; Schreiber, Old, and Smyth 2011).

Interakce nádorových a imunitních buněk se odehrávají ve třech stupních. Zaprvé je to eliminace, kdy nádor invazivně roste a vyvolává tak lokální zánětlivou reakci za účasti makrofágů a NK buněk. Tyto buňky po rozpoznání nádorové buňky vylučují cytokiny, jako je interferon gamma (IFN- γ). Následně je spuštěna kaskáda imunitních aktivací, která vede k prezentaci nádorových antigenů T-buňkám v lymfatických uzlinách a přivolání nádorově specifických CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů adaptivního systému do místa nádoru, kde tyto buňky mohou nádor rozpoznat a eliminovat. Pokud je tato eliminace kompletní, organismus nevytvoří nádory (Dighe et al. 1994; Aqbi et al. 2018).

Zadruhé může dojít k neúplné eliminaci, kdy interakce nádoru a imunitního systému vede k dynamické rovnováze mezi nádorovými a infiltrovanými imunitními buňkami. Během této fáze nádorové buňky neproliferují. Zatřetí mohou na konci rovnovážné fáze v odpověď na selekční tlak vyvíjený imunitními buňkami vznikat varianty nádorových buněk, které imunitnímu dohledu uniknou. Tyto nádorové buňky již mohou proliferovat a v organismu se projevují jako klinický nádor (Martin et al. 2021; Palucka and Coussens 2016).

Existují také důkazy, že různé populace imunitních buněk, které se podílejí na vytvoření chronických zánětlivých reakcí, jako jsou T-buňky, makrofágy a žírné buňky, mohou podporovat rozvoj některých typů nádorů. To může být zapříčiněno přímou podporou přežívání nádorových buněk nebo inhibicí protinádorové imunitní odpovědi v mikroprostředí nádoru. Například

v myším modelu cervikálního karcinomu dochází po depleci makrofágů k potlačení nádorové progresi. Makrofágy v nádorovém mikropostředí sekretují zánětlivé cytokiny IL-1, IL-6, VEGF a TNF- α , což vede ke stimulaci angiogeneze podporující růst nádoru (Giraud, Inoue, and Hanahan 2004). Chronický zánět může přispět k iniciaci nádoru navozením genotoxického stresu nebo k udržení a progresi nádoru stimulací jeho proliferace (Grivennikov, Greten, and Karin 2010).

Je tedy jasné, že imunitní systém má v nádorovém mikropostředí dvojí úlohu. Protinádorová imunitní odpověď je kompenzována vytvářením mikropostředí podporující tvorbu nádoru sekrecí cytokinů a přivoláním buněk suprimujících protinádorovou imunitu. Přínos imunitního systému se mění v závislosti na kontextu nádoru a složení nádorového mikropostředí. Kromě toho mohou být různé části imunitního systému pronádorové nebo protinádorové ve stejném mikropostředí v závislosti na jejich časovém a prostorovém výskytu v nádorovém mikropostředí (Schreiber, Old, and Smyth 2011).

3.2.4. Epigenetické mechanizmy v progresi nádorů

Epigenetické přeprogramování je jeden z regulačních mechanismů, který předurčuje osud buňky během nádorové progresi a metastázování.

První pozorování aberantní metylace DNA v nádorových tkáních bylo zaznamenáno před téměř čtyřiceti lety, kdy byla pomocí chromatografických technik analyzována globální metylace DNA. Výsledkem byla snížená metylace DNA v různých typech maligních nádorů ve srovnání s normální tkání, ze které nádor vznikl (Romanov and Vanyushin 1981; Gama-Sosa et al. 1983).

Dosavadní studie prokazují souvislost mezi DNA metylací a nádorovou progresí, nicméně interpretace dat je komplikovaná, zejména proto, že vzorec metylace DNA v promotorových ostrovech CpG v daném nádoru často odpovídá metylačnímu vzorci původní tkáně (Sproul et al. 2012; Hoadley et al. 2018). Navíc geny, o kterých se běžně předpokládá, že jsou v nádorech umlčeny hypermethylací, mohou stále vykazovat velmi variabilní úroveň metylace mezi nádorovými buňkami a měly by být brány v úvahu při jejich použití jako epigenetických biomarkerů (Zhang and Huang 2017). Zatím není zcela jasné, jaký mechanismus rozeznává specifické místo na DNA pro její metylaci či demethylaci během nádorové progresi. Změny v metylaci DNA v nádorech a metastázách pravděpodobně odpovídají změnám v aktivitě transkripčních faktorů, které rozeznávají specifickou sekvenci

DNA. V experimentálním systému bylo zjištěno, že sekvence DNA předurčuje vzorec metylace DNA v normálních buňkách (Krebs et al. 2014). Nicméně specifické prometastatické změny mohou vznikat selekcí náhodných alterací v celkovém metylačním vzorci DNA (Landan et al. 2012).

Abnormální metylační vzorec nádorových buněk je většinou zapříčiněn rozsáhlou hypometylací DNA genů podporujících nádorovou progresi a hypermetylací DNA tumor-supresorových genů (Ehrlich 2002). Takové epigenetické mechanismy mohou synergizovat se známými řídicími mutacemi a usnadnit tak vznik a vývoj nádoru (Tao et al. 2019). Dále bylo prokázáno, že diferenciální metylace v malých oblastech, většinou charakterizovaných hypermetylací, ovlivňuje genovou regulaci, zatímco diferenciální metylace ve velkých genomických oblastech, většinou charakterizovaných hypometylací, ovlivňuje chromozomální organizaci (Santoni D. 2021).

Funkční relevance hypometylace DNA v nádorech pravděpodobně souvisí s indukcí genomové nestability (Jones and Gonzalzo 1997). Hypometylace DNA nádorových buněk má charakter globální ztráty 5-mC (Soares et al. 1999; Eden et al. 2003). Zajímavým příkladem jsou seminomy (Reuter 2005), jejichž vývoj, podobně jako u ostatních testikulárních tumorů zárodečných buněk (TGCT), připomíná raná stádia embryogeneze (Robertson 2005). TGCT pravděpodobně vznikají z primordiálních zárodečných buněk, což je stádium vývoje zárodečné linie, kdy je metylace DNA vymazána a je opětovně ustanovena totipotence (Morgan et al. 2005). Genom seminomů zůstává rozsáhle hypometylovaný a prakticky zcela bez hypermetylace ostrovů CpG (Smiraglia et al. 2002). Zajímavé je, že neseminomové typy TGCT, které jsou výrazněji diferencované, mají genom metylovaný podobně jako somatické tkáně (Netto et al. 2008).

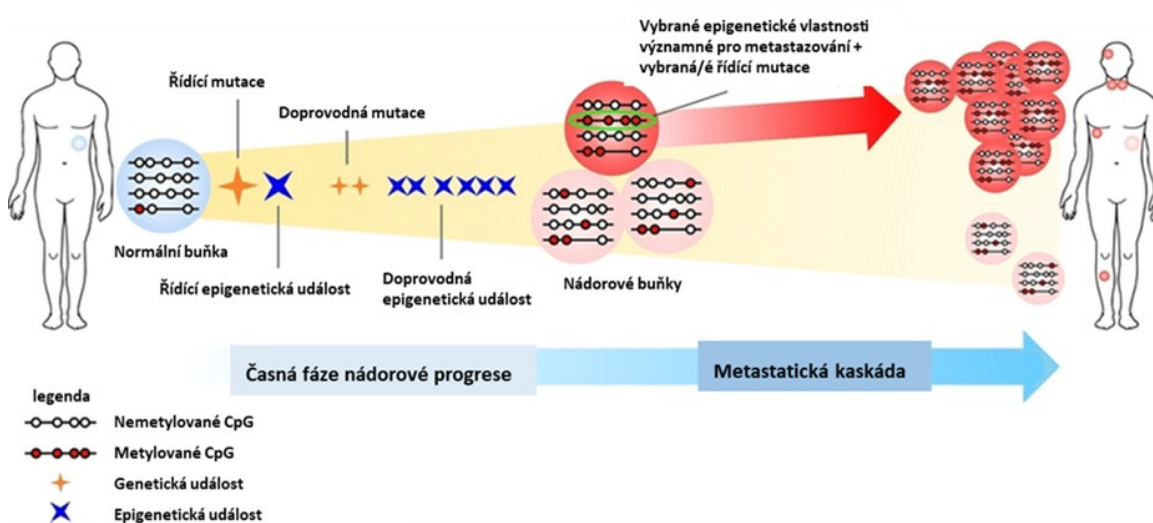
Hypermetylace DNA se pravděpodobně odehrává v časných fázích nádorové progresi a to zejména v promotorových oblastech bohatých na CpG. (Ballestar and Esteller 2008). V některých typech nádorů může vzniknout metylátorový fenotyp ostrovů CpG (CIMP), což je situace, kdy dochází k metylaci několika tisíců ostrovů CpG zároveň (Costello et al. 2000; Malta et al. 2018). Profily hypermetylace CpG ostrovů tumor-supresorových genů se značně liší v závislosti na typu nádoru (Costello et al. 2000). Epigenetická inaktivace není jen vlastností ojedinělých nádorů ale také neoplazií dědičných nádorových onemocnění a může se jednat i o sekundární změny v průběhu nádorové progresi (Esteller et al. 2001). Specifická hypermetylace CpG ostrovů je dokonce zachována u dlouhodobě kultivovaných nádorových

buněčných linií (Paz et al. 2003; Blazkova et al. 2009). Některé nádorové typy mají více metylované CpG ostrovy než jiné. Například nejvíce hypermetylované nádorové buňky jsou původem z gastrointestinálního traktu, zatímco nejmenší hypermetylace byla pozorována u ovariálního karcinomu a sarkomu (Esteller 2007). Jedno z vysvětlení pro tento jev je, že v těchto nádorech zatím nebyly nalezeny specifické geny s výrazně hypermetylovaným promotorem. Dalším důvodem může být, že více hypermetylované typy jsou ty, které jsou více vystavené externím karcinogenním vlivům (Costello et al. 2000). Studie lidských karcinomových buněk *in vitro* ukazuje, že nejvíce hypermetylované geny asociované s nádory mohou být reaktivovány inhibítorem metylace DNA 5-aza-2'-deoxycytidinem (5-aza-dC) (Mompalmer and Bovenzi 2000). Takto vzniklá demetylace DNA může indukovat terminální diferenciaci a senescenci neoplastických buněk (Razin and Riggs 1980).

V nádorových buňkách jsou změny v metylaci DNA doprovázeny změnami v histonových modifikacích. Histonové deacetylázy (HDAC) jsou enzymy, které deacetylují histonové lyziny, což vede ke kondenzaci chromatinu. Při terapeutickém použití inhibitorů histonových deacetyláz (HDACi) dochází přednostně k ovlivnění klíčových buněčných funkcí u maligních buněk. Je to pravděpodobně důsledkem reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou v normálních buňkách vychytávány thioredoxinem (TXN). V nádorových buňkách TXN exprimován není a vlivem akumulace ROS dochází k buněčné smrti (Ungerstedt et al. 2005). Deriváty kyseliny hydroxamové byly první třídou objevených HDACi. Do této třídy patří i Vorinostat (též SAHA) (Bradner et al. 2010), který se také využívá pro reaktivaci latentních provirů HIV-1 (viz kapitola 3.3.3.) Dalším příkladem HDACi je derivát benzamidu MS-275, který vykazuje protinádorovou aktivitu u dětského osteosarkomu, maligního rhabdomyosarkomu a Ewingova sarkomu (Jaboín et al. 2002).

Nádorové geny mohou skrývat tisíce somatických mutací ale pouze některé z nich jsou kritické pro nádorovou progresi. Stejně tak nádorový epigenom může mít tisíce alterací v metylaci DNA, ale pouze některé jsou relevantní pro buněčnou transformaci (Obr. 5.). Například v nádorech prostaty je mezi primárním nádorem a metastázami metylace DNA obvykle konzervovaná (Aryee et al. 2013), zatímco v případě prsního karcinomu byly v metastatických buňkách pozorovány změny v metylaci DNA, přednostně mimo regiony bohaté na CpG (Reyngold et al. 2014). V nádorech prostaty byla navíc identifikována heterogenita v metylaci DNA v rámci nádoru, která koreluje s metastatickou progresí (Brocks et al. 2014).

V hlavní části této disertační práce věnované metastázování se mimo jiné zabýváme právě epigenetickou regulací kandidátního genu *HOPX*.



Obr. 5. Schematické znázornění mutací a epigenetických událostí v průběhu nádorové progresse. Upraveno podle (Chatterjee, Rodger, and Eccles 2018).

3.2.5. Transkripční faktor *HOPX* (Homeodomain Only Protein)

Homeoboxové geny kódují transkripční faktory, které jsou důležité pro určení osudu buňky a formování orgánů během embryogeneze a jsou dobře konzervované během evoluce (Izpisua-Belmonte and Duboule 1992). Jsou charakteristické 60 aminokyselin dlouhou homeodoménou zodpovědnou za vazbu DNA. Strukturní analýza ukázala, že homeodoména se skládá ze tří alfa helixů, z nichž třetí rozpoznávací helix je schopen ukotvení ve velkém žlábků DNA a je tak zodpovědný za sekvencně specifický kontakt s páry bází (Kissinger et al. 1990). Hox proteiny regulují transkripci vazbou na regulační sekvence DNA přítomné v promotorových či enhancerových oblastech genů nebo přímou interakcí s jinými transkripčními kofaktory (Grueneberg et al. 1995).

HOPX byl objeven poměrně nedávno a to hned několika nezávislými skupinami (Chen et al. 2002; Shin et al. 2002). *HOPX* je pravděpodobně specifický jen pro obratlovce. Lidský a myší *HOPX* sdílejí 92% identitu v aminokyselinové sekvenci (Adu et al. 2002).

Jeho exprese je poprvé detekována u mezodermálního prekursoru srdečního svalu v E8.0 během myšího vývoje a později v myokardu. Exprese je udržována v srdečních

myocytech během vývoje až do dospělosti. Až do pozdní gestace je exprese *HOPX* výhradně v srdeční tkáni. V E16.5 je exprimován v myokardu, distálním plicním epitelu a intestinálním epitelu (Adu et al. 2002). V myokardovém prekurzoru je exprese *HOPX* spuštěna těsně po spuštění exprese homeoboxového genu *Nkx2-5* specifického pro srdeční tkáň. U myši deficientní v *Nkx2-5* je exprese *HOPX* snižena a tranzientní transfekce *Nkx2-5* je schopna aktivovat jeho expresi vazbou na konkrétní vazebné místo v blízkosti promotoru *HOPX*. *HOPX* je tedy transkripčním cílem *Nkx2-5* během vývoje myokardu. *HOPX* může naopak sloužit jako inhibitor funkce *Nkx2-5* v rámci zpětnovazebné regulační smyčky (Chen et al. 2002; Shin et al. 2002).

Inaktivace genu *HOPX* vede k vytvoření komplexního fenotypu. Asi polovina *HOPX* *-/-* embryí má narušený vývoj myokardu a občas nastává ruptura myokardu nebo perikardiální efúze. Nicméně některá embrya přežijí až do dospělosti dokonce s normální kardiovaskulární fyziologií. Další životaschopní mutanti *HOPX* mají zvýšený poměr váhy srdce ku váze těla. Toto zvětšení srdce koreluje s větším počtem srdečních myocytů. *HOPX* je tudíž vyžadován k normální maturaci srdečních myocytů během rané gestace a normálnímu perinatálnímu ukončení buněčného cyklu. Důvod občasné absence embryonální letality po vyřazení genu *HOPX* není zcela jasný (Shin et al. 2002).

Řada genů specifických pro funkci srdce je regulována transkripčním komplexem zahrnujícím *Nkx2-5*, *Gata4* a *SRF* (serum response factor) (Wang et al. 2001). *HOPX* je schopen vazby na *SRF*, což znemožňuje vazbu *SRF* na DNA a následnou aktivaci specifických genů. Promotory nebo enhancery srdečních genů, jako je srdeční aktin alfa (*α -CA*), obsahují vazebná místa pro *SRF* a ve spolupráci s *Nkx2-5* či *Gata4* jsou *SRF* aktivovány. Myš s mutací v *HOPX* vykazuje zvýšenou expresi genů závislých na *SRF*, včetně *α -CA*. *HOPX* tedy funguje jako modulátor transkripce závislé na *SRF* (Chen et al. 2002).

V dospělosti je *HOPX* mimo jiné exprimován v mozku, placentě, plicích, děloze, močovém měchýři, ledvinách a slezině (Asanoma et al. 2004). V roce 2011 Takeda et al (Takeda et al. 2011) prokázali, že je *HOPX* marker specifické populace intestinálních kmenových buněk. Intestinální buňky pozitivní na *HOPX* jsou klidové, zachovávají si však kapacitu rychle proliferovat, jako odpověď na ozáření. Vyskytují se ve specifických místech střevních krypt, kde se díky schopnosti střídání aktivního a neaktivního stavu podílí na udržení epitelové homeostáze (Barker 2014).

HOPX byl poprvé spojován s nádorovou transformací v roce 2003, kdy Asanoma *et al.* (Asanoma *et al.* 2003) zjistili, že ve vzorcích choriokarcinomu je tento gen umlčen. Odtud pochází jeho jiný název - NECC1 (Not Expressed In Choriocarcinoma Clone 1). Buňky choriokarcinomu exprimující exogenní *HOPX* vykazovaly znatelné morfologické změny, zvětšenou cytoplazmu a jedno velké jádro nebo několik jader. Po imunohistochemickém barvení byly pozitivní na choriový hormon somatomotropin 1 (CSH1), což je specifický marker diferencovaných syncytiotrofoblastů. Tyto výsledky prokazují, že *HOPX* ovlivňuje diferenciaci placentálních trofoblastů. Stejná skupina v roce 2009 prokázala, že *HOPX* je umlčen v endometriálním karcinomu, přestože žádná mutace v genu *HOPX* nebyla zjištěna. *HOPX* je zde transkripčně umlčen hypermetylací svého promotoru, což vede k rozvoji endometriálního karcinomu. Naopak pokud je promotor *HOPX* hypometylovaný, dochází ke zvýšené expresi *HOPX*, což vede k částečné inhibici buněčné proliferace a nádorové progresi (Yamaguchi *et al.* 2009).

Transkripční umlčení *HOPX* vlivem hypermetylace promotoru bylo v následujících letech prokázáno i u karcinomu žaludku, kolorekta, slinivky a plic (Ooki *et al.* 2010; Harada *et al.* 2011; Waraya *et al.* 2012; Chen, Yang, *et al.* 2015). *HOPX* v buňkách plicního karcinomu potlačuje proliferaci nádorových buněk a podporuje senescenci aktivací onkogenního *Ras* a následné dráhy MAPK, což vede k inhibici MDM2 a zvýšené hladině p21. Senescence navozená *HOPX* byla aktivní také v lidských bronchiálních epitelových buňkách (Chen, Yang, *et al.* 2015). V karcinomu žaludku zvýšená exprese *HOPX* podporuje apoptózu (Ooki *et al.* 2010) a v endometriálním karcinomu *HOPX* potlačuje proliferaci stimulovanou estrogenem prostřednictvím inhibice SRF (Yamaguchi *et al.* 2009). Po transfekci exogenního *HOPX* do buněk karcinomu slinivky, který je pravděpodobně generován buňkami Langerhansových ostrovů konstitutivně exprimujícími *HOPX*, dochází k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a inhibici invazivního charakteru buněk (Waraya *et al.* 2012).

HOPX je umlčený také v proliferujících lidských keratinocytech a je indukovaný během jejich diferenciaci. V epidermis je *HOPX* výrazně exprimovaný v terminálně diferencovaných suprabazálních vrstvách. Zajímavé je, že při použití demetylačního agens 5-aza-dC není exprese *HOPX* indukována a jeho suprese tedy není pod kontrolou metylace DNA. Naproti tomu exogenní exprese *HOPX* snižuje expresi diferenciacních markerů v immortalizovaných lidských keratinocytech. V tomto případě je *HOPX* regulovaný buněčnou diferenciací, což může přispívat k homeostázi keratinocytů kontrolou genů závislých na diferenciaci (Yang *et al.* 2010). Přestože jsou keratinocyty schopné sekretovat molekuly

matrixové metaloproteázy 9 a podporovat tak invazivní charakter melanomových buněk (Van Kilsdonk et al. 2010), spojení *HOPX* s incidencí melanomů doposud není známé.

Souvislost mezi diferenciací epitelových buněk adenokarcinomu a expresí *HOPX* dokládá práce Cheunga *et al.* (Cheung et al. 2013), která prokazuje, že diferenciace buněk plicního adenokarcinomu (ADC) je regulována transkripčními faktory GATA6 a *HOPX*. Tyto faktory mohou společně inhibovat metastázování buněk ADC modulací alveolární diferenciace. V případě adenokarcinomu *HOPX* spolupracuje s GATA6. Naopak v myocytech *HOPX* inhibuje funkci transkripčního faktoru GATA4, který je exprimován srdečními progenitorovými buňkami a reguluje kardiogenezi. Při absenci *HOPX* a jeho interakčního partnera HDAC2 v myších embryích dochází k hyperacetylaci *GATA4* a následnému zvýšení proliferace srdečních myocytů, zvýšení exprese cílových genů GATA4 a perinatální letalitě. *GATA4* je zde nehistonový cíl HDAC2, která s GATA4 interaguje za pomoci faktoru *HOPX* (Trivedi et al. 2010). Dále se *HOPX* účastní epigenetických regulací prostřednictvím interakce s EPC1, který je součástí histonové acetyltransferázy NuA4 ovlivňující aktivitu vybraných genů pomocí acetylace histonů H4 a H2A (Doyon et al. 2004). EPC1 hraje roli v iniciaci diferenciace kosterního svalstva a interakce s *HOPX* je vyžadovaná pro jeho plnou aktivitu (Kee et al. 2007).

Role *HOPX* v tvorbě metastáz byla popsána u nasofaryngeálního karcinomu. *HOPX* zde byl identifikován jako nejvíce signifikantně hypometylovaný gen. Obnovení exprese *HOPX* potlačuje metastázy a zvyšuje chemosenzitivitu buněk. Tyto účinky jsou zprostředkovány epigenetickým umlčením transkripce SNAIL prostřednictvím zvýšení deacetylace histonu H3K9 v promotoru SNAIL (Ren et al. 2017).

Výše zmíněné práce prokazují roli *HOPX* jako tumor supresoru. *HOPX* však vykazuje funkční dualitu jako tumor supresor a onkogen. Jeho zvýšená exprese byla nalezena v buňkách karcinomu štítné žlázy (Pauws et al. 2004). Navíc v případě kožního spinocelulárního karcinomu vede snížená exprese *HOPX* k inhibici proliferace a invazivity prostřednictvím urychlení apoptózy. *HOPX* zde tedy působí jako onkogen prostřednictvím aktivace druhého alternativního promotoru a modulace apoptózy (Pavlova et al. 2021).

Přestože bylo studium genu *HOPX* dlouhá léta opomíjeno, posledních deset let ukázalo, že se jedná o významný regulátor genové exprese nejen za fyziologických podmínek ale také v různých typech nádorů. Z dosavadních výsledků vyplývá, že *HOPX* podporuje diferenciaci a ve většině případů inhibuje nádorovou progresi. Role *HOPX* v metastatické kaskádě zatím

byla studována pouze u nasofaryngeálního karcinomu (Ren et al. 2017). Naše práce je věnovaná zkoumání role *HOPX* v incidenci metastáz ze sarkomu na modelovém kuřecím systému. V tomto projektu se také zabýváme hledáním dalších genů asociovaných s metastázováním, které prozatím, stejně jako kdysi *HOPX*, unikly pozornosti na poli výzkumu nádorové progresi.

3.3. Proces replikace HIV-1 a možnosti terapie

3.3.1. HIV-1 a jeho interakce s CD4⁺ T-lymfocyty

HIV-1 primárně infikuje CD4⁺ T-lymfocyty, což vede k jejich depleci, deregulaci imunitního systému a imunitní deficienci. Virus HIV-1 se váže na receptor CD4 a koreceptory CCR5 nebo CXCR4 na buněčné membráně CD4⁺ T-lymfocytů a fúzí s membránou do nich vstupuje. Genomová RNA HIV je následně reverzně transkribována za vzniku dvouřetězcového DNA proviru, který je hlavní komponentou preintegračního komplexu (PIC). PIC vstupuje do jádra, kde se integruje do hostitelského genomu. Integrovaná provirová forma je obklopena dvěma dlouhými terminálními repeticemi (LTR), které vznikly během reverzní transkripce a jsou nezbytné pro virovou replikaci (Hu and Hughes 2012).

Provirus HIV se chová jako buněčný gen, má svůj vlastní promotor situovaný v 5'LTR a je bohatý na responsivní elementy obsahující vazebná místa řady buněčných transkripčních faktorů. 3'LTR zajišťuje polyadenylaci virové mRNA a její napodobování buněčných transkriptů (Wilusz 2013). 5'LTR HIV-1 řídí expresi integrovaného proviru za pomoci hostitelské transkripční mašinerie a transaktivačního proteinu Tat kódovaného virem HIV-1. V počátečních fázích ale dochází k abortivní transkripci v přítomnosti neprocesivní RNA Pol II na promotorové oblasti a až po importování Tat zpět do jádra nastává transkripce virové mRNA a genomové RNA. Virové proteiny jsou pak translatované z virové mRNA a v kombinaci s genomovou RNA vytvářejí nové virové partikule, které pučí z infikované buňky a maturují. Maturovaný virus může dále vázat a infikovat nové CD4⁺ buňky (Buchbinder 1990).

Expresi proviru HIV-1 ovlivňuje dostupnost transkripčních faktorů v hostitelské buňce, ale také epigenetické mechanismy, včetně vlastností integračního místa.

3.3.2. Epigenetické mechanismy regulující latenci provirů HIV-1

Epigenetickým regulacím nepodléhají pouze buněčné geny či endogenní retrovirové sekvence ale také exogenní viry, což je jeden z mechanismů antivirové imunitní odpovědi. Nicméně některé viry mohou využít epigenetického umlčení k vytvoření perzistentní infekce. Umlčení virové exprese chrání jednotlivé buňky před lytickou virovou replikací, ale nemusí vést k jednoznačnému vítězství hostitele. Ustanovení latence může virům umožnit dlouhodobou perzistentci, kdy unikají hostitelské adaptivní imunitní odpovědi, a později i návrat k lytickému replikačnímu cyklu. To je i případ latentní infekce paměťových T-lymfocytů virem HIV-1 nebo neuronů virem HSV-1 a B-lymfocytů virem Epstein-Barr (EBV). Každý z těchto příkladů latentní infekce je asociován s přidáním represivní epigenetické modifikace H3K9 me3 a H3K27 me3 a s nízkým množstvím aktivujících histonových modifikací (Lieberman 2016).

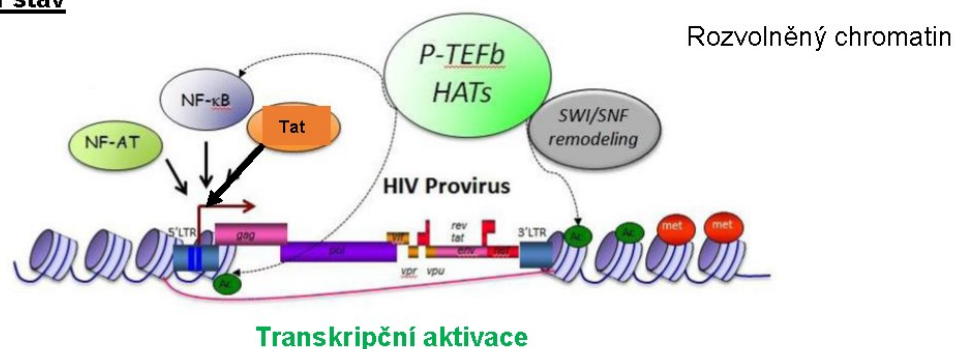
Navzdory účinnosti ART, která snižuje replikaci HIV-1 a redukuje mortalitu v důsledku infekce HIV-1, může virem ustanovená latentní infekce vést k rezistenci k ART (Finzi et al. 1999). Latence je ustanovena časně během akutní infekce, pravděpodobně během několika dní po počáteční nákaze. Velmi stabilní latentní rezervoár HIV-1 představují klidové paměťové CD4⁺ T-lymfocyty. Tento rezervoár vzniká pravděpodobně infekcí částečně aktivovaných CD4⁺ T-lymfocytů, které se vrací do klidového paměťového stavu (Chun et al. 1997; Zhou et al. 2005). V tomto stavu s kompaktním genomem je provirus HIV-1 také umlčen. Transkripce takových replikačně kompetentních latentních provirů HIV-1 perzistujících v genomech velmi malé podmnožiny klidových paměťových T-lymfocytů je inhibována (Chun et al. 1997; Ho et al. 1995). Studie dokládají, že poločas života této populace buněk je 3,7 let. Tudíž populace 1 miliónu latentně infikovaných buněk by přirozeně zanikla během 73,4 let (Siliciano et al. 2003).

Aktivitu provirové exprese do značné míry ovlivňuje integrační místo. Na modelu ptačího sarkomového a leukózy viru (ASLV) bylo prokázáno, že integrace vzdálené od promotorových oblastí genů a tedy i oblastí bohatých na aktivační chromatinovou modifikaci H3K4 me3 vedou k efektivnímu umlčení proviru oproti provirům integrovaným v promotorových oblastech genů (Senigl, Auxt, and Hejnar 2012). Ve studii integračních míst HIV-1 bylo prokázáno, že mezi 2 969 integračními místy HIV-1 došlo k 8 nezávislým integračním událostem do genu *DNMT1* (Bushman et al. 2005). Není jasné, zda tento gen a s ním i několik jiných s vícečetnou integrací HIV-1 mají zvláštní vlastnosti, nebo zda se

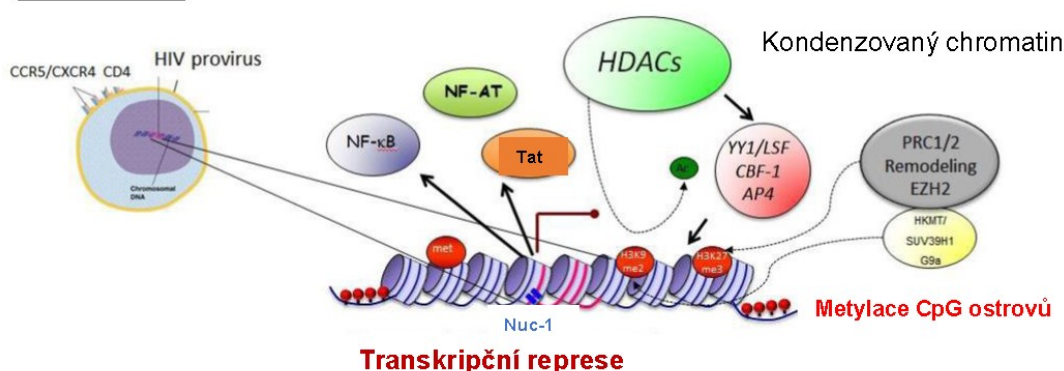
nacházejí na okraji Gaussovy distribuce. Dosud publikované analýzy neuvádí, že by byla některá funkční třída genů upřednostňována pro integraci HIV-1 (Bushman et al. 2005; Schroder et al. 2002), ale předpokládá se, že HIV-1 je do genomu integrován nenáhodně. Preintegrační komplex je cílen do regionů aktivní transkripce asociací virové integrázy s transkripčním koaktivátorem LEDGF/p75 nebo HRP-2 (Ciuffi et al. 2005; Schrijvers et al. 2012). LEDGF/p75 interaguje s integrázou HIV-1 a také s histonovou modifikací H3K36 me3, jež značí aktivně transkribované geny. Následuje jasný výběr místa integrace v intronech aktivně transkribovaných genů obohacených o kanonické aktivační modifikace, jako je již výše zmíněná H3K36 me3 (Eidahl et al. 2013).

Latentní infekce je také ovlivněna rovnováhou mezi vazbou a aktivitou transkripčních faktorů rozeznávajících několik konsenzuálních vazebných míst na promotoru HIV-1, která může vést k produktivní infekci nebo virové latenci (Ruelas and Greene 2013). V klidových paměťových T-lymfocytech jsou aktivátory jako NF- κ B a NFAT přítomné v cytoplazmě a nemohou tak transkripci HIV-1 aktivovat. Po aktivaci T-lymfocytů je řada transkripčních faktorů směřována z cytoplazmy do jádra (Donahue and Wainberg 2013; Pan et al. 2007) (Obr. 6.). Také bylo prokázáno že HIV-1 může být aktivován nezávisle na NF- κ B transkripčním faktorem Δ VII-Ets-1 aniž by došlo k aktivaci T-lymfocytů (Yang, Shen, et al. 2009). Další studie ukazuje, že proteiny Lck a NFAT jsou vyžadovány pro optimální reaktivaci latentního proviru v primárních paměťových T-lymfocytech (Bosque and Planelles 2009). Po vazbě aktivačních transkripčních faktorů na promotor HIV-1 hraje významnou úlohu virový transaktivační protein Tat, který stimuluje elongační fázi, při níž dochází k syntéze plnodélkových transkriptů oproti iniciační fázi, kdy jsou transkripty krátké a předčasně terminované v důsledku vazby negativních elongačních faktorů (Mbonye and Karn 2014; Yamaguchi, Shibata, and Handa 2013). Na základě pozitivní zpětné vazby může docházet k vysoké míře provirové exprese v případě vysoké hladiny Tat nebo ke klidové latenci, je-li nízká hladina Tat (Razooky and Weinberger 2011). Pokud je Tat exprimován, váže se na transaktivační reakční element (TAR) v 5'LTR nascentní RNA a podporuje vazbu elongačního komplexu na transkripty HIV-1, jehož hlavní komponentou je pozitivní elongační komplex (P-TEFb) složený z cyklinu T1 a cyklin-dependentní kinázy 9 (CDK9). CDK9 fosforyluje negativní elongační faktory a koncovou doménu RNA polymerázy II, což vede k disociaci těchto faktorů a zvýšení procesivity polymerázy (Kim et al. 2002). Tat dále podporuje transkripci vazbou ostatních transkripčních koaktivátorů, jako jsou acetyl transferázy a ATP-dependentní komplex remodelující chromatin (Sobhian et al. 2010). Výsledkem je vysoká intenzita tvorby plnodélkových transkriptů HIV-1 (Obr. 6.).

Aktivní stav



Latentní stav



Obr. 6. Schematické znázornění aktivního a latentního stavu proviru HIV-1. Upraveno dle (Taube and Peterlin 2013)

Kromě místa integrace a přítomnosti aktivačních transkripčních faktorů je transkripce HIV-1 ovlivněna také chromatinovou strukturou. Bylo prokázáno, že v distálním enhanceru HIV-1 se nachází nukleozóm Nuc-0 a na transkripčním počátku HIV-1 nukleozóm Nuc-1, jehož posunutí je nezbytné pro procesivní transkripci (Verdin 1991; Verdin, Paras, and Van Lint 1993) (Obr. 6.). Během represivního stavu tato organizace nukleotidů blokuje tvorbu transkripčního preiniciačního komplexu. K přestavbě Nuc-1 dochází při aktivaci T-lymfocytů za pomoci histonových chaperonů závislých na ATP. Zajímavé je, že umístění těchto dvou nukleozómů je pravděpodobně aktivní a vysoce konzervovaný proces, který si zachovává každý provirus v unikátním integračním místě za pomoci remodelačního komplexu BAF, který aktivně umísťuje Nuc-1 do místa transkripčního startu. Při absenci BAF je Nuc-1 přednostně umístěn v alternativní pozici na promotoru v místě vazebných míst pro transkripční faktory NF-κB a NFAT, což vede ke zvýšené bazální transkripci (Rafati et al. 2011).

Metylace CpG na promotoru HIV-1 je dalším mechanismem zodpovědným za potlačení provirové transkripce prostřednictvím inhibice vazby transkripčních faktorů na cílových místech DNA (Obr. 6.). Methylace DNA promotoru nebo enhanceru se pravděpodobně neúčastní ustavení latence, ale má zásadní roli v udržení latentního stavu (Pion et al. 2003; Blazkova et al. 2009; Kauder et al. 2009). Methylace retrovirového promotoru a enhancerových sekvencí v 5'LTR koreluje s umlčením různých infekčních i endogenních retrovirů, jak bylo ukázáno u viru Rousova sarkomu (Hejnar et al. 1999; Hejnar et al. 2001) nebo lidských endogenních retrovirů z rodiny H, K a W (Lavie et al. 2005; Matouskova et al. 2006). V naší dřívější studii (Blazkova et al. 2009) o vlivu methylace DNA v CD4⁺ T-lymfocytech pacientů léčených ART bylo prokázáno, že frekvence methylace promotoru v izolovaných klidových buňkách stoupá u pacientů s nižší virémií, naopak pacienti s vysokou virémií mají často hypometylovaný promotor HIV-1, což naznačuje, že methylace DNA slouží jako transkripční bariéra. Methylace promotoru HIV-1 je však vzácná událost a význam její změny na latenci HIV-1 zůstává nejasný. V naší studii jsme pozorovali, že pacienti dlouhodobě léčení ART vykazují akumulaci methylace DNA v latentním rezervoáru a dokonce u některých pacientů byly detekované velmi hustě metylované molekuly proviru. Navíc po tranzientní stimulaci modelových CD4⁺ T-buněk (Jurkat) pomocí mitogenního forbol 12-myristát 13-acetátu (PMA) a tumor nekrotického faktoru α (TNF- α) došlo k nárůstu methylace promotoru HIV-1 také *in vitro* (Trejbalova et al. 2016). V jiné studii byl Metyl-CpG vazebný protein MBD2 identifikován jako transkripční represor účastnící se latence HIV-1. MBD2 je asociovaný s CpG ostrovy a potlačuje transkripci HIV-1 prostřednictvím nukleozóm remodelujícího deacetylázového komplexu. Inhibice DNA methylace pomocí 5-aza-dC snížila represi transkripce a bránila vazbě MBD2 a HDAC za výrazného zvýšení exprese virových genů (Kauder et al. 2009).

Je-li latence jednou ustanovena, je poměrně obtížné opět transkripci HIV-1 aktivovat. Předpokládá se, že infikované buňky, ve kterých byl virus reaktivován, budou zničeny imunitní odpovědí nebo cytopatickým efektem viru zatímco ART potlačí nové kolo infekce buněk. Pilotní studie, během které bylo 11 pacientům podávána kyselina valproová inhibující HDAC s cílem rozvolnit chromatinovou strukturu, sice vedla k detekci virových transkriptů ze zjevně latentně infikovaných buněk, ale žádný signifikantní pokles velikosti rezervoáru HIV-1 pozorován nebyl (Sagot-Lerolle et al. 2008). Existují debaty jestli virové transkripty reprezentují transkripty regulované endogenním promotorem HIV nebo jestli se jedná o transkripty pročtené z promotoru hostitelského genu, kam se HIV integroval (Bullen et al. 2014). V tomto projektu se na modelových buňkách nesoucích provirus odvozený od HIV-1

blíže zabýváme vlivem modulace exprese vybraných genů a různých agens na reaktivaci latentního proviru, které by mohly v budoucnu v kombinaci s ART přispět k eradikaci HIV-1 z organismu.

3.3.3. Antiretrovirová terapie (ART)

ART infekce HIV-1 musí překonat dvě hlavní překážky. Zaprvé vysokou míru mutace viru, která umožňuje vznik variant rezistentních k ART (Folks 1994). Zadruhé je to nemožnost úplné eradikace viru z těla ani po dlouhodobé léčbě. ART je do značné míry schopna vypořádat se s variabilitou viru tím, že současně cílí na několik klíčových kroků virového replikačního cyklu (Folks 1994). Používané inhibitory reverzní transkriptázy se inkorporují do nascentní virové DNA, což vede k terminaci DNA a inhibici jejího dalšího prodlužování nebo jsou schopny zastavit virovou replikaci vazbou na hydrofobní kapsu podjednotky reverzní transkriptázy a bránit jí tak v konverzi virové RNA na DNA (D'Cruz and Uckun 2006). Vysoká chybovost reverzní transkriptázy a vysoká hladina replikace HIV-1 často vede k rezistenci k těmto inhibitorům (D'Cruz and Uckun 2006; Ren et al. 1995). Další inhibitory jsou cílené proti virové integráze, která katalyzuje procesování 3' konce a přenos řetězce. Během procesování odstraní integráza dinukleotid z 3' konce virové cDNA, která je následně kovalentně navázána na hostitelskou DNA. Tento unikátní proces je považován za významný cíl terapie. Inhibitory integráz mohou být peptidy, nukleotidy, komplexy DNA, stejně jako malé molekuly odvozené z přírodních produktů (Gupta and Nagappa 2003; Maurin, Bailly, and Cotelle 2003; de Soultrait, Desjobert, and Tarrago-Litvak 2003). Dalšími používanými inhibitory jsou inhibitory proteáz, které kompetitivně inhibují proteázu HIV-1 a jsou aktivní během akutní i chronické infekce. HIV-1 obsahuje tři hlavní geny, *gag*, *pol* a *env*. Geny *gag* a *env* kódují proteiny nukleokapsidy a glykoproteiny virové membrány, gen *pol* kóduje mimo jiné tři esenciální enzymy, reverzní transkriptázu, integrázu a proteázu. *gag* a *pol* jsou translatovány jako dlouhý polypeptidový prekurzor, který musí být štěpen ve specifických místech za vzniku funkčních proteinů. Proteáza HIV-1 je zodpovědná právě za štěpení polyproteinu *gag-pol*. Tento klíčový krok v maturaci HIV-1 se děje v konečné fázi životního cyklu HIV, kdy viriony pučí z hostitelské buňky. Inhibice proteázy HIV vede k uvolňování nematurovaných neinfekčních partikulí (Tomasselli and Heinrikson 2000; Wensing, van Maarseveen, and Nijhuis 2010).

Nemožnost eradikace integrovaného HIV-1 z těla je podmíněna latentním stavem proviru. Stále není jasné, jaký rezervoár je zodpovědný za návrat virémie, tzv. rebound, během

přerušeni léčby *in vivo* (Barton, Winckelmann, and Palmer 2016). Zdroj rebound virémie může pocházet z několika buněčných a anatomických kompartmentů a pravděpodobně neexistuje jejich žádný preferenční zdroj (De Scheerder et al. 2019). Vyvíjejí se nové terapie k trvalému vyléčení infekce HIV. Mnoho z nich má za cíl snížit množství latentního viru, který přetrvává i po několikaleté léčbě antiretrovirovými léky. Testované přístupy, které se pokoušejí o reaktivaci latentních virových kopií, prozatím nebyly úspěšné. Nejčastěji používaným činidlem pro reaktivaci je HDACi Vorinostat. Klinické studie se také pokoušejí kombinovat různé přístupy, například reaktivaci latence a podání široce neutralizačních protilátek proti HIV-1 (Gao et al. 2021). Klíčovým problémem je zřejmě neúčinná reaktivace významné části latentních provirů a prozatím žádná z těchto studií úspěšná nebyla. Doživotní užívání ART tak zůstává jediným léčebným prostředkem. Vzhledem k tomu, že latentní virus je obtížné detekovat, často jediným způsobem, jak zjistit, zda tyto nové terapie zafungovaly, je přerušit veškerou léčbu a čekat, zda se infekce obnoví. Pokud nastane rebound viru, který není po dlouhou dobu detekován, může být rezervoár opět rozšiřován. Předpokládá se, že rozsah tohoto opětovného výsevu závisí na celkovém počtu nově infikovaných buněk během doby, kdy není rebound detekován (Hill et al. 2016).

Několik případů, kdy téměř došlo k vyléčení infekce virem HIV-1, dokládá problém s eradikací rezervoáru HIV-1. Dva jedinci známí jako „Bostonští pacienti“ podstoupili transplantaci hematopoetických kmenových buněk, zatímco zůstali na ART. To vedlo ke snížení rezervoáru o >2 -log. Po přerušeni ART došlo k návratu virémie po 3 a 8 měsících. Snížení rezervoáru tedy oddálilo rebound (normálně 2 týdny) (Henrich et al. 2014). Dlouhá remise bez ART pozorovaná u těchto HIV+ jedinců může být vysvětlena perzistencí nereplikující se formy viru v malém počtu latentně infikovaných buněk (Sengupta and Siliciano 2018).

HIV pozitivní pacienti podstupující dlouhodobou ART mohou akumulovat klony s identickým integračním místem. Tyto klonálně expandované buňky, které se objeví během několika týdnů po infekci, mohou být důležitou součástí rezervoáru, jelikož některé klony dokáží perzistovat roky a navíc malá frakce klonů nese replikačně kompetentní virus (Coffin et al. 2019). Wagner *et al.* ve studii s 534 integračními místy odvozenými od tří pacientů podstupujících ART po dobu 11,3 – 12,7 let ukázali, že každý pacient měl identické virové sekvence integrované ve stejné pozici v mnoha buňkách, což prokazuje klonální proliferaci infikovaných buněk. Integrace byly z větší části přítomné ve známých genech asociovaných s nádory s preferencí 12 genů nalezených u různých pacientů. 12,5% unikátních genů ze všech provirových integrací byly anotované jako asociované s nádory v porovnání s pouhými 5,19%

„ostatních“ lidských genů v genomu. Navíc unikátní integrace v poliferujících infikovaných buňkách byly preferenčně cíleny do genů asociovaných s nádory, což naznačuje, že integrace HIV-1 může poškodit regulaci genů buněčného cyklu (Wagner et al. 2014), tak jak je známo během indukce nádorů neakutními onkogenními retroviry (Fan and Johnson 2011). Výsledky byly potvrzeny i *in vitro* u akutně infikovaných CD4⁺ T-lymfocytů linie Jurkat, které vykazovaly unikátní integraci v intronech genů v 80% případů a 11,14% unikátních integrací bylo právě v genech asociovaných s nádory. Frekvence proliferujících buněk byla významně zvýšena během času na ART, aniž by se zvyšovala míra unikátní integrace do nádorových genů, což naznačuje, že se HIV-1 přednostně integruje do genů asociovaných s nádory včetně genů podporujících buněčnou proliferaci (Chomont et al. 2009; Wagner et al. 2014). Ve stejném roce byla publikována práce analyzující integrační místa pacientů podstupujících ART po dobu 11 let. 43% integrací bylo zastoupeno více než jednou ($p=0,02$), což dokládá, že velká frakce infikovaných buněk pochází z expandovaných klonů. Navíc 70% genů s vícečetnou integrací ve vysoce expandovaných kloněch regulují buněčný růst a mitózu. Některé z těchto klonů byly v pacientovi přítomny až 11 let. Tyto klony byly díky dlouhému času na ART odhaleny, ale ART k jejich vzniku nepřispívá (Maldarelli et al. 2014). Rostoucí nadměrné zastoupení proliferujících buněk obsahujících proviry napovídá, že integrace HIV-1 hraje mechanistickou roli v přežívání infikovaných buněk během ART a může podporovat proliferaci a perzistenci infikovaných buněk při absenci virové replikace (Obr. 2.5.) (Wagner et al. 2014) .

Přestože se současná terapie orientuje zejména na dlouho žijící paměťové CD4⁺ buňky, dormantní HIV provirus sídlí i v jiných buněčných typech a představuje zásadní překážku úplného vyléčení. Epigenetická charakteristika různých hostitelských buněk infikovaných HIV a mechanismy latence jsou tedy významnou oblastí výzkumu, který by usnadnil vývoj léčiv specifických pro daný buněčný typ (Ay et al. 2013).

4 Materiál a metody

4.1. Zvířecí model

Všechny experimenty *in vivo* byly provedeny na pražských inbredních kuřatech linie CC.R1 (*Gallus gallus*), která je progresorem tumorigeneze indukované *v-src* a neobsahuje ptačí infekční leukózní viry. Postupy byly prováděny v souladu s vyhláškou (č207/2004sb.) o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat, podle projektu pokusu schváleného rezortní komisí Akademie věd České republiky. Kuřata byla chována za standardních laboratorních podmínek s volným přístupem k potravě a vodě.

4.2. Kuřecí buněčné kultury

Metastatická buněčná linie PR9692, její nemetastatický subklon PR9692-E9 a z nich odvozené buněčné linie byly izolovány, jak bylo popsáno dříve (Cermak et al. 2010). Obě linie jsou citlivé k infekci retroviru podskupiny C, ale rezistentní k infekci retroviru podskupiny A. Kultivace buněk probíhala v IMDM mediu (Iscove's modified Dulbecco's minimal essential medium, Gibco) s přidáním 8% fetálního telecího séra, 2% kuřecího séra, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu ve 40 °C v atmosféře s 95% vzduchu a 5% CO₂. Buňky PR9692-shHOPX, PR9692-shLSP1, PR9692-shAQP1, PR9692-shUPP1 a PR9692-shITGA4 byly odvozeny z buněk PR9692 transfekcí buněk v kultuře plazmidy pDNA3shHOPX, pDNA3shLSP1, pDNA3shAQP1, pDNA3shUPP1 a pDNA3shITGA4 s použitím transfekčního činidla FuGENE HD Transfection reagent (Promega, Madison, WI) dle instrukcí výrobce. Buňky byly selektovány 2 týdny pomocí G418 (500ug/ml). Transfekce vektoru pDNA3shMOCK byla použita k přípravě kontrolní buněčné linie PR9692-shMOCK obdobným způsobem. Buňky PR9692-E9-HOPX byly odvozeny z buněk PR9692-E9 infekcí buněk v kultuře pseudotypovanými retrovirovými partikulami, které byly připraveny transfekcí pakážívacích buněk AviPack (Plachy et al. 2010) plazmidem pSFCV-HOPX. Transfekce byla provedena s použitím transfekčního činidla X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) podle instrukcí výrobce.

4.3. Lidské buněčné kultury

Buněčná linie H12 popsána již dříve (Jordan, Defechereux, and Verdin 2001) byla poskytnuta E. Verdinem. Buněčná linie 2D12 byla připravena stimulací buněk H12 pomocí PMA

a TNF- α následovanou tříděním jednotlivých buněk negativních na EGFP a klonální selekcí (Blazkova et al. 2009).

Buňky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 obsahující 2 mM L-Glutamin (Sigma-Aldrich) s přidavkem 10% fetálního telecího séra, 100 U/ml penicilinu a 100 μ g/ml streptomycinu ve 37 °C v atmosféře s 95% vzduchu a 5% CO₂. Pro reaktivaci proviru HIV-1 byly buňky kultivovány s 10 nM PMA (Sigma-Aldrich) a 10 ng/ml TNF- α (Sigma-Aldrich) nebo 1 μ M oxidem arsenitým (As₂O₃) po dobu 24 hodin.

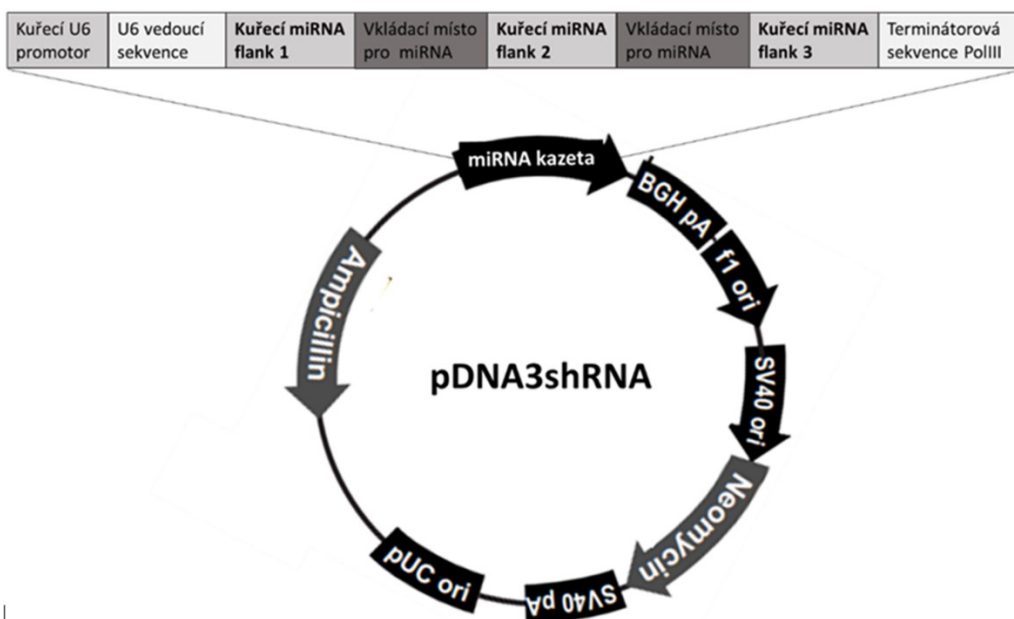
Choriokarcinomové buňky BeWo byly kultivovány v DMEM/F-12 médiu (Sigma-Aldrich) s přidavkem 1% NaHCO₃, 10% fetálního telecího séra, 100 U/ml penicilinu a 100 μ g/ml streptomycinu ve 37 °C v atmosféře s 95% vzduchu a 5% CO₂.

4.4. Lidské vzorky tkání

Testikulární vzorky pochází od pacientů, kteří byli chirurgicky léčeni na Oddělení Urologie, Univerzitní nemocnice Královské Vinohrady, 3. Lékařské Fakulty Univerzity Karlovy v letech 2011-2015. Studie byla schválena etickou komisí Univerzitní nemocnice Královské Vinohrady (Referenční číslo EK-VP/06/2012). Histologická klasifikace byla provedena dle klasifikace WHO (Moch et al. 2016).

4.5. Konstrukty DNA

Vektor pDNA3shRNA byl připraven vyjmutím cytomegalovirového promotoru (CMV) z komerčního vektoru pcDNA3 (Invitrogen) za pomoci restrikčního enzymu SpeI a vložení expresní kazety miRNA o plné délce (Obr. 7.) (Das et al. 2006) s využitím restrikčních míst HindIII a BamHI. Kazeta obsahuje kuřecí promotor RNA pol. III a sekvence odvozené od kuřecí miRNA, vlásenka je odvozená od lidské miRNA-30. Vektor pSFCV-HOPX byl konstruován vložení celé kuřecí cDNA *HOPX* mezi restrikční místa HindIII a EcoRI do vektoru pSFCV (Fuerstenberg and Vennstrom 1993).



Obr. 7. Schéma vektoru pDNA3shRNA. Upraveno podle (Das et al. 2006).

Pro výběr sekvencí anti-*HOPX*, anti-*LSP1*, anti-*AQP1*, anti-*Upp1*, a anti-*ITGA4* byla sekvence genu *HOPX*, *LSP1*, *AQP1*, *UPP1* a *ITGA4* analyzována za pomoci internetového vyhledávacího programu „siRNA-design tool“ (<http://www.genscript.com>).

Ke konstrukci expresních plazmidů s anti-*HOPX*, anti-*LSP1*, anti-*AQP1*, anti-*UPP1* a anti-*ITGA4* shRNA (pDNA3-shHOPX, pDNA3-shLSP1, pDNA3-shAQP1, pDNA3-shUPP1, pDNA3-shITGA4) a kontrolního vektoru (pDNA3-shMOCK) byly použity oligonukleotidy pro syntézu krátké vlásenky RNA (shRNA), „Vlásenka 5“ a „Vlásenka 3“ (Das et al. 2006). Stručně, vlásenka odvozená od miRNA-30 a sekvence kuřecí miRNA byly generovány pomocí PCR z použitím specifických párů primerů (shHOPX, shLSP1, shAQP1, shUPP1, shITGA4 a shMOCK) a obecných primerů Vlášenska 5 a Vlášenska 3. Všechny konstrukty byly ověřeny sekvenováním. Po štěpení restriktázami *NheI* a *MluI* byl produkt PCR ligován do vektoru pDNA3shRNA štěpeného stejnými enzymy. Sekvence všech použitých oligonukleotidů jsou uvedeny v Tabulce 1 v kapitole 4.19.

Vektor pcDNA3Tat byl konstruován vložením celé sekvence cDNA virového proteinu Tat syntetizovanou dle provirové sekvence v chromozomální DNA buněk H12 s použitím restriktčních míst *EcoRI* a *EcoRV*.

4.6. Transfekce siRNA a vektoru do buněk H12 nebo 2D12

Specifické ON-TARGETplus SMARTpool siRNA proti genům *DNMT1*, *DNMT3B*, *HDAC1* a *HDAC2* společně s negativní kontrolou, ON-TARGETplus Non-targeting siRNA, byly pořízeny od Dharmaconu (GE Healthcare Life Sciences). Pro transfekci siRNA bylo použito transfekční činidlo Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies). 6×10^5 buněk 2D12 bylo vyseto na jamku šesti-jamkové destičky a smícháno s siRNA komplexem složeným z 90 pmol specifické siRNA SMARTpool nebo kontrolní siRNA (siCTRL) a transfekčního činidla. Tři nebo šest dní po transfekci byly buňky sesbírány pro analýzu efektivity RNA interference (RNAi) pomocí Western blotu nebo qRT-PCR nebo pro stimulaci buněk pomocí PMA a TNF- α a izolaci DNA. Transfekční účinnost 40% byla určena pomocí transfekce fluorescenčně značených oligonukleotidů FITC-labeled BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo (Invitrogen) a transfekčního činidla Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) a naměřena na průtokovém cytometru LSRII (BD Biosciences).

Transfekce vektoru pcDNA3Tat byla provedena s použitím transfekčního činidla X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) podle instrukcí výrobce.

4.7. Analýza růstu primárního nádoru a metastáz v kuřecím modelu

Kuřata byla inokulována injekcí do vnější oblasti prsního svalu ve věku 6 týdnů s použitím 10^4 nádorových buněk (nebo 10^5 buněk PR9692-shHOPX), které byly odebrány přímo z buněčné kultury a resuspendovány v 0,2 ml kultivačního média. Plocha primárního nádoru vytvořeného v prsním svalu byla měřena přiložením transparentního papíru a zakreslením obrysů nádoru. Obrys byl pak přenesen na milimetrový papír a byla spočítána plocha nádoru (mm^2) (Svoboda et al. 1992). Spontánní metastatická aktivita každého nádoru byla stanovena pitvou kuřat 20 – 49 dní po inokulaci. Metastázy byly analyzovány makroskopicky a s použitím disekčního mikroskopu. Pokusy byly zopakovány třikrát o celkovém počtu asi 40 kuřat v každé skupině s výjimkou skupiny PR9692-shMOCK, kde byly počty kuřat sníženy.

4.8. Kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR)

Celková RNA byla izolována z asi 10^6 buněk s použitím RNeasy RLT (Qiagen, Crawley, UK) a RNeasy spin columns (Qiagen, Crawley, UK). 1 μg celkové RNA byl reverzně transkribován pomocí náhodných hexamerů (Promega, Madison, WI) a M-MLV reverzní transkriptázy (Promega, Madison, WI)

v případě kuřecí RNA a ProtoscriptII reverzní transkriptázy (New England BioLabs) pro lidské RNA. Genová exprese byla měřena qRT-PCR pomocí MESA GREEN qPCR Master Mix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) na přístroji C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad). Každý vzorek byl připraven v triplicátu a každá buněčná linie reprezentuje tři nezávislé biologické vzorky. Sekvence primerů jsou součástí Tabulky 1, kapitola 4.19. Signály byly normalizovány na odpovídající kontrolní GAPDH v případě kuřecích genů a na podjednotku α RNA polymerázy II (RP II) pro lidské geny. Data byla analyzována pomocí CFX Manager software version 3.1. (Bio-Rad) a Excel (Microsoft). Relativní zastoupení mRNA ve vzorku bylo odhadnuto pomocí hodnoty $E^{AC(t)}$. Významnost rozdílu byla stanovena Welchovým t testem pro páry PR9692 vs. PR9692-E9 a PR9692-shMOCK vs. PR9692-shHOPX, v ostatních případech byl použit Studentův t test.

4.9. Bisulfitová analýza metylace cytosinu

Bisulfitové ošetření DNA zajišťuje konverzi nemodifikovaných cytosinů (C) na uracil (U). DNA byla izolována fenol-chloroformovou extrakcí s přidáním Proteinázy K a RNAázy A následovanou etanolovou precipitací. 2 μ g genomové DNA byly použity pro bisulfitovou konverzi pomocí EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) v případě promotoru *HOPX* a pomocí Plus DNA Bisulfite Kit (Qiagen Inc.) v případě promotoru proviru HIV-1. Bisulfitovaná DNA byla amplifikována pomocí semi-nested PCR specifické pro promotorovou oblast *HOPX* nebo nested PCR specifické pro 5' LTR HIV-1 v 50 μ l reakčního mixu. První kolo PCR proběhlo se 120 ng genomové DNA, 2 μ l z prvního kola byly použity pro kolo druhé. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 1, kapitola 4.19.

Pozitivní primery (sense) obsahují T a negativní primery (antisense) obsahují A místo C v pozici komplementární k nemetylovanému C (tedy C mimo dinukleotid CpG). Takovýto výběr primerů zajišťuje jejich specifitu vůči konvertované DNA. Pomocí agarózové elektroforézy jsme ověřili, že nekonvertovaná DNA nevede k produkci proužků na elektroforéze. Provedeny byly nejméně tři první kola PCR pro každý vzorek, abychom se vyvarovali amplifikace jedné templátové molekuly. Několik netemplátových kontrol bylo zahrnuto do každé bisulfitové reakce PCR. Amplifikované produkty byly klonovány do vektoru pGEM-T-EasyVector System (Promega, Madison, WI) a sekvenovány. Analýza proběhla s použitím softwaru Quma (Quantification tool for Methylation Analysis, <http://quma.cdb.riken.jp/>). V úvahu byly vzaty pouze klony s nejméně 95% konverzí cytosinů mimo CpG. Pokud bylo získáno více konvertovaných molekul s identickou sekvencí, pouze jedna z nich byla použita pro kalkulaci

procentuálního zastoupení metylovaných CpG, aby se minimalizovalo zkreslení pocházející z preferenční amplifikace jedné molekuly.

4.10. Oxidativní bisulfitová analýza hydroxymethylace cytosinu

Bisulfitová metoda nedokáže rozlišit mezi 5-mC a 5-hmC a obě varianty ponechává jako cytosiny (C) zatímco nemodifikované cytosiny konvertuje na uracily (U). Naopak oxidativní ošetření DNA zajišťuje konverzi 5-hmC na 5-fC a následné bisulfitové ošetření konvertuje 5-fC a nemodifikované C na U. Pouze 5-mC jsou zachovány jako nekonvertované C. Pro analýzu 5-hmC je tedy nutné provést bisulfitové sekvenování samostatně a také v kombinaci s oxidativním ošetřením a porovnat získané sekvence.

1 µg genomové DNA byl použit pro bisulfitovou konverzi nebo oxidativní ošetření a následnou bisulfitovou konverzi pomocí TrueMethyl Seq kit (CEGX, Cambridge Epigenetix) dle přiloženého protokolu. Bisulfitem ošetřená DNA byla amplifikována pomocí PCR specifické pro 5' LTR *ERVWE1* v 50 µl reakčního mixu za použití primerů ERVWE1-BIS-FW a ERVWE1-BIS-RV (Tabulka 1). Jedna 50 µl reakce obsahovala: 2 µl bisulfitovaný/oxidativní bisulfitovaný produkt, 2,5 mM MgCl₂, 2µg HotStart-IT Binding Protein (Affymetrix), 0,32 µM primery, 2U Platinum Taq polymerase (ThermoFisher Scientific) a 0,2mM dNTP (Promega).

Účinnost oxidace 5-hmC na 5-fC byla kontrolována pomocí syntetické próby obsahující 5-hmC. Odpovídající oblast promotoru *ERVWE1* byla amplifikovaná pomocí PCR z genomové DNA s použitím mixu dNTP, kde byly dCTP nahrazeny dhmCTP (sekvence primerů ERVWE1-nonBIS-FW a ERVWE1-nonBIS-RV jsou součástí Tabulky 1, kapitola 4.19. Amplifikovaný produkt dlouhý 538bp obsahující 155 5-hmC byl izolovaný z agarózového gelu a 100ng fragmentu bylo ošetřeno oxidativní bisulfitovou metodou dle návodu TrueMethyl Seq kit (CEGX, Cambridge Epigenetix). Následně byla provedena PCR s použitím primerů ERVWE1-BIS-FW a RV (Tabulka 1, kapitola 4.19.). Produkty amplifikace ze tří PCR byly vloženy do vektoru pGEM-T-Easy a sekvenovány. Analýza proběhla s použitím softwaru Quma a v úvahu byly vzaty všechny klony bez ohledu na míru konverze C. Celková míra konverze 5-hmC na U byla v jednotlivých molekulách 97,9 až 99,3% což dokazuje efektivní oxidaci.

4.11. Mikročipová analýza a zpracování dat

Celková RNA ze tří nezávislých buněčných kultur (izolovaných, jak bylo popsáno výše) byla značena podle technického manuálu Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix,

2001): 5 µg celkové RNA bylo použito k syntéze cDNA reverzní transkripcí s použitím oligo(dT) primerů značených sekvencí promotoru polymerázy T7. cDNA byla amplifikována pomocí RNA polymerázy T7 za vzniku antisense cRNA značené inkorporovanými biotinylovanými nukleotidy. 20 µg této cRNA bylo fragmentováno a hybridizováno na Affymetrix GeneChip Chicken Genome Array ve 45 °C po 16 hodin. Následně byly čipy barveny pomocí Affymetrix Fluidics Station 450. Signál byl změřen naskenováním s použitím Affymetrix GeneChip Scanner 3000. Data byla zpracována pomocí Partek Genomics Suite (Partek Inc.) s použitím normalizace algoritmem GC-RMA (Irizarry et al. 2003). Kritéria výběru diferenciálně exprimovaných genů byla stanovena na dvojnásobný rozdíl v expresi hodnotou $P < 0,05$. Barevná škála zobrazující normalizovanou intenzitu signálu byla vytvořena v programu Microsoft Excel 2007. Nastavené anotace sondy byly ručně upraveny a data byla uložena do databáze GEO (GEO ID: GSE42516), data vyhovují pravidlům MIAME.

4.12. Analýza proteinů pomocí Western blotu (WB)

30 µg celkového proteinu (60 µg pro analýzu exprese HOPX) bylo nanášeno na 8 až 12% SDS polyakrylamidový gel a přeneseno na PVDF membránu, která byla následně blokována v 5% odstředěném mléce nebo 5% BSA. Membrána byla následně inkubována s protilátkou HOPX (C-term. ředěnou 1 : 300, Abgent) a sekundární příslušnou protilátkou s kovalentně vázanou křenuvou peroxidázou, anti-rabbit (Cell Signaling Technology). (Chemi)Luminiscenční reakce byla provedena s použitím roztoků LumiGLO (Cell Signaling) a zachycena na rentgenový film (Agfa). Proteiny ITGA4, FOXG1, pVAV3 a NCAM1, DNMT1 a DNMT3B byly detekovány obdobným způsobem s protilátkami anti-Integrin $\alpha 4$ (ředění 1 : 1000, Millipore), anti-FOXG1B (AB2, ředění 1 : 1000, Sigma-Aldrich), anti-VAV3 (phospho Y173, ředění 1 : 1000, Abcam) a anti-NCAM1 (clone 5e-a, ředění 1 : 1000, Developmental Studies Hybridoma Bank), Anti-DNMT1 [EPR3522] (ab92314) (ředění 1 : 1000, Abcam) a Anti-DNMT3B [52A1018] (ředění 1 : 250, Abcam). Stejnoměrná nanáška proteinů byla ověřena pomocí imunodetekce GAPDH (ředění 1 : 4000, Invitrogen) nebo γ -Tubulinu, Anti- γ -Tubulin, Clone GTU-88 (ředění 1 : 1000 Sigma-Aldrich) na stejné membráně. Výsledky v obrázcích jsou reprezentativním vzorkem alespoň tří nezávislých experimentů.

4.13. Migrační test

8×10^5 buněk bylo vyseto na ničem nepokrytou kultivační jamku šesti-jamkové destičky (experiment PR9692-shHOPX) nebo jamku pokrytou fibronectinem (Millipore, experiment PR9692-shITGA4) a kultivováno přes noc do dosažení konfluentního nárůstu. S použitím

sterilní 200 µl-pipetovací špičky byly v každé jamce provedeny tři oddělené rýhy. Buňky byly omyty ohřátým kultivačním médiem a destička byla umístěna na inkubátoru BL109 (PeCon GmbH) vyhřátého na 40 °C a napojeného na mikroskop Leica DMI6000B. Fotografické snímky byly pořizovány v jednominutových intervalech po dobu 24 hodin s použitím fotoaparátu Leica DFC360 FX. Snímky z času 0, 10, 12, 20, 24 hodin byly následně kvantitativně analyzovány. Vzdálenost okrajů rýhy byla měřena s použitím programu ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Analyzováno bylo několik různých pozic rýhy ve stejném čase. V obrázcích jsou reprezentativní snímky tří experimentů v čase 20 hodin od započatého experimentu.

4.14. Test na 3D kolagenovou invazivitu

Buněčná invaze byla měřena pomocí testu na 3D kolagenovou invazivitu. Do 400 µl roztoku obsahujícího 4 mg/ml kolagenu Collagen R (Serva) bylo přidáno 40 µl NaHCO₃ a 40 µl HMEM. Roztok kolagenu byl rozmíchán na ledu a 10 µl z něj bylo přidáno do každé jamky plata a ponecháno polymerovat 30 minut ve 37°C. 5 x 10³ buněk v 50 µl bylo přidáno na povrch kolagenového gelu a necháno invadovat po 48 hodin ve 40°C. Po 24 hodinách bylo růstové médium zaměněno za bezsérové médium. Snímky optických řezů o tloušťce 10 µm byly pořízeny pomocí fotoaparátu ProgRes MF Cool camera (Jenoptic) a mikroskopu Nikon-Eclipse TE2000-S (objektiv 20x/0.40 HMC). Pro každou buněčnou linii bylo pomocí programu VirtualDub analyzováno 8 různých zorných polí, u nichž byl určen průměr hloubky kolagenového gelu, které byly invadující buňky schopné dosáhnout. Průměrná hloubka invaze byla normalizována na hloubku invaze buněk PR9692 (pozitivní kontrola). Ke stanovení významnosti rozdílů byl použit Studentův *t* test.

4.15. Test adhezivity

K analýze buněčné adhezivity bylo použito 1 x 10⁵ buněk vysetých na fibronektinem (Millipore) pokrytou jamku šesti-jamkové destičky. Ta byla nejprve 30 minut blokována 0,5% BSA k zabránění nespecifických vazeb. Buňky byly ponechány adherovat 2 hodiny ve 40°C. Destička byla následně třepána 15 s při 2000 rpm. Uvolněné buňky byly odstraněny trojnásobným promytím v kultivačním médiu s 0,1% BSA. Adherované buňky byly fixovány s pomocí 4% paraformaldehydu a bareveny krystalovou violetí. Po kompletním vyschnutí jamičky byl přidán 2% SDS a po následujících 30 minutách byl signál spektrofotometricky analyzován při vlnové délce 550nm.

4.16. Analýza organizace aktinového cytoskeletu

K porovnání rozdílů v organizaci aktinového cytoskeletu bylo 5×10^3 buněk vyseto na jamku dvanácti-jamkové kultivační destičky pokryté kolagenem typu I z krysího ocasu (Millipore). Buňky byly ponechány adherovat přes noc ve 40°C . Poté byly dvakrát omyty PBS a fixovány 4% paraformaldehydem 20 minut a následně permeabilizovány s použitím 0,1% Tritonu X-100 v PBS po dobu 5 minut. Následně proběhlo přímé značení aktinu pomocí faloidinu Alexa Fluor 488 (Invitrogen) po dobu 50 minut. Po dvojnásobném omytí PBS byl aktinový cytoskelet pozorován na konfokálním mikroskopu Leica DMI6000/TCS SP5 AOBSTANDEM. Fotografické snímky byly pořízeny pomocí digitálního fotoaparátu Leica DFC420C.

4.17. Analýza času zdvojení a buněčného cyklu

5×10^5 buněk bylo vyseto na 60 mm kultivační misku a inkubováno 72 hodin. Adherentní buňky byly případně trypsinizovány a všechny buňky byly spočítány. Čas zdvojení byl spočítán s použitím rovnice $1/\log_2 \times (\log N_h - \log N_i) / \text{počet hodin}$, kde N_h je počet sklizených buněk a N_i je počet vyšetých buněk. Pro měření množství DNA v buňce k určení fáze buněčného cyklu bylo na 60 mm kultivační misku vyseto 5×10^5 buněk a inkubováno 48 hodin. Adherentní buňky byly případně trypsinizovány a všechny buňky byly resuspendovány v PBS s přídatkem EtOH do konečné koncentrace 70%. Buňky byly inkubovány 15 minut na ledu a následně centrifugovány 10 minut při 1 300 rpm. Po odsátí EtOH byly buňky barveny $5 \mu\text{g/ml}$ propidium jodidu v pokojové teplotě po dobu 30 minut. Zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu bylo analyzováno průtokovým cytometrem LSRII (BD Biosciences), data byla analyzována pomocí softwaru FlowJo.

4.18. Analýza průtokovým cytometrem

Za použití průtokového cytometru LSRII (BD Biosciences) byla analyzována pozitivita nebo negativita buněk na EGFP a na značení anti-CD69 protilátkou kojugovanou s fykoerytrinem (PE-konjugovaná-CD69) (Miltenyi Biotec). Živé buňky byly negativní na značení Hoechstem 33258 (Invitrogen) v koncentraci $1 \mu\text{g/ml}$. Data získaná z průtokového cytometru byla vyhodnocena pomocí software FlowJO. Buňky negativní na EGFP byly izolovány pomocí buněčného sorteru Influx high speed cell sorter (BD Biosciences).

4.19. Primery použité ve studii

Tab. 1 Seznam primerů použitých ve studii. *A= adenin, C=cytosin, G=guanin, T=thymin*

Primery specifické pro kuřecí buňky	sekvence oligonukleotidu
Vlásenka 5	5'GGCGGGGCTAGCTGGAGAAGATGCCTTCCGGAGAGGTGCTGCCAGTGAGCG
Vlásenka 3	5'GGGTGGACGCGTAAGAGGGGAAGAAAGCTTCTAACCCCGTATTACCACCACCAGTAGGCA
shHOPX fw	5'AGGTGCTGCCAGTGAGCGAAAGCTAGAGATCCTGGAGTATAGTGAAGCCACAGATGTA
shHOPX rev	5'CACCACCACCAGTAGGCAGAAGCTAGAGATCCTGGAGTATACATCTGTGGCTTCACT
shLSP1 fw	5'AGGTGCTGCCAGTGAGCGAGCCTGTGTCCAAGATAGATTAGTGAAGCCACAGATGTA
shLSP1 rev	5'CACCACCACCAGTAGGCAGGCCTGTGTCCAAGATAGATTACATCTGTGGCTTCACT
shAQP1a fw	5'AGGTGCTGCCAGTGAGCGAGGGCGGTGGTGGCTGAGTTTAGTGAAGCCACAGATGTA
shAQP1a rev	5'CACCACCACCAGTAGGCAGGGCGGTGGTGGCTGAGTTTACATCTGTGGCTTCACT
shAQP1b fw	5'AGGTGCTGCCAGTGAGCGACCTCGCCATGATCCTCTTTTAGTGAAGCCACAGATGTA
shAQP1b rev	5'CACCACCACCAGTAGGCAGCCTCGCCATGATCCTCTTTTACATCTGTGGCTTCACT
shAQP1c fw	5'AGGTGCTGCCAGTGAGCGAGGTTATCCATCGCGACCATTAGTGAAGCCACAGATGTA
shAQP1c rev	5'CACCACCACCAGTAGGCAGGGTTATCCATCGCGACCATTACATCTGTGGCTTCACT
shAQP1d fw	5'AGGTGCTGCCAGTGAGCGAGCTGCCAGATCAGCATCTTTAGTGAAGCCACAGATGTA
shAQP1d rev	5'CACCACCACCAGTAGGCAGGCTGCCAGATCAGCATCTTTACATCTGTGGCTTCACT
shAQP1e fw	5'AGGTGCTGCCAGTGAGCGAGCCAGATCAGCATCTTCAATAGTGAAGCCACAGATGTA
shAQP1e rev	5'CACCACCACCAGTAGGCAGGCCAGATCAGCATCTTCAATACATCTGTGGCTTCACT
shUPP1 fw	5'AGGTGCTGCCAGTGAGCGAGCGCCAGGTCCAAGCATATAGTGAAGCCACAGATGTA
shUPP1 rev	5'AGGTGCTGCCAGTGAGCGAGCGCCAGGTCCAAGCATATAGTGAAGCCACAGATGTA
shITGA4 fw	5'AGGTGCTGCCAGTGAGCGAAGTTCGAAGTAAGAGCGACATAGTGAAGCCACAGATGTA
shITGA4 rev	5'CACCACCACCAGTAGGCAGAGTTCGAAGTAAGAGCGACATACATCTGTGGCTTCACT
shMOCK fw	5'AGGTGCTGCCAGTGAGCGGATCGGTATCGACATCGACATTAGTGAAGCCACAGATGTA
shMOCK rev	5'CACCACCACCAGTAGGCAAGATCGGTATCGACATCGACATTACATCTGTGGCTTCACT
qRT-PCR primery	
ADCY7 fw	5'GAATGCTTGCGACTGTTGAA
ADCY7 rev	5'AAAGGAGTGTGCGTTGATGC
AQP1 fw	5'CGCTTGCAAAAAGGAATCAAT
AQP1 rev	5'TCTGGCTGGGTTAATCCAC
ARGHDIB fw	5'GTCGGGACTAAAATACGTGCAGC
ARGHDIB rev	5'GCTCATCTGTCCATTCCTTCTTG
BAMBI fw	5'ACATTCCCCTACTCATGGCTG

BAMBI rev	5'GCTCCCTTGTCTGAAGTCTCACC
FOXG1 fw	5'CAATGACTTCTCAGAGCAGCACT
FOXG1 rev	5'ATGTTCACTTACAGTCTGATCCC
FSCN1 fw	5'CATGGAGACAGCAGGTGAGA
FSCN1 rev	5'CGTGGTCACCCTTCAGGTAT
FUCA1 fw	5'AGGCGCTCAGAGAGAACAAC
FUCA1 rev	5'TTCCCAGTCTCCATCTGACC
GFPT2 fw	5'GCTGTTGCTACCAGGAGAGG
GFPT2 rev	5'CAACAGCGTGAAGGCAAGTA
HOPX fw	5'AGAAATGGCCACGGAGAAGT
HOPX rev	5'TCCCTCACAGACCCACATTC
ITPR3 fw	5'CGAGTCCTTGTTCTCTGCTC
ITPR3 rev	5'CTTGTCTTCACTCGCACCA
ITGA4 fw	5'GCTGGAGTTTTACAAGTGGGAAC
ITGA4 rev	5'AGGAAATACAGAGTTGTTTGTAAGG
LSP1 fw	5'AGCCTGCAAGGATATTGTGG
LSP1 rev	5'GCTGGTTAGTGGGTTCTCCA
NCAM1 fw	5'TGCCTTCTCGAAAGATGAGTCC
NCAM1 rev	5'GTCGCTGATCATGCTTTGCTC
NUDT14 fw	5'TCTGTGCTGGCATCGTAGAC
NUDT14 rev	5'CCCATTGTCTTCGGAAGTGT
RGS20 fw	5'GCTTTTCGCGAATTTCTACG
RGS20 rev	5'CTCTGGAGTCCAAGCTGACC
RHOF fw	5'GGGGAAAAAGGAGGTGAAGA
RHOF rev	5'GACACCCTGGCAGAAGTGAT
RIAM fw	5'ATCCACCAGAGGCTCAGGCAA
RIAM rev	5'GAGGAGGTTACAGAGGTCAG
UPP1 fw	5'ACTCTCCTGAATCGGCTTGA
UPP1 rev	5'ATGCACAGAGTTGTGACCA
Oligonuklotid y specifické pro lidské buňky	
DNMT1 fw	5'GAAGGGAGACGTGGAGATG
DNMT1 rev	5'ATGGAGCGCTTGAAGGAGAC
DNMT3B fw	5'GCCGGCTCTTCTCGAATTT
DNMT3B rev	5'GAAGTATCGGGCCCTGTGAG
HDAC1 fw	5'CGAATCCGCATGACTCATAA
HDAC1 rev	5'TCTCTGCATCTGCTTGCTGT

HDAC2 fw	5'TGGTGTCCAGATGCAAGCTA
HDAC2 rev	5'TGATCAGCCACATTTCTTCG
RNAPol II fw	5'GCACCACGTCCAATGACAT
RNAPol II rev	5'GTGCGGCTGCTTCCATAA
Tat-vektor fw	5'CGAGCTCGGATCCACTAGTAA
Tat-vektor rev	5'ACAGTGGGAGTGGCACCTT
Tat-virus fw	5'TGAACGGATCTCGACGGTAT
Tat-virus rev	5'ATTGGGAGGTGGGTTGCTTT
Primery pro bisulfitovou analýzu	
bisHOPX1 fw	5'ATTGGTGATATAGGTATTGAGGTTATATT
bisHOPX2 fw	5'GGTTTTAGTTGGTTTTGTTTTGTGT
bisHOPX rev	5'TCACTTAAAAATAATATCACAACAAC
bisLTR1 fw	5'GGTAGAATTATATATTAGGGTTAGGGATT
bisLTR2 fw	5'AGAGAAGGTAGAAGAAGTTAATGAAGGAGA
bisLTR1 rev	5'CACCCATCTCTCTCCTTCTAACCTC
bisLTR2 rev	5'AAAAAACTCCTCTAATTTCCCTTT
ERVWE1-BIS-FW	5'GGAGATATAGTAATTATTTTGTAATTGAGAGAT
ERVWE1-BIS-RV	5'AACAATAACAAACCTTTAACCCAATTA
ERVWE1 non-BIS-FW	5'GGAGATACAGCAATTATCTTGCAACTGAGAGAC
ERVWE1 non-BIS-RV	5'AACAATGGCAAGCCTTTAGCCCAATTG

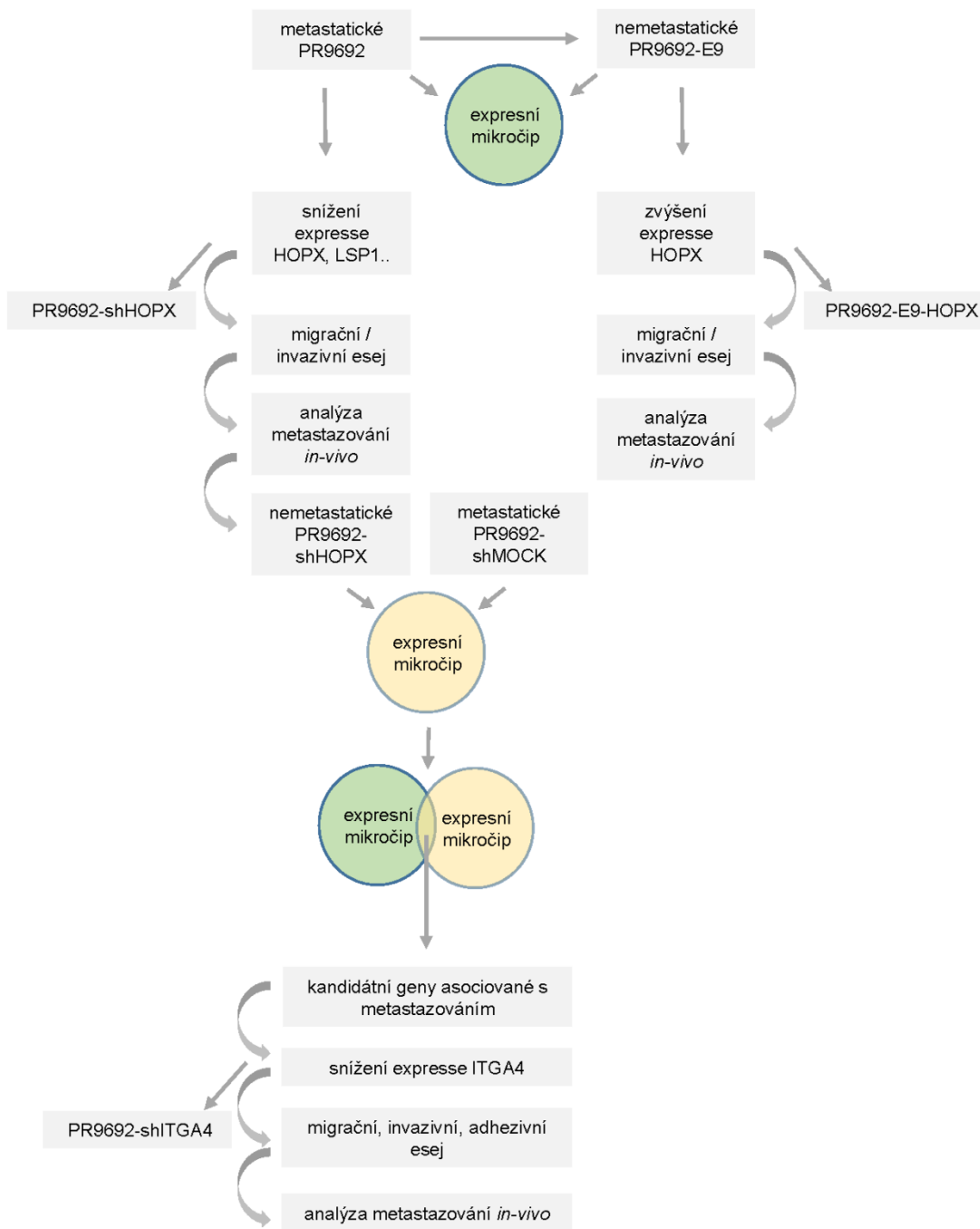
5 Výsledky

5.1. Kuřecí modelový systém pro studium metastázování

V nejrozsáhlejší části své doktorské práce jsme se zabývali rozdíly v genové expresi, které ovlivňují metastatický potenciál nádorových buněk. Pro studium metastázování jsme využili náš unikátní kuřecí model založený na nádorové buněčné linii PR9692 a jejím subklonu PR9692-E9, které jsou transformované genem *v-src*. Vnesením plazmidové DNA obsahující provirovou strukturu LTR,*v-src*, LTR do kuřat inbrední linie CC.R1 byly indukovány sarkomy v místě vpichu (Svoboda et al. 1992). Buňky odebrané z těchto sarkomů byly dlouhodobě kultivovány *in vitro* a po překonání růstové krize vznikla buněčná linie PR9692 (Plachy and Hejnar 2002). Z ní byl limitním ředěním odvozený subklon PR9692-E9. Mateřská linie PR9692 i dceřiná linie PR9692-E9 reprodukovatelně tvoří po inokulaci do prsního svalu syngenních kuřat sarkomy v místě vpichu. Mateřská linie navíc indukuje tvorbu metastáz v plicích. Subklon PR9692-E9 však schopnost tvořit metastázy již od svého vzniku ztratil (Cermak et al. 2010). Rozdíl v kapacitě indukovat metastázy nám umožňuje identifikovat geny, jejichž polymorfizmy nebo změny v expresi podmiňují tvorbu metastáz.

Mateřská linie a její subklon se navíc liší i morfologicky. Metastázující buňky PR9692 jsou adherentní, naopak nemetastázující buňky PR9692-E9 jsou zakulacené a v buněčné kultuře suspenzní.

Tato práce navazuje na předchozí studii, kde byly modelová linie PR9692 a její subklon PR9692-E9 použity k určení genů asociovaných s metastázováním, mezi kterými byl identifikován i transkripční faktor EGR1 (Cermak et al. 2010). Obě práce vycházejí z expresní analýzy provedené mikročipovou technologií s cílem identifikovat nové kandidátní geny účastníci se metastatického procesu. Celkové schéma tohoto projektu je znázorněno na obrázku 8.



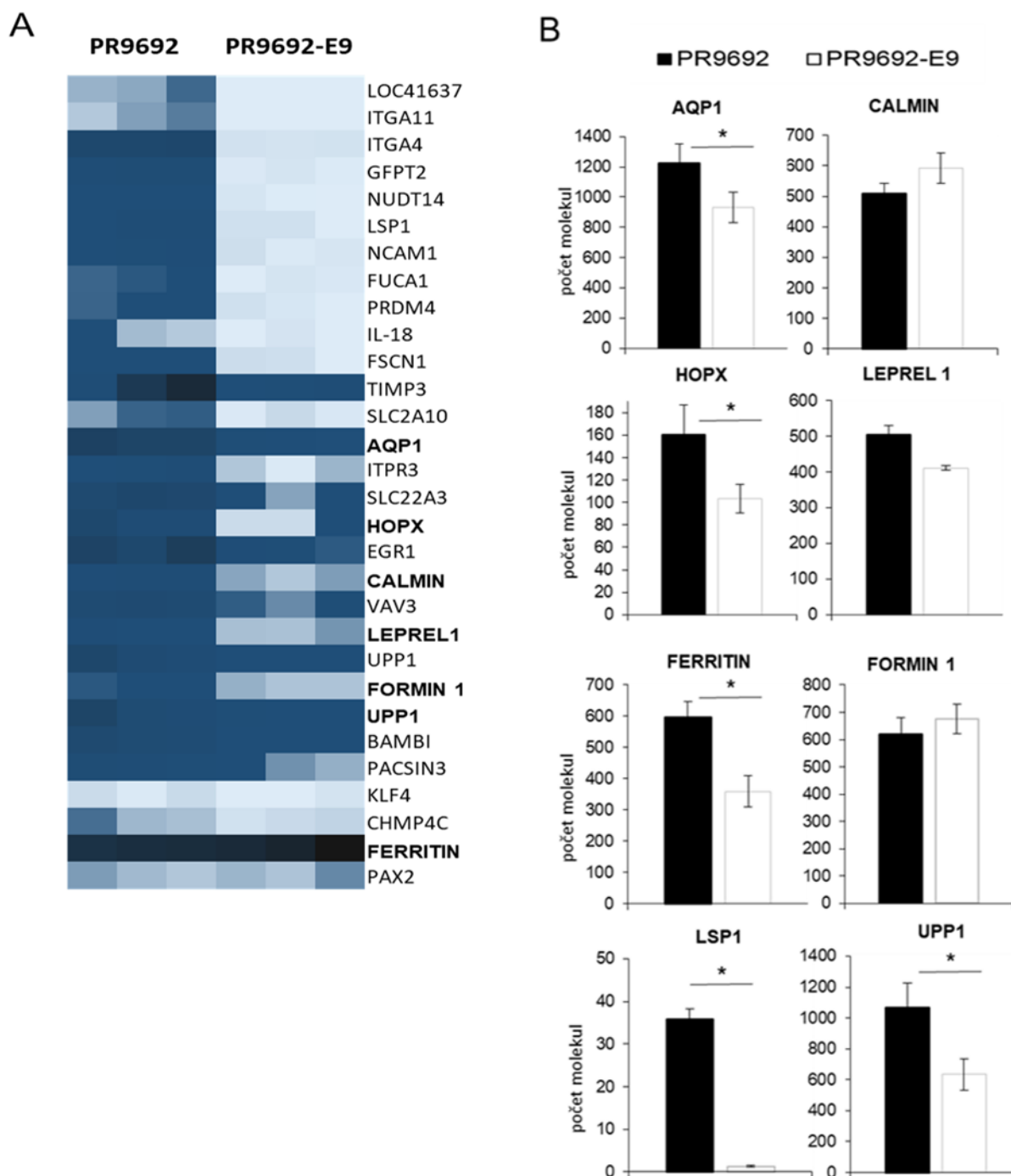
Obr. 8. Schéma experimentů pro studium metastázování

5.2. Expresní analýza genů v metastázující linii PR9692 a nemetastázujícím subklonu PR9692-E9 a výběr kandidátních genů

K identifikaci rozdílné exprese mezi metastázujícími liniemi PR9692 a nemetastázujícím subklonem PR9692-E9 byla použita mikročipová analýza exprese genů (Obr. 9a) (Cermak et al. 2010). Základem pro tuto analýzu byla RNA izolovaná z buněčné kultury PR9692 a PR9692-

E9. Předpokládali jsme, že geny účastníci se nádorové progresi nalezneme právě mezi geny s rozdílnou expresí mezi PR9692 a PR9692-E9. V seznamu genů s rozdílnou expresí jsme mimo jiné očekávali geny s jasnou souvislostí s nádorovou progresí, ale v tomto projektu jsme se soustředili na geny, jejichž role v procesu tvorby metastáz není intuitivní. Dalším kritériem pro výběr kandidátních genů byla kromě rozdílné exprese mezi buňkami PR9692 a PR9692-E9 také schopnost reprodukovat změny v metastázování při cílené modulaci jejich exprese. Pokud tato kritéria nebyla splněna, kandidátní geny byly z dalších experimentů vyřazeny.

Mezi vybrané kandidáty patří F-aktin vazebný protein Lymphocyte-Specific Protein 1 (*LSP1*), transkripční faktor *HOPX* nebo Leprecan-Like 1 (*LEPREL1*), který má zatím málo prozkoumanou roli v tvorbě karcinomu prsu (Shah et al. 2009). Dalšími, z hlediska metastázování, zajímavými kandidáty byly *FORMINI* ovlivňující buněčnou adhezivitu (Kobielak, Pasolli, and Fuchs 2004), transmembránový aktin-vazebný protein *CALMIN*, Aquaporin 1 (*AQP1*), který reguluje transport vody ale také buněčnou migraci (Jiang 2009) a Uridin fosforyláza 1 (*UPPI*), jejíž zvýšená exprese byla nalezena v karcinomu slinivky (Sahin et al. 2005). V neposlední řadě jsme se zaměřili také na *FERRITIN*, který slouží jako hlavní depozit železa v buňce. Jeho zvýšená hladina v séru byla nalezena u pacientů s nádorovým onemocněním a koreluje s agresivním nádorovým fenotypem (Hann et al. 1990; Hann et al. 1985). Výsledky z mikročipové analýzy (Obr. 9a) bylo nutné u kandidátních genů ověřit pomocí kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR, Obr. 9b). Nutnost verifikovat výsledky z mikročipu vedla k vyřazení genů *CALMIN* a *FERRITIN* z dalších experimentů, u nichž jsme získali opačné výsledky, než jaké jsme po mikročipové analýze očekávali. *CALMIN* byl dle mikročipu více exprimován v metastázující linii PR9692, podle qRT-PCR jsme naměřili zvýšené hodnoty u nemetastázujícího subklonu PR9692-E9. Naopak u *FERRITINU* jsme dle první expresní analýzy očekávali jeho nižší expresi v buňkách PR9692. Tento výsledek nebyl pomocí qRT-PCR potvrzen. U genů *LEPREL1* a *FORMINI* byla sice změna v expresi dle qRT-PCR v souladu s mikročipovými výsledky, naměřené rozdíly mezi PR9692 a PR9692-E9 ale nebyly signifikantní. Proto jsme se dále zaměřili na geny *LSP1*, *HOPX*, *AQP1* a *UPPI*.



Obr. 9. Rozdílná exprese genů v buňkách PR9692 a PR9692-E9: A) Vybrané geny, jejichž exprese je podle mikročipu rozdílná v buňkách PR9692 (vlevo) a PR9692-E9 (vpravo). Vyšší sytost barvy znázorňuje vyšší expresi. Každý ze tří sloupců reprezentuje jeden replikát. B) Exprese genů AQP1, CALMIN, HOPX, LEPREL1, FERRITIN, FORMIN 1, LSP1 a UPP1 na úrovni mRNA naměřená pomocí qRT-PCR v buňkách PR9692 (černá), PR9692-E9 (bílá). Data normalizované exprese pochází ze třech experimentů s použitím triplikátů (*, $P < 0,05$).

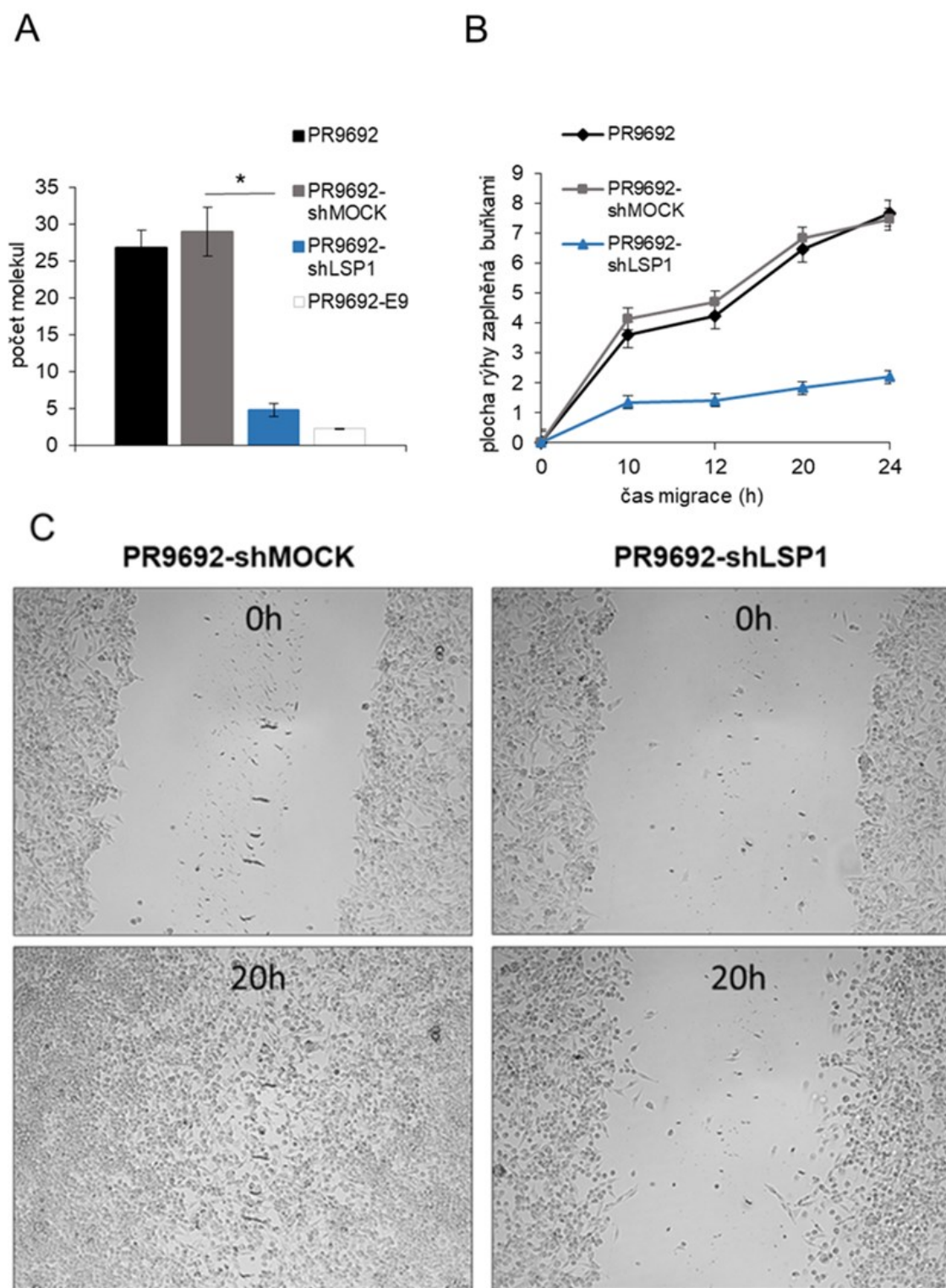
5.3. Kandidátní geny HOPX, LSP1, AQP1 a UPP1

5.3.1. *LSP1* – Lymphocyte Specific Protein 1

Naše předpoklady, že by *LSP1* mohl být jeden z genů regulujících nádorovou progresi, byly v souladu s pracemi jiných laboratoří. Liu *et al.* dokládají, že *LSP1* je kritický v regulaci transendoteliální migrace neutrofilů a cévní propustnosti (Liu et al. 2005). Mohlo by se jednat o podobné mechanismy, které nádorová buňka využívá k úniku z primárního nádoru do vzdálenějších orgánů.

V kuřecím modelovém systému má *LSP1* vyšší expresi v metastázuující linii PR9692 ve srovnání s nemetastázuující PR9692-E9. Proto jsme se rozhodli studovat jeho účast na tvorbě metastáz stabilním snížením exprese *LSP1* v buňkách PR9692 pomocí RNA interference (RNAi). RNAi v našem systému zajišťuje vlásenková RNA (shRNA), která je stabilně exprimována z vektoru nesoucího RNAi kazetu s kuřecím promotorem U6. Kazeta kromě promotoru U6 obsahuje i části sekvencí kuřecí miRNA pro zajištění optimálního zpracování transkriptů pomocí endoribonukleázy Dicer (Das et al. 2006). Buňky PR9692 byly transfekovány vektorem pDNA3shLSP1, ze kterého se exprimuje shRNA proti *LSP1*. Buňky byly selektovány G418 za vzniku stabilní linie PR9692-shLSP1. Exprese *LSP1* byla v těchto buňkách testována 6 týdnů po transfekci a dosáhla snížení téměř na úroveň PR9692-E9 (Obr. 10a). Kontrolní buňky PR9692-shMOCK byly připraveny obdobným způsobem -transfekcí vektoru pDNA3shMOCK exprimující kontrolní vlásenku.

Schopnost buněk migrovat je důležitou charakteristikou metastázuujících buněk, otestovali jsme proto vliv snížené hladiny *LSP1* na pohyblivost buněk na kultivační misce s použitím migračního testu, při kterém sledujeme za pomoci časosběrných mikroskopových snímků, jak buňky postupně zaplňují rýhu vytvořenou v jejich monovrstvě. Buňky PR9692 a PR9692-shMOCK obsadily signifikantně větší plochu než PR9692-shLSP1 (Obr. 10b). Po 10 hodinách od zahájení experimentu jsme u PR9692-shLSP1 pozorovali 2,6krát sníženou migraci ($P < 0,01$). Rýha v monovrstvě kontrolních buněk byla téměř obsazena po 20 hodinách, zatímco v případě PR9692-shLSP1 zůstala otevřená (Obr. 10c). Buňky PR9692-E9 jsme pro srovnání nepoužili, jelikož jejich suspenzní fenotyp by v této analýze zkresloval výsledek. Pomocí migračního testu jsme prokázali vliv genu *LSP1* na pohyblivost buněk *in vitro*.



Obr. 10. Snížení exprese *LSP1* a její vliv na buněčnou migraci *in vitro*: A) Snížení exprese *LSP1* na úrovni mRNA naměřená pomocí qRT-PCR v buňkách PR9692 (černá), PR9692-shMOCK (tmavě šedá), PR9692-shLSP1 (modrá) a PR9692-E9 (bílá). Data normalizované exprese pochází ze třech experimentů s použitím triplikátů (*, $P < 0,05$) B) Buněčná migrace analyzovaná jako plocha obsazená buňkami v rýze v monovrstvě buněk v čase. Analyzována byla šířka rýhy z pěti experimentů. Buňky PR9692 (černá), PR9692-shMOCK (tmavě šedá) a PR9692-shLSP1 (modrá) C) Snímek fázového kontrastu rýhy v monovrstvě buněk PR9692-shMOCK (vlevo) a PR9692-shLSP1 (vpravo) v čase 0 a 20 hodin od zahájení experimentu.

V dalším experimentu jsme přistoupili přímo k testování vlivu *LSP1* na tvorbu metastáz *in vivo* v kuřecím systému (Plachy and Hejnar 2002). Metastázující linie PR9692, kontrolní linie PR9692-shMOCK a linie PR9692-shLSP1 byly inokulovány do kuřat inbrední linie CC.R1, původního hostitele nádoru PR9692. Po 20 dnech byl analyzován počet a velikost primárních nádorů a metastáz. Buňky PR9692 a PR9692-shMOCK indukovaly tvorbu primárního nádoru a metastáz ve 100% případů. Metastázy se dle očekávání nacházely v plicích, kde tvořily více než 50% objemu plic. Velmi překvapivý výsledek jsme obdrželi po inokulaci buněk se sníženou expresí *LSP1*. Namísto očekávaného snížení tvorby metastáz po inokulaci PR9692-shLSP1, jsme pozorovali velké metastázy v plicích ale také v srdci. Zajímavé je naopak snížení velikosti primárního nádoru oproti kontrolním buňkám (Tab. 2).

Snížení exprese *LSP1* vedlo ke zvýšené tvorbě metastáz. Navíc sekundárním orgánem nebyly pouze plíce, ale také srdce. Přestože migrační experimenty *in vitro* předpovídaly potvrzení korelace exprese *LSP1* s invazivitou buněk, *in vivo* experimenty tuto hypotézu vyvrátily. Výše popsané výsledky naznačují, že gen *LSP1* není vhodný kandidát, a proto byl z dalších experimentů vyřazen.

Tab. 2 Incidence a velikost metastáz v plicích a srdci

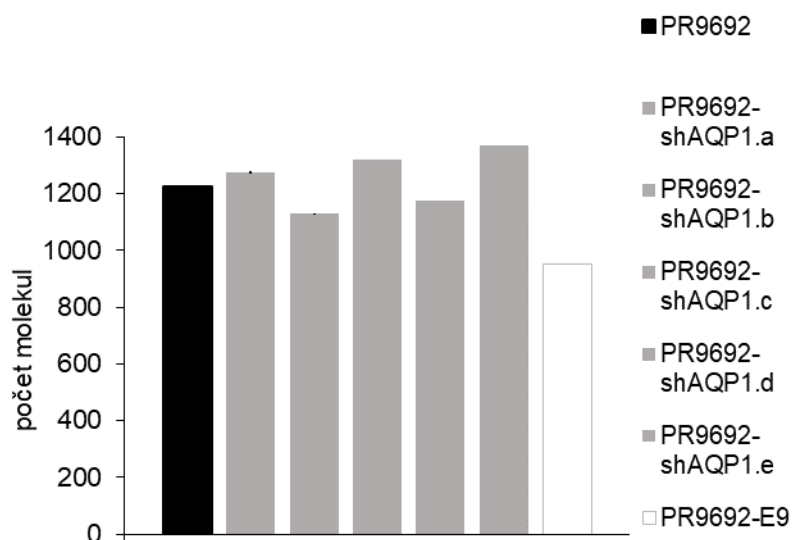
BUŇKY	Počet inokul. buněk	Dny po inokulaci	Počet kuřat s primár. nádorem / Počet inokulovaných kuřat	Průměrná konečná váha nádoru (g)	Počet kuřat s metastázami			% kuřat s metastázami
					+	++	+++	
PR9692	10 ⁴	20	3/3	68,6	0	0	3	100
PR9692-shMOCK	10 ⁴	20	6/6	45,3	1	2	5	100
PR9692-shLSP1	10 ⁴	20	6/6	30,9	2	1+1*	3+5*	100

+ několik malých a 1-3 středně velké metastázy, ++ několik malých a více než 3 středně velké metastázy nebo 1-3 velké (4-5 mm) izolované metastázy, +++ plíce/srdce prorostlé středně velkými až velkými metastázami, * metastázy v srdci

5.3.2. *AQP1* – Aquaporin 1 a *UPPI* - Uridine Phosphorylase 1

Podobně jako v případě *LSP1* jsme postupovali i při zkoumání vlivu *AQP1* na nádorovou progresi. Naše hypotéza byla podpořena prací Hoque *et al.*, která prokazuje zvýšenou expresi *AQP1* v karcinomu plic (Hoque et al. 2006) a prací Esteva-Font *et al.*, který dokonce ukazuje

korelaci mezi expresí *AQP1* a plicními metastázami z prsního adenomu (Esteve-Font, Jin, and Verkman 2014). Buňky PR9692, které mají zvýšenou expresi *AQP1* ve srovnání s PR9692-E9, jsme transfekovali vektory pDNashAQP1(a-e) zajišťující expresi vlásenek cílených do pěti různých míst genu *AQP1*. Bohužel ani v jednom případě jsme nedocílili výraznějšího snížení exprese *AQP1* (Obr. 11.). Ze stejného důvodu jsme vřadili i gen *UPPI* (data neukázána).

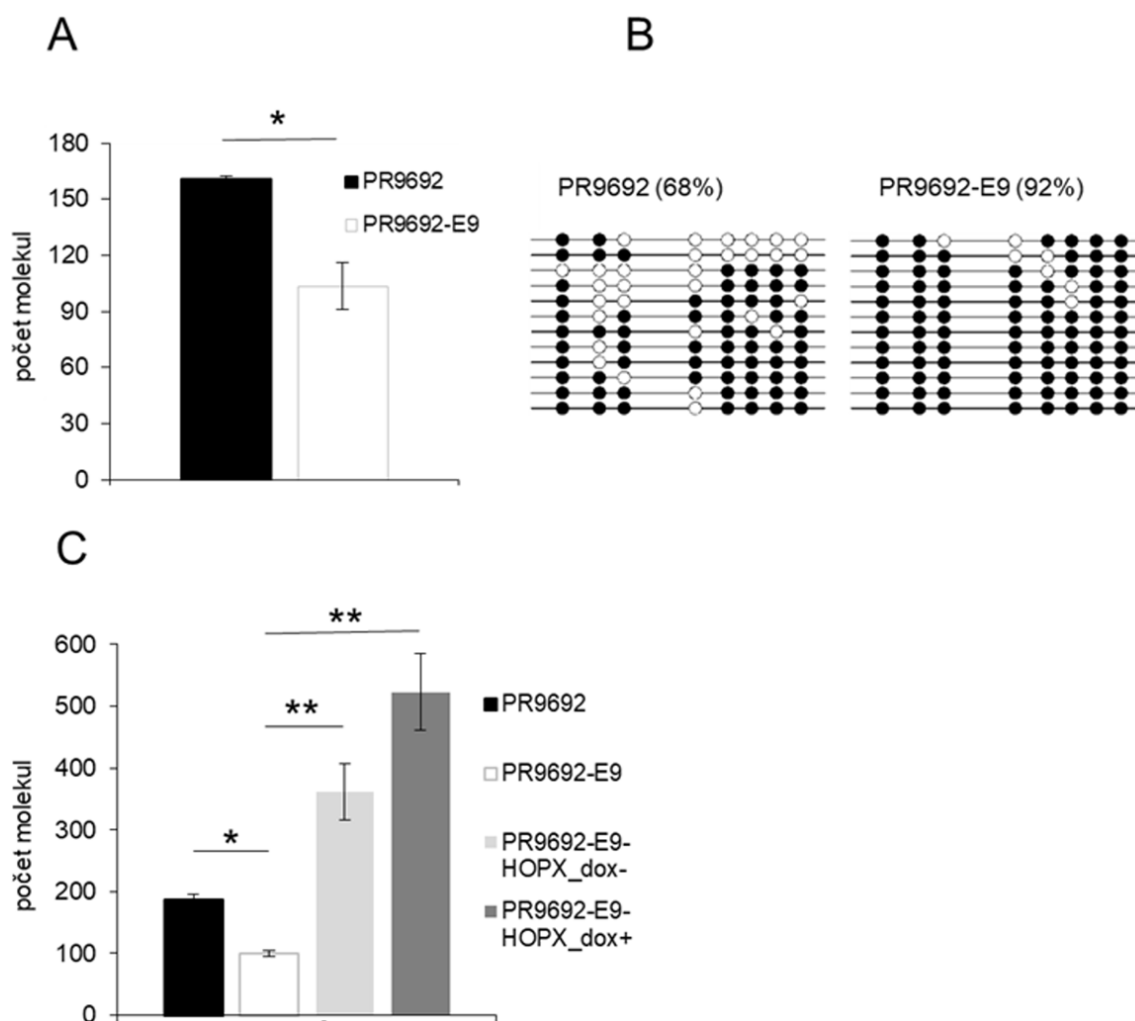


Obr. 11. Normalizovaná exprese genu *AQP1* v buňkách PR9692 (černá), PR9692-shAQP1a-e (šedá) a PR9692-E9 (bílá) naměřená pomocí qRT-PCR ve dvou nezávislých experimentech s použitím triplikátů.

5.3.3. Transkripční faktor *HOPX* – Homeodomain-Only Protein

HOPX je další gen, který jsme si na základě výsledků mikročipové analýzy vytipovali (Obr. 9a). Výsledky jsme potvrdili pomocí RT-PCR, kde je exprese *HOPX* snížena v nemetastázujícím subklonu PR9692-E9 (Obr. 12a).

Za jeden z hlavních důvodů transkripčního umlčení tumor-supresorových genů je označována hypermetylace CpG ostrovů v jejich promotorech, což bylo prokázáno i v případě snížené exprese *HOPX* v různých karcinomech (Yamaguchi et al. 2009; Ooki et al. 2010; Harada et al. 2011). Proto jsme se podívali na metylaci promotoru *HOPX* v kuřecích buňkách PR9692 a PR9692-E9. Metylační status promotoru *HOPX* jsme analyzovali pomocí bisulfitového sekvenování. V buňkách PR9692-E9 jsme našli hustě metylovaný promotor *HOPX*, naopak v buňkách PR9692 byla metylace promotoru nižší (Obr. 12b). Exprese genu *HOPX* tedy i v kuřecím modelovém systému negativně koreluje s metylací jeho promotoru (Obr. 12a a 12b).



Obr. 12. Expresa mRNA a metylace promotoru *HOPX*: A) Normalizovaná genová exprese *HOPX* v buňkách PR9692 (černá) a PR9692-E9 (bílá) naměřená pomocí qRT-PCR v pěti nezávislých experimentech s použitím triplikátů (*, $P < 0,05$) B) Status metylace CpG v promotorové oblasti *HOPX* v buňkách PR9692 a PR9692-E9 naměřená pomocí bisulfitového sekvenování. Místa metylovaných CpG jsou znázorněna černými kroužky, nemetylované CpG jsou znázorněny bílými kroužky. Ukázány jsou výsledky z 12 klonů pocházejících ze 2 nezávislých reakcí PCR. Čísla v závorce ukazují procento metylovaných dinukleotidů CpG. C) Normalizovaná exprese *HOPX* v buňkách PR9692 (černá), PR9692-E9 (bílá), PR9692-E9-HOPX_dox- bez doxycyklinu (světle šedá) a PR9692-E9-HOPX_dox+ s doxycyklinem (tmavě šedá) naměřená pomocí qRT-PCR ve třech nezávislých experimentech s použitím triplikátů (*, $P < 0,05$, **, $P < 0,01$).

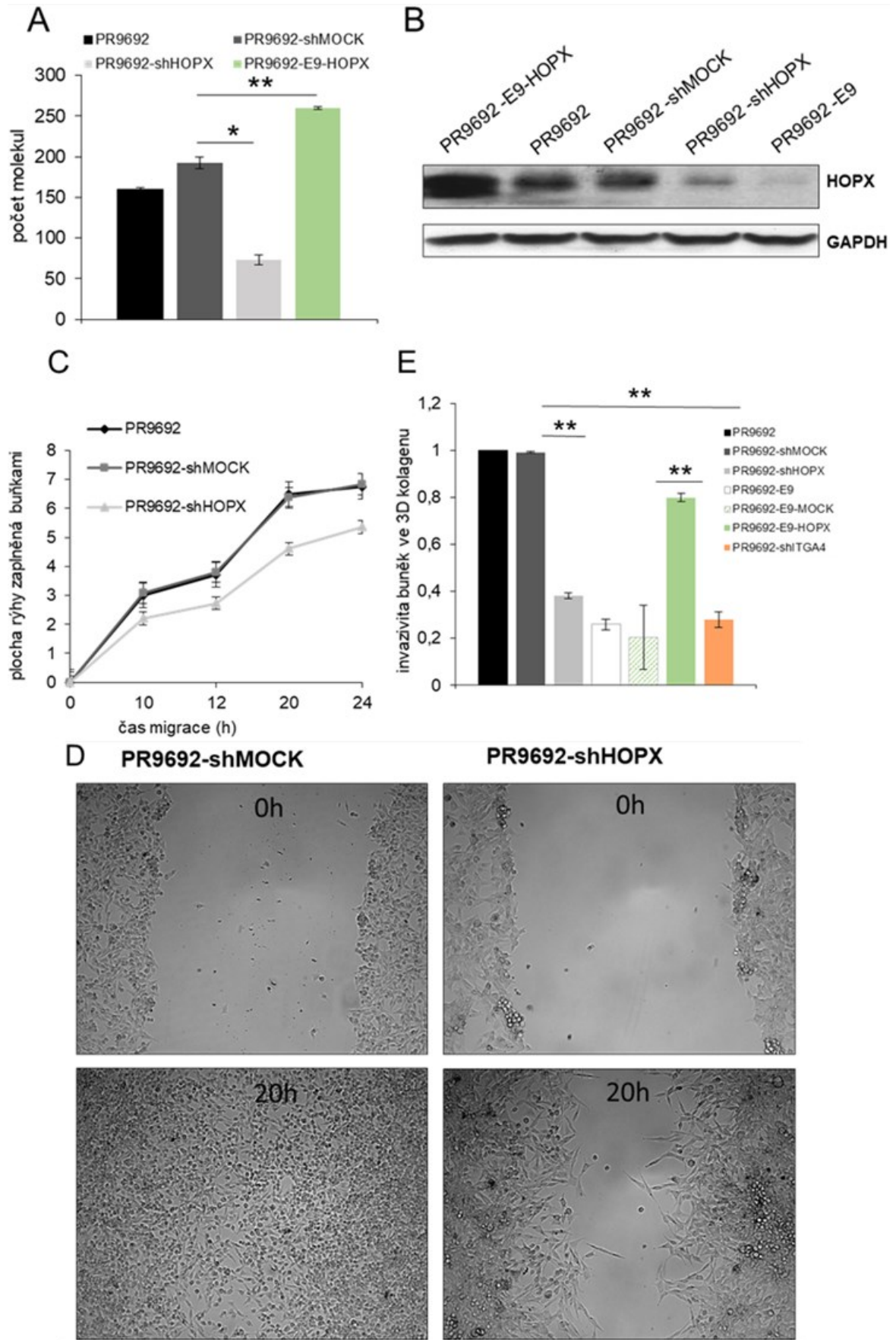
Pro vyšetření role *HOPX* v invazivních vlastnostech buněk jsme v nemetastázující linii PR9692-E9 zvýšili expresi *HOPX*. Pro lepší manipulaci s genovou expresí *HOPX* jsme chtěli zvýšit jeho expresi pomocí inducibilního lentivirového systému Lenti-X Tet-On (Clontech). Infekcí buněk PR9692-E9 jsme vytvořili stabilní linii s cílem indukovat expresi *HOPX* jako odpověď na přidaný doxycyklin. Bohužel i přes použití séra doporučeného výrobcem byla zbytková exprese *HOPX* bez stimulace doxycyklinem příliš vysoká (Obr. 12c). Proto jsme stabilní linii PR9692-E9-HOPX připravili pomocí infekce buněk replikačně defektními

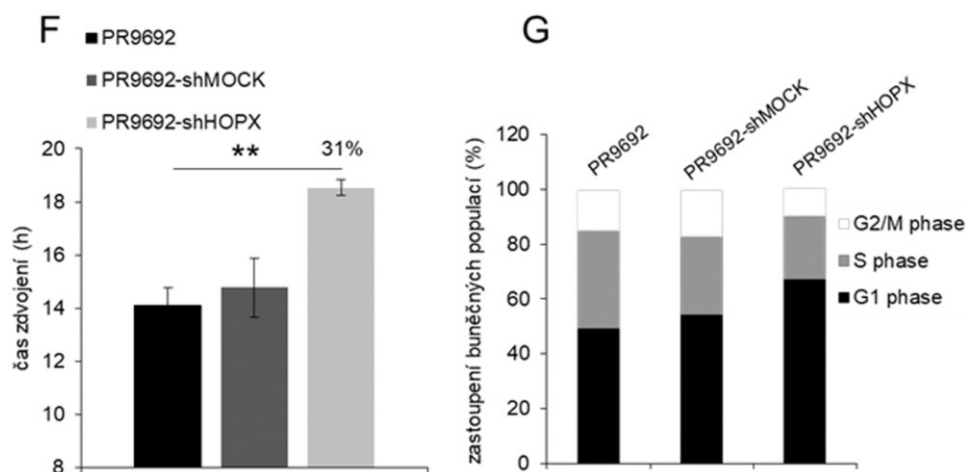
retrovirovými partikulami. Ty byly produkovány na kuřecí pakážovací linii AviPack (Plachy et al. 2010), která byla transfekována retrovirovým vektorem pSFCV-HOPX. Obdobným způsobem byly připraveny kontrolní buňky PR9692-E9-MOCK s použitím prázdného vektoru pSFCV. Buňky byly selektovány G418 a 6 týdnů po infekci PR9692-E9 byla analyzována exprese *HOPX* (Obr. 13a). Hladina *HOPX* v PR9692-E9-HOPX je zvýšena oproti mateřské linii PR9692, přesto je nižší než při použití indukibilního systému. Snažili jsme se expresi co nejvíce přiblížit mateřské linii, aby nedocházelo k nefyziologicky vysoké expresi *HOPX*, která by mohla ovlivnit zejména experimenty *in vivo*. Výsledky z qRT-PCR jsme potvrdili na proteinové úrovni s použitím protilátky proti lidskému *HOPX*, a využili tak dostatečné sekvenční podobnosti v epitopu lidské a kuřecí formy (Obr. 13b).

Naopak u metastázuující linie PR9692 jsme expresi *HOPX* stabilně snížili transfekcí vektoru pDNA3shHOPX za vzniku linie PR9692-shHOPX. Buňky byly selektovány G418 a 6 týdnů po transfekci PR9692 byla analyzována exprese *HOPX* (Obr. 13a). U PR9692-shHOPX se nám podařilo snížit expresi *HOPX* na podobnou hladinu jako v PR9692-E9. Výsledky z qRT-PCR jsme potvrdili na proteinové úrovni s použitím protilátky proti lidskému *HOPX* (Obr. 13b).

5.3.4. Vliv *HOPX* na buněčnou migraci, proliferaci a invazivitu *in vitro*

K charakterizaci chování buněk s modulovanou expresí *HOPX in vitro* jsme opět použili migrační test s narušením monovrstvy buněk. Časosběrné snímky z mikroskopu jsme analyzovali po 24 hodinách. Plocha obsazená migrujícími buňkami je vyhodnocena na obrázku 13c. Kontrolní buňky PR9692 a PR9692-shMOCK obsadily signifikantně větší plochu rýhy nežli buňky PR9692-shHOPX. Po 10 hodinách od počátku experimentu jsme pozorovali snížení migrace PR9692-shHOPX 1,38krát, $P=0,01$. Rýha v monovrstvě kontrolních buněk byla po 20 hodinách téměř zaplněna, zatímco v rýze monovrstvy PR9692-shHOPX byly patrné jednotlivé protahující se buňky směrem ke středu rýhy, většina z nich ale zůstávala na okraji rýhy a spíše se nechala tlačit rostoucí masou proliferujících buněk (Obr. 13d).





Obr. 13. Snížení exprese *HOPX* a její vliv na buněčnou migraci, invazivitu a proliferaci *in vitro*: A) Snížení exprese *HOPX* na úrovni mRNA naměřená pomocí qRT-PCR v buňkách PR9692 (černá), PR9692-shMOCK (tmavě šedá), PR9692-shHOPX (světle šedá) a PR9692-E9-HOPX (zelená). Data normalizované exprese pochází ze třech experimentů s použitím triplikátů (*, $P < 0,05$, **, $P < 0,01$) B) Snížená exprese *HOPX* na proteinové úrovni analyzována Western blotem, blot GAPDH je ukázán jako kontrola nanášky. C) Buněčná migrace analyzovaná jako plocha obsazená buňkami v rýze v monovrstvě buněk v čase. Analyzována byla šířka rýhy z pěti experimentů. Buňky PR9692 (černá), PR9692-shMOCK (tmavě šedá) a PR9692-shHOPX (světle šedá). D) Snímek fázového kontrastu rýhy v monovrstvě buněk PR9692-shMOCK (vlevo) a PR9692-shHOPX (vpravo) v čase 0 a 20 hodin od zahájení experimentu. E) Invazivní vlastnosti buněk ve 3D kolagenu ze tří nezávislých experimentů (**, $P < 0,01$). F) Míra buněčné proliferace znázorněna jako čas zdvojení v hodinách. Data reprezentují 3 paralelní buněčné kultury (**, $P < 0,01$), hodnota nad sloupcem reprezentuje prodloužení času zdvojení (v procentech) po snížení exprese *HOPX*. G) Analýza buněčného cyklu buněk PR9692, PR9692-shMOCK, PR9692-shHOPX. Množství buněk v G1 fázi (černá), S fázi (šedá) a G2/M fázi (bílá) byly naměřeny pomocí FACS ve třech nezávislých experimentech.

Ačkoli morfologie PR9692-shHOPX nevykazovala žádné změny (např. zakulacení buněk či sníženou adhezivitu ke kultivační misce pozorovanou u PR9692-E9), povšimli jsme si mírně snížené metabolizace média během jejich kultivace. Spočítáním jejich času zdvojení jsme prokázali, že snížení exprese *HOPX* vede k signifikantnímu prodloužení času zdvojení o 31% ($P=0,007$, Obr. 13f). Tento výsledek jsme dále potvrdili analýzou buněčného cyklu za použití barvení intaktního jádra propidium jodidem. Nižší exprese *HOPX* v PR9692-shHOPX koreluje se zvětšenou populací buněk v G1 fázi a zmenšenou populací v S a G2 fázi buněčného cyklu ve srovnání s buňkami PR9692 a PR9692-shMOCK (Obr. 13g). Buněčný cyklus PR9692-shHOPX je pozastaven v kontrolním bodu G1, kde probíhá kontrola genomu buňky.

Jelikož snížená migrace buněk PR9692-shHOPX při zaplňování rýhy mohla být důsledkem jejich snížené proliferace, rozhodli jsme se vliv *HOPX* na pohyblivost buněk analyzovat pomocí třidimenzionálního invazivního testu, který sleduje invazivní vlastnosti jednotlivých buněk nezávisle na rychlosti buněčné proliferace. Při tomto testu se nanášá buňky

na vrstvu kolagenu, do které se nechají invadovat po směru koncentrace séra 48 hodin. Hloubka, do jaké byly jednotlivé buňky schopny invadovat, se analyzuje pomocí snímků 10 μm optických řezů. Sledovaná invazivita jednotlivých buněk je korelována s celkovým počtem analyzovaných buněk. To umožňuje charakterizovat invazivní vlastnosti různých linií nezávisle na rychlosti jejich proliferace. Invaze buněk 3D kolagenem je navíc podobnější pohybu buněk v nádorovém mikroprostředí než je tomu během pohybu buněk na kultivační misce. Buňky PR9692 a PR9692-shMOCK vykazují větší invazivní aktivitu, zatímco schopnost buněk PR9692-shHOPX invadovat byla snížena o 62% ($P < 0,05$) oproti buňkám PR9692. Role HOPX v invazivním charakteru buněk byla potvrzena i opačným přístupem. Zvýšená exprese *HOPX* v PR9692-E9-HOPX vedla k větší invazivitě, která téměř dosáhla hodnot buněk PR9692 (Obr. 13e).

Výše uvedené výsledky ukazují, že snížená exprese *HOPX* inhibuje migraci, proliferaci a invazivitu buněk PR9692-shHOPX ve 3D prostředí, naopak jeho zvýšená exprese obnovuje invazivní fenotyp buněk PR9692-E9-HOPX.

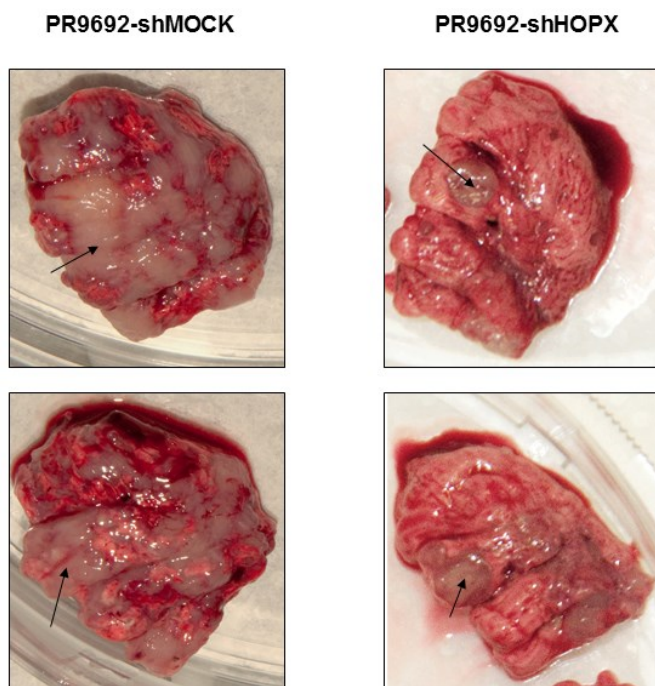
5.3.5. Role genu *HOPX* v metastatických vlastnostech buněk *in vivo*

V další fázi projektu jsme se rozhodli přistoupit k experimentům *in vivo* a zjistit tak, zda invazivita ve 3D kolagenu koreluje s tvorbou metastáz pomocí našeho kuřecího modelu (Plachy and Hejnar 2002). Kuřata inbrední linie CC.R1 byla inokulována buňkami PR9692 a PR9692-shMOCK a po 20 až 25 dnech byla během pitvy analyzována velikost primárního nádoru a přítomnost metastáz. Jak je ukázáno v tabulce 3, všechna inokulovaná kuřata vytvořila progresivně rostoucí sarkom v místě vpichu a makroskopické ohledání plic odhalilo rozsáhlé oblasti metastatické tkáně. Vzhledem k nižší míře proliferace buněk PR9692-shHOPX rostly primární nádory pomaleji, a proto ohledání kuřat proběhlo až 36. a 49. den po inokulaci. Konečná incidence a velikost sarkomu byla srovnatelná s kontrolními buňkami. Naopak pouze malé množství kuřat vytvořilo metastázy po inokulaci buněk PR9692-shHOPX a to i v případě největšího primárního nádoru rostoucího až do 49. dne od inokulace (Tab. 3). Tyto metastázy byly navíc malé a izolované od okolní plicní tkáně (Obr. 14.). Abychom si byli jisti, že snížená proliferace buněk PR9692-shHOPX neovlivnila výsledek, inokulovali jsme 10krát větší množství buněk (10^5). Ani tento krok incidenci metastáz po inokulaci PR9692-shHOPX nezvýšil (Tab. 3).

Pro další potvrzení vlivu *HOPX* na tvorbu metastáz jsme testovali invazivní potenciál buněk PR9692-E9-HOPX, které mají zvýšenou hladinu *HOPX* na podobnou úroveň jako buňky PR9692. Takto zvýšená hladina dokázala buňkám PR9692-E9-HOPX navrátit metastatický

fenotyp u 28% inokulovaných kuřat. V jednom případě dokonce došlo k vytvoření velkých srostlých metastáz. Naopak kontrolní buňky PR9692-E9 a PR9692-E9-MOCK nevytvořily žádné metastázy (Tab. 3).

Výsledky dokládají, že inhibice exprese *HOPX* snižuje kapacitu PR9692 tvořit plicní metastázy po jejich inokulaci do syngenních kuřat. Navíc tento pokles není výsledkem delšího času zdvojení buněk PR9692-shHOPX.



Obr. 14. Fotodokumentace incidence metastáz po inokulaci buněk PR9692-shMOCK (vlevo) a PR9692-shHOPX (vpravo) do modelové kuřecí linie, metastatická tkáň je zvýrazněna šipkami.

Tab. 3 Incidence a velikost plicních metastáz

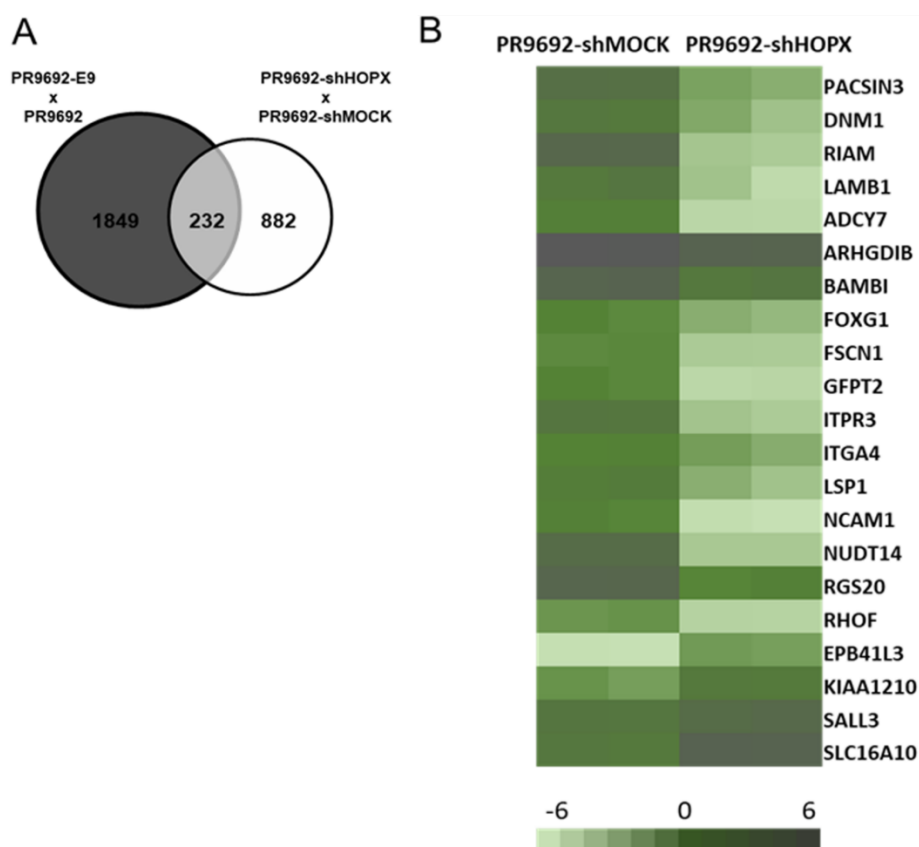
BUŇKY	Počet inokul. buněk	Dny po inokulaci	Počet kuřat s primár. nádorem / Počet inokulovaných kuřat	Průměrná konečná váha nádoru (g)	Počet kuřat s metastázami			% kuřat s metastázami
					+	++	+++	
PR9692	10 ⁴	20	19/19	39,6	2	3	14	100
	10 ⁴	25	6/6	67,5	1	1	4	100
	10 ⁵	25	4/4	58,7	1	0	3	100
PR9692-shMOCK	10 ⁴	20	11/11	31,5	3	4	2	100
PR9692-shHOPX	10 ⁴	36	21/22	25,7	2	1	0	14
	10 ⁴	49	9/10	39,7	2	0	0	22
	10 ⁵	49	6/6	70,1	0	1	0	17
PR9692-shITGA4	10 ⁴	37	15/15	33,3	2	4	0	27
PR9692-E9	10 ⁴	35	4/4	55,6	0	0	0	0
	10 ⁴	49	6/6	96,7	0	0	0	0
PR9692-E9-MOCK	10 ⁴	49	10/10	65,6	0	0	0	0
PR9692-E9-HOPX	10 ⁴	35	12/12	50,4	0	0	0	0
	10 ⁴	49	18/18	94,8	4	0	1	28

+ několik malých a 1-3 středně velké metastázy, ++ několik malých a více než 3 středně velké metastázy nebo 1-3 velké (4-5 mm) izolované metastázy, +++ plíce prorostlé středně velkými až velkými metastázami

5.4. Analýza diferenciálně exprimovaných genů v liniích

PR9692-shMOCK a PR9692-shHOPX

V další části experimentu jsme chtěli reprodukovat rozdíl mezi buňkami PR9692 a nemetastázujícím subklonem PR9692-E9. Zajímalo nás, jaké změny exprese v buňkách PR9692-shHOPX vedly ke ztrátě jejich invazivních schopností po snížení exprese *HOPX*. Pomocí mikročipu jsme provedli srovnávací expresní analýzu mezi buňkami PR9692-shMOCK a PR9692-shHOPX. Analýza odhalila více než 700 odlišně exprimovaných genů s nejméně dvojnásobnou změnou exprese, $P < 0,05$. Kompletní seznam rozdílně (více než 2krát) exprimovaných genů je uveden v elektronické příloze – Tabulka EP



Obr. 15. Mikročipová data odhalila kandidátní geny asociované s metastázováním s rozdílnou expresí genů v buňkách se sníženou expresí HOPX: A) Schematické znázornění přesahu mezi dvěma skupinami diferenciólně exprimovaných genů ve dvou párech metastázujících / nemetastázujících buněk. B) Vybrané geny, jejichž exprese je podle mikročipu rozdílná v buňkách PR9692-MOCK (vlevo) a PR9692-HOPX (vpravo). Vyšší sytost barvy znázorňuje vyšší expresi. Každý z dvojice sloupců reprezentuje jeden replikát.

Abychom zúžili počet kandidátních genů, které jsou ovlivněny hladinou HOPX a zároveň působí na metastatickou kapacitu, porovnali jsme tyto výsledky s předešlou studií (Cermak et al. 2010) srovnávající expresní profily metastázujících buněk PR9692 a spontánně nemetastázujícího subklonu PR9692-E9. Překryv diferenciólně exprimovaných genů v obou párech metastázujících a nemetastázujících linií označuje kandidátní geny asociované s metastázováním, tedy podporující nebo inhibující nádorovou invazivitu. Takto jsme výběr genů zúžili na 232, které vykazují nejméně dvojnásobnou změnu v genové expresi v obou párech buněčných linií. Mezi nimi je 186 genů s 2krát až 192krát sníženou expresí a 46 genů se 2krát až 36krát vyšší expresí v nemetastázujících buňkách (Obr. 15a). Mezi námi identifikovanými 232 geny se nachází několik ontogenetických tříd. Jsou to geny ovlivňující nádorové bujení (*EPB41L3*, *KIAA1210*, *SALL3*), buněčnou adhezi a migraci (*RIAM*, *LAMB1*), nebo vnitrobuněčný transport (*SLC16A10*, *PACSIN3*, *DNMI*) (Li et al. 2011; Vanaja et al. 2006; Yang

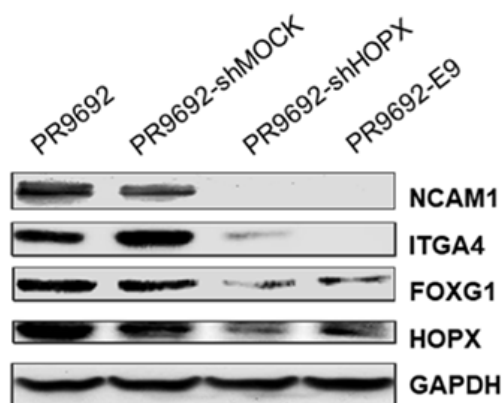
et al. 2012; Worth et al. 2010; Patarroyo, Tryggvason, and Virtanen 2002; Grimm-Gunter et al. 2008; van der Bliek et al. 1993; Friesema et al. 2008) (Obr. 15b a Tab. 4).

Tab. 4 Seznam vybraných genů odlišně exprimovaných mezi buňkami PR9692-shHOPX vs. PR9692-shMOCK a PR9692-E9 vs. PR9692

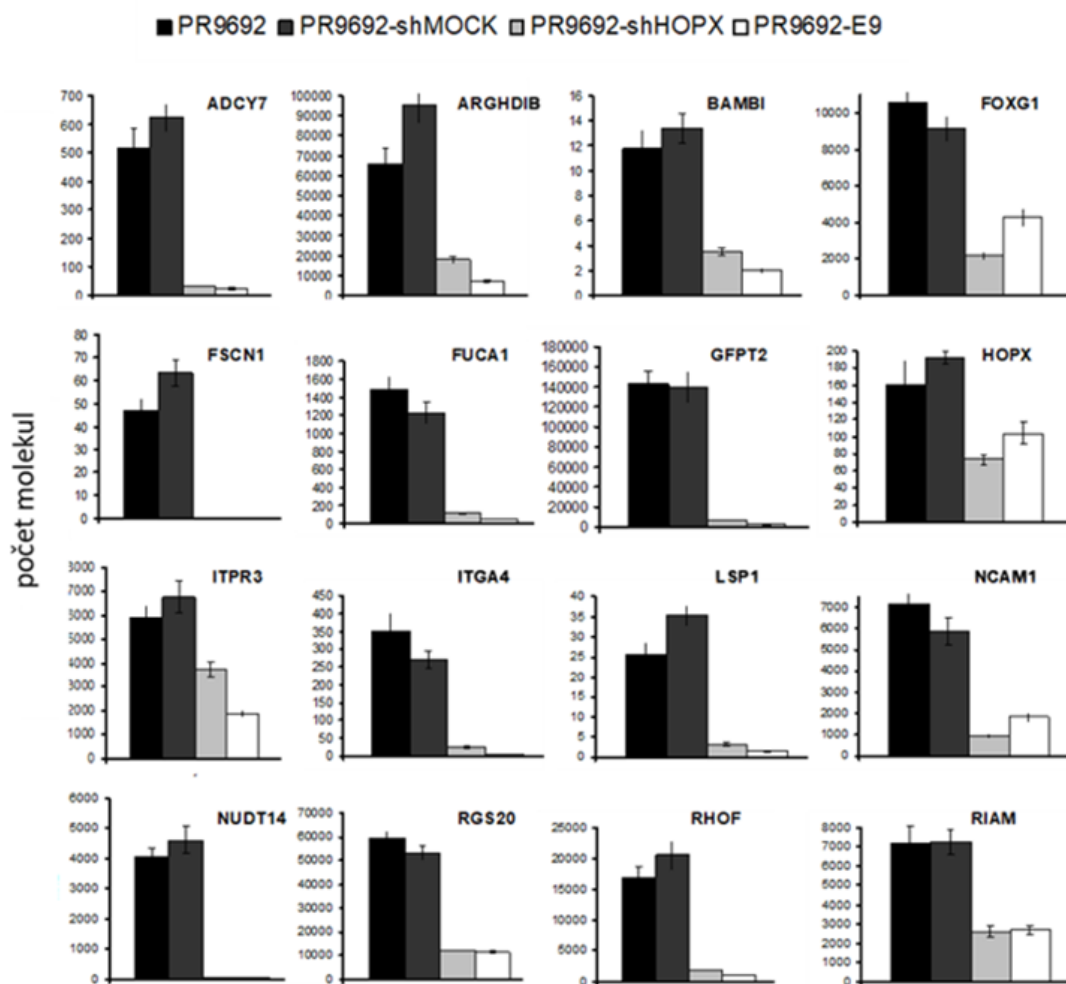
Symbol genu	Mezinárodní (anglicky) jméno genu	Změna log ₂ (PR9692shHOP vs. PR9692-shMOCK)	Hodnota P (PR9692shHOP vs. PR9692-shMOCK)	Změna log ₂ (PR9692-E9 vs. PR9692)	Hodnota P (PR9692-E9 vs. PR9692)
ADCY7	adenylate cyclase 7	-15.013	0.000	-29.929	0.000
ANXA7	annexin A7	-16.042	0.000	-126.263	0.000
ARHGDI1B	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	-2.597	0.003	-5.320	0.000
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog	-6.627	0.000	-9.066	0.000
DNM1	dynamamin 1	-8.172	0.001	-5.833	0.001
FOXP1	forkhead box G1	-2.687	0.022	-2.155	0.027
FSCN1	fascin homolog 1, actin-bundling protein	-13.139	0.001	-6.842	0.002
FUCA1	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	-24.395	0.000	-15.404	0.000
GFPT2	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	-55.721	0.000	-251.417	0.000
GSR	glutathione reductase	-42.586	0.000	-29.441	0.000
HTR1D	5-hydroxytryptamine receptor 1D, G protein-coupled	-192.015	0.000	-9.542	0.000
ITGA4	integrin, alpha 4	-2.601	0.006	-196.727	0.000
ITPR3	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 3	-19.539	0.000	-21.216	0.000
KIAA1210	KIAA1210	4.111	0.000	12.099	0.000
LAMB1	laminin, beta 1	-17.410	0.001	-2.681	0.046
LHFPL5	lipoma HMGIC fusion partner-like 5	-19.196	0.001	-70.501	0.000
LSP1	lymphocyte-specific protein 1	-17.073	0.000	-37.097	0.000
MAPK11	mitogen-activated protein kinase 11	-14.056	0.000	-5.475	0.001
NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	-12.569	0.001	-31.376	0.000
NUDT14	nudix-type motif 14	-63.491	0.000	-18.548	0.000
PACSN3	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3	-16.870	0.001	-7.897	0.001
RAB15	ras-related protein Rab-15	-70.320	0.000	-54.899	0.000
RGS20	regulator of G-protein signaling 20	-18.632	0.000	-4.004	0.003
RHOF	ras homolog gene family, member F	-17.316	0.000	-7.873	0.000
RIAM	Rap1-GTP-interacting adapter molecule	-43.213	0.000	-13.357	0.000
SALL3	sal-like 3 (Drosophila)	3.656	0.043	6.707	0.004
SLC16A10	solute carrier family 16, member 10	9.468	0.019	5.911	0.022
SLC22A3	solute carrier family 22	-92.347	0.000	-30.656	0.000
TTC32	tetratricopeptide repeat domain 32	-33.421	0.000	-10.161	0.000

U vybraných genů, které jsou známé svým vlivem na buněčnou migraci, adhezi či angiogenezi jsme výsledky z mikročipové analýzy ověřili pomocí qRT-PCR. Jedná se o geny *ADCY7*, *ARHGDI1B*, *BAMBI*, *FOXP1*, *FSCN1*, *GFPT2*, *ITPR3*, *ITGA4*, *LSP1*, *NCAM1*, *NUDT14*, *RGS20*, *RHOF* a *RIAM* (Worth et al. 2010; Liu et al. 2005; Al-Alwan et al. 2011; Guillot et al. 2012; Kanamori et al. 2007; Chan et al. 2009; Zecchini et al. 2011; Agarwal et al. 2013; Choi, Jang, and Kim 2011; Ellis and Mellor 2000; Zhou et al. 2006; Liu et al. 2008; Riker et al. 2008; Kil et al. 1998; Hata et al. 2004). Výsledky získané pomocí qRT-PCR (Obr. 16b) byly v souladu s mikročipovými daty a potvrdily spolehlivost mikročipové analýzy. V případě genů *ITGA4*, *NCAM1*, *FOXP1* a samotného *HOPX* jsme výsledky ještě potvrdili na proteinové úrovni (Obr. 16a). Mezi kandidátními geny se objevil i dříve zmíněný *LSP1*. Vzhledem k jeho rozporuplným výsledkům *in vitro* a *in vivo* jsme se jeho možnou interakcí se signální drahou HOPX nezabývali.

A



B



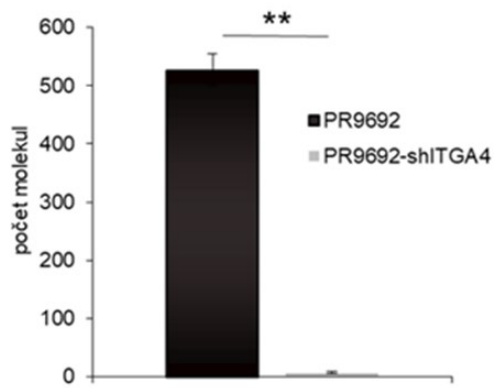
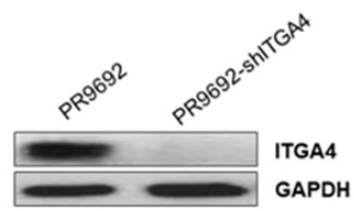
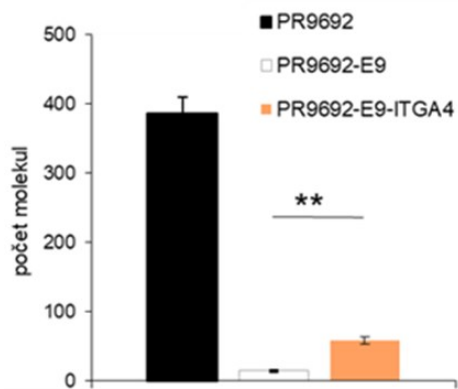
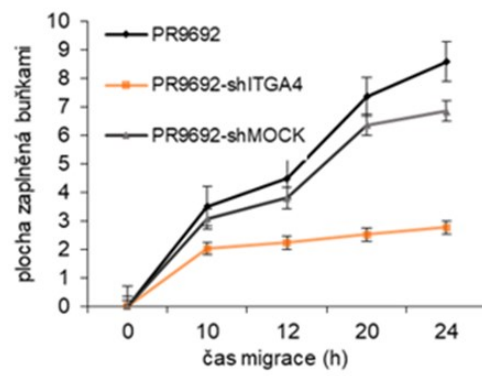
Obr. 16. Ověření exprese genů vybraných na základě mikročipové analýzy. A) Expresse genů HOPX, NCAM1, ITGA4 a FOXG1 v buňkách PR9692, PR9692-shMOCK, PR9692-shHOPX, PR9692-E9 na proteinové úrovni analyzována pomocí Western blotting. Blot GAPDH je ukázán jako kontrola nanášky. **B)** Expresse ADCY7, ARGHDIB, BAMBI, FOXG1, FSCN1, FUCA1, GFPT2, HOPX, IPTR3, ITGA4, LSP1, NCAM, NUDT14, RGS20, RHOF a RIAM v buňkách PR9692 (černá), PR9692-shMOCK (tmavě šedá), PR9692-shHOPX (světle šedá) a PR9692-E9 (bílá) analyzována pomocí qRT-PCR ve třech nezávislých experimentech.

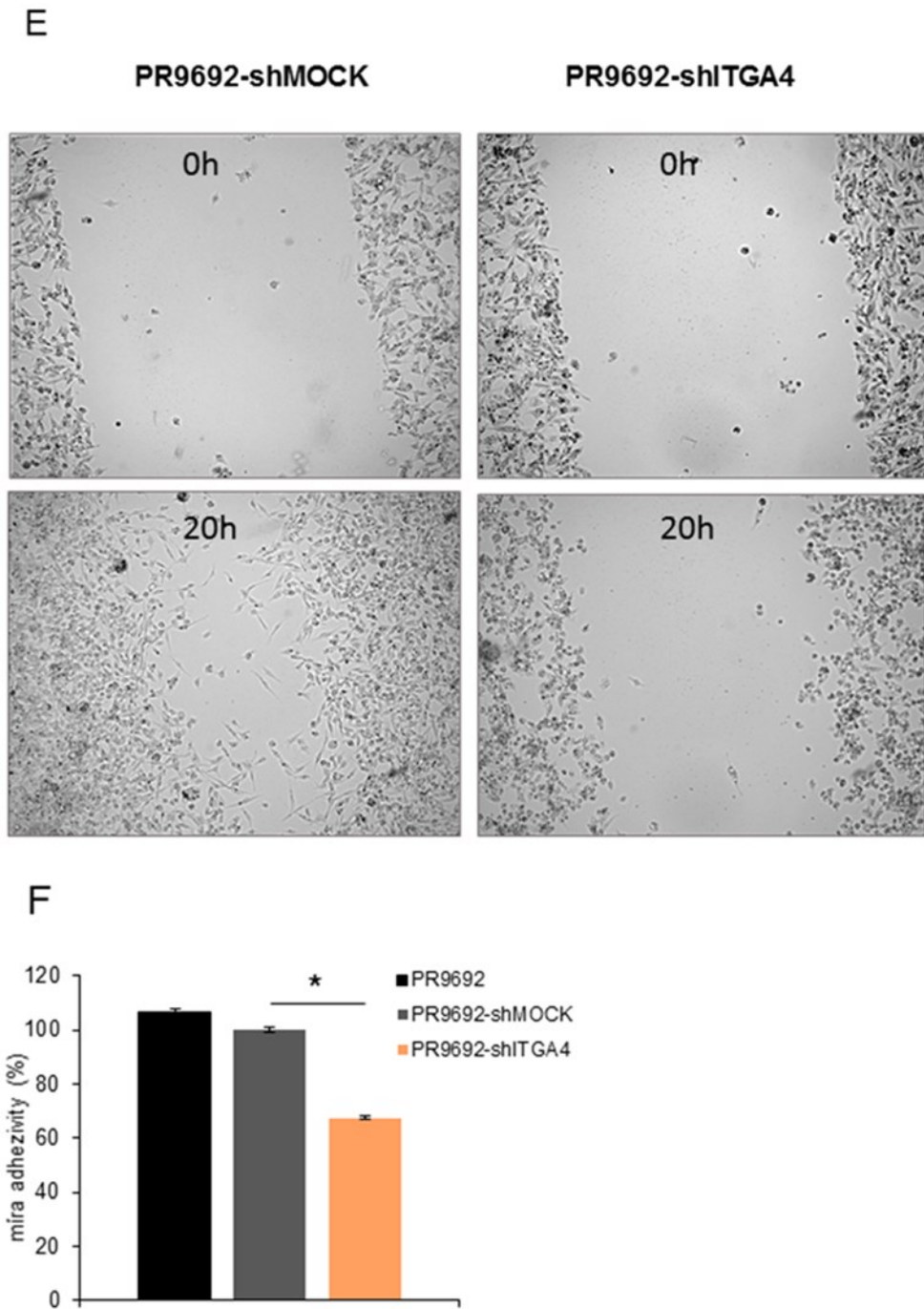
5.5. Snížená exprese genu *ITGA4* vede k inhibici buněčné adhezivity a migrace

Gen, který nás zaujal, byl integrin alfa 4 (*ITGA4*), pomocí kterého jsme chtěli ověřit naše závěry o kandidátních genech vyvozené na základě mikročipových dat. Podle našich výsledků byla exprese *ITGA4* vyšší v metastázujících buňkách PR9692 a PR9692-shMOCK. Expresi *ITGA4* v buňkách PR9692 jsme snížili prostřednictvím shRNA proti *ITGA4*, obdobným způsobem jako v případě *HOPX*. Velmi efektivní snížení exprese patrné na úrovni mRNA (Obr. 17a) koresponduje s chybějícím signálem také na proteinové úrovni (Obr. 17b). V buňkách PR9692-E9 jsme naopak chtěli zvýšit expresi *ITGA4* retrovirovou infekcí s využitím vektoru pSFCV-ITGA4 obdobně jako při přípravě buněk PR9692-E9-HOPX. Dle úrovně mRNA se nám expresi podařilo více než ztrojnásobit (Obr. 17c). I přes kontrolu primární sekvence a snahu optimalizovat sekvenci v blízkosti transkripčního startu se transkript genu *ITGA4* pravděpodobně nepřekládal a na proteinové úrovni jsme jeho signál nezaznamenali (data neukázána).

Vliv *ITGA4* na buněčnou motilitu jsme v případě buněk 9692shITGA4 testovali pomocí migračního testu na kultivačních miskách pokrytých fibronektinem, který je ligandem transmembránových heterodimerů integrinů $\alpha4/\beta1$ a $\alpha4/\beta7$ (Matsunaga et al. 2003). Pomocí časosběrných mikroskopových snímků jsme po 24 hodin sledovali zaplňování rýhy v monovrstvě buněk PR9692-shITGA4 a kontrolních buněk PR9692 a PR9692-shMOCK. Plocha zaplněná buňkami PR9692 a PR9692-shMOCK byla 2,9krát větší ($P = 0,027$) než v případě PR9692-shITGA4 (Obr. 17d). Okraje rýhy v monovrstvě buněk PR9692-shITGA4 zůstaly i po 20 hodinách od zahájení experimentu vzdálené (Obr. 17e).

Během kultivace buněk PR9692-shITGA4 jsme si povšimli jejich nižší přilnavosti k ničím nepokryté kultivační misce a mírného zakulacení buněk, které je ve velké míře patrné u nemetastázujícího subklonu PR9692-E9 (Cermak et al. 2010). Integriny jsou buněčné adhezivní proteiny a snížení přilnavosti buněk k substrátu je známkou invazivního charakteru některých typů nádorů (Chaffer and Weinberg 2011). Naše pozorování jsme ověřili pomocí testu adhezivity na fibronektin. Zjistili jsme, že adheze buněk PR9692-shITGA4 na fibronektin byla snížena o 33% ($P < 0,05$) ve srovnání s kontrolními buňkami (Obr. 17f).

A**B****C****D**



Obr. 17. Snížená exprese *ITGA4* a její vliv na buněčnou migraci a adhezivitu *in vitro*:
 A) Snížená exprese *ITGA4* na úrovni mRNA měřená pomocí qRT-PCR v buňkách PR9692 (černá) a PR9692-shITGA4 (oranžová) ve třech experimentech s použitím triplikátů (**, $P < 0,01$), B) Snížená exprese *ITGA4* na proteinové úrovni analyzovaná pomocí Western blottingu. Blot GAPDH byl použit jako kontrola nanášky. C) Zvýšená exprese *ITGA4* na úrovni mRNA měřená pomocí qRT-PCR v buňkách PR9692 (černá), PR9692-E9 (bílá) a PR9692-shITGA4 (světle šedá) ve třech experimentech s použitím triplikátů (**, $P < 0,01$) D) Buněčná migrace analyzovaná jako plocha obsazená buňkami v rýze v monovrstvě buněk v čase. Analyzována byla šířka rýhy z pěti experimentů s použitím buněk PR9692 (černá), PR9692-shMOCK (tmavě šedá) a PR9692-shITGA4 (oranžová). E) Snímek fázového kontrastu rýhy v monovrstvě buněk PR9692-shMOCK (vlevo) a PR9692-shITGA4 (vpravo) v čase 0 a 20 hodin od zahájení experimentu. F) Adhezivní vlastnosti buněk na povrch pokrytý fibronektinem vyjádřené v procentech ze tří nezávislých experimentů (*, $P < 0,05$).

Abychom detailněji prozkoumali invazivní potenciál buněk se sníženou expresí *ITGA4*, provedli jsme test na 3D kolagenovou invazivitu na buňkách PR9692-shITGA4. Inhibice exprese *ITGA4* vedla k poklesu buněčné invazivity o 72% (Obr. 13e).

Výše uvedená data dokládají, že *ITGA4* podporuje migraci a invazi kuřecích modelových linií.

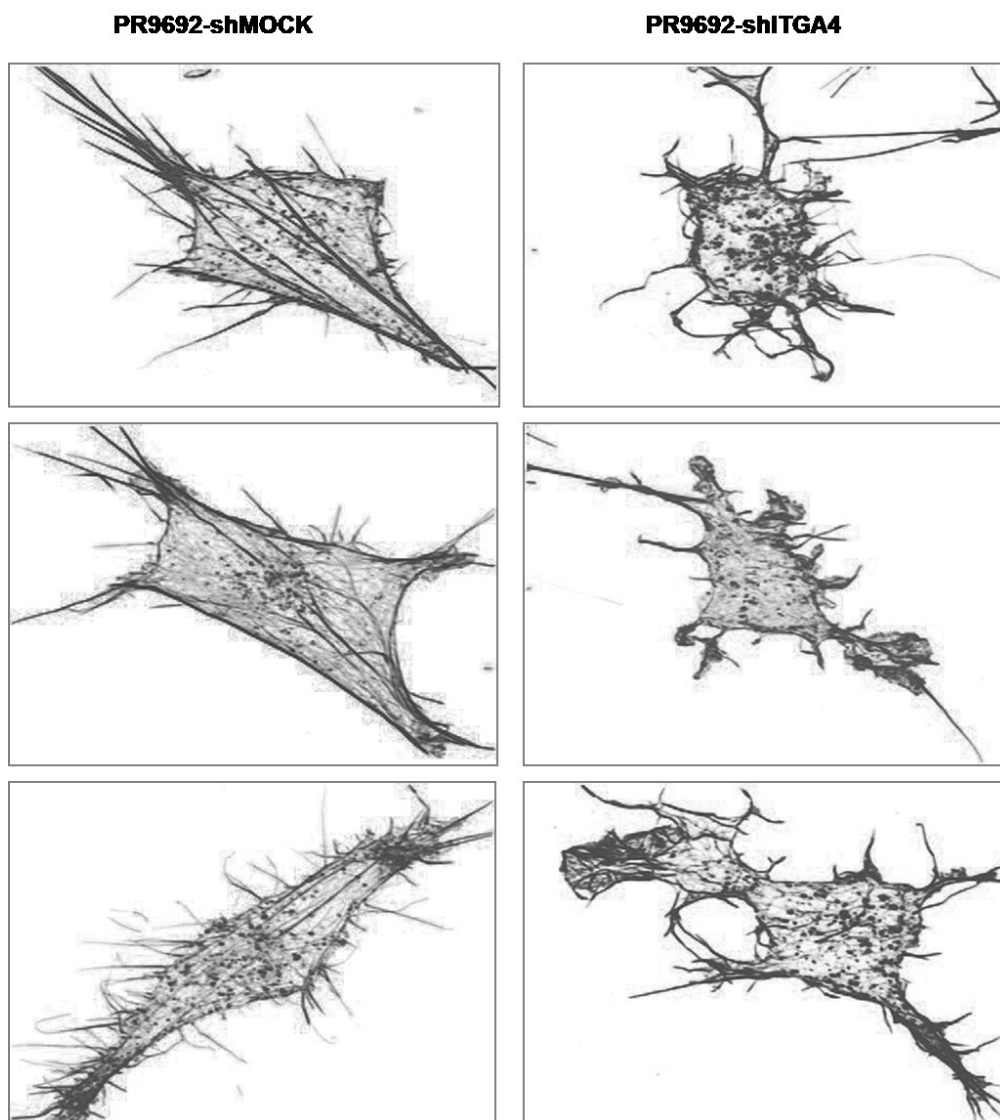
V souladu se změnami buněčné pohyblivosti, přilnavosti k substrátu a invazivitě ve 3D kolagenu je i pozorovaný vliv *ITGA4* na organizaci aktinového cytoskeletu v buňkách PR9692-shITGA4. Charakteristikou mezenchymových migrujících buněk je přítomnost aktinových stresových vláken (Vallénus 2013), jejichž úbytek jsme pozorovali po snížení exprese *ITGA4* (Obr. 18). Kontrolní buňky PR9692-shMOCK mají jasně patrná stresová vlákna v celé délce buňky s viditelnou předozadní buněčnou polaritou. Naopak PR9692-shITGA4 mají zkrácená aktinová vlákna a ztracenou buněčnou polaritu s četnými malými výběžky.

ITGA4 se tak podílí na typické morfologii buněk a s tím související schopnosti buňky adherovat a cíleně řídit svůj pohyb.

5.6. Snížená exprese genu *ITGA4* vede k inhibici metastázování

Efekt snížené exprese *ITGA4* na formování metastáz byl testován *in vivo* v kuřatech linie CCR1. Jak bylo uvedeno výše, buňky PR9692 a PR9692-shMOCK vyvolávaly tvorbu primárních nádorů a metastáz ve 100% kuřat (Tab. 3). Po inokulaci buňkami PR9692-shITGA4 vytvořila všechna kuřata primární sarkomy a po 37 dnech od inokulace byla provedena pitva k analýze přítomnosti metastáz. Kuřata vyvinula pouze malé až středně velké metastázy a to ve 27% případů (Tab. 3).

Tyto výsledky prokazují, že snížená exprese *ITGA4* koreluje se sníženou pohyblivostí, adhezí a invazivitou buněk PR9692-shITGA4 *in vitro* a se sníženou tvorbou plicních metastáz *in vivo*. *ITGA4* se tedy účastní procesů charakteristických pro metastázující buňky. Experimenty potvrdily spolehlivost našeho experimentálního systému pro hledání genů asociovaných s metastázováním.



Obr. 18. Změny v aktinovém cytoskeletu indukované snížením exprese *ITGA4* v buňkách PR9692-shMOCK (vlevo) a PR9692-shITGA4 (vpravo).

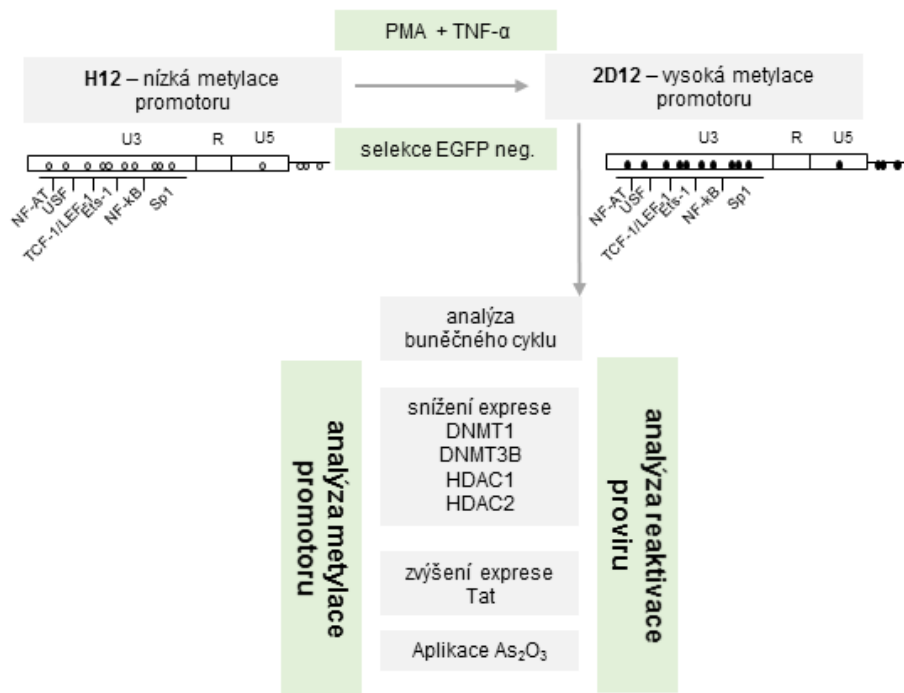
Z výše uvedených výsledků vyplývá, že s pomocí našeho unikátního kuřecího modelového systému jsme prokázali vliv hladiny transkripčního faktoru HOPX na tvorbu metastáz. Porovnáním aktivity genů s použitím mikročipové technologie v buňkách s modulovanou expresí *HOPX* jsme vybrali další kandidátní geny, které by mohly hrát významnou roli v různých fázích metastatického procesu.

V další části doktorské práce jsem se opět zabývala genovou expresí, tentokrát její epigenetickou regulací, která je zásadní pro latenci proviru HIV-1.

5.7. Modelové buněčné linie pro studium latence HIV-1 a vývoje metylace DNA proviru HIV-1

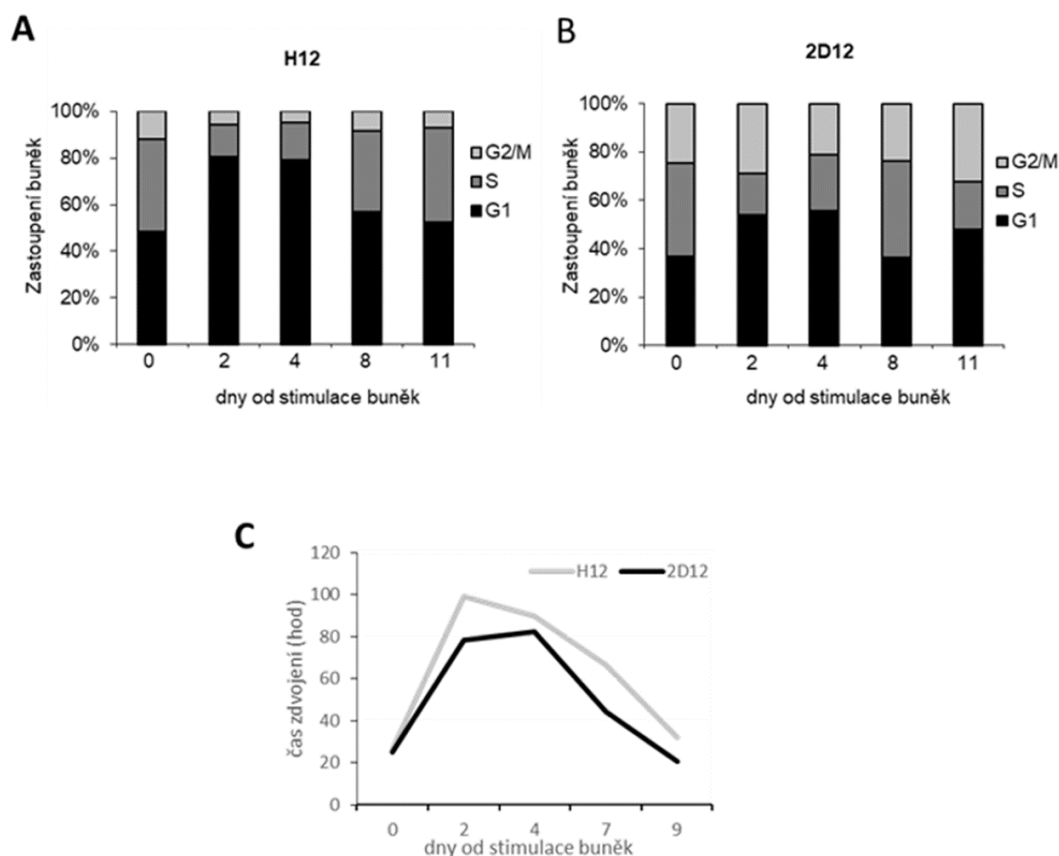
Role metylace DNA v latenci HIV-1 je předmětem intenzivního zkoumání. V naší dřívější studii jsme vytvořili buněčný modelový systém latence HIV-1 (Blazkova et al. 2009). Ten je založen na dvou buněčných klonech H12 a 2D12 odvozených z linie lidských imortalizovaných CD4⁺ T-lymfocytů Jurkat. Klony H12 a 2D12 v sobě nesou replikačně nekompetentní latentní “mini-provirus” HIV-1 skládající se z LTR-Tat-IRES-EGFP-LTR. V klidovém stavu je provirus latentní a neexprimuje se, nicméně působením nejrůznějších činidel může být reaktivován a procento buněk s reaktivovaným provirem může být měřeno podle procenta buněk pozitivních na EGFP. Činidla, která reaktivují provirus, mohou nebo nemusí současně stimulovat buňky a expresi aktivačních markerů, například časného aktivačního markeru CD69. V klonech H12 i 2D12 je jedna nepoškozená provirová kopie, která je integrována do stejného místa lidského genomu v genu pro *Ubiquilin 1*. Klon H12 vykazuje nízkou hladinu metylace DNA na 5'LTR a latentní provirus je zde snadno reaktivovatelný různými agens včetně PMA a TNF- α . Naopak klon 2D12 vykazuje vysokou hladinu metylace DNA na 5'LTR a latentní provirus je v těchto buňkách rezistentní k reaktivaci (Blazkova et al. 2009). Klon 2D12 byl odvozen z buněk H12, a to selekcí subklonů negativních na EGFP po předchozí stimulaci PMA a TNF- α (Obr. 19). Byl vytvořen model, podle něhož histonové modifikace na promotoru HIV-1 zajišťují první stupeň latence (klon H12), dodatečná metylace DNA pak zajišťuje „hlubší“, obtížněji reaktivovatelnou latenci (klon 2D12) (Blazkova et al. 2009).

V tomto projektu jsme studovali možnost přímé souvislosti mezi latencí HIV-1 a metylací DNA na promotoru HIV-1, k čemuž jsme využili rozdílnou schopnost reaktivace proviru mezi buňkami H12 a 2D12. Naším cílem bylo dosáhnout účinné reaktivace proviru v buňkách 2D12, což mělo být umožněno, podle našeho předpokladu, snížením metylace DNA na promotoru. Schéma experimentů je znázorněno na obrázku 19.



Obr. 19. Schéma experimentů pro studium latence HIV-1

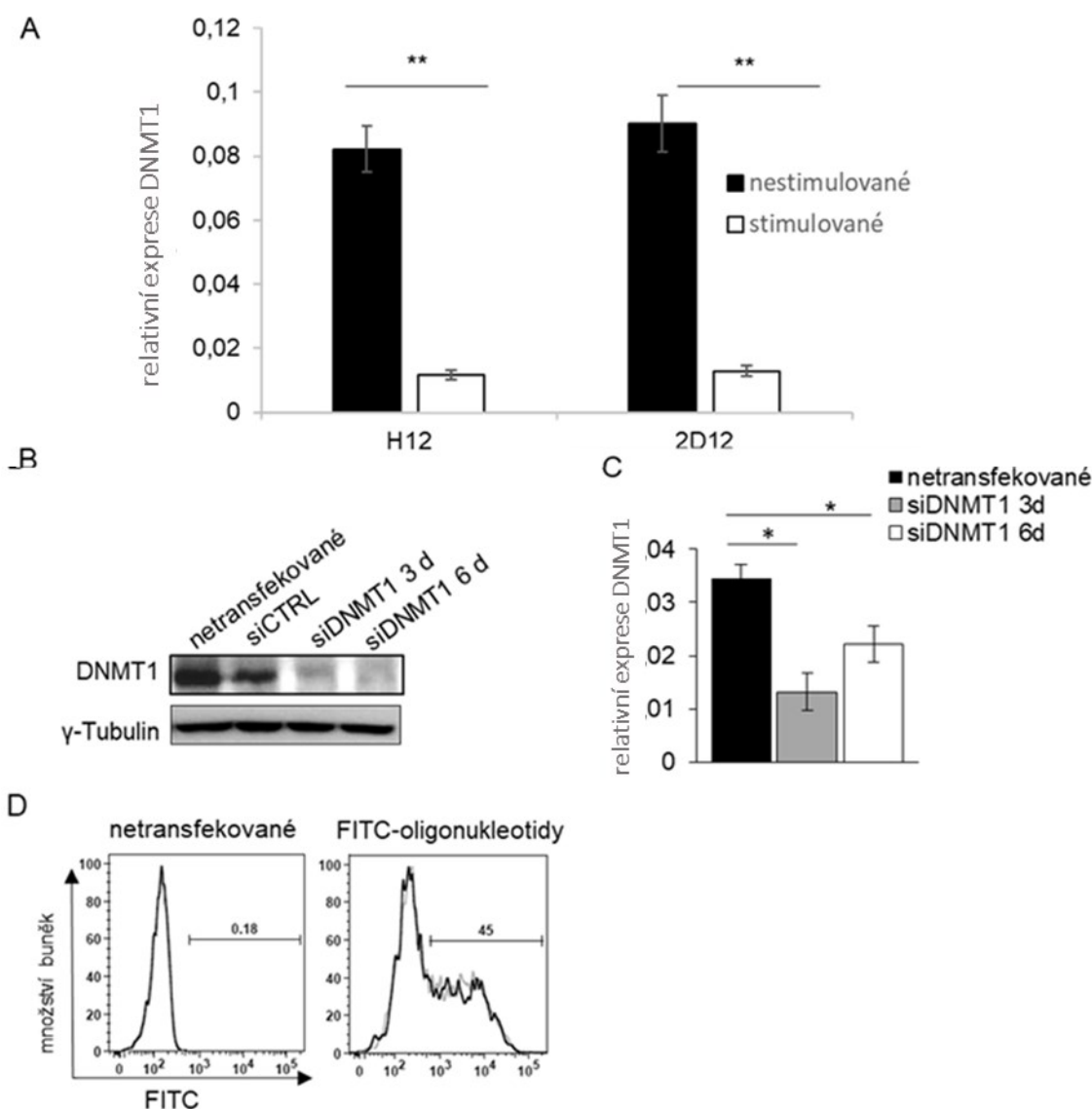
Udržování již zavedené metylace DNA, případně pasivní demethylace, probíhají při replikaci DNA v S fázi buněčného cyklu. Abychom zjistili jak agens PMA a TNF- α používané ke stimulaci buněk 2D12 a H12 ovlivňují proliferaci, analyzovali jsme buněčný cyklus těchto buněk za použití barvení intaktního jádra propidium jodidem. Tato analýza prokázala, že stimulace buněk PMA a TNF- α vede k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, které je nejpatrnější 48 hodin po stimulaci (Obr. 20a a 20b) a to zejména v buňkách H12. Prodloužení G1 fáze trvá v buňkách 2D12 i H12 až do jedenáctého dne od stimulace, nicméně výrazná změna je patrná do čtyř dní po stimulaci, a to zejména v buňkách H12, které vykazují i vyšší procento buněk s reaktivovaným provirem (Obr. 20a a 20b). Změny v zastoupení buněk v jednotlivých fázích cyklu korespondují se změnami času zdvojení (Obr. 20c). Druhý den po stimulaci buněk 2D12 a H12 dochází k výraznému prodloužení času zdvojení obzvláště v buňkách H12. Devátý den od stimulace je čas zdvojení kolem 24 h, což odpovídá času zdvojení nestimulovaných buněk. Naměřené hodnoty dokládají, že stimulace buněk, zejména v kombinaci s reaktivací proviru HIV-1 prodlužuje G1 fázi a zpomaluje buněčnou proliferaci, přičemž tento účinek je nejvýraznější do čtyř dní po infekci.



Obr. 20. Vliv stimulace buněk H12 a 2D12 na buněčný cyklus a proliferaci *in vitro*: A) Analýza buněčného cyklu buněk H12 0 – 11 dní po stimulaci PMA a TNF- α . B) Analýza buněčného cyklu buněk 2D12 0 – 11 dní po stimulaci PMA a TNF- α . Množství buněk v G1 fázi (černá), S fázi (tmavě šedá) a G2 fázi (bílá) byly naměřeny pomocí průtokové cytometrie ve třech nezávislých experimentech. C) Míra proliferace buněk H12 (šedá) a 2D12 (černá) znázorněna jako čas zdvojení v hodinách. Data ve všech panelech reprezentují průměr 3 paralelních buněčných kultur.

5.8. Vliv *DNMT1* a *DNMT3B* na reaktivovatelnost proviru HIV-1

Protože hladina metylace 5'LTR promotoru v klonech 2D12 a H12 negativně koreluje s reaktivovatelností proviru a tedy s expresí *EGFP* (Blazkova et al. 2009), chtěli jsme blíže prozkoumat roli metyltransferáz v tomto procesu. V první řadě jsme se zaměřili na *DNMT1*, která je zodpovědná za udržení metylačního vzorce DNA po replikaci (Hermann, Goyal, and Jeltsch 2004). Pomocí qRT-PCR jsme analyzovali expresi *DNMT1* v klonech H12 a 2D12 před a po stimulaci buněk pomocí PMA a TNF- α . Bez stimulace mají buňky H12 i 2D12 srovnatelnou hladinu exprese *DNMT1*. Po stimulaci klesla exprese *DNMT1* téměř 5krát u klonu H12 i 2D12 (Obr. 21a). V linii 2D12 s vysokou hladinou metylace 5'LTR jsme se rozhodli snížit hladinu *DNMT1* pomocí siRNA (siDNMT1), které zajišťují tranzientní snížení exprese cílového genu, a pozorovat vliv snížené hladiny *DNMT1* na reaktivaci HIV-1 a hladinu metylace DNA 5'LTR.



Obr. 21. Expresa *DNMT1* v buňkách H12 a 2D12: A) Expresa *DNMT1* v buňkách H12 a 2D12 před a po stimulaci na úrovni mRNA měřená pomocí qRT-PCR. Data normalizované exprese pochází ze třech experimentů s použitím triplikátů (***, $P < 0,01$) B) Expresa *DNMT3B* v buňkách H12 a 2D12 před a po stimulaci na úrovni mRNA měřená pomocí qRT-PCR. Data normalizované exprese pochází ze třech experimentů s použitím triplikátů (***, $P < 0,01$). C) Expresa *DNMT1* v buňkách 2D12 transfekovaných siCTRL a siDNMT1 3 a 6 dní po transfekci na proteinové (vlevo) a mRNA (vpravo) úrovni, blot γ -Tubulin je ukázán jako kontrola nanášky, Hladina mRNA byla naměřena pomocí qRT-PCR. Data normalizované exprese pochází ze třech experimentů s použitím triplikátů (*, $P < 0,05$, ****, $P < 0,0001$). D) Transfekční účinnost v buňkách 2D12 měřená transfekcí oligonukleotidů značených FITC na průtokovém cytometru. Data pochází ze dvou experimentů (značené černou a šedou linií).

Snížení exprese *DNMT1* jsme analyzovali na proteinové i mRNA úrovni 3. a 6. den po transfekci (*, $P < 0,05$, obr. 21b a 21c). Účinnost transfekce siRNA ověřená pomocí fluorescenčně značených oligonukleotidů byla asi 40% (Obr. 21d).

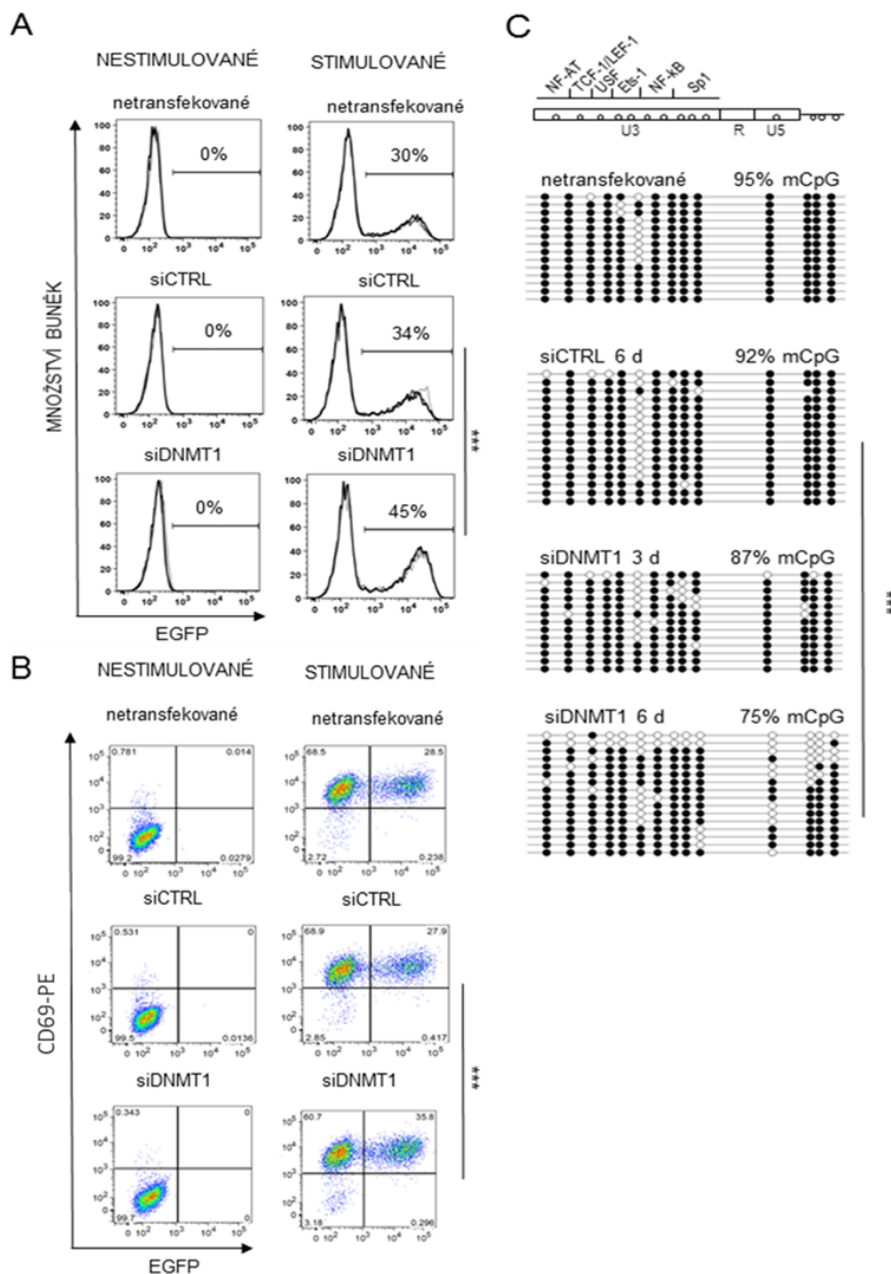
V buňkách 2D12 se sníženou expresí *DNMT1* 6 dní po transfekci siDNMT1 jsme pomocí průtokového cytometru změřili expresi EGFP, tedy reaktivaci proviru HIV-1 v buňkách 2D12.

Samotné snížení exprese *DNMT1* nevedlo k reaktivaci proviru, ale v kombinaci s PMA a TNF- α došlo k reaktivaci proviru ve vyšším počtu buněk. Rozdíl ve srovnání s kontrolními buňkami transfekovanými kontrolní siRNA (siCTRL) představoval 11% (***, $P < 0,001$, obr. 22a). Navíc se po snížení exprese *DNMT1* nezměnila exprese časného aktivačního markeru CD69 před i po stimulaci buněk (Obr. 22b). V případě siCTRL i siDNMT1 bylo stimulováno kolem 95% buněk. Provirus byl reaktivován právě v buňkách pozitivních na CD69. Transfekce siCTRL neovlivnila reaktivovatelnost proviru v nestimulovaných buňkách 2D12 ani v buňkách stimulovaných PMA a TNF- α (Obr. 22a).

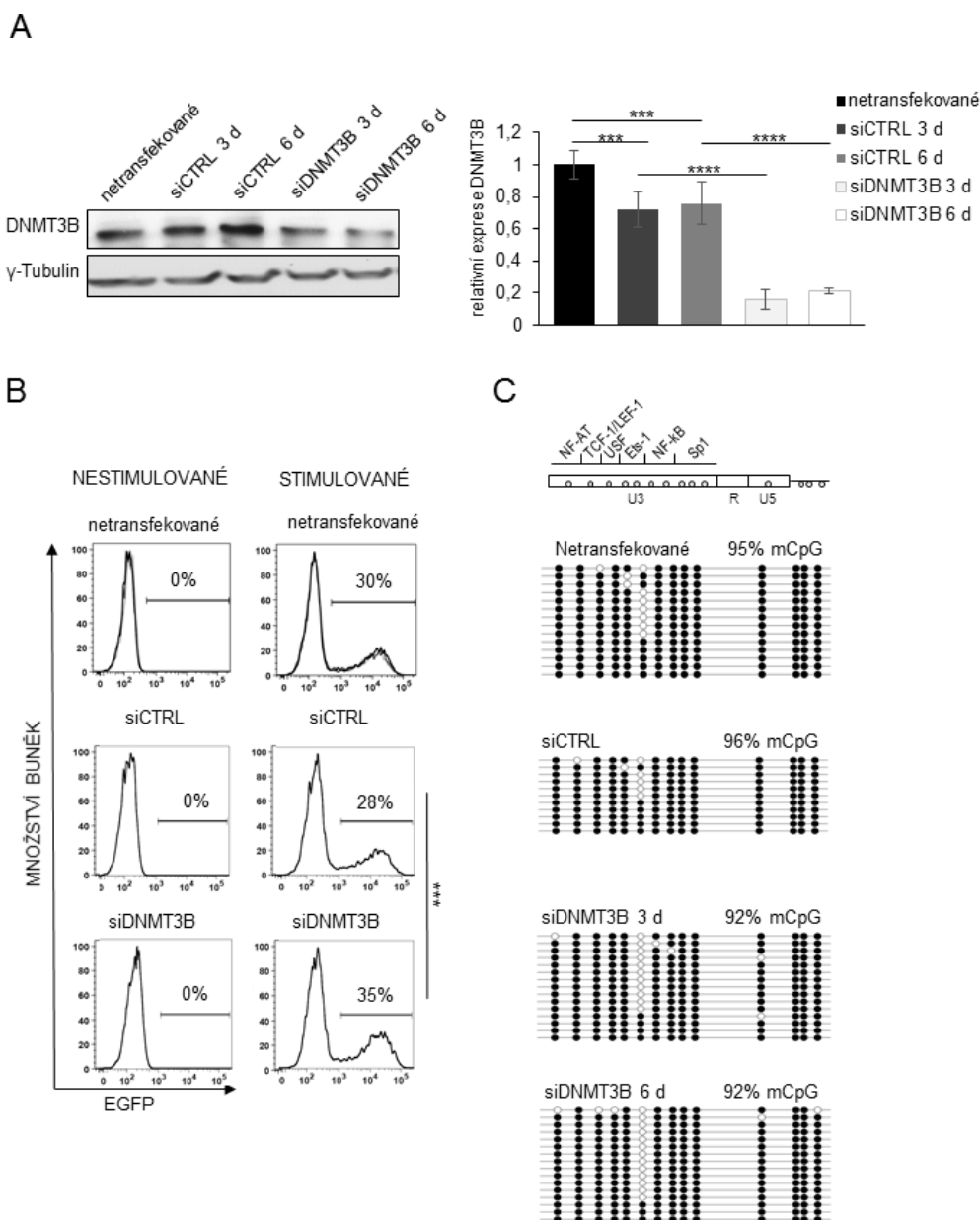
Dále jsme se chtěli přesvědčit, jestli snížená exprese *DNMT1* ovlivnila metylaci DNA 5'LTR. Hladinu metylace jsme analyzovali pomocí bisulfitového sekvenování. Po transfekci siCTRL jsme nepozorovali žádný pokles v metylaci 5'LTR. Naopak po transfekci siDNMT1 nastal mírný pokles metylace 5'LTR tři dny po transfekci siDNMT1 a tento pokles se zvětšil až na 17% rozdíl šestý den po transfekci siDNMT1 (***, $P < 0,01$, obr. 22c).

V dalších experimentech jsme se zaměřili na *DNMT3B*, která je zodpovědná za metylaci DNA *de novo* (Hermann, Gowher, and Jeltsch 2004). Pomocí siDNMT3B jsme snížili expresi *DNMT3B* v buňkách 2D12 a tento pokles jsme ověřili na proteinové i mRNA úrovni (Obr. 23a). Stejně jako v případě siDNMT1, samotná transfekce siDNMT3B nezpůsobila reaktivaci proviru HIV-1 měřenou 6 dní po transfekci. Po přidání PMA a TNF α došlo k mírnému nárůstu počtu EGFP pozitivních buněk o 7% ve srovnání s buňkami transfekovanými siCTRL (Obr. 23b). Překvapivě se po bisulfitové analýze tento rozdíl ve schopnosti reaktivace neprojevil na metylaci 5'LTR ani 6 dní po transfekci siRNA (Obr. 23c).

Modulací exprese *DNMT1* a *DNMT3B* pomocí siRNA v buňkách 2D12 jsme prokázali, že snížení *DNMT1* v těchto buňkách vede k vzestupu reaktivovatelnosti proviru a poklesu metylace DNA 5'LTR. V případě *DNMT3B* dochází po snížení její exprese k mírnému nárůstu reaktivovaných provirů, ale metylace 5'LTR ovlivněna není. Udržovací DNA metyltransferáza DNMT1 se tedy přímo účastní udržení latentního stavu proviru HIV-1 pomocí metylace DNA na promotoru HIV-1.



Obr. 22. Vliv snížení exprese *DNMT1* na reaktivaci proviru HIV-1 *in vitro* a metylaci provirového promotoru: A) Míra reaktivace proviru 6 dní po transfekci siDNMT1 nebo siCTRL. Histogramy v levém sloupci reprezentují analýzu bez buněčné stimulace, pravý sloupec reprezentuje histogramy po 24 hodinách stimulace PMA a TNF- α . Tři analýzy naměřené pomocí FACS jsou překryté, průměrné množství pozitivních buněk na EGFP je ukázáno nad křivkou. Hodnota P byla vypočítána nepárovým t-testem (***, $P < 0,001$). B) Míra reaktivace proviru 6 dní po transfekci siDNMT1 nebo siCTRL. Histogramy v levém sloupci reprezentují analýzu bez buněčné stimulace, pravý sloupec reprezentuje histogramy po 24 hodinách stimulace PMA a TNF- α . Fluorescence EGFP je znázorněna na ose X, fluorescence PE-konjugovaná-CD69 na ose Y. Znázorněn je reprezentativní experiment. Hodnota P byla vypočítána nepárovým t-testem. Významnost *** byla stanovena pro $P < 0,001$. C) Hladina metylace CpG 5'LTR v nestimulovaných 2D12 transfekovaných siCTRL nebo siDNMT1(3 a 6 dní po transfekci) je znázorněna jako průměrné procento metylovaných CpG (mCpG) v promotoru HIV-1. Analýza promotorových molekul je ukázána jako řada bílých kroužků reprezentujících nemetylované CpG a černých kroužků reprezentujících metylované CpG. Každá řada reprezentuje jednu sekvenovanou molekulu 5'LTR. Obdelník schematicky znázorňuje U3, R a U5 oblasti v 5'LTR jednotlivě analyzovaných dinukleotidů CpG a vazebná místa transkripčních faktorů. Hodnoty P byly spočítány neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem (***, $P < 0,001$).



Obr. 23. Vliv hladiny *DNMT3B* na reaktivaci proviru HIV-1 a metylaci provirového promotoru: A) Proteinová hladina (vlevo) DNMT3B v buňkách 2D12 transfekovaných siCTRL a siDNMT3B 3 a 6 dní po transfekci, blot γ -Tubulin je ukázán jako kontrola nanášky a hladina mRNA (vpravo) DNMT3B v buňkách 2D12 transfekovaných siDNMT3B 0 (kontrola), 3 a 6 dní po transfekci naměřená pomocí qRT-PCR. Data normalizované exprese pochází ze třech experimentů s použitím triplikátů (***, $P < 0,001$ a ****, $P < 0,0001$). B) Míra reaktivace proviru 6 dní po transfekci siDNMT3B nebo siCTRL. Histogramy v levém sloupci reprezentují analýzu bez buněčné stimulace, pravý sloupec reprezentuje histogramy po 24 hodinách stimulace PMA a TNF- α . Tři analýzy naměřené pomocí FACS jsou překryté, průměrné množství pozitivních buněk na EGFP je ukázáno nad křivkou. Hodnota P byla vypočítána nepárovým t-testem (***, $P < 0,001$). C) Hladina metylace CpG 5'LTR v nestimulovaných 2D12 transfekovaných siCTRL nebo siDNMT3B (3 a 6 dní po transfekci) je znázorněna jako průměrné procento metylovaných CpG (mCpG) v promotoru HIV-1. Analýza promotorových molekul je ukázána jako řada bílých kroužků reprezentujících nemetylované CpG a černých kroužků reprezentujících metylované CpG. Každá řada reprezentuje jednu sekvenovanou molekulu 5'LTR. Obdélník schematicky znázorňuje U3, R a U5 oblasti v 5'LTR jednotlivě analyzovaných dinukleotidů CpG a vazebná místa transkripčních faktorů.

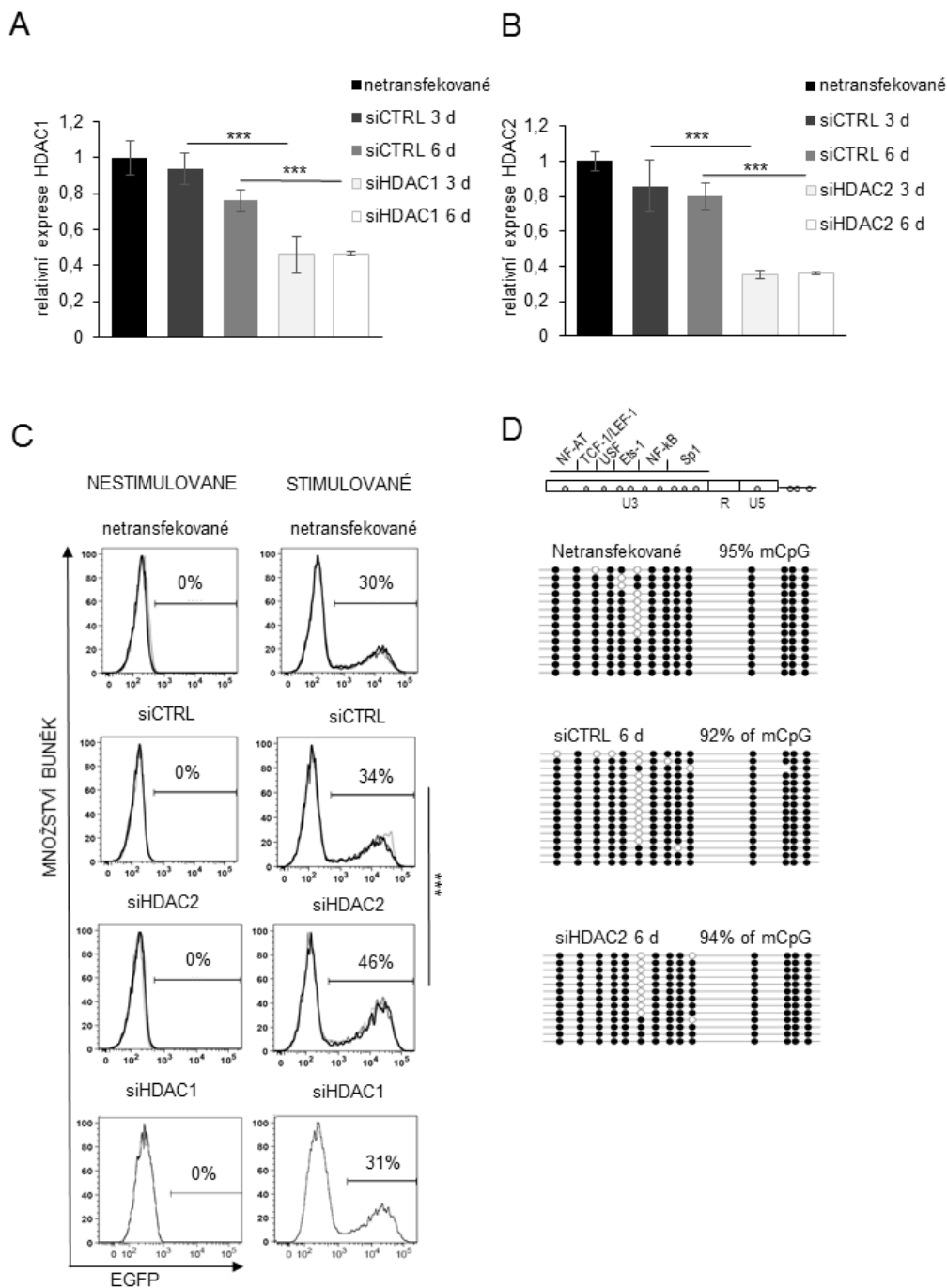
5.9. Vliv *HDAC1* a *HDAC2* na reaktivovatelnost proviru HIV-1

Změny v metylaci DNA jsou často doprovázeny změnami v histonových modifikacích. Naše dřívější studie dokládá, že hypermetylovaný provirový promotor v buňkách 2D12 nese represivní chromatinovou modifikaci H3K9 me3 a H3K27 me3 a po reaktivaci proviru vzrůstá acetylace H3 (Blazkova et al. 2009). Expresi *HDAC1* a *HDAC2* jsme v buňkách 2D12 snížili pomocí specifické siRNA. Expresi *HDAC1* i *HDAC2* na úrovni mRNA významně poklesla tři a šest dní po transfekci siRNA (***, $P < 0,01$, obr. 24a a 24b).

Snížená exprese *HDAC1* neměla žádný efekt na reaktivaci proviru v nestimulovaných ani stimulovaných buňkách 2D12. Naopak snížená exprese *HDAC2* vedla ve stimulovaných buňkách k nárůstu reaktivace proviru o 12% ve srovnání s buňkami transfekovanými siCTRL a o 16% oproti netransfekovaným buňkám 2D12 (***, $P < 0,01$, obr. 24c). Transfekce siHDAC2 v nestimulovaných buňkách neměla žádný efekt.

Bisulfitovou sekvenací jsme analyzovali efekt snížené exprese *HDAC2* na metylaci DNA 5'LTR. Nepozorovali jsme žádný významný pokles metylace DNA. Buňky 2D12 transfekované siHDAC2 vykazovaly 94% metylaci DNA 5'LTR, což bylo srovnatelné s 92% naměřenými v buňkách 2D12 transfekovanými kontrolní siRNA (Obr. 24d).

Výše uvedené výsledky dokládají význam metylace DNA i deacetylace chromatinu pro zachování latence HIV-1. Snížení exprese *HDAC2* vedlo po stimulaci buněk 2D12 PMA a TNF- α k částečné reaktivaci proviru, přesto nedošlo ke změnám hladiny metylace latentního proviru HIV-1. HDAC2 částečně přispívá k udržení latentního stavu proviru HIV-1, tento účinek však není závislý na metylaci DNA.

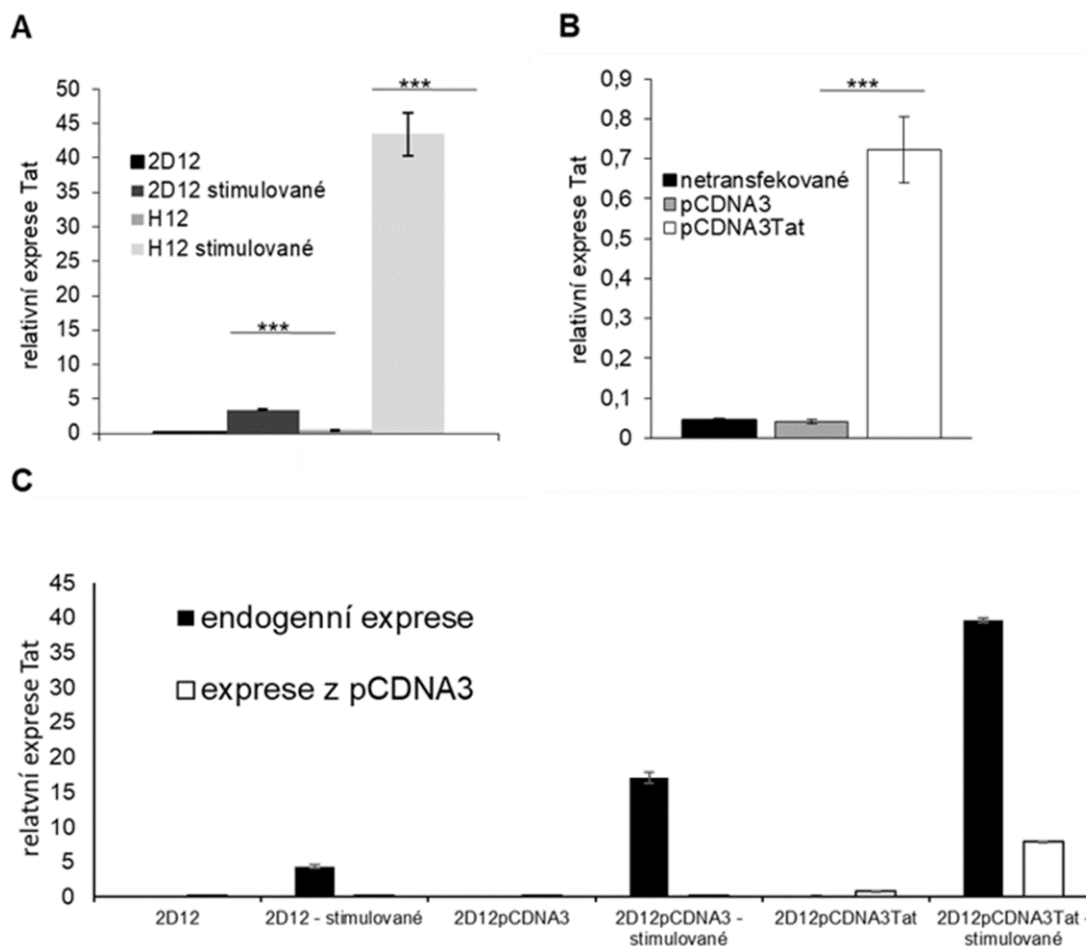


Obr. 24. Vliv hladiny *HDAC1* a *HDAC2* na reaktivaci proviru HIV-1 a metylaci provirového promotoru: A) Expresa HDAC1 a B) expresa HDAC2 v buňkách 2D12 transfekovaných siHDAC1 a siHDAC2 0 (kontrola), 3 a 6 dní po transfekci na úrovni mRNA naměřená pomocí qRT-PCR. Data normalizované expresa pochází ze třech experimentů s použitím triplikátů (***, $P < 0,001$). C) Míra reaktivace proviru 6 dní po transfekci siHDAC2 nebo siCTRL. Histogramy v horní řadě reprezentují analýzu bez buněčné stimulace, dolní řada reprezentuje histogramy po 24 hodinách stimulace PMA a TNF- α . Tři analýzy naměřené pomocí FACS jsou překryté, průměrné množství pozitivních buněk na EGFP je ukázáno nad křivkou. Hodnota P byla vypočítána nepárovým t-testem (***, $P < 0,001$). D) Hladina metylace CpG 5'LTR v nestimulovaných 2D12 transfekovaných siCTRL nebo siHDAC2(6 dní po transfekci) je znázorněna jako průměrné procento metylovaných CpG (mCpG) v promotoru HIV-1. Analýza promotorových molekul je ukázána jako řada bílých kroužků reprezentujících nemetylované CpG a černých kroužků reprezentujících metylované CpG. Každá řada reprezentuje jednu sekvenovanou molekulu 5'LTR. Obdelník schematicky znázorňuje U3, R a U5 oblasti v 5'LTR jednotlivě analyzovaných dinukleotidů CpG a vazebná místa transkripčních faktorů.

5.10. Rozdílná exprese *Tat* v buňkách H12 a 2D12 a její vliv na reaktivovatelnost proviru HIV-1

Součástí “mini-proviru” je kromě EGFP také transaktivační gen *Tat*. Nízké hladiny *Tat* a produkce nematurovaných RNA transkriptů z promotoru HIV-1 jsou známkou latence HIV-1 (Kiernan et al. 1999; Lin et al. 2003). Proto jsme se podívali, jak vypadá hladina exprese *Tat* ve stimulovaných a nestimulovaných buňkách 2D12 a H12. Pomocí qRT-PCR jsme zjistili, že v buňkách 2D12 s hypermetylovaným provirovým promotorem je hladina exprese *Tat* velmi nízká. Po stimulaci buněk 2D12 však jeho exprese stoupne téměř 40krát (***, $P < 0,01$, Obr. 25a). U nestimulovaných buněk H12 s menší hladinou metylace provirového promotoru je exprese *Tat* také poměrně nízká, přesto je 5krát větší než v nestimulovaných 2D12 (*, $P < 0,05$). Po stimulaci buněk H12 dochází k prudkému až stonásobnému nárůstu exprese *Tat* (Obr. 25a).

V dalších experimentech jsme v buňkách 2D12 stabilně zvýšili expresi *Tat* pomocí expresního vektoru pCDNA3*Tat* a následné selekce G418. Jako kontrola byly použity buňky transfekované prázdným vektorem pCDNA3. Exprese celkového *Tat* naměřená pomocí qRT-PCR vzrostla v buňkách 2D12 transfekovaných pCDNA3*Tat* 8krát (***, $P < 0,01$, obr. 25b). Abychom zjistili, jak vnesení exogenního *Tat* ovlivní transkripci z provirového promotoru, navrhli jsme primery, které specificky rozeznávají buď exogenní nebo endogenní *Tat*. V nestimulovaných buňkách 2D12 je *Tat* exprimován dle očekávání zejména z vektoru pCDNA3*Tat*. Po stimulaci buněk 2D12 transfekovaných vektorem pCDNA3*Tat* pomocí PMA a TNF- α dochází k šestinásobnému zvětšení exprese exogenního *Tat* a až ke čtyřicetinásobnému zvětšení transkripce *Tat* z provirového promotoru (***, $P < 0,01$, obr. 25c).



Obr. 25. Expres *Tat* v buňkách 2D12 a H12: A) Expres *Tat* v buňkách H12 a 2D12 před a po stimulaci na úrovni mRNA měřená pomocí qRT-PCR. Data normalizované exprese pochází ze třech experimentů s použitím triplikátů (***, $P < 0,001$) B) Stablně zvýšená exprese *Tat* v buňkách 2D12 transfekovaných pCDNA3Tat nebo pCDNA3 (kontrola) na úrovni mRNA naměřená pomocí qRT-PCR. Data normalizované exprese pochází ze třech experimentů s použitím triplikátů (***, $P < 0,001$). C) Analýza exprese *Tat* v buňkách 2D12 transfekovaných pCDNA3Tat nebo pCDNA3 (kontrola) na úrovni mRNA naměřená pomocí qRT-PCR za použití specifických primerů pro endogenní formu *Tat* (černá) nebo exogenní *Tat* (bílá).

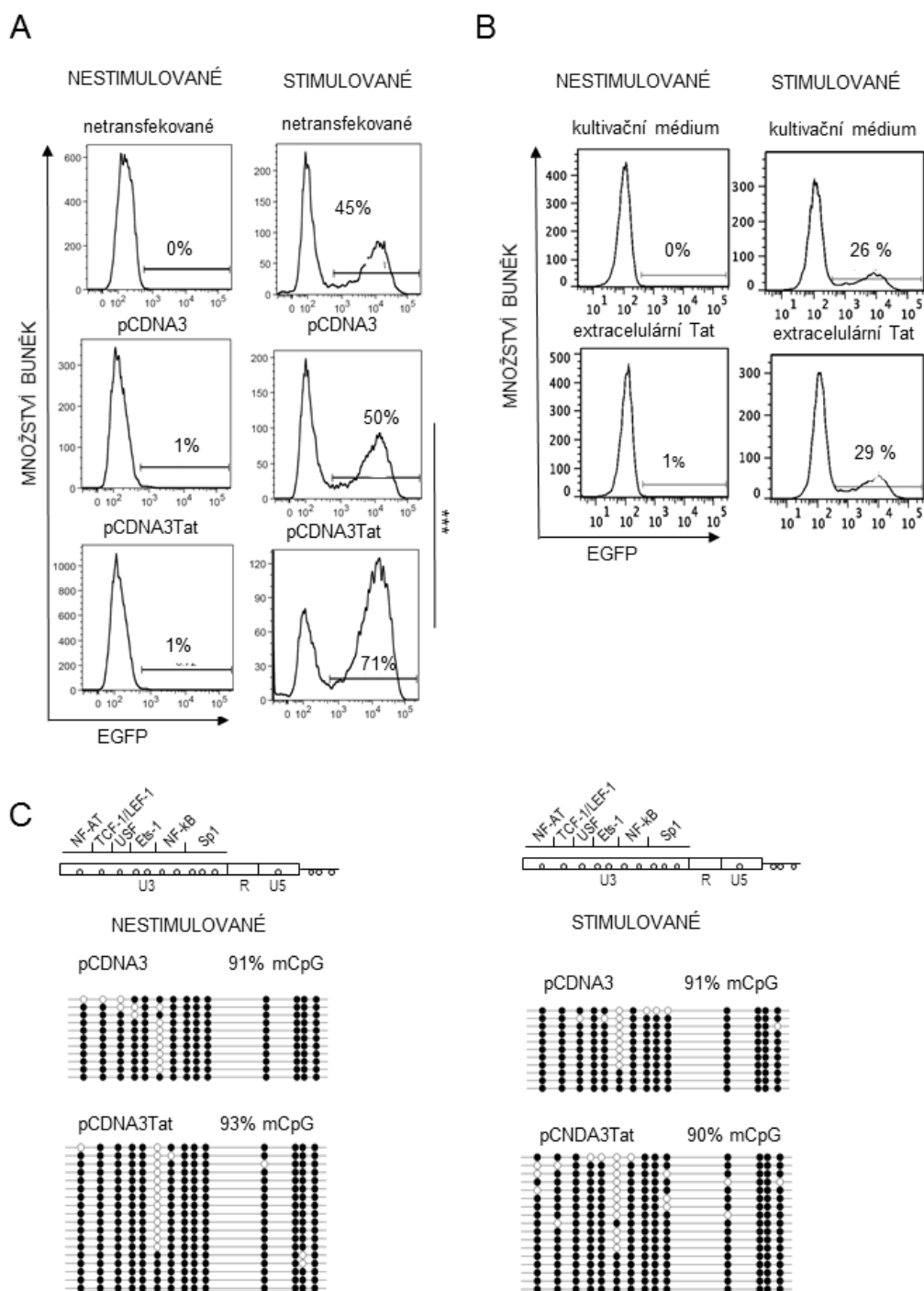
Jaký vliv má zvýšená hladina *Tat* v buňkách 2D12 na expresi EGFP jsme měřili pomocí průtokového cytometru. Analýza ukázala, že transfekce vektoru pCDNA3Tat do buněk 2D12 nevede k reaktivaci proviru HIV-1. Po stimulaci buněk 2D12 transfekovaných pCDNA3Tat dochází k reaktivaci proviru v 70% buněk, což je o 20% více než v kontrolních buňkách 2D12 transfekovaných prázdným vektorem pCDNA3 (Obr. 26a).

Podobný experiment jsme zopakovali s použitím extracelulárního *Tat* proteinu namísto exogenně exprimovaného. Během akutní infekce HIV-1 nebo po transfekci genu *Tat*, je protein *Tat* uvolňován do supernatantu buněčných kultur. Tato extracelulární forma *Tat* stimuluje

expresi genů HIV-1 (Ensoli et al. 1993). Buňky transfekované pCDNA3Tat byly stimulovány PMA a TNF- α . Tyto stimulační agens byly po čtyřech hodinách odmyty a nahrazeny čerstvým médiem. Po 48 hodinách byl supernatant obsahující extracelulární Tat přenesen na buňky 2D12. Extracelulární Tat expresi EGFP měřenou průtokovým cytometrem v nestimulovaných buňkách 2D12 neovlivnil. Po stimulaci buněk 2D12 s extracelulárním Tat došlo k reaktivaci proviru ve 29% buňkách, tedy k nárůstu o pouhých 3% oproti stimulovaným buňkám 2D12 (Obr. 26b).

Pomocí bisulfitového sekvenování jsme analyzovali vliv zvýšené exprese *Tat* na hladinu metylace provirového promotoru. Mezi buňkami 2D12 transfekovanými pCDNA3 nebo pCDNA3Tat nenastala žádná změna v metylaci provirového promotoru. Obě linie vykazovaly metylaci promotoru kolem 90%. Ani stimulace buněk PMA a TNF- α nevedla ke změnám v metylaci 5'LTR (Obr. 26c).

Expese *Tat* je po stimulaci buněk 2D12 PMA a TNF- α významně zvýšena. Po vnesení exogenního *Tat* do buněk 2D12 a stimulaci PMA a TNF- α dochází k nárůstu reaktivity proviru o 20%. Výrazně zvýšená hladina *Tat* ale nijak neovlivňuje množství metylovaných CpG na provirovém promotoru. Z našich výsledků vyplývá, že virový transkripční aktivátor *Tat* v součinnosti se stimulací PMA a TNF- α umožňuje reaktivaci latentního proviru HIV-1 s hustou metylací DNA promotorové oblasti.



Obr. 26. Vliv hladiny Tat na reaktivaci proviru HIV-1 a metylaci provirového promotoru:

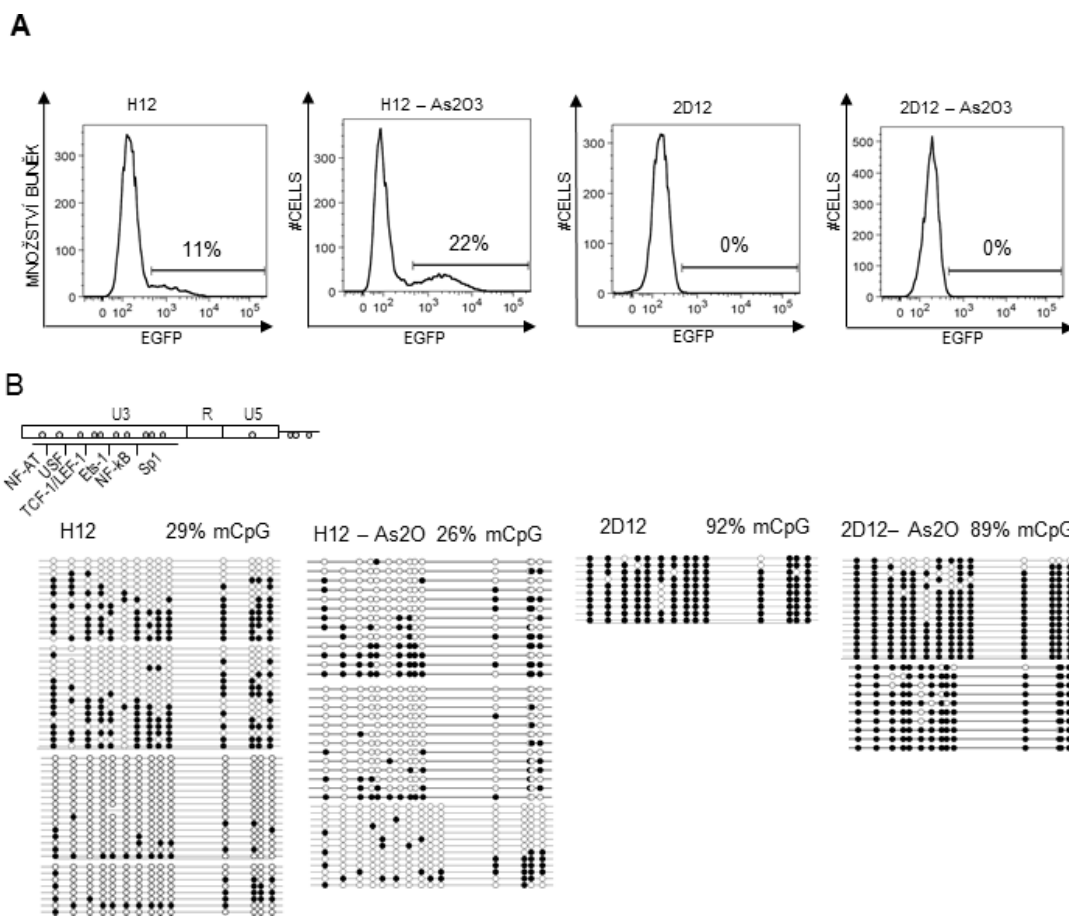
A) Míra reaktivace proviru v buňkách 2D12 transfekovaných pCDNA3Tat nebo pCDNA3 (kontrola). Histogramy v levém sloupci reprezentují analýzu bez buněčné stimulace, pravý sloupec reprezentuje histogramy po 24 hodinách stimulace PMA a TNF- α . Množství pozitivních buněk na EGFP je ukázáno nad křivkou. B) Míra reaktivace proviru v buňkách 2D12 s použitím kultivačního média nebo média obohaceného extracelulárním Tat. C) Hladina metylace CpG 5'LTR v nestimulovaných a stimulovaných 2D12 transfekovaných pCDNA3 a pCDNA3Tat je znázorněna jako průměrné procento metylovaných CpG (mCpG) v promotoru HIV-1. Analýza promotorových molekul je ukázána jako řada bílých kroužků reprezentujících nemetylované CpG a černých kroužků reprezentujících metylované CpG. Každá řada reprezentuje jednu sekvenovanou molekulu 5'LTR. Obdélník schematicky znázorňuje U3, R a U5 oblasti v 5'LTR jednotlivě analyzovaných dinukleotidů CpG a vazebná místa transkripčních faktorů.

5.11. Vliv oxidu arsenitého (As₂O₃) na reaktivovatelnost proviru HIV-1

Cílem As₂O₃ v buňkách je protein PML (protein promyelocytické leukémie), který je součástí jaderných tělísek a přispívá ke genetické a epigenetické kontrole genové exprese. Degradace PML vede k aktivaci virové transkripce a ztrátě represivní heterochromatinové modifikace H3K9 me₂ (Lusic et al. 2013). Po aplikaci As₂O₃ na buňky 2D12 nedochází k reaktivaci proviru HIV-1. V buňkách H12 kultivovaných s As₂O₃ došlo k vzestupu reaktivace proviru o 11% v porovnání s buňkami H12 (Obr. 27a). S použitím bisulfitové sekvenace jsme zjišťovali, jestli za tento nárůst v reaktivaci proviru může snížená metylace promotoru HIV-1. Aplikace As₂O₃ na buňky 2D12 ani H12 nevedla ke změnám v hladině metylace provirového 5'LTR (Obr. 27b).

As₂O₃, který ovlivňuje histonové modifikace a chromatinovou strukturu, má tedy bez přítomnosti dalších reaktivačních agens mírný vliv na reaktivaci proviru a to v buňkách H12, které se vyznačují snadnou reaktivovatelností proviru. Ke změnám v metylaci CpG v 5'LTR ale nedochází.

Na našich buněčných modelech latence viru HIV-1 jsme prokázali vliv *DNMT1* na reaktivaci proviru, který je doprovázený změnami v metylaci provirového 5'LTR. Mírný vliv na reaktivaci proviru jsme zaznamenali i u *DNMT3B* a *HDAC2*. Modulace exprese *DNMT3B* ani *HDAC2* však nevedla ke změnám v hladině metylace promotoru HIV-1. Přestože exogenně zvýšená exprese *Tat* ve stimulovaných buňkách 2D12 vede ke zvýšení reaktivace proviru až o 20%, pokles metylace CpG v provirovém promotoru jsme nezaznamenali. Tyto výsledky dokládají, že metylace je důležitá pro udržení latence HIV-1, ale podílí se na ní i další epigenetické regulační mechanismy.



Obr. 27. Vliv As_2O_3 na reaktivaci proviru HIV-1 a metylaci provirového promotoru: A) Míra reaktivace proviru 48 hodin po přidání As_2O_3 na buňky H12 a 2D12. Množství pozitivních buněk na EGFP je ukázáno nad křivkou B) Hladina metylace CpG 5'LTR v buňkách H12 a 2D12 před a po stimulaci As_2O_3 je znázorněna jako průměrné procento metylovaných CpG (mCpG) v promotoru HIV-1. Analýza promotorových molekul je ukázána jako řada bílých kroužků reprezentujících nemetylované CpG a černých kroužků reprezentujících metylované CpG. Každá řada reprezentuje jednu sekvenovanou molekulu 5'LTR. Obdélník schematicky reprezentuje U3, R a U5 oblasti v 5'LTR jednotlivě analyzovaných dinukleotidů CpG a vazebná místa transkripčních faktorů.

I poslední část mé doktorské práce se věnuje regulaci genové exprese prostřednictvím epigenetických faktorů.

5.12. Analýza metylace a hydroxymethylace CpG promotoru

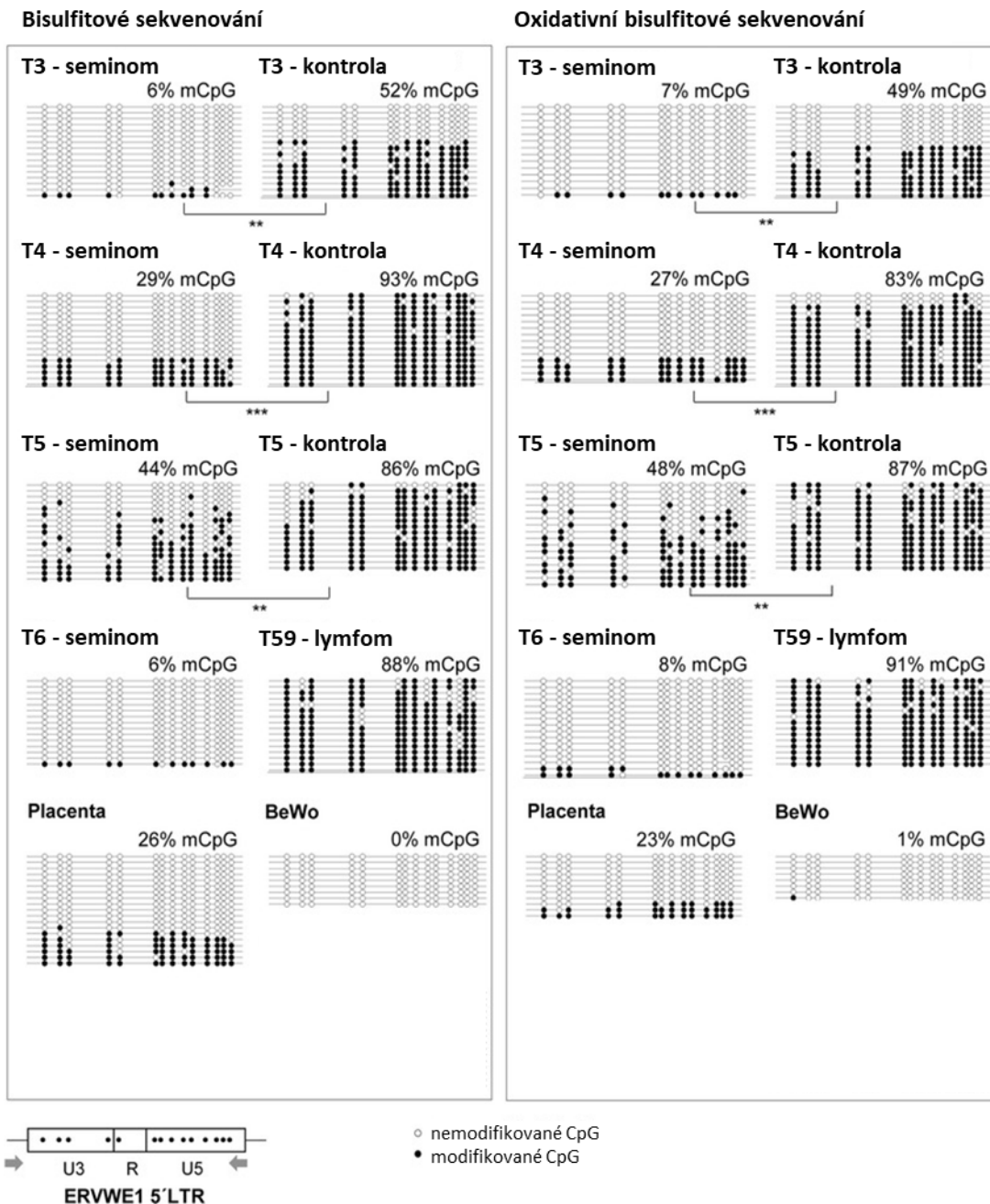
ERVWE1 v seminomech

Lokus *ERVWE1* kóduje retrovirový obalový glykoprotein Syncytin-1, který se během vývoje placenty podílí na fúzi buněk trofoblastů za vzniku mnohojaderného syncytiotrofoblastu (Mi et al. 2000). V ostatních tkáních musí být jeho exprese pod přísnou kontrolou, které se účastní řada mechanismů včetně metylace DNA a trimethylace H3K9 na 5'LTR *ERVWE1*

(Matouskova et al. 2006; Gimenez et al. 2009; Trejbalova et al. 2011). Za fyziologických podmínek je promotor *ERVWE1* v lidských tkáních, s výjimkou placenty, výrazně metylován. Zvýšená exprese *ERVWE1* však byla nalezena např. v buňkách seminomů (Gimenez et al. 2010; Trejbalova et al. 2011). Tyto buňky vznikají z embryonálních primordiálních zárodečných buněk a zachovávají si nízkou míru celkové metylace genomu (Moch et al. 2016; Netto et al. 2008). Analyzovali jsme, jestli zvýšené expresi *ERVWE1* v seminomech předchází aktivní demethylace jeho promotoru. Během této demethylace dochází ke vzniku intermediátu 5-hmC vlivem dioxygenáz rodiny TET. Zejména *TET1* má v seminomech zvýšenou expresi (Benesova et al. 2017). Přítomnost 5-mC a 5-hydroxymethylcytosinu byla analyzována pomocí bisulfitového sekvenování a oxidativní bisulfitové modifikace.

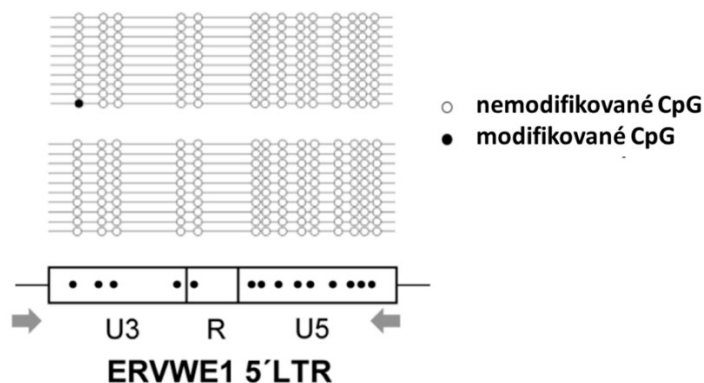
Dle očekávání měly buňky placenty a choriokarcinomové BeWo buňky hypometylovaný promotor *ERVWE1*, což odpovídalo vysoké expresi *Syncytinu-1*. U vzorků seminomů, kde jsme pozorovali zvýšenou expresi *Syncytinu-1*, byl zaznamenán pokles 5-mC na promotoru *ERVWE1* v porovnání s kontrolní tkání. V seminomu T6, u kterého jsme neměli adekvátní kontrolu, byl promotor extrémě hypometylovaný. Metylační vzorec seminomů T3, T4 a T6 vykazoval buď zcela metylované nebo demetylované molekuly. Naopak vzorek lymfomu vykazoval vysokou míru metylace promotoru *ERVWE1* v souladu s velmi nízkou expresí *Syncytinu-1* (Obr. 28.). U žádného vzorku včetně placenty a buněk BeWo jsme nezaznamenali rozdíl mezi výsledky bisulfitového a oxidativního bisulfitového sekvenování (Obr. 28.), přestože proces oxidace byl efektivní (Obr. 29.). Tyto výsledky ukazují, že v době analýzy bylo na promotoru *ERVWE1* pouze velmi malé či nedetekovatelné množství 5-hmC, přestože zde dochází k vysoké expresi mRNA *TET1* (Benesova et al. 2017). Přítomnost 5-hmC je pravděpodobně ovlivněna rychlostí procesů během demethylace promotoru *ERVWE1* v seminomech.

Z naší analýzy vyplývá, že seminomy mají nízkou míru metylace promotoru *ERVWE1*, což vede k transkripci *ERVWE1* v těchto buňkách.



Obr. 28. Profily metylace a hydroxymethylace CpG na promotoru *ERVWE1* ve vybraných vzorcích.: Pro analýzu modifikací CpG na promotoru ERVWE1 (5'LTR) bylo použito bisulfitové a oxidativní bisulfitové sekvenování. Výsledky bisulfitového sekvenování (5-mC + 5-hmC) jsou ukázány v levém panelu, výsledky oxidativního bisulfitového sekvenování (5-mC) jsou v pravém panelu. Analýza promotorových molekul je ukázána jako řada bílých kroužků reprezentujících nemetylované CpG a černých kroužků reprezentujících metylované CpG. Každá řada reprezentuje jednu sekvenovanou molekulu 5'LTR. Pro každý vzorek je znázorněno průměrné procento modifikovaných CpG. Obdélník schematicky reprezentuje rozložení dinukleotidů CpG v promotoru ERVWE1 a primerů použitých pro analýzu. Hodnoty P byly vyjádřeny následovně: ***, $P < 0,001$, **, $P < 0,01$.

Oxidativní bisulfitové sekvenování 5-hydroxymetylovaného fragmentu



Obr. 29. Oxidativní bisulfitové sekvenování 5-hydroxymetylovaného fragmentu promotoru *ERVWE1*: Zobrazeny jsou výsledky oxidativního bisulfitového sekvenování uměle připraveného 5-hydroxymetylovaného fragmentu 5'LTR *ERVWE1*. Každá řada reprezentuje jednu analyzovanou molekulu, každý kroužek zastupuje dinukleotid CpG. Bílé kroužky reprezentují nemetylované CpG, černé kroužky metylované CpG. Výsledky jasně ukazují, že proces oxidace 5hmC byl efektivní (97,9-99,3%). Ve spodní části obrázku je vyobrazeno schéma 5'LTR *ERVWE1*. Šedé šipky reprezentují umístění primerů použitých pro oxidativní bisulfitové sekvenování. Černé kroužky reprezentují analyzované dinukleotidy CpG. 5'LTR *ERVWE1* se skládá ze třech částí – U3, R a U5.

6 Diskuze

Naše práce se zabývá studiem nádorové progresi, virové latence a epigenetické regulace v seminomech a navzájem propojuje poznatky získané v jednotlivých tématech. Společnou základní myšlenkou celé doktorské práce je genová exprese a její modulace, ať už prostřednictvím epigenetických mechanismů nebo prostřednictvím siRNA/shRNA. Pilotní výsledky epigenetické regulace genu *HOPX* v našich modelových liniích nás inspirovaly k podrobnějšímu studiu jeho funkce v nádorové progresi, zatímco studium virové latence a seminomů zůstalo na epigenetické úrovni. Disertační práce je tak metodicky i ve výsledcích značně divergentní.

6.1. Identifikace kandidátních genů asociovaných s metastázováním a role *HOPX* v incidenci metastáz

Mikročipová technologie byla v době vzniku tohoto projektu progresivní technologií poskytující významný nástroj k odhalení expresního vzorce genů asociovaných s metastázováním. Během desetiletí, kdy byly mikročipové technologie používány, se vyvinulo mnoho užitečných nástrojů k analýze získaných dat. Bohužel pro použití mikročipové technologie musíme dobře znát genom studovaného organismu. Nesprávná nebo nekompletní genomová anotace přímo ovlivňuje efektivitu mikročipu (Hurd and Nelson 2009). Vzhledem k významu kuřete jako modelového organismu je stále vyvíjena snaha o pokrok v kompletaci sekvencí kuřecího genomu (assembly genomu). Nová verze assembly kuřecího genomu (Gallus_gallus-5.0; GCA_000002315.3) je sestavena na základě kombinované technologie dlouhého sekvenování jedné molekuly, hotových BAC klonů a vylepšených fyzických map. Gallus_gallus-5.0 vykazuje nárůst o 4679 anotovaných genů (z toho 1911 kódujících protein) proti předešlé verzi Gallus_gallus-4.0 (Warren et al. 2017).

Dnes je mikročipová technologie častěji nahrazena sekvenací nové generace (NGS) či sekvenováním RNA (RNA-Seq), které umožňuje odhalit transkriptom jakéhokoli organismu bez potřeby specifických sond, což je velká výhoda vzhledem k úzké nabídce mikročipů specifických pro kuřecí model. RNA-Seq může navíc detekovat nové transkripty, genové fúze či nukleotidové varianty, které mikročipová technologie neodhalí. Mikročip kromě toho poskytuje spíše relativní než absolutní hodnoty exprese. To může být problematické, jsou-li studované transkripty hojně zastoupené, což může vést k saturaci signálu a zkreslení rozdílné exprese mezi vysoce

exprimovanými vzorky. Naopak signál transkriptů s nízkým výskytem může být ztracen v nespecifickém signálu pozadí.

Přestože mikročipová technologie nyní ustoupila do pozadí, vedla v minulosti k řadě důležitých objevů včetně těch na poli nádorové progresse. Byla například využívána k určení subtypů primárních nádorů a tedy i pravděpodobnosti rekurence nádoru či incidence metastáz u nádorů, které vykazují velkou histologickou heterogenitu, jak bylo ukázáno na studii karcinomu prostaty, kde pomocí mikročipové analýzy identifikovali biologicky a klinicky relevantní genovou expresi nádorových subtypů, což ulehčuje výběr léčby a určení prognózy (Lapointe et al. 2004). Expresní profilování bylo k identifikaci genů asociovaných s metastázami použito v mnoha studiích, jako je studie porovnávací expresní profily 12 metastáz odvozených z adenokarcinomů různého původu (plíce, prostata, tlusté střevo a konečník, děloha, vaječníky) se 64 primárními adenokarcinomy od různých pacientů. Studie identifikovala 128 genů s rozdílnou expresí, podle nichž byly některé primární nádory chybně považovány za metastázy. Důvody autoři připisují přítomnosti metastatické genové exprese už v některých buňkách primárního nádoru v době jeho diagnózy (Ramaswamy et al. 2003). Hodnocení dat ze vzorků různého základu a jedinců musí být ale odlišeno od experimentů, které dokládají, že primární nádory a metastázy z nich odvozené ve stejném pacientovi jsou si navzájem podobnější než s nádory jiných pacientů (Perou et al. 2000). S tím souvisí i poměrně velké množství studií analyzujících expresní profily nádorů a metastáz, aniž by bylo dosaženo konsenzu ve specifických genech zúčastněných v nádorové progresi, což může být zapříčiněno zkreslením rozdílů v genové expresi pocházející právě z porovnávání vzorků jedinců s různým genetickým pozadím.

Náš experimentální systém byl proto navržen tak, abychom toto zkreslení způsobené různým genetickým pozadím eliminovali. Systém je založen na kuřecích sarkomových metastázujících buňkách PR9692 transformovaných genem *v-src* a jejich tumorigenním nemetastázujícím subklonu PR9692-E9 (Cermak et al. 2010). Již v minulosti bylo použito několik modelů založených na účinně nebo vzácně metastázujících klonálních derivátech, které podporují hypotézu o existenci metastatické subpopulace buněk také v kultuře buněčných linií (Fidler and Kripke 1977; Nicoletti et al. 1985). Existují i varianty klonů s vysoce metastatickým potenciálem, které po několika generacích revertovaly na variantu s nízkou metastatickou kapacitou. To může odrážet děje *in vivo*, kdy některá buňka úspěšně dokončí sérii kroků v metastatickém procesu a usadí se v sekundárním místě, kde původní selekční tlak chybí a buňky si tak nepotřebují zachovávat originální invazivní fenotyp (Harris et al. 1982). Jelikož

kuřecí systém vykazuje nižší míru genomových mutací ve srovnání se savci (Smeds, Qvarnstrom, and Ellegren 2016), jsou naše unikátní kuřecí modelové buňky do jisté míry osvobozeny od změn způsobených během kultivace, což nám zaručuje zisk spolehlivých a reprodukovatelných výsledků.

Kuřecí model je tradičně používán v retrovirologii, experimentální onkologii, vývojové biologii či imunologii nejen kvůli svým komparativním aspektům. Kuřecí buňky, stejně jako buňky lidské a primátů, mají na rozdíl od buněk hlodavců vzácnou spontánní imortalizaci ale velký počet generací primárních buněk, během nichž jsou stále geneticky stabilní. S lidskými buňkami sdílejí podobnosti i v procesu buněčné transformace (Plachy and Hejnar 2002) stejně jako v aminokyselinových sekvencích mnoha genů. V posledních desetiletích byl tento model opomíjen zejména kvůli absenci reverzní genetiky a transgenní technologie. Dnes může být transgenní jedinec připraven i v ptačím systému, například s použitím nové technologie TALENů (Transcription activator-like nucleases) nebo systému CRISPR/Cas9 umožňujících vyřadit z funkce specifické geny v buňkách kuřecí primordiální zárodečné line (Schusser et al. 2013; Park et al. 2014; Koslova et al. 2020). S pomocí CRISPR/Cas9 technologie byl v naší laboratoři již připraven deleční mutant v receptoru pro ptačí leukózní vir podskupiny J (ALV-J). Získaná homozygotní kuřata jsou k ALV-J zcela rezistentní a kromě pokroku v drůbežářském průmyslu představují významný výzkumný model (Koslova et al. 2020). Kombinace systému CRISPR/Cas9 a transplantace primordiálních zárodečných buněk (PGC) do kohoutů (Trefil et al. 2017) by mohla být do budoucna využita i pro bližší zkoumání genu *HOPX* nejen v nádorové progresi.

Význam ptačího modelu byl ukázán také na studii interakce Syncytinu-1 s membránovým receptorem ASCT2, který slouží jako aminokyselinový transportér (Scalise et al. 2018). Gen *ASCT2* je přítomný u většiny obratlovců, ale v kuřecím genomu chybí. S využitím kuřecího systému je možné exprimovat různé deleční mutanty *ASCT2* v absenci endogenní exprese, která je při použití savčího modelu hlavním úskalím (Stafl et al. 2021). Donedávna panoval konsenzus, že ptáci mají asi o 30% méně genů kódujících proteiny než lidé. Nové výzkumy však ukazují, že existuje podskupina ptačích genů bohatá na nukleotidy G a C, díky čemuž je velmi obtížné tyto geny amplifikovat pomocí PCR a analyzovat metodami sekvenování nové generace (Hron et al. 2015; Elleder and Kaspers 2019). Většina chybějících genů byla identifikována rozsáhlým usilím s využitím velkého množství dat ze sekvenování RNA a pokročilých metod genomového assembly (Bornelov et al. 2017; Laine et al. 2019; Yin et al. 2019).

Kuřecí modelový systém tak tvoří nepostradatelný komplement myšího modelu a k tomu umožňuje studium sarkomů, jejichž výzkum je v savčích modelech podhodnocený.

S využitím našeho experimentálního systému jsme se v této práci zaměřili na geny diferenciatně exprimované v metastázující linii a jejím nemetastázujícím subklonu. Nemetastázující subklon PR9692-E9 netvoří metastázy ani po inokulaci přímo do krevního oběhu kuřete, tudíž absence metastatické kapacity může být důsledkem inhibice jakéhokoli kroku metastatické progresse. Vzhledem k mezenchymovému charakteru sarkomových buněk předpokládáme, že pravděpodobně v prvních krocích, jako je opuštění nádorového stromatu a intravazace, blok není. Zajímavým pokusem by bylo zjistit přítomnost PR9692-E9 v krevním oběhu kuřete například na základě větší velikosti buněk či pomocí barvení vimentinu (Satelli and Li 2011). Pokud by jejich přítomnost byla prokázána, znamenalo by to, že buňky s největší pravděpodobností nemohou kolonizovat sekundární orgán a v nové tkáni neproliferují. Námi identifikované geny s rozdílnou expresí budou tedy možná patřit do skupiny genů podporujících proliferaci nebo expresi genů umožňujících přežití v novém mikroprostředí.

Na základě mikročipových dat jsme identifikovali čtyři kandidátní geny, které by mohly být asociované s metastázováním, *LSP1*, *AQP1*, *UPP1*, *HOPX*. Všechny čtyři měly zvýšenou expresi v metastázující linii, což bylo ověřeno i s použitím qRT-PCR. Řada genů s rozdílnou expresí v buňkách PR9692 a PR9692-E9, které byly v souvislosti s metastázováním málo studované a byly by pro náš projekt zajímavými kandidáty, jsme museli vyloučit, protože výsledky z mikročipové analýzy nebyly pomocí qRT-PCR potvrzeny. Pro naše analýzy, kde hledáme výrazně změněnou expresi genů mezi dvěma buněčnými liniemi je citlivost qRT-PCR dostačující. Pokud bychom chtěli absolutní kvantifikaci nebo bychom se chtěli zaměřit na geny s velmi malou expresí či detekci ojedinělých alel, bylo by vhodnější použít droplet digital PCR (ddPCR) (Hindson et al. 2011). Určení počtu výchozích molekul specifické nukleové kyseliny je při použití qRT-PCR nepřímé a závisí na kalibrační křivce. Přímá metoda ddPCR vychází z limitního naředení PCR reakce a přítomnost jedné cílové molekuly v dané reakci je detekována v souboru velkého počtu mikroreakcí. Kvantifikace tak není závislá na referenčním standardu či endogenních kontrolách. S tím souvisí i lineární intenzita signálu ddPCR na počet přítomných kopií, což umožňuje detekci i velmi malých rozdílů exprese (Hayden et al. 2013). Navíc je ddPCR méně náchylná na přítomnost inhibitorů PCR v extraktech DNA (Morisset et al. 2013).

Geny *AQP1* a *UPP1* jsme vyřadili již na počátku studie, protože se nám pomocí RNAi nedařilo snížit jejich expresi v metastázující linii PR9692, kde mají oproti buňkám PR9692-E9

vyšší expresi, a nebyly tak splněny podmínky výběru kandidátních genů. Příčinou tohoto neúspěchu může být nedostatečná funkce konkrétní vlásenky v inhibici exprese *AQPI*. Také detekce snížené exprese pomocí RNAi může být značně obtížná zejména při použití nevhodných primerů rozeznávajících fragment štěpené mRNA, který slouží jako templát pro syntézu cDNA, což může být příčinou falešně negativních výsledků (Holmes et al. 2010). K detekci RNAi se spolehlivěji používají specifické protilátky, které bohužel nejsou vždy dostupné zejména v případě méně známých genů či při práci s kuřecími buňkami. Pokud by se v dalších analýzách ukázal jejich nesporný význam pro tvorbu metastáz v našem modelovém systému, mohli bychom jejich funkce studovat zvýšením exprese *AQPI* nebo *UPPI* v nemetastázujícím subklonu PR9692-E9 pomocí expresních vektorů. I v tomto případě bychom se museli vypořádat s absencí specifických kuřecích protilátek například expresí fúzních proteinů. K modulaci exprese *AQPI* nebo *UPPI* bychom také případně mohli v budoucnu využít systém CRISPR/Cas9 s využitím proteinu Cas9, který má dvě funkční domény, doménu RuvC-like a nukleázovou doménu HNH (Cong et al. 2013). Endonukleáza Cas9 může být naváděna syntetickou single-guide RNA (sgRNA) rozeznávající cílovou sekvencí, což vede k produkci dvouřetězcových zlomů v cílovém místě (Cong et al. 2013). Dvouřetězcové zlomy následně spustí komplexní mechanismy oprav DNA v buňce a generují rozličné místně-specifické genetické změny prostřednictvím nehomologního spojování konců (Non-homologous end joining, NHEJ) nebo homologní opravy DNA (HDR). Dráha NHEJ je náchylná k chybám a typicky vede k inzercím či delecím v cílové sekvenci. Pokud tyto záměny vedou ke změně čtecího rámce nebo k narušení funkční domény, funkce cílového genu je zničena (Gratz et al. 2013). Pravděpodobnost homologní rekombinace výrazně vzroste v přítomnosti homologních fragmentů DNA během procesu oprav. Účinnost rekombinace způsobená dvouřetězcovými zlomy může být zvýšená až tisíckrát (Rouet, Smih, and Jasin 1994). Díky tomu může být dráha HDR použita k cílení specifických genů za pomoci homologní donorové DNA jako templátu k vložení konkrétní bodové mutace nebo inzerci požadované sekvence v cílovém místě (Feng et al. 2014). Tento systém na rozdíl od RNAi, která pouze snižuje expresi cílového genu, vede ke kompletní a trvalé eliminaci funkce genu. To může ulehčit detekci fenotypového projevu takové expresní změny, ale v některých specifických případech může dokonce dojít ke smrti buňky, pokud je exprese daného, pro buňku esenciálního, genu zcela eliminována. RNAi se přednostně používá v případě, kdy chceme snížit expresi pouze dočasně, buď s použitím siRNA nebo inducibilního promotoru k expresi shRNA. Navíc zde není potřeba izolovat jednotlivé klony, což znamená časově méně náročný experiment, ale hlavně se vyvarujeme případné selekce

jednotlivé buňky, která již v sobě nese jinou náhodnou heterogenitu a může mít již od počátku jiné invazivní vlastnosti.

V průběhu práce na tomto projektu se našim favoritním kandidátem stal gen *LSP1*, jehož role v transendoteliální migraci (Liu et al. 2005) evokovala možnou souvislost s intravazací či extravazací cirkulujících nádorových buněk do nového mikroprostředí. Navíc bylo ukázáno, že polymorfismus *LSP1* je faktorem zvyšujícím riziko incidence prsního karcinomu u lidí (Chen, Qi, et al. 2015). Po efektivním snížení jeho exprese v metastázujících buňkách PR9692 jsme pozorovali pokles jejich migrační aktivity *in vitro*. Tyto výsledky bohužel nebyly *in vivo* potvrzeny. Po inokulaci buněk PR9692-sh*LSP1* došlo k vytvoření plicních metastáz srovnatelných s metastázujícími linií PR9692 a dokonce metastáz v srdci, což jsme u kontrolních buněk PR9692 nikdy nepozorovali. To poukazuje na velmi zjednodušený systém detekce migrace buněk na kultivační misce, který se nedá srovnávat se složitostí nádorového mikroprostředí. Existuje řada buněčných linií, které byly na základě sekvenace genomu a analýzy transkriptomu prohlášeny za věrný experimentální model daného typu nádoru (Barretina et al. 2012; Garnett et al. 2012; Wilding and Bodmer 2014), přesto signální kaskády stimulované růstovými faktory nebo heterogenní kontakty buněk v buněčné kultuře plně nezastupují komplexnost nádoru *in situ*. Používání buněčných linií rostoucích v suspenzi nebo na dvourozměrné plastické kultivační misce sice přináší možnost rychlých a poměrně jednoduchých analýz, avšak je omezeno ve své schopnosti pojmut heterogenitu nádorového procesu a tedy v reprodukovatelnosti získaných výsledků *in vivo*. S tím souvisí i klinické hodnocení efektivity protinádorových léčiv, jež je největším zdrojem neúspěchu v testovací fázi 2, přestože v preklinických studiích byla efektivita jednoznačně demonstrována. Nová protinádorová terapeutika jsou nejméně úspěšná léčiva v rámci všech klinických studií a preklinické modely nádorové progresy, včetně modelů *in vitro*, patří k nejméně vypovídajícím (Cook et al. 2014; Hay et al. 2014; Arrowsmith 2011). Zajímavým kompromisem je používání 3D modelů nádorové progresy. Studie srovnávající chování 29 různých buněčných linií ovariálního karcinomu ve 2D a 3D modelu s xenografty dokládá, že několik linií analyzovaných ve 3D modelu vykazovalo dle histologie změny vysokého stupně s velkou mírou diferenciací, která ale nebyla u 2D modelu zaznamenána. Přesto chování buněk ve 3D modelu odráželo situaci v originálním nádoru pouze v některých případech (Lee et al. 2013).

Vzhledem k překvapivému umístění metastáz v srdci by mohl protein *LSP1* ovlivňovat interakci s endoteliálními buňkami a tedy orgánový tropismus metastáz. Námi prokázána spíše

negativní role *LSP1* v nádorové progresi je v souladu se studií hepatocelulárního karcinomu, kde *LSP1* negativně ovlivňuje proliferaci a migraci nádorových buněk (Koral et al. 2015).

V tomto projektu jsme se soustředili na identifikaci kandidátních genů asociovaných s metastázováním a pokud některý z nich vykazoval nereproducibilní výsledky *in vitro* a *in vivo*, byl z dalších studií vyřazen. Proto jsme v nemetastázujícím subklonu PR9692-E9 nepřistoupili k transgennímu zvýšení exprese *LSP1*, abychom jeho negativní vliv na tvorbu metastáz v srdci blíže prozkoumali. V důsledku toho nemůžeme vyloučit, že při použití vlásenky pro navození RNAi nedošlo k nespecifickému ovlivnění exprese jiných genů. Takové nespecifické cílení RNAi může mít dle studií *in silico* incidenci v 5% až 80% případů dle daného organismu (Qiu, Adema, and Lane 2005).

V dalších experimentech jsme se zaměřili na gen *HOPX*, jehož exprese je v metastázující linii PR9692 zvýšená oproti nemetastázujícímu subklonu. Dosavadní práce dokládají, že *HOPX* je častým cílem epigenetického umlčení v různých typech karcinomů (Yamaguchi et al. 2009) (Ooki et al. 2010; Harada et al. 2011; Waraya et al. 2012; Chen, Yang, et al. 2015), ale až na výjimku (Ren et al. 2017) se nezabývají jeho rolí v incidenci metastáz, je-li primární nádor již zformovaný. Tento na první pohled s naší hypotézou rozporuplný výsledek byl pro nás výzvou k prozkoumání úlohy *HOPX* v indukci tvorby metastáz, jelikož role genů v tvorbě primárního nádoru a invazivitě do sekundárních orgánů nemusí být vždy stejná (Thomas et al. 2011). Vzhledem ke své nezastupitelné roli ve vývoji srdce by gen *HOPX* mohl pravděpodobně hrát úlohu i během EMT specifických buněk srdeční neurální lišty, které se nachází v podoblasti lebeční neurální lišty (Waldo et al. 1999). Tyto buňky se od svých sousedních neuroepitelových buněk oddělují procesem delaminace, který zahrnuje částečnou nebo celkovou epitelově-mezenchymovou tranzici regulovanou komplexní sítí transkripčních faktorů včetně několika protoonkogenů (Duband 2010). Studium vzájemných vztahů v čase emigrace a individuální či kolektivní vliv těchto transkripčních faktorů, včetně *HOPX*, na chování buňky by mohlo poskytnout cenné informace o jejich roli během EMT i v jiných kontextech, jako je metastázování (Theveneau and Mayor 2012).

V našem modelovém systému exprese *HOPX* negativně koreluje s hladinou metylace CpG na predikovaném promotoru. Odlišná hladina metylace v metastázujícím a z něj odvozeném nemetastázujícím klonu může naznačovat uplatnění *HOPX* v invazivitě buněk PR9692. Abychom sledovali jeho roli v metastatické progresi, stabilně jsme snížili expresi *HOPX* v metastázující linii. Tyto buňky vykazovaly sníženou proliferaci v porovnání s parentální linií.

Modulace exprese genů zúčastněných v nádorové progresi často vede ke změnám v míře jejich proliferace, proto jsme v dalších experimentech kladli důraz na to, aby invazivní analýzy *in vitro* a závěrečné pokusy *in vivo* nebyly tímto faktem zatíženy a nezkreslovaly studii metastatické kapacity. Výsledky z migračního a invazivního testu *in vitro* dokládají, že *HOPX* může podporovat invazivní charakter sarkomových buněk. Po počátečním neúspěchu s genem *LSP1* jsme se v případě genu *HOPX* snažili lépe napodobit podmínky v nádorovém mikroprostředí a pro testování *in vitro* jsme zvolili 3D model testu invazivity, který navíc eliminuje zkreslení výsledků vlivem rozdílné generační doby. Snížená exprese *HOPX* dokonce vedla k inhibici tvorby metastáz *in vivo* nezávisle na velikosti primárního nádoru. Tvorba metastáz nebyla pozorována ani po inokulaci většího počtu buněk, čímž jsme kompenzovali jejich delší generační dobu. Gen *HOPX* splnil podmínky výběru kandidátních genů, a abychom vyloučili nespecifické efekty a verifikovali výše uvedené výsledky, zvýšili jsme expresi genu *HOPX* v nemetastázujícím subklonu, což vedlo k záchraně fenotypu, tedy k obnovení tvorby metastáz, po inokulaci původně nemetastázujícího subklonu. Tím jsme potvrdili pozitivní roli *HOPX* v tvorbě metastáz ze sarkomu v kuřecím systému.

Vzhledem k tomu, že modulace exprese jediného genu dokáže takto výrazně zvrátit metastatické charakteristiky nádorových buněk, soudíme, že *HOPX* může mít pleiotropní účinek na transkripci většího počtu efektorových genů. Provedli jsme proto další, srovnávací mikročipovou analýzu, abychom identifikovali možné cíle tohoto transkripčního faktoru a tedy i další geny asociované s metastázováním. Řada genů, které byly po snížení exprese *HOPX* diferenciólně exprimované oproti kontrolním buňkám PR9692-shMOCK, vykazovaly obdobné změny exprese již v pilotní studii porovnávající parentální linii PR9692 a její subklon PR9692-E9 (Cermak et al. 2010). Tyto výsledky napovídají, že se vzorec genové exprese po snížení exprese genu *HOPX* velmi podobá vzorci exprese spontánně vzniklého nemetastázujícího subklonu PR9692-E9. Snížená exprese 186 genů v liniích PR9692-shHOPX a PR9692-E9 by mohla být důsledkem sníženého množství komplexu *HOPX* s dalším transkripčním faktorem, jelikož *HOPX* sám není schopen vazby na DNA (Chen et al. 2002). Nepředpokládáme, že by *HOPX* přímo ovlivňoval expresi takového interakčního partnera, proto se pravděpodobně nebude nacházet ani mezi kandidátními geny získanými mikročipovou analýzou. Mohl by však být mezi diferenciólně exprimovanými geny mezi parentální linií PR9692 a subklonem PR9692-E9 z původní studie (Cermak et al. 2010). Naopak zvýšená aktivita 46 námi identifikovaných genů v liniích PR9692-shHOPX a PR9692-E9 by mohla být zapříčiněna interakcí *HOPX* s HDAC2, která vede k deacetylaci transkripčního faktoru GATA4 a tedy inhibici transkripce genů závislých na GATA4 (Trivedi et al. 2010). *HOPX* interaguje

také se SRF a brání tak jeho vazbě na DNA, což vede ke snížené transkripci genů závislých na SRF (Chen et al. 2002). Jsou to například bezprostředně časné geny, cytoskeletální geny či svalově specifické geny (Selvaraj and Prywes 2004). Identifikované geny se zvýšenou expresí by tedy mohly být přímo nebo nepřímo ovlivněné SRF či GATA4. Zajímavá je zřetelná převaha (186) genů se sníženou expresí, jelikož dle dosavadních studií interakce HOPX se SRF či HDAC2 by se po snížení exprese *HOPX* dalo očekávat spíše obecné zvyšování exprese různých genů.

HOPX se dle naší a další studie (Pavlova et al. 2021) chová jako onkogen. Zatímco v jiných typech nádorových buněk (Ren et al. 2017; Asanoma et al. 2003; Yamaguchi et al. 2009; Ooki et al. 2010) má roli tumor supresoru. Mechanismus funkční duality HOPX v nádorovém procesu není znám. Jednou z možností jsou různé aktivity alternativních promotorů (Pavlova et al. 2021). Další možností jsou odlišné vlastnosti různých nádorových buněk. Doposud byl HOPX studován pouze v buňkách karcinomu. Tyto buňky jsou epiteliálního původu a během nádorové progresy procházejí procesem EMT. Aby dále rostly ve vzdálených orgánech, podstupují naopak MET. Oproti tomu sarkomy vznikají z mezenchymálních buněk. Fenotypická plasticita v sarkomech není příliš popsána, nicméně podmnožina sarkomů podléhá procesu podobnému MET (Somarelli et al. 2016). Protichůdné nádorové vlastnosti *HOPX* by tudíž mohly být zapříčiněny rozdílným charakterem buněk. Na jedné straně jsou karcinomy, kde HOPX působí ve většině případů jako tumor supresor, na straně druhé sarkomy, kde HOPX podporuje incidenci metastáz.

V další části projektu jsme pomocí qRT-PCR potvrdili expresní změny v řadě vybraných genů identifikovaných během druhé, srovnávací, mikročipové analýzy, což dokládá spolehlivost mikročipové analýzy. Navíc byla spolehlivost prokázána i identifikací genů, které již dříve byly zařazeny mezi geny regulující nádorovou progresi. Tyto geny vykazovaly zvýšenou expresi v metastázující buněčné linii a zahrnují adhezivní molekulu neurálních buněk (*NCAM1*), transkripční faktor *FOXG1* nebo integrin *ITGA4*. V případě těchto genů jsme výsledky mikročipu potvrdili také na proteinové úrovni a zařadili je mezi možné cíle působení *HOPX*.

Abychom prokázali efektivitu identifikace genů asociovaných s metastázováním v našem modelovém systému v kombinaci s mikročipovou technologií, vybrali jsme pro další experimenty gen *ITGA4*. Integriny jsou buněčné povrchové molekuly, které zprostředkovávají interakce buňka-buňka nebo buňka-ECM a jsou důležité pro přežití nádorových buněk a jejich diseminaci. Integriny podporují homotypickou adhezi nádorových buněk a regulují matrixové

metaloproteázy, které nádorové buňce usnadňují pohyb přes ECM (Huhtala et al. 1995). Integrin alfa 4 tvoří heterodimery integrálních membránových proteinů alfa-4/beta-1 (VLA-4) a alfa-4/beta-7, které jsou receptory pro fibronektin. *ITGA4* tak může regulovat směřování nádorových buněk do orgánových kompartmentů, kde jsou exprimovány ligandy ITGA4, a v závislosti na typu nádoru indukovat tvorbu metastáz. ITGA4 na buňkách melanomu nebo sarkomu po jejich vstupu do krevního oběhu podporuje jejich šíření do vzdálenějších orgánů interakcí s ligandy exprimovanými na povrchu endoteliálních buněk, krevními destičkami a specifickými proteiny ECM, což podporuje tvorbu metastáz (Gehlsen, Davis, and Sriramarao 1992; Holzmann, Gossler, and Bittner 1998). ITGA4 svou interakcí s endoteliálními buňkami stimuluje adhezi nádorové buňky k cévní stěně a ulehčuje tak transendoteliální migraci (Meerschaert and Furie 1994). V případě gastrointestinálního stromálního tumoru byla popsána zvýšená exprese *ITGA4* a snížení jeho exprese vede k inhibici invazivity *in vitro* (Pulkka et al. 2018). Opačná role *ITGA4* byla prokázána v karcinomu prsu, kde je jeho snížená exprese během onkogenní transformace krucální pro vytvoření invazivního fenotypu (Jia et al. 2004). *ITGA4* může také negativně ovlivňovat přežívání buněk ve vzdálených orgánech. Zvýšením jeho exprese v lymfomových T-buňkách došlo k redukcii metastáz po intravenózní injekci buněk do myši. ITGA4 zde inhibuje kolonizaci sekundární tkáně a má v tomto typu nádoru a v této fázi metastatického procesu vliv negativní (Gossler et al. 1996). V našem modelovém kuřecím systému vedla snížená exprese *ITGA4* v metastázuující linii PR9692 k inhibici buněčné migrace a invazivity *in vitro* a metastatické diseminace ze sarkomu *in vivo*. Navíc po snížení exprese *ITGA4* došlo ke změnám v cytoskeletální organizaci, která vedla k získání fenotypu podobného nemetastázuujícímu subklonu PR9692-E9. To dokládá, že *ITGA4* zde nádorovou progresi spíše podporuje než potlačuje.

Dalším námi identifikovaným genem je *NCAMI* zajišťující adheze mezi neurony a tvorbu neuritů. Bylo ukázáno, že *NCAMI* stimuluje migraci a invazivitu epitelových buněk ovariálního karcinomu a melanomu a podporuje diseminaci nádorových buněk v myším modelu. Tyto pronádorové funkce molekuly *NCAMI* jsou zprostředkované její interakcí s receptorem pro růstový faktor fibroblastů (FGFR) (Liu et al. 2011; Zecchini et al. 2011). V recentní studii byl *NCAMI* identifikován jako pravděpodobný cíl metylačního umlčení v kolorektálním karcinomu. Porovnáním mikročipových expresních profilů a metylačních profilů vzorků kolorektálního karcinomu a přilehlé zdravé tkáně byl odhalen překryv u čtyř adhezivních molekul včetně *NCAMI*. Tato studie přináší první důkaz o možném vlivu metylace na expresi *NCAMI* (Kok-Sin et al. 2015). Do budoucna by bylo zajímavé zjistit, jestli se tak děje i v našich modelových buňkách.

Gen *FOXG1* kóduje člen rodiny transkripčních faktorů „forkhead“ (vidlicovitá hlava), která získala svůj název podle rozdvojeného střeva v konečném vývoji octomilky obecné v přítomnosti mutace forkhead proteinů (Weigel et al. 1989). *FOXG1* funguje jako transkripční represor a hraje roli ve vývoji mozku. Je také považován za onkoprotein inhibující antiproliferační odpověď zprostředkovanou TGF- β v meduloblastomu a ovariálním karcinomu pomocí suprese transkripce *p21(WAF1/CIP1)* (Chan et al. 2009; Adesina et al. 2007). Hladina exprese *FOXG1* koreluje s fenotypem epitelově-mezenchymové tranzice v buňkách hepatocelulárního karcinomu (Zheng et al. 2019).

Dále jsme identifikovali geny, jejichž role v metastázování zatím nebyla blíže studována a mohly by být zajímavou výzvou pro hledání nových prognostických markerů či terapeutických cílů. Tyto geny zahrnují *NUDT14* (nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 14), regulátor G-proteinové signalizace 20 (*RGS20*) nebo adenylátcyklázu 7 (*ADCY7*).

V naší studii jsme pozorovali výrazně zvýšenou expresi *NUDT14* (87krát, $P < 0,001$) v metastázujících buňkách PR9692. Gen *NUDT14* kóduje protein hydrolyzující UDP-glukózu na glukózu 1-fosfát a UMP a ADP-ribózu na ribózu 5-fosfát a AMP. Tento doposud málo charakterizovaný gen je mapován na chromozómu 14q32.33, což je region patřící mezi nejčastější místa cytogenetických změn pozorovaných u B-buněčných malignit (Takashima et al. 1997). Navíc byla prokázána jeho zvýšená exprese v lidském rektálním karcinomu (Choi, Jang, and Kim 2011). Naše výsledky jsou tedy konzistentní s dosavadní literaturou.

RGS20 patří do rodiny proteinů s konzervovanou GTPázu-aktivující doménou o velikosti asi 120 aminokyselin (Xie and Palmer 2007). Již dříve bylo prokázáno, že se geny *RGS2* a *RGS6* účastní vzniku karcinomu plic a močového měchýře (Gu et al. 2006; Berman et al. 2004), ale jejich přesnější role v těchto procesech popsána není. *RGS20* je známý svou inhibicí signální transdukce prostřednictvím stimulace GTPázové aktivity alfa podjednotky G-proteinu, což vede k vytvoření inaktivní formy s navázaným GDP (Glick et al. 1998). Navíc bylo prokázáno, že existuje spojení mezi *RGS20* a stabilitou mikrotubulů (Nixon, Grenningloh, and Casey 2002), které slouží jako koleje pro molekulární motory kineziny, jenž byly extenzivně studovány jako možný cíl protinádorové terapie (Rath and Kozielski 2012). V naší studii dokládáme zvýšenou expresi *RGS20* (více než 5krát, $P = 0,003$) v metastázující linii PR9692 a navrhuje, že *RGS20* je pravděpodobně gen asociovaný s metastázováním, což je ve shodě se studií metastázujících melanomových buněk, kde má *RGS20* podle mikročipové analýzy zvýšenou expresi ve srovnání s buňkami primárního melanomu (Riker et al. 2008). V nedávné studii byl *RGS20* navržen jako

možný prognostický marker renálního karcinomu, v němž tento gen zvyšuje invazivitu nádorových buněk (Jiang et al. 2021).

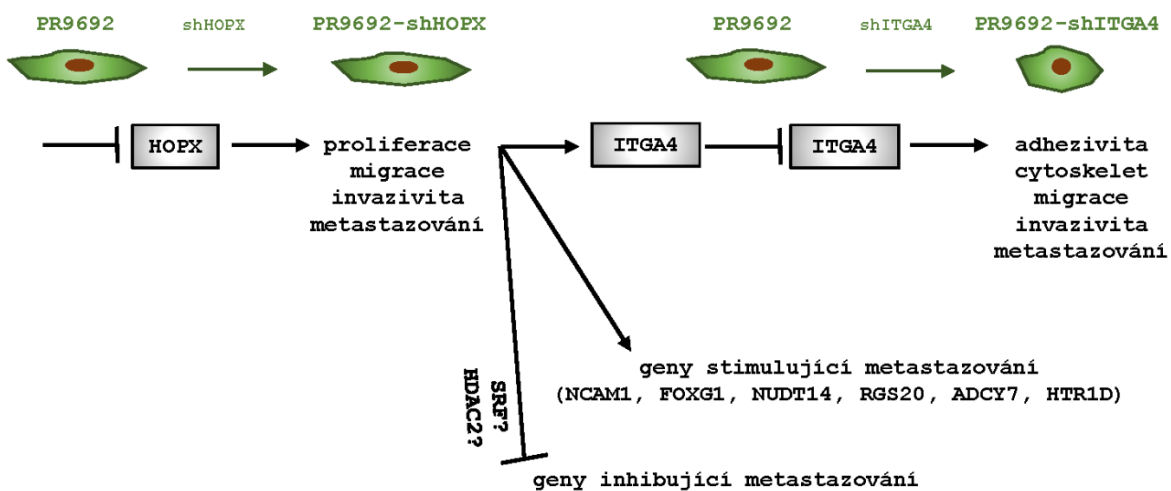
ADCY7 je membránově vázaná adenylátcykláza, která katalyzuje vznik cyklického AMP z ATP a je regulována hladinou vápníku. Studie její role v metastázování chybí, kromě práce Kanamori et al., kteří popsali zvýšenou expresi *ADCY7* ve vysoce metastatickém klonu myší sarkomové linie (Kanamori et al. 2007). Dále byla zveřejněna práce ukazující, že *ADCY7* stimuluje buněčný růst a expresi c-Myc v buňkách akutní myeloidní leukemie (Li et al. 2015). S využitím expresní databáze byla popsána aberantní exprese *ADCY7* v několika lidských karcinomech (Zeng et al. 2021).

V neposlední řadě jsme identifikovali řadu dosud neodhalených, ale významných expresních změn, které mohou být zahrnuty v metastázování, jako je například 5-hydroxytryptaminový receptor 1D (*HTR1D*). Ten byl identifikován jako jeden z genů ovlivňující progresi adenokarcinomu tlustého střeva (Zeng and Chen 2019).

I přes některé nesporné výhody našeho experimentálního systému nemůžeme přesněji určit jakou fázi metastatické progresi gen *HOPX* ovlivňuje, jelikož test metastázování reprezentuje pouze část komplexního procesu tvorby metastáz. Dnes se již může metastázování studovat za použití intravitální mikroskopie (IVM) a celotělových scannerů v živých zvířatech, která dovoluje rozdělení jednotlivých krucióálních kroků metastázování a také monitorování dynamických procesů, které podstupují individuální metastázující buňky, jež jsou mezi ostatními buňkami uvolněnými z primárních nádorů vzácné. IVM umožňuje sledování migrace buněk, indukci angiogeneze, přeprogramování energetického metabolismu buňky, narušení imunitního systému nebo profitování ze zánětlivého stavu mikroprostředí (Ellenbroek and van Rheenen 2014). Sledování pouze konečné fáze tvorby makroskopických metastáz je i možný důvod našich rozdílných výsledků oproti dosavadní literatuře, která se z velké části zabývá formováním primárního nádoru a nikoli incidencí metastáz. V průběhu celé fáze nádorové a metastatické progresi může buňka procházet různými expresními stavy a proto záleží v jakém čase a v jakém kontextu jsou expresní profily studovány. Navíc byla u řady genů prokázána jejich dvojitá role v různých typech nádorů nebo fázích nádorové progresi, výše zmíněný *ITGA4* je toho dobrým příkladem. Také Thomas et al. dokládají, že c-Src, jehož aktivita nebo exprese je zvýšená v mnoha lidských nádorech, naopak inhibuje metastázování buněk karcinomu močového měchýře (Thomas et al. 2011; Ishizawar and Parsons 2004). Aktivita c-Src zde negativně koreluje s hladinou Caveolinu-1 (Cav-1), přestože byl Cav-1 poprvé popsán jako hlavní

substrát kinázy Src u buněk transformovaných v-Src (Lee et al. 2000). Tato studie dokládá propojení dvou proteinů majících ve specifickém kontextu různé efekty (Thomas et al. 2011). Dalším příkladem je slezinová tyrosin kináza (SYK), která se v některých typech nádorů chová jako tumor-supresor v jiných nádorovou progresi podporuje. V řadě hematopoetických malignit SYK zprostředkovává signály k přežívání a jeho inhibice často vede k apoptóze. V nádorech neimunitních buněk SYK také podporuje přežívání, ale může i inhibovat nádorovou progresi potlačením epitelově-mezenchymové tranzice či inhibicí buněčné migrace (Krisenko and Geahlen 2015).

Jedná se o první studii role *HOPX* v incidenci metastáz, kdy snížení exprese *HOPX* v metastázující linii PR9692 vedlo k potlačení invazivity buněk *in vitro* a inhibici metastázování v kuřecím organismu *in vivo*. Během této studie jsme navíc identifikovali geny asociované s metastázováním a možná i interakční partnery *HOPX*. Role genu *HOPX* je schematicky znázorněná na obrázku 30. Naše výsledky potvrdily počáteční hypotézu založenou na porovnání expresních profilů sarkomové metastázující linie a jejího spontánně nemetastázujícího subklonu.



Obr. 30. Schematické znázornění zapojení genu *HOPX* do metastatického procesu

6.2. Modulace exprese vybraných genů pro studium latence viru HIV-1

S nástupem efektivní ART došlo k významnému úbytku úmrtí asociovaných s infekcí virem HIV-1. Nicméně kompletní vyléčení infekce HIV-1 je prozatím nemožné z důvodu existence latentního rezervoáru, který v pacientech přetrvává i v průběhu ART. Tento latentní rezervoár vzniká během rané infekce plně nebo částečně aktivovaných CD4⁺ T-lymfocytů, které se následně vrací do klidového paměťového stavu. Paměťové T-buňky jsou ideálním dlouhodobým rezervoárem virového genomu díky extrémně dlouhé životnosti těchto buněk, počas se uvádí až 44 měsíců (Siliciano et al. 2003; Pierson, McArthur, and Siliciano 2000). Kromě několikaleté životnosti paměťových CD4⁺ T-buněk přispívají ke stabilitě rezervoáru i podskupiny paměťových CD4⁺ T-buněk charakteristické perzistentní imunitní aktivací (Chomont et al. 2009), které podstupují homeostatickou proliferaci a zajišťují tak stabilitu rezervoáru co do velikosti i genetické variability. Provirová DNA je preferenčně detekována v takovéto podskupině paměťových T-buněk aviremických pacientů s nízkým počtem CD4⁺ a vysokou mírou homeostatické proliferace zprostředkované homeostatickým cytokinem interleukin-7 (IL-7) (Chomont et al. 2009). Navíc bylo prokázáno, že integrace proviru v genech asociovaných s nádory a v genech regulující buněčný cyklus podporuje proliferaci a perzistenci buněk latentního rezervoáru (Wagner et al. 2014).

Součástí rezervoáru HIV-1 jsou také monocyty a makrofágy, které jsou časným cílem infekce HIV-1 (Koppensteiner, Brack-Werner, and Schindler 2012). Tyto buňky na svém povrchu nesou receptor CD4 i koreceptory CCR5 a CXCR4 (Lee et al. 1999). Vzhledem k tomu, že monocyty/makrofágy jsou více rezistentní k cytopatickým efektům viru HIV, mohou virus uchovávat delší dobu. Po vstupu do tkání monocyty nevrátne diferencují v makrofágy a mikrogliové buňky mozku (Le Douce et al. 2010). A jelikož jsou makrofágy přítomné ve většině orgánů, mohou se podílet na diseminaci viru v těle. Dalším rezervoárem jsou dendritické buňky, které dokáží transportovat infekční virus, aniž by byly samy infikovány. Nicméně takto internalizovaný virus reprezentuje pravděpodobně pouze krátkodobý rezervoár *in vivo* s omezenou účastí na chronické perzistenci viru (Turville et al. 2004), přestože *in vitro* bylo prokázáno, že myeloidní dendritické buňky mohou přežít a zůstat infekční déle než 45 dní (Popov et al. 2005). V neposlední řadě jsou součástí rezervoáru i folikulární dendritické buňky (Schmitz et al. 1994) a pravděpodobně i NK buňky (Valentin et al. 2002) či žírné buňky (Sundstrom et al. 2004). Výčet těchto různých buněčných typů podílejících se na tvorbě

rezervoáru naznačuje, že pravděpodobně pro každý typ rezervoáru bude potřeba individuálního přístupu pro jeho eliminaci.

Na ustavení a udržování latentního stavu integrovaného proviru v rezervoáru se podílejí různé mechanismy. Jedná se například o nedostatek transkripčních faktorů v klidových buňkách, nedostatek dNTP pro reverzní transkripci v klidových buňkách způsobený dNTPázovou aktivitou buněčného proteinu SAMHD1 (Baldauf et al. 2012; Descours et al. 2012), inhibiči prostřednictvím miRNA (Ruelas et al. 2015; Patel et al. 2014), dále o epigenetické mechanismy zahrnující metylaci DNA v promotorové oblasti proviru a heterochromatinovou strukturu integrovaného proviru. Všechny vyjmenované a řada dalších mechanismů se účastní umlčování genové exprese proviru HIV-1 v klidových paměťových CD4⁺ T-buňkách. V mikrogliových buňkách má významnou roli v podpoře virové latence transkripční faktor CTIP2, který přivolává HDAC1 a HDAC2 na virový promotor, což vede k lokální deacetylaci histonu H3 a tvorbě heterochromatinového prostředí inhibujícího expresi genů HIV-1 (Rohr et al. 2003). Dalšími buňkami mozku nesoucí latentní provirus jsou nejhojnější mozkové buňky astrocyty, které umlčují transkripci HIV-1 prostřednictvím HDAC a histonových metyltransferáz (Narasipura, Kim, and Al-Harhi 2014).

V tomto projektu jsme pro studium latence viru HIV-1 použili modelové buněčné linie odvozené od immortalizovaných CD4⁺ buněk T-buněčné leukemie Jurkat, které v sobě nesou mini-provirus se strukturou LTR-Tat-IRES-EGFP-LTR. Přítomnost EGFP zajišťuje snadnou analýzu aktivace proviru pomocí průtokového cytometru. Klon H12 vykazuje nízkou hladinu metylace provirového promotoru a po jeho stimulaci PMA a TNF- α a následné selekci subklonů negativních na EGFP vznikl klon 2D12 s vysokou hladinou metylace provirového promotoru. Aktivovatelnost proviru v těchto dvou klonech není ovlivněna integračním místem, jelikož je v obou klonech jeden provirus integrovaný do stejného místa v genomu (Blazkova et al. 2009). Naše práce byla založená na předpokladu, že zatímco inhibiční histonové modifikace na promotoru H12 představují první, snadno reaktivovatelný, stupeň latence, tak metylace DNA na promotoru HIV-1 u klonu 2D12 latenci prohlubuje a reaktivaci znesnadňuje (Blazkova et al. 2009). S pomocí popsaného buněčného modelu jsme se snažili odhalit vztah mezi metylací DNA a reaktivací proviru.

Modely latence založené na buněčných liniích jsou významné v mnoha aspektech výzkumu HIV, včetně hledání malých molekul, které mohou latenci revertovat a potencionálně pomoci virus eradikovat, jelikož přímé studium latence *ex vivo* s použitím buněk infikovaných

pacientů je komplikované i kvůli nízké frekvenci a absenci markeru latentně infikovaných buněk (Jordan, Bisgrove, and Verdin 2003; Folks et al. 1989; Pomerantz et al. 1990). Bosque a Planelles vytvořili model, ve kterém infikují primární naivní CD4⁺ T-buňky, v nichž kultivace s růstovými faktory a protilátkami vede k indukci diferenciaci v paměťové buňky (Bosque and Planelles 2009). Jiná laboratoř vyvinula model paměťových klidových CD4⁺ buněk kultivovaných s chemokiny, které umožní tyto typicky nepermissivní buňky infikovat (Cameron et al. 2010). V jiném případě bylo pro infekci klidových primárních CD4⁺ T-buněk využito spinokulace (Lassen et al. 2012; Swiggard et al. 2005). Nicméně krátký poločas života primárních CD4⁺ buněk limituje rozsah a trvání experimentů, které vzhledem k tématu výzkumu musejí být poměrně dlouhodobé. Kim *et al.* našli kompromis mezi používáním latentních CD4⁺ T-buněk *ex vivo* a buněčných linií odvozených z CD4⁺ T-lymfocytů, které dostatečně nereprezentují klidový stav latentně infikovaných buněk přítomných v pacientech. Primární CD4⁺ T-buňky transdukují Bcl-2, což umožní jejich dlouhodobou kultivaci. Primární CD4⁺ T-buňky transdukované Bcl-2 se navrátí do klidového stavu, ale na aktivační podněty T-buněk odpovídají normálně. Tyto buňky jsou následně infikovány reportérovým virem HIV-1 a jsou ponechány v kultuře několik týdnů bez aktivačních stimulů, aby ustavily latenci v přeživších buňkách (Yang, Xing, et al. 2009).

Cílem této a podobných studií je reaktivovat latentní provirus při absenci globální stimulace CD4⁺ T-buněk, přičemž přenesení těchto poznatků do systému *in vivo* by mohlo vést k eliminaci buněk s reaktivovaným provirem imunitními mechanizmy nebo virovými cytopatickými efekty, zatímco antiretrovirová léčba zabrání dalšímu šíření viru, tzv. “kick and kill” terapeutická strategie. Obecně se dnes předpokládá, že po několika cyklech reaktivity proviru by mohlo dojít k eliminaci rezervoáru.

Pro studium reaktivity proviru HIV-1 v buňkách 2D12 jsme využili, stejně jako v předchozím projektu o nádorové progresi, RNA interferenci. Tentokrát jsme použili tranzientní transfekci siRNA. Jako cíle RNAi jsme identifikovali gen *DNMT1* a *DNMT3B*, které ovlivňují metylaci CpG, a modulace jejich exprese by mohla pomoci objasnit roli metylace promotoru HIV-1 ve virové latenci. Snížení exprese *DNMT1* zajišťující udržení metylace DNA během replikace vedlo k 11% nárůstu reaktivity proviru HIV-1 po stimulaci buněk PMA a TNF- α . K nárůstu pravděpodobně přispěla snížená hladina metylace proviru, která poklesla o 17% šestý den po transfekci siDNMT1. Tento kontinuální pokles metylace DNA je pravděpodobně výsledkem pasivní demethylace závislé na replikaci DNA. Po snížení hladiny DNMT3B, která zajišťuje metylaci *de novo*, došlo k nárůstu reaktivity proviru o 7% po stimulaci buněk PMA a

TNF- α , ale metylace 5'LTR zůstala nezměněná. Získané výsledky naznačují, že metylace CpG může do jisté míry inhibovat reaktivovatelnost proviru HIV-1. K výzkumu role DNA metyltransferáz byly využity i různé specifické inhibitory. Methylace DNA je úzce spojena s nádorovou progresí a vzhledem k rozsáhlosti vývoje protinádorových léčiv existují různé molekuly interferující s aktivitou DNMT, které jsou testovány v klinických studiích (Foulks et al. 2012) a mohou být použity i pro studium virové latence. Po aplikaci inhibitoru metylace DNA 5-aza-dC v kombinaci s TNF- α na modelovou linii J-Lat s latentním provirem došlo k nárůstu reaktivity proviru oproti buňkám ošetřených pouze TNF- α . Opačný efekt měl 5-aza-dC v T-lymfoidní linii ACH-2 a linii lidských monocytů U1, kde aplikace 5-aza-dC společně s TNF- α vedla ke snížení produkce HIV-1 (Fernandez and Zeichner 2010). Tyto výsledky poukazují na rozdílný vliv inhibitorů DNMT na různé buněčné linie, což předpovídá jejich ještě dlouhou cestu, než budou moci být využity k eradikaci latentního rezervoáru v pacientech.

Ve výzkumu nádorové progresi se s úspěchem využívají také HDACi (Jaboin et al. 2002; Paris et al. 2008). Jsou také nejvíce studovanými agens v souvislosti s aktivací latentního rezervoáru HIV-1, jelikož jsou málo toxické a nezpůsobují globální aktivaci T-buněk (Bose, Dai, and Grant 2014). Aplikace HDACi I. třídy Vorinostatu (SAHA) na CD4⁺ T-buňky pacientů infikovaných HIV léčených ART vedla k indukci virové produkce *ex vivo* (Archin et al. 2009). Bohužel v další studii bylo ukázáno, že žádný z běžně používaných HDACi kromě bryostatinu-1 nebyl schopen indukovat produkci viru v buňkách izolovaných z aviremických pacientů infikovaných HIV-1 léčených ART (Bullen et al. 2014). Jaký vliv na reaktivaci latentního proviru HIV-1 mají HDAC jsme se chtěli podívat v našich modelových buňkách 2D12. Snížení exprese *HDAC1* vliv na reaktivaci proviru HIV-1 nemělo v nestimulovaných ani stimulovaných buňkách 2D12. Snížení exprese *HDAC2* ve stimulovaných buňkách zvýšilo reaktivaci proviru o 12%, ale nevedlo ke změnám v metylaci promotoru HIV-1. Tyto výsledky dokládají, že v buňkách s vysokou metylací promotoru HIV-1, vede modulace exprese HDAC2 k částečnému zvýšení reaktivity latentního proviru. Role metylace DNA a histonových modifikací však není v latenci HIV-1 zastupitelná. Chromatinové změny předcházejí metylaci promotoru HIV-1 během ustavení latence HIV-1 a také iniciují reaktivaci latentního HIV-1 navzdory přítomnosti metylovaných CpG na virovém promotoru (Blazkova et al. 2009). Výsledky získané po snížení exprese *DNMT1* a HDAC2 tyto nezastupitelné role metylace DNA a histonových modifikací dokládají.

Vzhledem k tomu, že se efekt snížené hladiny DNMT na reaktivaci proviru projevil na modelových buňkách až po jejich stimulaci PMA a TNF- α , je pravděpodobné, že metylační

změny musí být doprovázeny dalšími změnami, jako je přítomnost různých transkripčních faktorů. Kromě těch buněčných je to i virem kódovaný transaktivační protein Tat. Přetože je Tat nejsilnějším aktivátorem HIV-1, nebyl schopen reaktivovat provirus bez stimulace buněk PMA a TNF- α . Stabilní transgenní zvýšení exprese *Tat* v buňkách 2D12 vedla po jejich aktivaci PMA a TNF- α i ke stimulaci exprese endogenního *Tat*. Stejný ale mnohem výraznější efekt jsme pozorovali u klonu H12 s nízkou hladinou metylace promotoru HIV-1. Zvýšená exprese *Tat* ve stimulovaných buňkách 2D12 vede k nárůstu reaktivity proviru o 20%. Tato aktivace transkripce virových genů ale nebyla doprovázená úbytkem metylace CpG v 5'LTR proviru HIV-1. Transgenní vnášení *Tat* do latentně infikovaných buněk pravděpodobně nebude použito k eradikaci virového rezervoáru v pacientech mimo jiné z důvodu jeho toxicity, ale poznatky získané z těchto experimentů mohou pomoci lépe pochopit komplexnost dějů a interakce transkripčních faktorů na promotoru HIV-1.

Existují i studie zaměřující se na buněčné faktory nezbytné pro expresi virových genů, včetně prací popisujících nekonvenční roli NF- κ B jako transkripčního represoru, který zprostředkovává metylaci DNA přivoláním DNMT1 či DNMT3B na cílovou sekvenci DNA (Liu et al. 2012; Acharyya et al. 2010; Pacaud et al. 2014). Přivolání DNA metyltransferáz pomocí NF- κ B by mohl být mechanismus akumulace metylace DNA na 5'LTR po stimulaci PMA a TNF- α , která byla detekována v našem modelovém systému. Další studie dokládá, že mutace místa κ B I na promotoru HIV-1 snížila efekt heterodimeru p50-RelA aktivujícího expresi HIV-1 prostřednictvím NF- κ B a mutace vazebného místa Sp1 III brání v činnosti jak p50-RelA tak histonové acetyltransferáze (HAT) p300. Nicméně existence různých subtypů HIV-1 a sekvenční variabilita viru ve vazebných místech Sp1 či κ B a dalších místech U3 oblasti naznačuje, že různé virové subtypy mohou mít odlišné mechanismy latence a každý může vyžadovat odlišnou reaktivační strategii (Burnett et al. 2009).

V druhé části projektu jsme se zabývali reaktivací latentního proviru HIV-1. Vzhledem k přetrvávajícímu neúspěchu eradikovat latentní rezervoár v pacientech infikovaných HIV-1 je potřeba lépe pochopit mechanismy udržování latence a reverze latentního stavu kombinováním či hledáním nových aktivačních agens jako je například oxid arsenitý (As_2O_3) (Lusic et al. 2013), jehož aplikace na buňky H12 vedla k 10% nárůstu reaktivity proviru. Jako inspirace k dalšímu studiu virové latence může sloužit výzkum nádorové progresy, jelikož epigenetické regulace, zapojení transkripčních faktorů v procesech inhibice tumorsupresorových genů a latence proviru nebo naopak aktivace protoonkogenů a reaktivity latentního proviru jsou velmi podobné. Důkazem je rederivace různých inhibitorů původně určených pro nádorovou terapii k výzkumu

HIV-1 a také fakt, že virus HIV-1 integrovaný právě do genů asociovaných s nádory v dlouhodobém aspektu podporuje proliferaci buněk latentního rezervoáru (Chomont et al. 2009; Wagner et al. 2014).

6.3. Analýza metylace promotoru *ERVWE1* v seminomech

Seminomy patří mezi TGCT, které vznikají jako novotvar *in situ* z primordiálních zárodečných buněk nebo premeiotických gonocytů s opožděnou nebo blokovanou maturací (Rajpert-De Meyts 2006; Oosterhuis and Looijenga 2005). Stejně jako původní zárodečné buňky tak i buňky seminomu exprimují pluripotentní markery včetně *OCT4*, *NANOG* a *SALL4* (Gillis et al. 2011; Almstrup et al. 2004; Cao et al. 2009). Z epigenomického pohledu vykazují buňky seminomu nízkou míru metylace, která není způsobená nedostatečnou funkcí DNMT1. Buňky seminomu pravděpodobně prochází vývojovým programovaným úbytkem 5-mC (Netto et al. 2008).

V našich dřívějších studiích bylo prokázáno, že exprese *ERVWE1* je v neplacentálních tkáních suprimovaná epigenetickými mechanizmy (Matouskova et al. 2006; Trejbalova et al. 2011). V této práci jsme analyzovali přítomnost 5-mC a demetylačního intermediátu 5-hmC na promotoru *ERVWE1* v seminomech. Dle očekávání jsme v seminomech viděli úbytek 5-mC v porovnání s adekvátní kontrolou. Za povšimnutí stojí, že metylační vzorec promotoru *ERVWE1* v seminomech vykazoval dvojí charakter, buď kompletně demetylované molekuly nebo plně metylované molekuly. Podobný bimodální vzorec byl pozorován v promotoru latentního nebo aktivovaného proviru HIV-1 (Trejbalova et al. 2016) a potvrzuje význam demetylace promotoru pro obnovení transkripční aktivity. Zajímavě dopadla analýza přítomnosti 5-hmC na promotoru *ERVWE1*. Množství 5-hmC bylo velmi nízké nebo nedetekovatelné. Jedno z vysvětlení by mohla být kinetika procesu aktivní demetylace. Ta je zajištěna enzymy rodiny TET. Konkrétně TET1 vykazuje v seminomech zvýšenou expresi (Benesova et al. 2017). Programovaný úbytek 5-mC za vzniku 5-hmC je možná časově omezená událost, ke které dochází v časně fázi vývoje seminomů. Po aktivní demetylaci a odstranění 5-mC pak během metylace DNA nedojde k metylaci *de novo*, zatímco udržovací metylace už nemá předlohu pro metylaci, která je vymazaná. V době odběru makroskopického tumoru již 5-hmC není přítomen. Nízké množství 5-hmC v seminomech je v souladu s prací Nettersheim *et al.*, který demonstruje, že většina seminomů jsou hypometylované a hypohydroxymetylované, zatímco další demetylační intermediáty 5-formylcytosin a 5-karboxylcytosin jsou detekovatelné ve všech nádorech zárodečných buněk a jejich hodnoty neodpovídají množství 5-mC či 5-hmC (Nettersheim et al.

2013). Další možné vysvětlení nízkého množství 5-hmC na promotoru *ERVWE1*, by mohlo spočívat v jeho retrovirovém původu. Právě u retroelementů byla popsána velmi nízká hladina 5-hmC ve srovnání s ostatními genomickými regiony v primordiálních zárodečných buňkách (Guo et al. 2015), s nimiž seminomy sdílí některé charakteristiky.

Tato studie exprese *ERVWE1* v seminomech propojuje dosavadní znalosti epigenetických regulací *ERVWE1* a genomických charakteristik seminomových buněk. Zároveň poukazuje na složitost procesů modifikace DNA během vzniku nádoru z primordiálních zárodečných buněk.

7 Závěry

S využitím kuřecí modelové linie sarkomových buněk jsme prokázali, že *HOPX* má v nemetastázujícím subklonu PR9692-E9 sníženou expresi, která je důsledkem metylace promotoru *HOPX*. Dále uvádíme, že snížená exprese *HOPX* vede k inhibici migrace a invazivity ve 3D kolagenu *in vitro*. Po inokulaci buněk se sníženou expresí *HOPX* do syngenních kuřat dochází k redukcí počtu metastáz. Porovnáním expresních změn s pilotními výsledky z mikročipu jsme identifikovali nové kandidátní geny, které s největší pravděpodobností ovlivňují metastatickou kapacitu buněk a možná jsou interakčními partnery *HOPX*. Jedná se o geny *ADCY7*, *ARHGDI3*, *BAMBI*, *FOXP1*, *FSCN1*, *GFPT2*, *ITPR3*, *ITGA4*, *NCAM1*, *NUDT14*, *RGS20*, *RHOF* a *RIAM*. Po snížení exprese vybraného genu *ITGA4* dochází k potlačení tvorby metastáz *in vivo*. Touto studií jsme prokázali pozitivní vliv genu *HOPX* na tvorbu metastáz z primárního sarkomového nádoru a identifikovali jsme geny, které mohou být využity jako nové intervenční cíle ve výzkumu metastatické progresi.

V dalším projektu věnovanému latenci viru HIV-1 jsme pomocí siRNA u kandidátních genů *DNMT1*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2* tranzientně snížili expresi těchto genů, což v případě *DNMT1* a *DNMT3B* a *HDAC2* nikoli *HDAC1* vedlo ke zvýšení reaktivovatelnosti proviru po stimulaci buněk PMA a TNF- α . Dále jsme prokázali, že snížená hladina DNMT1 vede k redukcí počtu metylovaných CpG v promotoru proviru HIV-1, což pravděpodobně usnadňuje reaktivaci proviru HIV-1. Dále jsme potvrdili vliv transaktivačního proteinu Tat a As2O3 na reaktivovatelnost proviru HIV-1, který nebyl doprovázen změnami metylace 5'LTR proviru HIV-1. Touto studií jsme potvrdili význam metylace provirového promotoru na reaktivovatelnost latentního proviru a udržení latentního rezervoáru, ale také existenci dalších regulačních mechanismů ovlivňující tento proces.

Ve třetím projektu jsme studovali epigenetickou regulaci *ERVWE1* v seminomech. Analyzovali jsme metylaci promotoru *ERVWE1* a přítomnost demetylačního intermediátu 5-hmC. S použitím bisulfitového sekvenování jsme odhalili nízkou míru metylace promotoru *ERVWE1* ve vzorcích seminomů v porovnání s adekvátní neseminomovou kontrolou. Kombinací bisulfitové a oxidativní bisulfitové analýzy jsme naměřili pouze velmi malé či nedetekovatelné množství 5-hmC. Jelikož byla oxidace efektivní, absence 5-hmC na promotoru *ERVWE1* je pravděpodobně ovlivněna kinetikou demetylačního procesu. Touto studií dokládáme, že zvýšené expresi *ERVWE1* v seminomech předchází demetylace promotoru *ERVWE1*.

8 Podíl autora na výsledcích obsažených v disertační práci

Výsledky obsažené v této práci byly publikovány v následujících článcích:

Kovarova, D., J. Plachy, J. Kosla, K. Trejbalova, V. Cermak and J. Hejnar (2013). "Downregulation of HOPX controls metastatic behavior in sarcoma cells and identifies genes associated with metastasis." *Mol Cancer Res* 11(10): 1235-1247.

Trejbalova, K., **D. Kovarova**, J. Blazkova, L. Machala, D. Jilich, J. Weber, D. Kucerova, O. Vencalek, I. Hirsch and J. Hejnar (2016). "Development of 5' LTR DNA methylation of latent HIV-1 provirus in cell line models and in long-term-infected individuals." *Clin Epigenetics* 8: 19.

Benesova, M., K. Trejbalova, **D. Kovarova**, Z. Vernerova, T. Hron, D. Kucerova and J. Hejnar (2017). "DNA hypomethylation and aberrant expression of the human endogenous retrovirus ERVWE1/syncytin-1 in seminomas." *Retrovirology* 14(1): 20.

Denisa Kovářová je první autorkou publikace o vlivu genu *HOPX* na metastázování, kde se zásadním způsobem podílela na většině získaných výsledcích. Výjimku tvoří analýza tvorby metastáz *in vivo*, kterou provedl Ing. Jiří Plachý, CSc. Ve zbývajících publikacích je D. Kovářová druhá a třetí autorka. Z těchto publikací jsou uvedeny pouze výsledky pokusů, které prováděla D. Kovářová.

9 Použitá literatura

- Adesina, A. M., Y. Nguyen, V. Mehta, H. Takei, P. Stangeby, S. Crabtree, M. Chintagumpala, and M. K. Gumerlock. 2007. 'FOXG1 dysregulation is a frequent event in medulloblastoma', *J Neurooncol*, 85: 111-22.
- Adu, J., F. T. Leong, N. R. Smith, J. P. Leek, A. F. Markham, P. A. Robinson, and A. J. Mighell. 2002. 'Expression of mOb1, a novel atypical 73 amino acid K50-homeodomain protein, during mouse development', *Mech Dev*, 119 Suppl 1: S43-7.
- Agarwal, N. K., C. H. Chen, H. Cho, D. R. Boulbes, E. Spooner, and D. D. Sarbassov. 2013. 'Rictor regulates cell migration by suppressing RhoGDI2', *Oncogene*, 32: 2521-6.
- Aguirre-Ghiso, J. A. 2007. 'Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy', *Nat Rev Cancer*, 7: 834-46.
- Acharyya, S., S. M. Sharma, A. S. Cheng, K. J. Ladner, W. He, W. Kline, H. Wang, M. C. Ostrowski, T. H. Huang, and D. C. Guttridge. 2010. 'TNF inhibits Notch-1 in skeletal muscle cells by Ezh2 and DNA methylation mediated repression: implications in duchenne muscular dystrophy', *PloS one*, 5: e12479.
- Al-Alwan, M., S. Olabi, H. Ghebeh, E. Barhoush, A. Tulbah, T. Al-Tweigeri, D. Ajarim, and C. Adra. 2011. 'Fascin is a key regulator of breast cancer invasion that acts via the modification of metastasis-associated molecules', *PLoS One*, 6: e27339.
- Albritton, K. H. 2005. 'Sarcomas in adolescents and young adults', *Hematol Oncol Clin North Am*, 19: 527-46, vii.
- Aleshin, A., and R. S. Finn. 2010. 'SRC: a century of science brought to the clinic', *Neoplasia*, 12: 599-607.
- Allard, W. J., J. Matera, M. C. Miller, M. Repollet, M. C. Connelly, C. Rao, A. G. Tibbe, J. W. Uhr, and L. W. Terstappen. 2004. 'Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases', *Clin Cancer Res*, 10: 6897-904.
- Almstrup, K., C. E. Hoei-Hansen, U. Wirkner, J. Blake, C. Schwager, W. Ansorge, J. E. Nielsen, N. E. Skakkebaek, E. Rajpert-De Meyts, and H. Leffers. 2004. 'Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling', *Cancer Res*, 64: 4736-43.
- Ambrosi, C., M. Manzo, and T. Baubec. 2017. 'Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation', *J Mol Biol*, 429: 1459-75.
- Aqbi, H. F., M. Wallace, S. Sappal, K. K. Payne, and M. H. Manjili. 2018. 'IFN-gamma orchestrates tumor elimination, tumor dormancy, tumor escape, and progression', *J Leukoc Biol*.
- Archin, N. M., A. Espeseth, D. Parker, M. Cheema, D. Hazuda, and D. M. Margolis. 2009. 'Expression of latent HIV induced by the potent HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid', *AIDS Res Hum Retroviruses*, 25: 207-12.
- Arrowsmith, J. 2011. 'Trial watch: phase III and submission failures: 2007-2010', *Nat Rev Drug Discov*, 10: 87.
- Aryee, M. J., W. Liu, J. C. Engelmann, P. Nuhn, M. Gurel, M. C. Haffner, D. Esopi, R. A. Irizarry, R. H. Getzenberg, W. G. Nelson, J. Luo, J. Xu, W. B. Isaacs, G. S. Bova, and S. Yegnasubramanian. 2013. 'DNA methylation alterations exhibit intraindividual stability and interindividual heterogeneity in prostate cancer metastases', *Sci Transl Med*, 5: 169ra10.
- Asanoma, K., H. Kato, T. Inoue, T. Matsuda, and N. Wake. 2004. 'Analysis of a candidate gene associated with growth suppression of choriocarcinoma and differentiation of trophoblasts', *J Reprod Med*, 49: 617-26.
- Asanoma, K., T. Matsuda, H. Kondo, K. Kato, T. Kishino, N. Niikawa, N. Wake, and H. Kato. 2003. 'NECC1, a candidate choriocarcinoma suppressor gene that encodes a homeodomain consensus motif', *Genomics*, 81: 15-25.
- Avvisato, C. L., X. Yang, S. Shah, B. Hoxter, W. Li, R. Gaynor, R. Pestell, A. Tozeren, and S. W. Byers. 2007. 'Mechanical force modulates global gene expression and beta-catenin signaling in colon cancer cells', *J Cell Sci*, 120: 2672-82.

- Ay, E., F. Banati, M. Mezei, A. Bakos, H. H. Niller, K. Buzas, and J. Minarovits. 2013. 'Epigenetics of HIV infection: promising research areas and implications for therapy', *AIDS Rev*, 15: 181-8.
- Baldauf, H. M., X. Pan, E. Erikson, S. Schmidt, W. Daddacha, M. Burggraf, K. Schenkova, I. Ambiel, G. Wabnitz, T. Gramberg, S. Panitz, E. Flory, N. R. Landau, S. Sertel, F. Rutsch, F. Lasitschka, B. Kim, R. Konig, O. T. Fackler, and O. T. Keppler. 2012. 'SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells', *Nat Med*, 18: 1682-7.
- Ballestar, E., and M. Esteller. 2008. 'Epigenetic gene regulation in cancer', *Adv Genet*, 61: 247-67.
- Barker, N. 2014. 'Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 19-33.
- Barretina, J., G. Caponigro, N. Stransky, K. Venkatesan, A. A. Margolin, S. Kim, C. J. Wilson, J. Lehar, G. V. Kryukov, D. Sonkin, A. Reddy, M. Liu, L. Murray, M. F. Berger, J. E. Monahan, P. Morais, J. Meltzer, A. Korejwa, J. Jane-Valbuena, F. A. Mapa, J. Thibault, E. Bric-Furlong, P. Raman, A. Shipway, I. H. Engels, J. Cheng, G. K. Yu, J. Yu, P. Aspesi, Jr., M. de Silva, K. Jagtap, M. D. Jones, L. Wang, C. Hatton, E. Palesscandolo, S. Gupta, S. Mahan, C. Sougnez, R. C. Onofrio, T. Liefeld, L. MacConaill, W. Winckler, M. Reich, N. Li, J. P. Mesirov, S. B. Gabriel, G. Getz, K. Ardlie, V. Chan, V. E. Myer, B. L. Weber, J. Porter, M. Warmuth, P. Finan, J. L. Harris, M. Meyerson, T. R. Golub, M. P. Morrissey, W. R. Sellers, R. Schlegel, and L. A. Garraway. 2012. 'The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity', *Nature*, 483: 603-7.
- Barton, K., A. Winkelmann, and S. Palmer. 2016. 'HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy', *Trends Microbiol*, 24: 345-55.
- Behrens, J., L. Vakaet, R. Friis, E. Winterhager, F. Van Roy, M. M. Mareel, and W. Birchmeier. 1993. 'Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene', *J Cell Biol*, 120: 757-66.
- Benesova, M., K. Trejbalova, D. Kucerovala, Z. Vernerova, T. Hron, A. Szabo, R. Amouroux, P. Klezl, P. Hajkova, and J. Hejnar. 2017. 'Overexpression of TET dioxygenases in seminomas associates with low levels of DNA methylation and hydroxymethylation', *Mol Carcinog*, 56: 1837-50.
- Berman, D. M., Y. Wang, Z. Liu, Q. Dong, L. A. Burke, L. A. Liotta, R. Fisher, and X. Wu. 2004. 'A functional polymorphism in RGS6 modulates the risk of bladder cancer', *Cancer Res*, 64: 6820-6.
- Bhowmick, N. A., E. G. Neilson, and H. L. Moses. 2004. 'Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression', *Nature*, 432: 332-7.
- Bird, A. P. 1986. 'CpG-rich islands and the function of DNA methylation', *Nature*, 321: 209-13.
- Bisgrove, D., M. Lewinski, F. Bushman, and E. Verdin. 2005. 'Molecular mechanisms of HIV-1 proviral latency', *Expert Rev Anti Infect Ther*, 3: 805-14.
- Bishop, J. M., B. Baker, D. Fujita, P. McCombe, D. Sheiness, K. Smith, D. H. Spector, D. Stehelin, and H. E. Varmus. 1978. 'Genesis of a virus-transforming gene', *Natl Cancer Inst Monogr*: 219-23.
- Blazkova, J., K. Trejbalova, F. Gondois-Rey, P. Halfon, P. Philibert, A. Guiguen, E. Verdin, D. Olive, C. Van Lint, J. Hejnar, and I. Hirsch. 2009. 'CpG methylation controls reactivation of HIV from latency', *PLoS Pathog*, 5: e1000554.
- Blume-Jensen, P., and T. Hunter. 2001. 'Oncogenic kinase signalling', *Nature*, 411: 355-65.
- Bornelov, S., E. Seroussi, S. Yosefi, K. Pendavis, S. C. Burgess, M. Grabherr, M. Friedman-Einat, and L. Andersson. 2017. 'Correspondence on Lovell et al.: identification of chicken genes previously assumed to be evolutionarily lost', *Genome Biol*, 18: 112.
- Bose, P., Y. Dai, and S. Grant. 2014. 'Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights', *Pharmacol Ther*, 143: 323-36.
- Bosque, A., and V. Planelles. 2009. 'Induction of HIV-1 latency and reactivation in primary memory CD4+ T cells', *Blood*, 113: 58-65.
- Boyer, B., Y. Bourgeois, and M. F. Poupon. 2002. 'Src kinase contributes to the metastatic spread of carcinoma cells', *Oncogene*, 21: 2347-56.
- Bradner, J. E., N. West, M. L. Grachan, E. F. Greenberg, S. J. Haggarty, T. Warnow, and R. Mazitschek. 2010. 'Chemical phylogenetics of histone deacetylases', *Nat Chem Biol*, 6: 238-43.

- Brocks, D., Y. Assenov, S. Minner, O. Bogatyrova, R. Simon, C. Koop, C. Oakes, M. Zucknick, D. B. Lipka, J. Weischenfeldt, L. Feuerbach, R. Cowper-Sal Lari, M. Lupien, B. Brors, J. Korbel, T. Schlomm, A. Tanay, G. Sauter, C. Gerhauser, C. Plass, and ICGC Early Onset Prostate Cancer Project. 2014. 'Intratumor DNA methylation heterogeneity reflects clonal evolution in aggressive prostate cancer', *Cell Rep*, 8: 798-806.
- Brown, M. T., and J. A. Cooper. 1996. 'Regulation, substrates and functions of src', *Biochim Biophys Acta*, 1287: 121-49.
- Buchbinder, A. 1990. 'Virology of the human immunodeficiency virus type 1', *Ear Nose Throat J*, 69: 376, 79-84.
- Bullen, C. K., G. M. Laird, C. M. Durand, J. D. Siliciano, and R. F. Siliciano. 2014. 'New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo', *Nat Med*, 20: 425-9.
- Burnett, J. C., K. Miller-Jensen, P. S. Shah, A. P. Arkin, and D. V. Schaffer. 2009. 'Control of stochastic gene expression by host factors at the HIV promoter', *PLoS Pathog*, 5: e1000260.
- Bushman, F., M. Lewinski, A. Ciuffi, S. Barr, J. Leipzig, S. Hannenhalli, and C. Hoffmann. 2005. 'Genome-wide analysis of retroviral DNA integration', *Nat Rev Microbiol*, 3: 848-58.
- Cameron, P. U., S. Saleh, G. Sallmann, A. Solomon, F. Wightman, V. A. Evans, G. Boucher, E. K. Haddad, R. P. Sekaly, A. N. Harman, J. L. Anderson, K. L. Jones, J. Mak, A. L. Cunningham, A. Jaworowski, and S. R. Lewin. 2010. 'Establishment of HIV-1 latency in resting CD4+ T cells depends on chemokine-induced changes in the actin cytoskeleton', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 16934-9.
- Campbell, P. J., S. Yachida, L. J. Mudie, P. J. Stephens, E. D. Pleasance, L. A. Stebbings, L. A. Morsberger, C. Latimer, S. McLaren, M. L. Lin, D. J. McBride, I. Varela, S. A. Nik-Zainal, C. Leroy, M. Jia, A. Menzies, A. P. Butler, J. W. Teague, C. A. Griffin, J. Burton, H. Swerdlow, M. A. Quail, M. R. Stratton, C. Iacobuzio-Donahue, and P. A. Futreal. 2010. 'The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer', *Nature*, 467: 1109-13.
- Cao, D., J. Li, C. C. Guo, R. W. Allan, and P. A. Humphrey. 2009. 'SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors', *Am J Surg Pathol*, 33: 1065-77.
- Casas, E., J. Kim, A. Bendesky, L. Ohno-Machado, C. J. Wolfe, and J. Yang. 2011. 'Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis', *Cancer Res*, 71: 245-54.
- Celia-Terrassa, T., O. Meca-Cortes, F. Mateo, A. M. de Paz, N. Rubio, A. Arnal-Estape, B. J. Ell, R. Bermudo, A. Diaz, M. Guerra-Rebollo, J. J. Lozano, C. Estaras, C. Ulloa, D. Alvarez-Simon, J. Mila, R. Vilella, R. Paciucci, M. Martinez-Balbas, A. G. de Herreros, R. R. Gomis, Y. Kang, J. Blanco, P. L. Fernandez, and T. M. Thomson. 2012. 'Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells', *J Clin Invest*, 122: 1849-68.
- Cermak, V., J. Kosla, J. Plachy, K. Trejbalova, J. Hejnar, and M. Dvorak. 2010. 'The transcription factor EGR1 regulates metastatic potential of v-src transformed sarcoma cells', *Cell Mol Life Sci*, 67: 3557-68.
- Ciuffi, A., M. Llano, E. Poeschla, C. Hoffmann, J. Leipzig, P. Shinn, J. R. Ecker, and F. Bushman. 2005. 'A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration', *Nat Med*, 11: 1287-9.
- Coffin, J. M., D. W. Wells, J. M. Zerbato, J. D. Kuruc, S. Guo, B. T. Luke, J. J. Eron, M. Bale, J. Spindler, F. R. Simonetti, S. Hill, M. F. Kearney, F. Maldarelli, X. Wu, J. W. Mellors, and S. H. Hughes. 2019. 'Clones of infected cells arise early in HIV-infected individuals', *JCI Insight*, 4.
- Cohen, S. J., C. J. Punt, N. Iannotti, B. H. Saidman, K. D. Sabbath, N. Y. Gabrail, J. Picus, M. A. Morse, E. Mitchell, M. C. Miller, G. V. Doyle, H. Tissing, L. W. Terstappen, and N. J. Meropol. 2009. 'Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer', *Ann Oncol*, 20: 1223-9.
- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, and F. Zhang. 2013. 'Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems', *Science*, 339: 819-23.

- Cook, D., D. Brown, R. Alexander, R. March, P. Morgan, G. Satterthwaite, and M. N. Pangalos. 2014. 'Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework', *Nat Rev Drug Discov*, 13: 419-31.
- Costello, J. F., M. C. Fruhwald, D. J. Smiraglia, L. J. Rush, G. P. Robertson, X. Gao, F. A. Wright, J. D. Feramisco, P. Peltomaki, J. C. Lang, D. E. Schuller, L. Yu, C. D. Bloomfield, M. A. Caligiuri, A. Yates, R. Nishikawa, H. Su Huang, N. J. Petrelli, X. Zhang, M. S. O'Dorisio, W. A. Held, W. K. Cavenee, and C. Plass. 2000. 'Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns', *Nat Genet*, 24: 132-8.
- Cristofanilli, M., G. T. Budd, M. J. Ellis, A. Stopeck, J. Matera, M. C. Miller, J. M. Reuben, G. V. Doyle, W. J. Allard, L. W. Terstappen, and D. F. Hayes. 2004. 'Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer', *N Engl J Med*, 351: 781-91.
- D'Cruz, O. J., and F. M. Uckun. 2006. 'Novel tight binding PETT, HEPT and DABO-based non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase', *J Enzyme Inhib Med Chem*, 21: 329-50.
- Das, R. M., N. J. Van Hateren, G. R. Howell, E. R. Farrell, F. K. Bangs, V. C. Porteous, E. M. Manning, M. J. McGrew, K. Ohyama, M. A. Sacco, P. A. Halley, H. M. Sang, K. G. Storey, M. Placzek, C. Tickle, V. K. Nair, and S. A. Wilson. 2006. 'A robust system for RNA interference in the chicken using a modified microRNA operon', *Dev Biol*, 294: 554-63.
- de Bono, J. S., H. I. Scher, R. B. Montgomery, C. Parker, M. C. Miller, H. Tissing, G. V. Doyle, L. W. Terstappen, K. J. Pienta, and D. Raghavan. 2008. 'Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer', *Clin Cancer Res*, 14: 6302-9.
- De Craene, B., and G. Berx. 2013. 'Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression', *Nat Rev Cancer*, 13: 97-110.
- De Scheerder, M. A., B. Vrancken, S. Dellicour, T. Schlub, E. Lee, W. Shao, S. Rutsaert, C. Verhofstede, T. Kerre, T. Malfait, D. Hemelsoet, M. Coppens, A. Dhondt, D. De Looze, F. Vermassen, P. Lemey, S. Palmer, and L. Vandekerckhove. 2019. 'HIV Rebound Is Predominantly Fueled by Genetically Identical Viral Expansions from Diverse Reservoirs', *Cell Host Microbe*, 26: 347-58 e7.
- de Soultrait, V. R., C. Desjobert, and L. Tarrago-Litvak. 2003. 'Peptides as new inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase and integrase', *Curr Med Chem*, 10: 1765-78.
- Descours, B., A. Cribier, C. Chable-Bessia, D. Ayinde, G. Rice, Y. Crow, A. Yatim, O. Schwartz, N. Laguette, and M. Benkirane. 2012. 'SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells', *Retrovirology*, 9: 87.
- Deyell, M., C. S. Garris, and A. M. Laughney. 2021. 'Cancer metastasis as a non-healing wound', *Br J Cancer*, 124: 1491-502.
- Dighe, A. S., E. Richards, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 1994. 'Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors', *Immunity*, 1: 447-56.
- Donahue, D. A., and M. A. Wainberg. 2013. 'Cellular and molecular mechanisms involved in the establishment of HIV-1 latency', *Retrovirology*, 10: 11.
- Doyon, Y., W. Selleck, W. S. Lane, S. Tan, and J. Cote. 2004. 'Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans', *Mol Cell Biol*, 24: 1884-96.
- Duband, J. L. 2010. 'Diversity in the molecular and cellular strategies of epithelium-to-mesenchyme transitions: Insights from the neural crest', *Cell Adh Migr*, 4: 458-82.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2002. 'Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape', *Nat Immunol*, 3: 991-8.
- Dvorak, H. F. 1986. 'Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing', *N Engl J Med*, 315: 1650-9.
- Eden, A., F. Gaudet, A. Waghmare, and R. Jaenisch. 2003. 'Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation', *Science*, 300: 455.
- Ehrlich, M. 2002. 'DNA methylation in cancer: too much, but also too little', *Oncogene*, 21: 5400-13.

- Eidahl, J. O., B. L. Crowe, J. A. North, C. J. McKee, N. Shkriabai, L. Feng, M. Plumb, R. L. Graham, R. J. Gorelick, S. Hess, M. G. Poirier, M. P. Foster, and M. Kvaratskhelia. 2013. 'Structural basis for high-affinity binding of LEDGF PWWP to mononucleosomes', *Nucleic Acids Res*, 41: 3924-36.
- Elleder, D., and B. Kaspers. 2019. 'After TNF-alpha, still playing hide-and-seek with chicken genes', *Poult Sci*, 98: 4373-74.
- Ellenbroek, S. I., and J. van Rheenen. 2014. 'Imaging hallmarks of cancer in living mice', *Nat Rev Cancer*, 14: 406-18.
- Ellis, S., and H. Mellor. 2000. 'The novel Rho-family GTPase rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements', *Curr Biol*, 10: 1387-90.
- Ensoli, B., L. Buonaguro, G. Barillari, V. Fiorelli, R. Gendelman, R. A. Morgan, P. Wingfield, and R. C. Gallo. 1993. 'Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation', *J Virol*, 67: 277-87.
- Esteller, M. 2007. 'Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps', *Nat Rev Genet*, 8: 286-98.
- Esteller, M., M. F. Fraga, M. Guo, J. Garcia-Foncillas, I. Hedenfalk, A. K. Godwin, J. Trojan, C. Vaurs-Barriere, Y. J. Bignon, S. Ramus, J. Benitez, T. Caldes, Y. Akiyama, Y. Yuasa, V. Launonen, M. J. Canal, R. Rodriguez, G. Capella, M. A. Peinado, A. Borg, L. A. Aaltonen, B. A. Ponder, S. B. Baylin, and J. G. Herman. 2001. 'DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis', *Hum Mol Genet*, 10: 3001-7.
- Esteva-Font, C., B. J. Jin, and A. S. Verkman. 2014. 'Aquaporin-1 gene deletion reduces breast tumor growth and lung metastasis in tumor-producing MMTV-PyVT mice', *FASEB J*, 28: 1446-53.
- Fagan, J. B., M. E. Sobel, K. M. Yamada, B. de Crombrughe, and I. Pastan. 1981. 'Effects of transformation on fibronectin gene expression using cloned fibronectin cDNA', *J Biol Chem*, 256: 520-5.
- Fan, H., and C. Johnson. 2011. 'Insertional oncogenesis by non-acute retroviruses: implications for gene therapy', *Viruses*, 3: 398-422.
- Feng, Z., Y. Mao, N. Xu, B. Zhang, P. Wei, D. L. Yang, Z. Wang, Z. Zhang, R. Zheng, L. Yang, L. Zeng, X. Liu, and J. K. Zhu. 2014. 'Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 4632-7.
- Ferguson-Smith, A. C. 2011. 'Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm', *Nat Rev Genet*, 12: 565-75.
- Fernandez, G., and S. L. Zeichner. 2010. 'Cell line-dependent variability in HIV activation employing DNMT inhibitors', *Virology*, 7: 266.
- Fidler, I. J., and M. L. Kripke. 1977. 'Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor', *Science*, 197: 893-5.
- Finzi, D., J. Blankson, J. D. Siliciano, J. B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, J. Lisziewicz, F. Lori, C. Flexner, T. C. Quinn, R. E. Chaisson, E. Rosenberg, B. Walker, S. Gange, J. Gallant, and R. F. Siliciano. 1999. 'Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy', *Nat Med*, 5: 512-7.
- Folks, T. M. 1994. 'Mechanisms and strategies of viral antigenic variation', *Ann N Y Acad Sci*, 730: 37-41.
- Folks, T. M., K. A. Clouse, J. Justement, A. Rabson, E. Duh, J. H. Kehrl, and A. S. Fauci. 1989. 'Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 2365-8.
- Foulks, J. M., K. M. Parnell, R. N. Nix, S. Chau, K. Swierczek, M. Saunders, K. Wright, T. F. Hendrickson, K. K. Ho, M. V. McCullar, and S. B. Kanner. 2012. 'Epigenetic drug discovery: targeting DNA methyltransferases', *J Biomol Screen*, 17: 2-17.
- Frankfort, B. J., and I. H. Gelman. 1995. 'Identification of novel cellular genes transcriptionally suppressed by v-src', *Biochem Biophys Res Commun*, 206: 916-26.

- Friesema, E. C., J. Jansen, J. W. Jachtenberg, W. E. Visser, M. H. Kester, and T. J. Visser. 2008. 'Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10', *Mol Endocrinol*, 22: 1357-69.
- Frisch, S. M. 1997. 'The epithelial cell default-phenotype hypothesis and its implications for cancer', *Bioessays*, 19: 705-9.
- Fuerstenberg, S. M., and B. Vennstrom. 1993. 'Versatile avian retrovirus vectors', *Anal Biochem*, 209: 375-6.
- Gama-Sosa, M. A., V. A. Slagel, R. W. Trewyn, R. Oxenhandler, K. C. Kuo, C. W. Gehrke, and M. Ehrlich. 1983. 'The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors', *Nucleic Acids Res*, 11: 6883-94.
- Gao, H., A. N. Ozanturk, Q. Wang, G. H. Harlan, A. J. Schmitz, R. M. Presti, K. Deng, and L. Shan. 2021. 'Evaluation of HIV-1 latency reversal and antibody-dependent viral clearance by quantification of singly spliced HIV-1 vpu/env mRNA', *J Virol*.
- Garnett, M. J., E. J. Edelman, S. J. Heidorn, C. D. Greenman, A. Dastur, K. W. Lau, P. Greninger, I. R. Thompson, X. Luo, J. Soares, Q. Liu, F. Iorio, D. Surdez, L. Chen, R. J. Milano, G. R. Bignell, A. T. Tam, H. Davies, J. A. Stevenson, S. Barthorpe, S. R. Lutz, F. Kogera, K. Lawrence, A. McLaren-Douglas, X. Mitropoulos, T. Mironenko, H. Thi, L. Richardson, W. Zhou, F. Jewitt, T. Zhang, P. O'Brien, J. L. Boisvert, S. Price, W. Hur, W. Yang, X. Deng, A. Butler, H. G. Choi, J. W. Chang, J. Baselga, I. Stamenkovic, J. A. Engelman, S. V. Sharma, O. Delattre, J. Saez-Rodriguez, N. S. Gray, J. Settleman, P. A. Futreal, D. A. Haber, M. R. Stratton, S. Ramaswamy, U. McDermott, and C. H. Benes. 2012. 'Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells', *Nature*, 483: 570-5.
- Gehlsen, K. R., G. E. Davis, and P. Sriramarao. 1992. 'Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties', *Clin Exp Metastasis*, 10: 111-20.
- Gerlinger, M., A. J. Rowan, S. Horswell, J. Larkin, D. Endesfelder, E. Gronroos, P. Martinez, N. Matthews, A. Stewart, P. Tarpey, I. Varela, B. Phillimore, S. Begum, N. Q. McDonald, A. Butler, D. Jones, K. Raine, C. Latimer, C. R. Santos, M. Nohadani, A. C. Eklund, B. Spencer-Dene, G. Clark, L. Pickering, G. Stamp, M. Gore, Z. Szallasi, J. Downward, P. A. Futreal, and C. Swanton. 2012. 'Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing', *N Engl J Med*, 366: 883-92.
- Ghajar, C. M., H. Peinado, H. Mori, I. R. Matej, K. J. Evason, H. Brazier, D. Almeida, A. Koller, K. A. Hajjar, D. Y. Stainier, E. I. Chen, D. Lyden, and M. J. Bissell. 2013. 'The perivascular niche regulates breast tumour dormancy', *Nat Cell Biol*, 15: 807-17.
- Gillis, A. J., H. Stoop, K. Biermann, R. J. van Gurp, E. Swartzman, S. Cribbes, A. Ferlinz, M. Shannon, J. W. Oosterhuis, and L. H. Looijenga. 2011. 'Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis', *Int J Androl*, 34: e160-74.
- Gimenez, J., C. Montgiraud, G. Oriol, J. P. Pichon, K. Ruel, V. Tsatsaris, P. Gerbaud, J. L. Frendo, D. Evain-Brion, and F. Mallet. 2009. 'Comparative methylation of ERVWE1/syncytin-1 and other human endogenous retrovirus LTRs in placenta tissues', *DNA Res*, 16: 195-211.
- Gimenez, J., C. Montgiraud, J. P. Pichon, B. Bonnaud, M. Arsac, K. Ruel, O. Bouton, and F. Mallet. 2010. 'Custom human endogenous retroviruses dedicated microarray identifies self-induced HERV-W family elements reactivated in testicular cancer upon methylation control', *Nucleic Acids Res*, 38: 2229-46.
- Giraud, E., M. Inoue, and D. Hanahan. 2004. 'An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis', *J Clin Invest*, 114: 623-33.
- Glick, J. L., T. E. Meigs, A. Miron, and P. J. Casey. 1998. 'RGSZ1, a Gz-selective regulator of G protein signaling whose action is sensitive to the phosphorylation state of Galpha', *J Biol Chem*, 273: 26008-13.
- Goll, M. G., F. Kirpekar, K. A. Maggert, J. A. Yoder, C. L. Hsieh, X. Zhang, K. G. Golic, S. E. Jacobsen, and T. H. Bestor. 2006. 'Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2', *Science*, 311: 395-8.

- Goss, P. E., and A. F. Chambers. 2010. 'Does tumour dormancy offer a therapeutic target?', *Nat Rev Cancer*, 10: 871-7.
- Gosslar, U., P. Jonas, A. Luz, A. Lifka, D. Naor, A. Hamann, and B. Holzmann. 1996. 'Predominant role of alpha 4-integrins for distinct steps of lymphoma metastasis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 4821-6.
- Gratz, S. J., A. M. Cummings, J. N. Nguyen, D. C. Hamm, L. K. Donohue, M. M. Harrison, J. Wildonger, and K. M. O'Connor-Giles. 2013. 'Genome engineering of Drosophila with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease', *Genetics*, 194: 1029-35.
- Grimm-Gunter, E. M., M. Milbrandt, B. Merkl, M. Paulsson, and M. Plomann. 2008. 'PACSIN proteins bind tubulin and promote microtubule assembly', *Exp Cell Res*, 314: 1991-2003.
- Grivennikov, S. I., F. R. Greten, and M. Karin. 2010. 'Immunity, inflammation, and cancer', *Cell*, 140: 883-99.
- Gronchi, A., S. Lo Vullo, C. Colombo, P. Collini, S. Stacchiotti, L. Mariani, M. Fiore, and P. G. Casali. 2010. 'Extremity soft tissue sarcoma in a series of patients treated at a single institution: local control directly impacts survival', *Ann Surg*, 251: 506-11.
- Grueneberg, D. A., K. J. Simon, K. Brennan, and M. Gilman. 1995. 'Sequence-specific targeting of nuclear signal transduction pathways by homeodomain proteins', *Mol Cell Biol*, 15: 3318-26.
- Gu, J., X. Wu, Q. Dong, M. J. Romeo, X. Lin, J. S. Gutkind, and D. M. Berman. 2006. 'A nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in the PDZ-Rho guanine nucleotide exchange factor (Ser1416Gly) modulates the risk of lung cancer in Mexican Americans', *Cancer*, 106: 2716-24.
- Guibert, S., T. Forne, and M. Weber. 2009. 'Dynamic regulation of DNA methylation during mammalian development', *Epigenomics*, 1: 81-98.
- Guillot, N., D. Kollins, V. Gilbert, S. Xavier, J. Chen, M. Gentle, A. Reddy, E. Bottinger, R. Jiang, M. P. Rastaldi, A. Corbelli, and D. Schlondorff. 2012. 'BAMBI regulates angiogenesis and endothelial homeostasis through modulation of alternative TGFbeta signaling', *PLoS One*, 7: e39406.
- Guo, F., L. Yan, H. Guo, L. Li, B. Hu, Y. Zhao, J. Yong, Y. Hu, X. Wang, Y. Wei, W. Wang, R. Li, J. Yan, X. Zhi, Y. Zhang, H. Jin, W. Zhang, Y. Hou, P. Zhu, J. Li, L. Zhang, S. Liu, Y. Ren, X. Zhu, L. Wen, Y. Q. Gao, F. Tang, and J. Qiao. 2015. 'The Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Primordial Germ Cells', *Cell*, 161: 1437-52.
- Guo, W., Z. Keckesova, J. L. Donaher, T. Shibue, V. Tischler, F. Reinhardt, S. Itzkovitz, A. Noske, U. Zurrer-Hardi, G. Bell, W. L. Tam, S. A. Mani, A. van Oudenaarden, and R. A. Weinberg. 2012. 'Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state', *Cell*, 148: 1015-28.
- Gupta, S. P., and A. N. Nagappa. 2003. 'Design and development of integrase inhibitors as anti-HIV agents', *Curr Med Chem*, 10: 1779-94.
- Haggerty, C., H. Kretzmer, C. Riemenschneider, A. S. Kumar, A. L. Mattei, N. Bailly, J. Gottfreund, P. Giesselmann, R. Weigert, B. Brandl, P. Giehr, R. Buschow, C. Galonska, F. von Meyenn, M. B. Pappalardi, M. T. McCabe, L. Wittler, C. Giesecke-Thiel, T. Mielke, D. Meierhofer, B. Timmermann, F. J. Muller, J. Walter, and A. Meissner. 2021. 'Dnmt1 has de novo activity targeted to transposable elements', *Nat Struct Mol Biol*, 28: 594-603.
- Hajra, K. M., D. Y. Chen, and E. R. Fearon. 2002. 'The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer', *Cancer Res*, 62: 1613-8.
- Hann, H. W., A. E. Evans, S. E. Siegel, K. Y. Wong, H. Sather, A. Dalton, D. Hammond, and R. C. Seeger. 1985. 'Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience', *Cancer Res*, 45: 2843-8.
- Hann, H. W., B. Lange, M. W. Stahlhut, and K. A. McGlynn. 1990. 'Prognostic importance of serum transferrin and ferritin in childhood Hodgkin's disease', *Cancer*, 66: 313-6.
- Haqq, C., M. Nosrati, D. Sudilovsky, J. Crothers, D. Khodabakhsh, B. L. Pulliam, S. Federman, J. R. Miller, 3rd, R. E. Allen, M. I. Singer, S. P. Leong, B. M. Ljung, R. W. Sagebiel, and M. Kashani-Sabet. 2005. 'The gene expression signatures of melanoma progression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 6092-7.
- Harada, Y., K. Kijima, K. Shinmura, M. Sakata, K. Sakuraba, K. Yokomizo, Y. Kitamura, A. Shirahata, T. Goto, H. Mizukami, M. Saito, G. Kigawa, H. Nemoto, and K. Hibi. 2011. 'Methylation of the

- homeobox gene, HOPX, is frequently detected in poorly differentiated colorectal cancer', *Anticancer Res*, 31: 2889-92.
- Harris, J. F., A. F. Chambers, R. P. Hill, and V. Ling. 1982. 'Metastatic variants are generated spontaneously at a high rate in mouse KHT tumor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79: 5547-51.
- Hata, F., H. Nishimori, T. Yasoshima, H. Tanaka, K. Ohno, Y. Yanai, E. Ezoe, K. Kamiguchi, H. Isomura, R. Denno, N. Sato, and K. Hirata. 2004. 'Profiling analysis of differential gene expression between hematogenous and peritoneal metastatic sublines of human pancreatic cancer using a DNA chip', *J Exp Clin Cancer Res*, 23: 513-20.
- Hay, M., D. W. Thomas, J. L. Craighead, C. Economides, and J. Rosenthal. 2014. 'Clinical development success rates for investigational drugs', *Nat Biotechnol*, 32: 40-51.
- Hayden, R. T., Z. Gu, J. Ingersoll, D. Abdul-Ali, L. Shi, S. Pounds, and A. M. Caliendo. 2013. 'Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus', *J Clin Microbiol*, 51: 540-6.
- He, W., H. Wang, L. C. Hartmann, J. X. Cheng, and P. S. Low. 2007. 'In vivo quantitation of rare circulating tumor cells by multiphoton intravital flow cytometry', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 11760-5.
- He, Y. F., B. Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C. X. Song, K. Zhang, C. He, and G. L. Xu. 2011. 'Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA', *Science*, 333: 1303-7.
- Hejnar, J., P. Hajkova, J. Plachy, D. Elleder, V. Stepanets, and J. Svoboda. 2001. 'CpG island protects Rous sarcoma virus-derived vectors integrated into nonpermissive cells from DNA methylation and transcriptional suppression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 565-9.
- Hejnar, J., J. Plachy, J. Geryk, O. Machon, K. Trejbalova, R. V. Guntaka, and J. Svoboda. 1999. 'Inhibition of the rous sarcoma virus long terminal repeat-driven transcription by in vitro methylation: different sensitivity in permissive chicken cells versus mammalian cells', *Virology*, 255: 171-81.
- Helman, L. J., and P. Meltzer. 2003. 'Mechanisms of sarcoma development', *Nat Rev Cancer*, 3: 685-94.
- Henrich, T. J., E. Hanhauser, F. M. Marty, M. N. Sirignano, S. Keating, T. H. Lee, Y. P. Robles, B. T. Davis, J. Z. Li, A. Heisey, A. L. Hill, M. P. Busch, P. Armand, R. J. Soiffer, M. Altfeld, and D. R. Kuritzkes. 2014. 'Antiretroviral-free HIV-1 remission and viral rebound after allogeneic stem cell transplantation: report of 2 cases', *Ann Intern Med*, 161: 319-27.
- Herceg, Z., M. P. Lambert, K. van Veldhoven, C. Demetriou, P. Vineis, M. T. Smith, K. Straif, and C. P. Wild. 2013. 'Towards incorporating epigenetic mechanisms into carcinogen identification and evaluation', *Carcinogenesis*, 34: 1955-67.
- Hermann, A., H. Gowher, and A. Jeltsch. 2004. 'Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases', *Cell Mol Life Sci*, 61: 2571-87.
- Hermann, A., R. Goyal, and A. Jeltsch. 2004. 'The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites', *J Biol Chem*, 279: 48350-9.
- Hill, A. L., D. I. Rosenbloom, E. Goldstein, E. Hanhauser, D. R. Kuritzkes, R. F. Siliciano, and T. J. Henrich. 2016. 'Real-Time Predictions of Reservoir Size and Rebound Time during Antiretroviral Therapy Interruption Trials for HIV', *PLoS Pathog*, 12: e1005535.
- Hindson, B. J., K. D. Ness, D. A. Masquelier, P. Belgrader, N. J. Heredia, A. J. Makarewicz, I. J. Bright, M. Y. Lucero, A. L. Hiddessen, T. C. Legler, T. K. Kitano, M. R. Hodel, J. F. Petersen, P. W. Wyatt, E. R. Steenblock, P. H. Shah, L. J. Bousse, C. B. Troup, J. C. Mellen, D. K. Wittmann, N. G. Erndt, T. H. Cauley, R. T. Koehler, A. P. So, S. Dube, K. A. Rose, L. Montesclaros, S. Wang, D. P. Stumbo, S. P. Hodges, S. Romine, F. P. Milanovich, H. E. White, J. F. Regan, G. A. Karlin-Neumann, C. M. Hindson, S. Saxonov, and B. W. Colston. 2011. 'High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number', *Anal Chem*, 83: 8604-10.
- Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz. 1995. 'Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection', *Nature*, 373: 123-6.

- Hoadley, K. A., C. Yau, T. Hinoue, D. M. Wolf, A. J. Lazar, E. Drill, R. Shen, A. M. Taylor, A. D. Cherniack, V. Thorsson, R. Akbani, R. Bowlby, C. K. Wong, M. Wiznerowicz, F. Sanchez-Vega, A. G. Robertson, B. G. Schneider, M. S. Lawrence, H. Noushmehr, T. M. Malta, Network Cancer Genome Atlas, J. M. Stuart, C. C. Benz, and P. W. Laird. 2018. 'Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer', *Cell*, 173: 291-304 e6.
- Holmes, K., C. M. Williams, E. A. Chapman, and M. J. Cross. 2010. 'Detection of siRNA induced mRNA silencing by RT-qPCR: considerations for experimental design', *BMC Res Notes*, 3: 53.
- Holzmann, B., U. Gossler, and M. Bittner. 1998. 'alpha 4 integrins and tumor metastasis', *Curr Top Microbiol Immunol*, 231: 125-41.
- Hoque, M. O., J. C. Soria, J. Woo, T. Lee, J. Lee, S. J. Jang, S. Upadhyay, B. Trink, C. Monitto, C. Desmaze, L. Mao, D. Sidransky, and C. Moon. 2006. 'Aquaporin 1 is overexpressed in lung cancer and stimulates NIH-3T3 cell proliferation and anchorage-independent growth', *Am J Pathol*, 168: 1345-53.
- Howard, B. H., S. L. Adams, M. E. Sobel, I. Pastan, and B. de Crombrughe. 1978. 'Decreased levels of collagen mRNA in rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts', *J Biol Chem*, 253: 5869-74.
- Hron, T., P. Pajer, J. Paces, P. Bartunek, and D. Elleder. 2015. 'Hidden genes in birds', *Genome Biol*, 16: 164.
- Hu, W. S., and S. H. Hughes. 2012. 'HIV-1 reverse transcription', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.
- Huang, Q., H. Chen, J. Li, M. Oliver, X. Ma, D. Byck, Y. Gao, and S. W. Jiang. 2014. 'Epigenetic and non-epigenetic regulation of syncytin-1 expression in human placenta and cancer tissues', *Cell Signal*, 26: 648-56.
- Hugo, H., M. L. Ackland, T. Blick, M. G. Lawrence, J. A. Clements, E. D. Williams, and E. W. Thompson. 2007. 'Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression', *J Cell Physiol*, 213: 374-83.
- Huhtala, P., M. J. Humphries, J. B. McCarthy, P. M. Tremble, Z. Werb, and C. H. Damsky. 1995. 'Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin', *J Cell Biol*, 129: 867-79.
- Hurd, P. J., and C. J. Nelson. 2009. 'Advantages of next-generation sequencing versus the microarray in epigenetic research', *Brief Funct Genomic Proteomic*, 8: 174-83.
- Husemann, Y., J. B. Geigl, F. Schubert, P. Musiani, M. Meyer, E. Burghart, G. Forni, R. Eils, T. Fehm, G. Riethmuller, and C. A. Klein. 2008. 'Systemic spread is an early step in breast cancer', *Cancer Cell*, 13: 58-68.
- Chaffer, C. L., and R. A. Weinberg. 2011. 'A perspective on cancer cell metastasis', *Science*, 331: 1559-64.
- Chakrabarti, R., J. Hwang, M. Andres Blanco, Y. Wei, M. Lukacisin, R. A. Romano, K. Smalley, S. Liu, Q. Yang, T. Ibrahim, L. Mercatali, D. Amadori, B. G. Haffty, S. Sinha, and Y. Kang. 2012. 'Elf5 inhibits the epithelial-mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2', *Nat Cell Biol*, 14: 1212-22.
- Chan, D. W., V. W. Liu, R. M. To, P. M. Chiu, W. Y. Lee, K. M. Yao, A. N. Cheung, and H. Y. Ngan. 2009. 'Overexpression of FOXG1 contributes to TGF-beta resistance through inhibition of p21WAF1/CIP1 expression in ovarian cancer', *Br J Cancer*, 101: 1433-43.
- Chatterjee, A., E. J. Rodger, and M. R. Eccles. 2018. 'Epigenetic drivers of tumourigenesis and cancer metastasis', *Semin Cancer Biol*, 51: 149-59.
- Chen, F., H. Kook, R. Milewski, A. D. Gitler, M. M. Lu, J. Li, R. Nazarian, R. Schnepf, K. Jen, C. Biben, G. Runke, J. P. Mackay, J. Novotny, R. J. Schwartz, R. P. Harvey, M. C. Mullins, and J. A. Epstein. 2002. 'Hop is an unusual homeobox gene that modulates cardiac development', *Cell*, 110: 713-23.
- Chen, H., X. Qi, P. Qiu, and J. Zhao. 2015. 'Correlation between LSP1 polymorphisms and the susceptibility to breast cancer', *Int J Clin Exp Pathol*, 8: 5798-802.

- Chen, Y., L. Yang, T. Cui, M. Pacyna-Gengelbach, and I. Petersen. 2015. 'HOPX is methylated and exerts tumour-suppressive function through Ras-induced senescence in human lung cancer', *J Pathol*, 235: 397-407.
- Cheung, W. K., M. Zhao, Z. Liu, L. E. Stevens, P. D. Cao, J. E. Fang, T. F. Westbrook, and D. X. Nguyen. 2013. 'Control of alveolar differentiation by the lineage transcription factors GATA6 and HOPX inhibits lung adenocarcinoma metastasis', *Cancer Cell*, 23: 725-38.
- Chinen, L. T., C. A. Mello, E. A. Abdallah, L. M. Ocea, M. E. Buim, N. M. Breve, J. L. Junior Gasparini, M. F. Fanelli, and P. Paterlini-Brechot. 2014. 'Isolation, detection, and immunomorphological characterization of circulating tumor cells (CTCs) from patients with different types of sarcoma using isolation by size of tumor cells: a window on sarcoma-cell invasion', *Onco Targets Ther*, 7: 1609-17.
- Choi, S. Y., J. H. Jang, and K. R. Kim. 2011. 'Analysis of differentially expressed genes in human rectal carcinoma using suppression subtractive hybridization', *Clin Exp Med*, 11: 219-26.
- Chomont, N., M. El-Far, P. Ancuta, L. Trautmann, F. A. Procopio, B. Yassine-Diab, G. Boucher, M. R. Boulassel, G. Ghattas, J. M. Brenchley, T. W. Schacker, B. J. Hill, D. C. Douek, J. P. Routy, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2009. 'HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation', *Nat Med*, 15: 893-900.
- Chou, J., J. H. Lin, A. Brenot, J. W. Kim, S. Provot, and Z. Werb. 2013. 'GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression', *Nat Cell Biol*, 15: 201-13.
- Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, Y. H. Kuo, R. Brookmeyer, M. A. Zeiger, P. Barditch-Crovo, and R. F. Siliciano. 1997. 'Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection', *Nature*, 387: 183-8.
- Irizarry, R. A., B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay, K. J. Antonellis, U. Scherf, and T. P. Speed. 2003. 'Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data', *Biostatistics*, 4: 249-64.
- Ishizawa, R., and S. J. Parsons. 2004. 'c-Src and cooperating partners in human cancer', *Cancer Cell*, 6: 209-14.
- Ito, S., L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, and Y. Zhang. 2011. 'Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine', *Science*, 333: 1300-3.
- Izpisua-Belmonte, J. C., and D. Duboule. 1992. 'Homeobox genes and pattern formation in the vertebrate limb', *Dev Biol*, 152: 26-36.
- Jaboin, J., J. Wild, H. Hamidi, C. Khanna, C. J. Kim, R. Robey, S. E. Bates, and C. J. Thiele. 2002. 'MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked in vitro and in vivo antitumor activity against pediatric solid tumors', *Cancer Res*, 62: 6108-15.
- Javier, R. T., and J. S. Butel. 2008. 'The history of tumor virology', *Cancer Res*, 68: 7693-706.
- Jenuwein, T., and C. D. Allis. 2001. 'Translating the histone code', *Science*, 293: 1074-80.
- Jia, Y., Z. Z. Zeng, S. M. Markwart, K. F. Rockwood, K. M. Ignatoski, S. P. Ethier, and D. L. Livant. 2004. 'Integrin fibronectin receptors in matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by breast cancer and mammary epithelial cells', *Cancer Res*, 64: 8674-81.
- Jiang, L., J. Shen, N. Zhang, Y. He, and Z. Wan. 2021. 'Association of RGS20 expression with the progression and prognosis of renal cell carcinoma', *Oncol Lett*, 22: 643.
- Jiang, Y. 2009. 'Aquaporin-1 activity of plasma membrane affects HT20 colon cancer cell migration', *IUBMB Life*, 61: 1001-9.
- Jones, P. A., and M. L. Gonzalogo. 1997. 'Altered DNA methylation and genome instability: a new pathway to cancer?', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 2103-5.
- Jordan, A., D. Bisgrove, and E. Verdin. 2003. 'HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro', *EMBO J*, 22: 1868-77.

- Jordan, A., P. Defechereux, and E. Verdin. 2001. 'The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation', *EMBO J*, 20: 1726-38.
- Joshi, K., J. A. Smith, N. Perusinghe, and P. Monaghan. 1986. 'Cell proliferation in the human mammary epithelium. Differential contribution by epithelial and myoepithelial cells', *Am J Pathol*, 124: 199-206.
- Kalluri, R., and R. A. Weinberg. 2009. 'The basics of epithelial-mesenchymal transition', *J Clin Invest*, 119: 1420-8.
- Kalluri, R., and M. Zeisberg. 2006. 'Fibroblasts in cancer', *Nat Rev Cancer*, 6: 392-401.
- Kanamori, M., T. Yasuda, K. Ohmori, S. Nogami, and M. Aoki. 2007. 'Genetic analysis of high-metastatic clone of RCT sarcoma in mice, and its growth regression in vivo in response to angiogenesis inhibitor TNP-470', *J Exp Clin Cancer Res*, 26: 101-7.
- Karrison, T. G., D. J. Ferguson, and P. Meier. 1999. 'Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy', *J Natl Cancer Inst*, 91: 80-5.
- Kauder, S. E., A. Bosque, A. Lindqvist, V. Planelles, and E. Verdin. 2009. 'Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation', *PLoS Pathog*, 5: e1000495.
- Kee, H. J., J. R. Kim, K. I. Nam, H. Y. Park, S. Shin, J. C. Kim, Y. Shimono, M. Takahashi, M. H. Jeong, N. Kim, K. K. Kim, and H. Kook. 2007. 'Enhancer of polycomb1, a novel homeodomain only protein-binding partner, induces skeletal muscle differentiation', *J Biol Chem*, 282: 7700-9.
- Kerosuo, L., and M. Bronner-Fraser. 2012. 'What is bad in cancer is good in the embryo: importance of EMT in neural crest development', *Semin Cell Dev Biol*, 23: 320-32.
- Kienast, Y., L. von Baumgarten, M. Fuhrmann, W. E. Klinkert, R. Goldbrunner, J. Herms, and F. Winkler. 2010. 'Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation', *Nat Med*, 16: 116-22.
- Kiernan, R. E., C. Vanhulle, L. Schiltz, E. Adam, H. Xiao, F. Maudoux, C. Calomme, A. Burny, Y. Nakatani, K. T. Jeang, M. Benkirane, and C. Van Lint. 1999. 'HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation', *EMBO J*, 18: 6106-18.
- Kil, S. H., C. E. Krull, G. Cann, D. Clegg, and M. Bronner-Fraser. 1998. 'The alpha4 subunit of integrin is important for neural crest cell migration', *Dev Biol*, 202: 29-42.
- Kim, Y. K., C. F. Bourgeois, C. Isel, M. J. Churcher, and J. Karn. 2002. 'Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by CDK9 is directly responsible for human immunodeficiency virus type 1 Tat-activated transcriptional elongation', *Mol Cell Biol*, 22: 4622-37.
- Kissinger, C. R., B. S. Liu, E. Martin-Blanco, T. B. Kornberg, and C. O. Pabo. 1990. 'Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions', *Cell*, 63: 579-90.
- Kobiela, A., H. A. Pasolli, and E. Fuchs. 2004. 'Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables', *Nat Cell Biol*, 6: 21-30.
- Kok-Sin, T., N. M. Mokhtar, N. Z. Ali Hassan, I. Sagap, I. Mohamed Rose, R. Harun, and R. Jamal. 2015. 'Identification of diagnostic markers in colorectal cancer via integrative epigenomics and genomics data', *Oncol Rep*, 34: 22-32.
- Koppensteiner, H., R. Brack-Werner, and M. Schindler. 2012. 'Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection', *Retrovirology*, 9: 82.
- Koral, K., S. Paranjpe, W. C. Bowen, W. Mars, J. Luo, and G. K. Michalopoulos. 2015. 'Leukocyte-specific protein 1: a novel regulator of hepatocellular proliferation and migration deleted in human hepatocellular carcinoma', *Hepatology*, 61: 537-47.
- Koslova, A., P. Trefil, J. Mucksova, M. Reinisova, J. Plachy, J. Kalina, D. Kucerova, J. Geryk, V. Krchlikova, B. Lejckova, and J. Hejnar. 2020. 'Precise CRISPR/Cas9 editing of the NHE1 gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117: 2108-12.

- Kouros-Mehr, H., S. K. Bechis, E. M. Slorach, L. E. Littlepage, M. Egeblad, A. J. Ewald, S. Y. Pai, I. C. Ho, and Z. Werb. 2008. 'GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model', *Cancer Cell*, 13: 141-52.
- Krebs, A. R., S. Dessus-Babus, L. Burger, and D. Schubeler. 2014. 'High-throughput engineering of a mammalian genome reveals building principles of methylation states at CG rich regions', *Elife*, 3: e04094.
- Krisenko, M. O., and R. L. Geahlen. 2015. 'Calling in SYK: SYK's dual role as a tumor promoter and tumor suppressor in cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1853: 254-63.
- Ku, T. K., D. C. Nguyen, M. Karaman, P. Gill, J. G. Hacia, and D. L. Crowe. 2007. 'Loss of p53 expression correlates with metastatic phenotype and transcriptional profile in a new mouse model of head and neck cancer', *Mol Cancer Res*, 5: 351-62.
- Kumar, A., G. Darcis, C. Van Lint, and G. Herbein. 2015. 'Epigenetic control of HIV-1 post integration latency: implications for therapy', *Clin Epigenetics*, 7: 103.
- Labelle, M., and R. O. Hynes. 2012. 'The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination', *Cancer Discov*, 2: 1091-9.
- Laine, V. N., T. I. Gossmann, K. van Oers, M. E. Visser, and M. A. M. Groenen. 2019. 'Exploring the unmapped DNA and RNA reads in a songbird genome', *BMC Genomics*, 20: 19.
- Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck. 2014. 'Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 178-96.
- Landan, G., N. M. Cohen, Z. Mukamel, A. Bar, A. Molchadsky, R. Brosh, S. Horn-Saban, D. A. Zalcenstein, N. Goldfinger, A. Zundelovich, E. N. Gal-Yam, V. Rotter, and A. Tanay. 2012. 'Epigenetic polymorphism and the stochastic formation of differentially methylated regions in normal and cancerous tissues', *Nat Genet*, 44: 1207-14.
- Lapointe, J., C. Li, J. P. Higgins, M. van de Rijn, E. Bair, K. Montgomery, M. Ferrari, L. Egevad, W. Rayford, U. Bergerheim, P. Ekman, A. M. DeMarzo, R. Tibshirani, D. Botstein, P. O. Brown, J. D. Brooks, and J. R. Pollack. 2004. 'Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 811-6.
- Lassen, K. G., A. M. Hebbeler, D. Bhattacharyya, M. A. Lobritz, and W. C. Greene. 2012. 'A flexible model of HIV-1 latency permitting evaluation of many primary CD4 T-cell reservoirs', *PLoS One*, 7: e30176.
- Laughney, A. M., J. Hu, N. R. Campbell, S. F. Bakhoun, M. Setty, V. P. Lavalley, Y. Xie, I. Masilionis, A. J. Carr, S. Kottapalli, V. Allaj, M. Mattar, N. Rekhman, J. B. Xavier, L. Mazutis, J. T. Poirier, C. M. Rudin, D. Pe'er, and J. Massague. 2020. 'Regenerative lineages and immune-mediated pruning in lung cancer metastasis', *Nat Med*, 26: 259-69.
- Lavie, L., M. Kitova, E. Maldener, E. Meese, and J. Mayer. 2005. 'CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2)', *J Virol*, 79: 876-83.
- Le Douce, V., G. Herbein, O. Rohr, and C. Schwartz. 2010. 'Molecular mechanisms of HIV-1 persistence in the monocyte-macrophage lineage', *Retrovirology*, 7: 32.
- Lee, B., M. Sharron, L. J. Montaner, D. Weissman, and R. W. Doms. 1999. 'Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 5215-20.
- Lee, H., D. Volonte, F. Galbiati, P. Iyengar, D. M. Lublin, D. B. Bregman, M. T. Wilson, R. Campos-Gonzalez, B. Bouzahzah, R. G. Pestell, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 2000. 'Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette', *Mol Endocrinol*, 14: 1750-75.
- Lee, J. M., P. Mhaweche-Fauceglia, N. Lee, L. C. Parsanian, Y. G. Lin, S. A. Gayther, and K. Lawrenson. 2013. 'A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro', *Lab Invest*, 93: 528-42.
- Levental, K. R., H. Yu, L. Kass, J. N. Lakins, M. Egeblad, J. T. Erler, S. F. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weninger, M. Yamauchi, D. L. Gasser, and V. M. Weaver. 2009. 'Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling', *Cell*, 139: 891-906.

- Li, C., J. Xie, Z. Lu, C. Chen, Y. Yin, R. Zhan, Y. Fang, X. Hu, and C. C. Zhang. 2015. 'ADCY7 supports development of acute myeloid leukemia', *Biochem Biophys Res Commun*, 465: 47-52.
- Li, X., Y. Zhang, H. Zhang, X. Liu, T. Gong, M. Li, L. Sun, G. Ji, Y. Shi, Z. Han, S. Han, Y. Nie, X. Chen, Q. Zhao, J. Ding, K. Wu, and F. Daiming. 2011. 'miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3', *Mol Cancer Res*, 9: 824-33.
- Lieberman, P. M. 2016. 'Epigenetics and Genetics of Viral Latency', *Cell Host Microbe*, 19: 619-28.
- Lin, X., D. Irwin, S. Kanazawa, L. Huang, J. Romeo, T. S. Yen, and B. M. Peterlin. 2003. 'Transcriptional profiles of latent human immunodeficiency virus in infected individuals: effects of Tat on the host and reservoir', *J Virol*, 77: 8227-36.
- Liu, C. J., T. Y. Liu, L. T. Kuo, H. W. Cheng, T. H. Chu, K. W. Chang, and S. C. Lin. 2008. 'Differential gene expression signature between primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma', *J Pathol*, 214: 489-97.
- Liu, L., D. C. Cara, J. Kaur, E. Raharjo, S. C. Mullaly, J. Jongstra-Bilen, J. Jongstra, and P. Kubes. 2005. 'LSP1 is an endothelial gatekeeper of leukocyte transendothelial migration', *J Exp Med*, 201: 409-18.
- Liu, R., Y. Shi, H. J. Yang, L. Wang, S. Zhang, Y. Y. Xia, J. L. Wong, and Z. W. Feng. 2011. 'Neural cell adhesion molecule potentiates the growth of murine melanoma via beta-catenin signaling by association with fibroblast growth factor receptor and glycogen synthase kinase-3beta', *J Biol Chem*, 286: 26127-37.
- Liu, Y., M. W. Mayo, A. S. Nagji, P. W. Smith, C. S. Ramsey, D. Li, and D. R. Jones. 2012. 'Phosphorylation of RelA/p65 promotes DNMT-1 recruitment to chromatin and represses transcription of the tumor metastasis suppressor gene BRMS1', *Oncogene*, 31: 1143-54.
- Lusic, M., B. Marini, H. Ali, B. Lucic, R. Luzzati, and M. Giacca. 2013. 'Proximity to PML nuclear bodies regulates HIV-1 latency in CD4+ T cells', *Cell Host Microbe*, 13: 665-77.
- Madar, S., I. Goldstein, and V. Rotter. 2013. 'Cancer associated fibroblasts'--more than meets the eye', *Trends Mol Med*, 19: 447-53.
- Malanchi, I., A. Santamaria-Martinez, E. Susanto, H. Peng, H. A. Lehr, J. F. Delaloye, and J. Huelsken. 2012. 'Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization', *Nature*, 481: 85-9.
- Maldarelli, F., X. Wu, L. Su, F. R. Simonetti, W. Shao, S. Hill, J. Spindler, A. L. Ferris, J. W. Mellors, M. F. Kearney, J. M. Coffin, and S. H. Hughes. 2014. 'HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells', *Science*, 345: 179-83.
- Malek, A., and S. Izumo. 1992. 'Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium', *Am J Physiol*, 263: C389-96.
- Malta, T. M., C. F. de Souza, T. S. Sabedot, T. C. Silva, M. S. Mosella, S. N. Kalkanis, J. Snyder, A. V. B. Castro, and H. Noushmehr. 2018. 'Glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP): biological and clinical implications', *Neuro Oncol*, 20: 608-20.
- Martin, T. D., R. S. Patel, D. R. Cook, M. Y. Choi, A. Patil, A. C. Liang, M. Z. Li, K. M. Haigis, and S. J. Elledge. 2021. 'The adaptive immune system is a major driver of selection for tumor suppressor gene inactivation', *Science*, 373: 1327-35.
- Marusyk, A., V. Almendro, and K. Polyak. 2012. 'Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?', *Nat Rev Cancer*, 12: 323-34.
- Matousova, M., J. Blazkova, P. Pajer, A. Pavlicek, and J. Hejnar. 2006. 'CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues', *Exp Cell Res*, 312: 1011-20.
- Matsunaga, T., N. Takemoto, T. Sato, R. Takimoto, I. Tanaka, A. Fujimi, T. Akiyama, H. Kuroda, Y. Kawano, M. Kobune, J. Kato, Y. Hirayama, S. Sakamaki, K. Kohda, K. Miyake, and Y. Niitsu. 2003. 'Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia', *Nat Med*, 9: 1158-65.
- Maurin, C., F. Bailly, and P. Cotelle. 2003. 'Structure-activity relationships of HIV-1 integrase inhibitors--enzyme-ligand interactions', *Curr Med Chem*, 10: 1795-810.

- Mbonye, U., and J. Karn. 2014. 'Transcriptional control of HIV latency: cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure', *Virology*, 454-455: 328-39.
- Meerschaert, J., and M. B. Furie. 1994. 'Monocytes use either CD11/CD18 or VLA-4 to migrate across human endothelium in vitro', *J Immunol*, 152: 1915-26.
- Meng, S., D. Tripathy, E. P. Frenkel, S. Shete, E. Z. Naftalis, J. F. Huth, P. D. Beitsch, M. Leitch, S. Hoover, D. Euhus, B. Haley, L. Morrison, T. P. Fleming, D. Herlyn, L. W. Terstappen, T. Fehm, T. F. Tucker, N. Lane, J. Wang, and J. W. Uhr. 2004. 'Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy', *Clin Cancer Res*, 10: 8152-62.
- Mi, S., X. Lee, X. Li, G. M. Veldman, H. Finnerty, L. Racie, E. LaVallie, X. Y. Tang, P. Edouard, S. Howes, J. C. Keith, Jr., and J. M. McCoy. 2000. 'Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis', *Nature*, 403: 785-9.
- Miles, F. L., F. L. Pruitt, K. L. van Golen, and C. R. Cooper. 2008. 'Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis', *Clin Exp Metastasis*, 25: 305-24.
- Moch, H., A. L. Cubilla, P. A. Humphrey, V. E. Reuter, and T. M. Ulbright. 2016. 'The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours', *Eur Urol*, 70: 93-105.
- Momparler, R. L., and V. Bovenzi. 2000. 'DNA methylation and cancer', *J Cell Physiol*, 183: 145-54.
- Morgan, H. D., F. Santos, K. Green, W. Dean, and W. Reik. 2005. 'Epigenetic reprogramming in mammals', *Hum Mol Genet*, 14 Spec No 1: R47-58.
- Morisset, D., D. Stebih, M. Milavec, K. Gruden, and J. Zel. 2013. 'Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR', *PLoS One*, 8: e62583.
- Narasipura, S. D., S. Kim, and L. Al-Harhi. 2014. 'Epigenetic regulation of HIV-1 latency in astrocytes', *J Virol*, 88: 3031-8.
- Navin, N., J. Kendall, J. Troge, P. Andrews, L. Rodgers, J. McIndoo, K. Cook, A. Stepansky, D. Levy, D. Esposito, L. Muthuswamy, A. Krasnitz, W. R. McCombie, J. Hicks, and M. Wigler. 2011. 'Tumour evolution inferred by single-cell sequencing', *Nature*, 472: 90-4.
- Nettersheim, D., L. C. Heukamp, F. Fronhoffs, M. J. Grewe, N. Haas, A. Waha, F. Honecker, A. Waha, G. Kristiansen, and H. Schorle. 2013. 'Analysis of TET expression/activity and 5mC oxidation during normal and malignant germ cell development', *PLoS One*, 8: e82881.
- Netto, G. J., Y. Nakai, M. Nakayama, S. Jadallah, A. Toubaji, N. Nonomura, R. Albadine, J. L. Hicks, J. I. Epstein, S. Yegnasubramanian, W. G. Nelson, and A. M. De Marzo. 2008. 'Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors', *Mod Pathol*, 21: 1337-44.
- Nguyen, D. X., P. D. Bos, and J. Massague. 2009. 'Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization', *Nat Rev Cancer*, 9: 274-84.
- Nguyen, D. X., A. C. Chiang, X. H. Zhang, J. Y. Kim, M. G. Kris, M. Ladanyi, W. L. Gerald, and J. Massague. 2009. 'WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis', *Cell*, 138: 51-62.
- Nicoletti, G., P. Brambilla, C. De Giovanni, P. L. Lollini, B. Del Re, A. Marocchi, P. Mocarelli, G. Prodi, and P. Nanni. 1985. 'Colony-stimulating activity from the new metastatic TS/A cell line and its high- and low-metastatic clonal derivatives', *Br J Cancer*, 52: 215-22.
- Nixon, A. B., G. Grenningloh, and P. J. Casey. 2002. 'The interaction of RGS21 with SCG10 attenuates the ability of SCG10 to promote microtubule disassembly', *J Biol Chem*, 277: 18127-33.
- O'Connell, J. T., H. Sugimoto, V. G. Cooke, B. A. MacDonald, A. I. Mehta, V. S. LeBleu, R. Dewar, R. M. Rocha, R. R. Brentani, M. B. Resnick, E. G. Neilson, M. Zeisberg, and R. Kalluri. 2011. 'VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 16002-7.
- Ooki, A., K. Yamashita, S. Kikuchi, S. Sakuramoto, N. Katada, K. Kokubo, H. Kobayashi, M. S. Kim, D. Sidransky, and M. Watanabe. 2010. 'Potential utility of HOP homeobox gene promoter methylation as a marker of tumor aggressiveness in gastric cancer', *Oncogene*, 29: 3263-75.
- Oosterhuis, J. W., and L. H. Looijenga. 2005. 'Testicular germ-cell tumours in a broader perspective', *Nat Rev Cancer*, 5: 210-22.

- 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. Massague. 2011. 'Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs', *Nat Med*, 17: 867-74.
- Oskarsson, T., E. Batlle, and J. Massague. 2014. 'Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways', *Cell Stem Cell*, 14: 306-21.
- Ostman, A. 2012. 'The tumor microenvironment controls drug sensitivity', *Nat Med*, 18: 1332-4.
- Pacaud, R., Q. Sery, L. Oliver, F. M. Vallette, J. Tost, and P. F. Cartron. 2014. 'DNMT3L interacts with transcription factors to target DNMT3L/DNMT3B to specific DNA sequences: role of the DNMT3L/DNMT3B/p65-NFkappaB complex in the (de-)methylation of TRAF1', *Biochimie*, 104: 36-49.
- Palucka, A. K., and L. M. Coussens. 2016. 'The Basis of Oncoimmunology', *Cell*, 164: 1233-47.
- Pan, C., M. Mezei, S. Mujtaba, M. Muller, L. Zeng, J. Li, Z. Wang, and M. M. Zhou. 2007. 'Structure-guided optimization of small molecules inhibiting human immunodeficiency virus 1 Tat association with the human coactivator p300/CREB binding protein-associated factor', *J Med Chem*, 50: 2285-8.
- Pantel, K., and C. Alix-Panabieres. 2014. 'Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells: a special source for liquid biopsy in cancer patients', *Bonekey Rep*, 3: 584.
- Pantel, K., and R. H. Brakenhoff. 2004. 'Dissecting the metastatic cascade', *Nat Rev Cancer*, 4: 448-56.
- Paris, M., M. Porcelloni, M. Binaschi, and D. Fattori. 2008. 'Histone deacetylase inhibitors: from bench to clinic', *J Med Chem*, 51: 1505-29.
- Park, T. S., H. J. Lee, K. H. Kim, J. S. Kim, and J. Y. Han. 2014. 'Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 12716-21.
- Parsons, S. J., and J. T. Parsons. 2004. 'Src family kinases, key regulators of signal transduction', *Oncogene*, 23: 7906-9.
- Patarroyo, M., K. Tryggvason, and I. Virtanen. 2002. 'Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis', *Semin Cancer Biol*, 12: 197-207.
- Patel, P., M. Y. Ansari, S. Bapat, M. Thakar, R. Gangakhedkar, and S. Jameel. 2014. 'The microRNA miR-29a is associated with human immunodeficiency virus latency', *Retrovirology*, 11: 108.
- Pauws, E., G. G. Sijmons, C. Yaka, and C. Ris-Stalpers. 2004. 'A novel homeobox gene overexpressed in thyroid carcinoma', *Thyroid*, 14: 500-5.
- Pavlova, O., K. Lefort, A. Mariotto, M. Huber, and D. Hohl. 2021. 'HOPX Exhibits Oncogenic Activity during Squamous Skin Carcinogenesis', *J Invest Dermatol*, 141: 2354-68.
- Paz, M. F., M. F. Fraga, S. Avila, M. Guo, M. Pollan, J. G. Herman, and M. Esteller. 2003. 'A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines', *Cancer Res*, 63: 1114-21.
- Peltomaki, P. 1991. 'DNA methylation changes in human testicular cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1096: 187-96.
- Pennacchioli, E., G. Tosti, M. Barberis, T. M. De Pas, F. Verrecchia, C. Menicanti, A. Testori, and G. Mazarrol. 2012. 'Sarcoma spreads primarily through the vascular system: are there biomarkers associated with vascular spread?', *Clin Exp Metastasis*, 29: 757-73.
- Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslén, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown, and D. Botstein. 2000. 'Molecular portraits of human breast tumours', *Nature*, 406: 747-52.
- Pierson, T., J. McArthur, and R. F. Siliciano. 2000. 'Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy', *Annu Rev Immunol*, 18: 665-708.
- Pion, M., A. Jordan, A. Biancotto, F. Dequiedt, F. Gondois-Rey, S. Rondeau, R. Vigne, J. Hejnar, E. Verdin, and I. Hirsch. 2003. 'Transcriptional suppression of in vitro-integrated human immunodeficiency virus type 1 does not correlate with proviral DNA methylation', *J Virol*, 77: 4025-32.
- Plachy, J., and J. Hejnar. 2002. 'Chicken cells--oncogene transformation, immortalization and more', *Folia Biol (Praha)*, 48: 126-38.

- Plachy, J., J. Kotab, P. Divina, M. Reinisova, F. Senigl, and J. Hejnar. 2010. 'Provirus selected for high and stable expression of transduced genes accumulate in broadly transcribed genome areas', *J Virol*, 84: 4204-11.
- Pomerantz, R. J., D. Trono, M. B. Feinberg, and D. Baltimore. 1990. 'Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency', *Cell*, 61: 1271-6.
- Popov, S., A. L. Chenine, A. Gruber, P. L. Li, and R. M. Ruprecht. 2005. 'Long-term productive human immunodeficiency virus infection of CD1a-sorted myeloid dendritic cells', *J Virol*, 79: 602-8.
- Pratap, J., J. J. Wixted, T. Gaur, S. K. Zaidi, J. Dobson, K. D. Gokul, S. Hussain, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, G. S. Stein, and J. B. Lian. 2008. 'Runx2 transcriptional activation of Indian Hedgehog and a downstream bone metastatic pathway in breast cancer cells', *Cancer Res*, 68: 7795-802.
- Ptashne, M. 2007. 'On the use of the word 'epigenetic'', *Curr Biol*, 17: R233-6.
- Pulkka, O. P., J. P. Mpindi, O. Tynninen, B. Nilsson, O. Kallioniemi, H. Sihto, and H. Joensuu. 2018. 'Clinical relevance of integrin alpha 4 in gastrointestinal stromal tumours', *J Cell Mol Med*, 22: 2220-30.
- Qiu, S., C. M. Adema, and T. Lane. 2005. 'A computational study of off-target effects of RNA interference', *Nucleic Acids Res*, 33: 1834-47.
- Rafati, H., M. Parra, S. Hakre, Y. Moshkin, E. Verdin, and T. Mahmoudi. 2011. 'Repressive LTR nucleosome positioning by the BAF complex is required for HIV latency', *PLoS Biol*, 9: e1001206.
- Rajpert-De Meyts, E. 2006. 'Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects', *Hum Reprod Update*, 12: 303-23.
- Ramaswamy, S., K. N. Ross, E. S. Lander, and T. R. Golub. 2003. 'A molecular signature of metastasis in primary solid tumors', *Nat Genet*, 33: 49-54.
- Rasmussen, K. D., and K. Helin. 2016. 'Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer', *Genes Dev*, 30: 733-50.
- Rath, O., and F. Kozielski. 2012. 'Kinesins and cancer', *Nat Rev Cancer*, 12: 527-39.
- Razin, A., and A. D. Riggs. 1980. 'DNA methylation and gene function', *Science*, 210: 604-10.
- Razooky, B. S., and L. S. Weinberger. 2011. 'Mapping the architecture of the HIV-1 Tat circuit: A decision-making circuit that lacks bistability and exploits stochastic noise', *Methods*, 53: 68-77.
- Ren, J., R. Esnouf, E. Garman, D. Somers, C. Ross, I. Kirby, J. Keeling, G. Darby, Y. Jones, D. Stuart, and et al. 1995. 'High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes', *Nat Struct Biol*, 2: 293-302.
- Ren, X., X. Yang, B. Cheng, X. Chen, T. Zhang, Q. He, B. Li, Y. Li, X. Tang, X. Wen, Q. Zhong, T. Kang, M. Zeng, N. Liu, and J. Ma. 2017. 'HOPX hypermethylation promotes metastasis via activating SNAIL transcription in nasopharyngeal carcinoma', *Nat Commun*, 8: 14053.
- Reticker-Flynn, N. E., D. F. Malta, M. M. Winslow, J. M. Lamar, M. J. Xu, G. H. Underhill, R. O. Hynes, T. E. Jacks, and S. N. Bhatia. 2012. 'A combinatorial extracellular matrix platform identifies cell-extracellular matrix interactions that correlate with metastasis', *Nat Commun*, 3: 1122.
- Reuter, V. E. 2005. 'Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors', *Mod Pathol*, 18 Suppl 2: S51-60.
- Reyngold, M., S. Turcan, D. Giri, K. Kannan, L. A. Walsh, A. Viale, M. Drobnjak, L. T. Vahdat, W. Lee, and T. A. Chan. 2014. 'Remodeling of the methylation landscape in breast cancer metastasis', *PLoS One*, 9: e103896.
- Riker, A. I., S. A. Enkemann, O. Fodstad, S. Liu, S. Ren, C. Morris, Y. Xi, P. Howell, B. Metge, R. S. Samant, L. A. Shevde, W. Li, S. Eschrich, A. Daud, J. Ju, and J. Matta. 2008. 'The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis', *BMC Med Genomics*, 1: 13.
- Robertson, K. D. 2005. 'DNA methylation and human disease', *Nat Rev Genet*, 6: 597-610.
- Rohr, O., D. Lecestre, S. Chasserot-Golaz, C. Marban, D. Avram, D. Aunis, M. Leid, and E. Schaeffer. 2003. 'Recruitment of Tat to heterochromatin protein HP1 via interaction with CTIP2 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in microglial cells', *J Virol*, 77: 5415-27.

- Romanov, G. A., and B. F. Vanyushin. 1981. 'Methylation of reiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction', *Biochim Biophys Acta*, 653: 204-18.
- Rouet, P., F. Smith, and M. Jasin. 1994. 'Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 6064-8.
- Rous, P. 1911. 'A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells', *J Exp Med*, 13: 397-411.
- Ruelas, D. S., and W. C. Greene. 2013. 'An integrated overview of HIV-1 latency', *Cell*, 155: 519-29.
- Ruelas, D. S., J. K. Chan, E. Oh, A. J. Heidersbach, A. M. Hebbeler, L. Chavez, E. Verdin, M. Rape, and W. C. Greene. 2015. 'MicroRNA-155 Reinforces HIV Latency', *J Biol Chem*, 290: 13736-48.
- Sabin, L. R., M. J. Delas, and G. J. Hannon. 2013. 'Dogma derailed: the many influences of RNA on the genome', *Mol Cell*, 49: 783-94.
- Sagot-Lerolle, N., A. Lamine, M. L. Chaix, F. Boufassa, J. P. Aboulker, D. Costagliola, C. Goujard, C. Pallier, J. F. Delfraissy, O. Lambotte, and Anrs Ep study. 2008. 'Prolonged valproic acid treatment does not reduce the size of latent HIV reservoir', *AIDS*, 22: 1125-9.
- Sahin, F., W. Qiu, R. E. Wilentz, C. A. Iacobuzio-Donahue, A. Grosmark, and G. H. Su. 2005. 'RPL38, FOSL1, and UPP1 are predominantly expressed in the pancreatic ductal epithelium', *Pancreas*, 30: 158-67.
- Sanger, N., K. E. Effenberger, S. Riethdorf, V. Van Haasteren, J. Gauwerky, I. Wiegatz, K. Strebhardt, M. Kaufmann, and K. Pantel. 2011. 'Disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ductal carcinoma in situ', *Int J Cancer*, 129: 2522-6.
- Santoni D., Pignotti D., Vergni D. 2021. 'A genome-wide study on differential methylation in different cancers using TCGA database', *Informatics in Medicine Unlocked*, 23.
- Satelli, A., and S. Li. 2011. 'Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy', *Cell Mol Life Sci*, 68: 3033-46.
- Sato, H., T. Hasegawa, Y. Abe, H. Sakai, and S. Hirohashi. 1999. 'Expression of E-cadherin in bone and soft tissue sarcomas: a possible role in epithelial differentiation', *Hum Pathol*, 30: 1344-9.
- Scalise, M., L. Pochini, L. Console, M. A. Losso, and C. Indiveri. 2018. 'The Human SLC1A5 (ASCT2) Amino Acid Transporter: From Function to Structure and Role in Cell Biology', *Front Cell Dev Biol*, 6: 96.
- Selvaraj, A., and R. Prywes. 2004. 'Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent', *BMC Mol Biol*, 5: 13.
- Sengupta, S., and R. F. Siliciano. 2018. 'Targeting the Latent Reservoir for HIV-1', *Immunity*, 48: 872-95.
- Senigl, F., M. Auxt, and J. Hejnar. 2012. 'Transcriptional provirus silencing as a crosstalk of de novo DNA methylation and epigenomic features at the integration site', *Nucleic Acids Res*, 40: 5298-312.
- Shah, R., P. Smith, C. Purdie, P. Quinlan, L. Baker, P. Aman, A. M. Thompson, and T. Crook. 2009. 'The prolyl 3-hydroxylases P3H2 and P3H3 are novel targets for epigenetic silencing in breast cancer', *Br J Cancer*, 100: 1687-96.
- Shin, C. H., Z. P. Liu, R. Passier, C. L. Zhang, D. Z. Wang, T. M. Harris, H. Yamagishi, J. A. Richardson, G. Childs, and E. N. Olson. 2002. 'Modulation of cardiac growth and development by HOP, an unusual homeodomain protein', *Cell*, 110: 725-35.
- Scheel, C., and R. A. Weinberg. 2012. 'Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links', *Semin Cancer Biol*, 22: 396-403.
- Schmitz, J., J. van Lunzen, K. Tenner-Racz, G. Grossschupff, P. Racz, H. Schmitz, M. Dietrich, and F. T. Hufert. 1994. 'Follicular dendritic cells retain HIV-1 particles on their plasma membrane, but are not productively infected in asymptomatic patients with follicular hyperplasia', *J Immunol*, 153: 1352-9.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, and M. J. Smyth. 2011. 'Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion', *Science*, 331: 1565-70.

- Schrijvers, R., J. De Rijck, J. Demeulemeester, N. Adachi, S. Vets, K. Ronen, F. Christ, F. D. Bushman, Z. Debyser, and R. Gijssbers. 2012. 'LEDGF/p75-independent HIV-1 replication demonstrates a role for HRP-2 and remains sensitive to inhibition by LEDGINS', *PLoS Pathog*, 8: e1002558.
- Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman. 2002. 'HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots', *Cell*, 110: 521-9.
- Schubeler, D. 2015. 'Function and information content of DNA methylation', *Nature*, 517: 321-6.
- Schusser, B., E. J. Collarini, H. Yi, S. M. Izquierdo, J. Fesler, D. Pedersen, K. C. Klasing, B. Kaspers, W. D. Harriman, M. C. van de Lavoie, R. J. Etches, and P. A. Leighton. 2013. 'Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 20170-5.
- Siliciano, J. D., J. Kajdas, D. Finzi, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. B. Margolick, C. Kovacs, S. J. Gange, and R. F. Siliciano. 2003. 'Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells', *Nat Med*, 9: 727-8.
- Smeds, L., A. Qvarnstrom, and H. Ellegren. 2016. 'Direct estimate of the rate of germline mutation in a bird', *Genome Res*, 26: 1211-8.
- Smiraglia, D. J., J. Szymanska, S. M. Kraggerud, R. A. Lothe, P. Peltomaki, and C. Plass. 2002. 'Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors', *Oncogene*, 21: 3909-16.
- Soares, J., A. E. Pinto, C. V. Cunha, S. Andre, I. Barao, J. M. Sousa, and M. Cravo. 1999. 'Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression', *Cancer*, 85: 112-8.
- Sobhian, B., N. Laguette, A. Yatim, M. Nakamura, Y. Levy, R. Kiernan, and M. Benkirane. 2010. 'HIV-1 Tat assembles a multifunctional transcription elongation complex and stably associates with the 7SK snRNP', *Mol Cell*, 38: 439-51.
- Somarelli, J. A., S. Shetler, M. K. Jolly, X. Wang, S. Bartholf Dewitt, A. J. Hish, S. Gilja, W. C. Eward, K. E. Ware, H. Levine, A. J. Armstrong, and M. A. Garcia-Blanco. 2016. 'Mesenchymal-Epithelial Transition in Sarcomas Is Controlled by the Combinatorial Expression of MicroRNA 200s and GRHL2', *Mol Cell Biol*, 36: 2503-13.
- Songur, N., M. Dinc, C. Ozdilekan, S. Eke, U. Ok, and M. Oz. 2003. 'Analysis of lung metastases in patients with primary extremity sarcoma', *Sarcoma*, 7: 63-7.
- Soriano, P., C. Montgomery, R. Geske, and A. Bradley. 1991. 'Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice', *Cell*, 64: 693-702.
- Sproul, D., R. R. Kitchen, C. E. Nestor, J. M. Dixon, A. H. Sims, D. J. Harrison, B. H. Ramsahoye, and R. R. Meehan. 2012. 'Tissue of origin determines cancer-associated CpG island promoter hypermethylation patterns', *Genome Biol*, 13: R84.
- Stafl, K., M. Travnicek, D. Kucerova, L. Pecnova, V. Krchlikova, E. Galikova, V. Stepanets, J. Hejnar, and K. Trejbalova. 2021. 'Heterologous avian system for quantitative analysis of Syncytin-1 interaction with ASCT2 receptor', *Retrovirology*, 18: 15.
- Stephenson, A., S. E. Eggener, E. B. Bass, D. M. Chelnick, S. Daneshmand, D. Feldman, T. Gilligan, J. A. Karam, B. Leibovich, S. L. Liauw, T. A. Masterson, J. J. Meeks, P. M. Pierorazio, R. Sharma, and J. Sheinfeld. 2019. 'Diagnosis and Treatment of Early Stage Testicular Cancer: AUA Guideline', *J Urol*, 202: 272-81.
- Stingl, J., C. J. Eaves, I. Zandieh, and J. T. Emerman. 2001. 'Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue', *Breast Cancer Res Treat*, 67: 93-109.
- Strell, C., and F. Entschladen. 2008. 'Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells', *Cell Commun Signal*, 6: 10.
- Sundstrom, J. B., D. M. Little, F. Villinger, J. E. Ellis, and A. A. Ansari. 2004. 'Signaling through Toll-like receptors triggers HIV-1 replication in latently infected mast cells', *J Immunol*, 172: 4391-401.
- Svoboda, J., J. Plachy, J. Hejnar, I. Karakoz, R. V. Guntaka, and J. Geryk. 1992. 'Tumor induction by the LTR, v-src, LTR DNA in four B (MHC) congenic lines of chickens', *Immunogenetics*, 35: 309-15.

- Swiggard, W. J., C. Baytop, J. J. Yu, J. Dai, C. Li, R. Schretzenmair, T. Theodosopoulos, and U. O'Doherty. 2005. 'Human immunodeficiency virus type 1 can establish latent infection in resting CD4+ T cells in the absence of activating stimuli', *J Virol*, 79: 14179-88.
- Takashima, T., M. Itoh, Y. Ueda, K. Nishida, T. Tamaki, S. Misawa, T. Abe, M. Seto, T. Machii, and M. Taniwaki. 1997. 'Detection of 14q32.33 translocation and t(11;14) in interphase nuclei of chronic B-cell leukemia/lymphomas by in situ hybridization', *Int J Cancer*, 72: 31-8.
- Takeda, N., R. Jain, M. R. LeBoeuf, Q. Wang, M. M. Lu, and J. A. Epstein. 2011. 'Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches', *Science*, 334: 1420-4.
- Tao, Y., B. Kang, D. A. Petkovich, Y. R. Bhandari, J. In, G. Stein-O'Brien, X. Kong, W. Xie, N. Zachos, S. Maegawa, H. Vaidya, S. Brown, R. W. Chiu Yen, X. Shao, J. Thakor, Z. Lu, Y. Cai, Y. Zhang, I. Mallona, M. A. Peinado, C. A. Zahnow, N. Ahuja, E. Fertig, J. P. Issa, S. B. Baylin, and H. Easwaran. 2019. 'Aging-like Spontaneous Epigenetic Silencing Facilitates Wnt Activation, Stemness, and Braf(V600E)-Induced Tumorigenesis', *Cancer Cell*, 35: 315-28 e6.
- Taube, R., and M. Peterlin. 2013. 'Lost in transcription: molecular mechanisms that control HIV latency', *Viruses*, 5: 902-27.
- Theveneau, E., and R. Mayor. 2012. 'Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration', *Dev Biol*, 366: 34-54.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang, and M. A. Nieto. 2009. 'Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease', *Cell*, 139: 871-90.
- Thomas, S., J. B. Overvest, M. D. Nitz, P. D. Williams, C. R. Owens, M. Sanchez-Carbayo, H. F. Frierson, M. A. Schwartz, and D. Theodorescu. 2011. 'Src and caveolin-1 reciprocally regulate metastasis via a common downstream signaling pathway in bladder cancer', *Cancer Res*, 71: 832-41.
- Tomasselli, A. G., and R. L. Heinrikson. 2000. 'Targeting the HIV-protease in AIDS therapy: a current clinical perspective', *Biochim Biophys Acta*, 1477: 189-214.
- Tourne, M., C. Radulescu, and Y. Allory. 2019. '[Testicular germ cell tumors: Histopathological and molecular features]', *Bull Cancer*, 106: 328-41.
- Trefil, P., D. Aumann, A. Koslova, J. Mucksova, B. Benesova, J. Kalina, C. Wurmser, R. Fries, D. Elleder, B. Schusser, and J. Hejnar. 2017. 'Male fertility restored by transplanting primordial germ cells into testes: a new way towards efficient transgenesis in chicken', *Sci Rep*, 7: 14246.
- Trejbalova, K., J. Blazkova, M. Matouskova, D. Kucerova, L. Pecnova, Z. Vernerova, J. Heracek, I. Hirsch, and J. Hejnar. 2011. 'Epigenetic regulation of transcription and splicing of syncytins, fusogenic glycoproteins of retroviral origin', *Nucleic Acids Res*, 39: 8728-39.
- Trejbalova, K., D. Kovarova, J. Blazkova, L. Machala, D. Jilich, J. Weber, D. Kucerova, O. Vencalek, I. Hirsch, and J. Hejnar. 2016. 'Development of 5' LTR DNA methylation of latent HIV-1 provirus in cell line models and in long-term-infected individuals', *Clin Epigenetics*, 8: 19.
- Trivedi, C. M., W. Zhu, Q. Wang, C. Jia, H. J. Kee, L. Li, S. Hannenhalli, and J. A. Epstein. 2010. 'Hopx and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation', *Dev Cell*, 19: 450-9.
- Turville, S. G., J. J. Santos, I. Frank, P. U. Cameron, J. Wilkinson, M. Miranda-Saksena, J. Dable, H. Stossel, N. Romani, M. Piatak, Jr., J. D. Lifson, M. Pope, and A. L. Cunningham. 2004. 'Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells', *Blood*, 103: 2170-9.
- Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia. 2008. 'Mesenchymal stem cells in health and disease', *Nat Rev Immunol*, 8: 726-36.
- Ungerstedt, J. S., Y. Sowa, W. S. Xu, Y. Shao, M. Dokmanovic, G. Perez, L. Ngo, A. Holmgren, X. Jiang, and P. A. Marks. 2005. 'Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 673-8.
- Valastyan, S., and R. A. Weinberg. 2011. 'Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms', *Cell*, 147: 275-92.

- Valentin, A., M. Rosati, D. J. Patenaude, A. Hatzakis, L. G. Kostrikis, M. Lazanas, K. M. Wyvill, R. Yarchoan, and G. N. Pavlakis. 2002. 'Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 7015-20.
- Vallenius, T. 2013. 'Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells', *Open Biol*, 3: 130001.
- van der Blik, A. M., T. E. Redelmeier, H. Damke, E. J. Tisdale, E. M. Meyerowitz, and S. L. Schmid. 1993. 'Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation', *J Cell Biol*, 122: 553-63.
- Van Kilsdonk, J. W., M. Bergers, L. C. Van Kempen, J. Schalkwijk, and G. W. Swart. 2010. 'Keratinocytes drive melanoma invasion in a reconstructed skin model', *Melanoma Res*, 20: 372-80.
- Vanaja, D. K., K. V. Ballman, B. W. Morlan, J. C. Cheville, R. M. Neumann, M. M. Lieber, D. J. Tindall, and C. Y. Young. 2006. 'PDLIM4 repression by hypermethylation as a potential biomarker for prostate cancer', *Clin Cancer Res*, 12: 1128-36.
- Vanharanta, S., and J. Massague. 2013. 'Origins of metastatic traits', *Cancer Cell*, 24: 410-21.
- Veland, N., Y. Lu, S. Hardikar, S. Gaddis, Y. Zeng, B. Liu, M. R. Estecio, Y. Takata, K. Lin, M. W. Tomida, J. Shen, D. Saha, H. Gowher, H. Zhao, and T. Chen. 2019. 'DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells', *Nucleic Acids Res*, 47: 152-67.
- Verdin, E. 1991. 'DNase I-hypersensitive sites are associated with both long terminal repeats and with the intragenic enhancer of integrated human immunodeficiency virus type 1', *J Virol*, 65: 6790-9.
- Verdin, E., P. Paras, Jr., and C. Van Lint. 1993. 'Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation', *EMBO J*, 12: 3249-59.
- Wagner, T. A., S. McLaughlin, K. Garg, C. Y. Cheung, B. B. Larsen, S. Styrchak, H. C. Huang, P. T. Edlefsen, J. I. Mullins, and L. M. Frenkel. 2014. 'HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection', *Science*, 345: 570-3.
- Waldo, K., M. Zdanowicz, J. Burch, D. H. Kumiski, H. A. Stadt, R. E. Godt, T. L. Creazzo, and M. L. Kirby. 1999. 'A novel role for cardiac neural crest in heart development', *J Clin Invest*, 103: 1499-507.
- Wang, D., P. S. Chang, Z. Wang, L. Sutherland, J. A. Richardson, E. Small, P. A. Krieg, and E. N. Olson. 2001. 'Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor', *Cell*, 105: 851-62.
- Waraya, M., K. Yamashita, H. Katoh, A. Ooki, H. Kawamata, H. Nishimiya, K. Nakamura, A. Ema, and M. Watanabe. 2012. 'Cancer specific promoter CpG Islands hypermethylation of HOP homeobox (HOPX) gene and its potential tumor suppressive role in pancreatic carcinogenesis', *BMC Cancer*, 12: 397.
- Ward, K., C. Amaya, K. Verma, D. Tran, D. Diaz, A. Torabi, and B. A. Bryan. 2015. 'Epithelial cell adhesion molecule is expressed in a subset of sarcomas and correlates to the degree of cytological atypia in leiomyosarcomas', *Mol Clin Oncol*, 3: 31-36.
- Warren, W. C., L. W. Hillier, C. Tomlinson, P. Minx, M. Kremitzki, T. Graves, C. Markovic, N. Bouk, K. D. Pruitt, F. Thibaud-Nissen, V. Schneider, T. A. Mansour, C. T. Brown, A. Zimin, R. Hawken, M. Abrahamsen, A. B. Pyrkosz, M. Morisson, V. Fillon, A. Vignal, W. Chow, K. Howe, J. E. Fulton, M. M. Miller, P. Lovell, C. V. Mello, M. Wirthlin, A. S. Mason, R. Kuo, D. W. Burt, J. B. Dodgson, and H. H. Cheng. 2017. 'A New Chicken Genome Assembly Provides Insight into Avian Genome Structure', *G3 (Bethesda)*, 7: 109-17.
- Weigel, D., G. Jurgens, F. Kuttner, E. Seifert, and H. Jackle. 1989. 'The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo', *Cell*, 57: 645-58.
- Wells, A., C. Yates, and C. R. Shepard. 2008. 'E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas', *Clin Exp Metastasis*, 25: 621-8.
- Wensing, A. M., N. M. van Maarseveen, and M. Nijhuis. 2010. 'Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance', *Antiviral Res*, 85: 59-74.

- Wilding, J. L., and W. F. Bodmer. 2014. 'Cancer cell lines for drug discovery and development', *Cancer Res*, 74: 2377-84.
- Wilusz, J. 2013. 'Putting an 'End' to HIV mRNAs: capping and polyadenylation as potential therapeutic targets', *AIDS Res Ther*, 10: 31.
- Worth, D. C., K. Hodivala-Dilke, S. D. Robinson, S. J. King, P. E. Morton, F. B. Gertler, M. J. Humphries, and M. Parsons. 2010. 'Alpha v beta3 integrin spatially regulates VASP and RIAM to control adhesion dynamics and migration', *J Cell Biol*, 189: 369-83.
- Wu, Y., L. Chen, P. G. Scott, and E. E. Tredget. 2007. 'Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis', *Stem Cells*, 25: 2648-59.
- Wu, Y., and B. P. Zhou. 2009. 'Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis', *Cell Cycle*, 8: 3267-73.
- Xie, G. X., and P. P. Palmer. 2007. 'How regulators of G protein signaling achieve selective regulation', *J Mol Biol*, 366: 349-65.
- Yachida, S., S. Jones, I. Bozic, T. Antal, R. Leary, B. Fu, M. Kamiyama, R. H. Hruban, J. R. Eshleman, M. A. Nowak, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, and C. A. Iacobuzio-Donahue. 2010. 'Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer', *Nature*, 467: 1114-7.
- Yamaguchi, S., K. Asanoma, T. Takao, K. Kato, and N. Wake. 2009. 'Homeobox gene HOPX is epigenetically silenced in human uterine endometrial cancer and suppresses estrogen-stimulated proliferation of cancer cells by inhibiting serum response factor', *Int J Cancer*, 124: 2577-88.
- Yamaguchi, Y., H. Shibata, and H. Handa. 2013. 'Transcription elongation factors DSIF and NELF: promoter-proximal pausing and beyond', *Biochim Biophys Acta*, 1829: 98-104.
- Yamasaki, M., I. Takemasa, T. Komori, S. Watanabe, M. Sekimoto, Y. Doki, K. Matsubara, and M. Monden. 2007. 'The gene expression profile represents the molecular nature of liver metastasis in colorectal cancer', *Int J Oncol*, 30: 129-38.
- Yang, H. C., L. Shen, R. F. Siliciano, and J. L. Pomerantz. 2009. 'Isolation of a cellular factor that can reactivate latent HIV-1 without T cell activation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 6321-6.
- Yang, H. C., S. Xing, L. Shan, K. O'Connell, J. Dinoso, A. Shen, Y. Zhou, C. K. Shrum, Y. Han, J. O. Liu, H. Zhang, J. B. Margolick, and R. F. Siliciano. 2009. 'Small-molecule screening using a human primary cell model of HIV latency identifies compounds that reverse latency without cellular activation', *J Clin Invest*, 119: 3473-86.
- Yang, J. M., S. M. Sim, H. Y. Kim, and G. T. Park. 2010. 'Expression of the homeobox gene, HOPX, is modulated by cell differentiation in human keratinocytes and is involved in the expression of differentiation markers', *Eur J Cell Biol*, 89: 537-46.
- Yang, X. X., J. Z. Sun, F. X. Li, Y. S. Wu, H. Y. Du, W. Zhu, X. H. Li, and M. Li. 2012. 'Aberrant methylation and downregulation of sall3 in human hepatocellular carcinoma', *World J Gastroenterol*, 18: 2719-26.
- Yin, Z. T., F. Zhu, F. B. Lin, T. Jia, Z. Wang, D. T. Sun, G. S. Li, C. L. Zhang, J. Smith, N. Yang, and Z. C. Hou. 2019. 'Revisiting avian 'missing' genes from de novo assembled transcripts', *BMC Genomics*, 20: 4.
- Zecchini, S., L. Bombardelli, A. Decio, M. Bianchi, G. Mazarrol, F. Sanguineti, G. Aletti, L. Maddaluno, V. Berezin, E. Bock, C. Casadio, G. Viale, N. Colombo, R. Giavazzi, and U. Cavallaro. 2011. 'The adhesion molecule NCAM promotes ovarian cancer progression via FGFR signalling', *EMBO Mol Med*, 3: 480-94.
- Zeng, C., and Y. Chen. 2019. 'HTR1D, TIMP1, SERPINE1, MMP3 and CNR2 affect the survival of patients with colon adenocarcinoma', *Oncol Lett*, 18: 2448-54.
- Zeng, Y., N. Li, Z. Zheng, R. Chen, W. Liu, J. Zhu, M. Zeng, J. Cheng, M. Peng, and C. Hong. 2021. 'A Pan-Cancer Analysis of the Prognostic Value and Expression of Adenylate Cyclase 7 (ADCY7) in Human Tumors', *Int J Gen Med*, 14: 5415-29.
- Zhang, J., and K. Huang. 2017. 'Pan-cancer analysis of frequent DNA co-methylation patterns reveals consistent epigenetic landscape changes in multiple cancers', *BMC Genomics*, 18: 1045.

- Zhe, X., M. L. Cher, and R. D. Bonfil. 2011. 'Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack', *Am J Cancer Res*, 1: 740-51.
- Zheng, X., J. Lin, H. Wu, Z. Mo, Y. Lian, P. Wang, Z. Hu, Z. Gao, L. Peng, and C. Xie. 2019. 'Forkhead box (FOX) G1 promotes hepatocellular carcinoma epithelial-Mesenchymal transition by activating Wnt signal through forming T-cell factor-4/Beta-catenin/FOXG1 complex', *J Exp Clin Cancer Res*, 38: 475.
- Zhou, X., S. Temam, M. Oh, N. Pungpravat, B. L. Huang, L. Mao, and D. T. Wong. 2006. 'Global expression-based classification of lymph node metastasis and extracapsular spread of oral tongue squamous cell carcinoma', *Neoplasia*, 8: 925-32.
- Zhou, Y., H. Zhang, J. D. Siliciano, and R. F. Siliciano. 2005. 'Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4+ T cells', *J Virol*, 79: 2199-210.

10 Seznam příloh

Elektronická příloha – Tabulka EP

- seznam rozdílů (více než 2krát) exprimovaných genů mezi buněčnými liniemi PR9692-E9 a PR9692, PR9692shMOCK a PR9692shHOPX

