MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Význam tropomyosinu 2 v progresi osteosarkomu

Diplomová práce

ANDREA ROUSOVÁ

Vedoucí práce: **doc. Mgr. Petr Beneš, Ph.D.**

Ústav experimentální biologie
Program Molekulární biologie a genetika

Brno 2023

MUNI
SCI

Bibliografický záznam

Autor: Andrea Rousová
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Význam tropomyosinu 2 v progresi osteosarkomu

Studijní program: Molekulární biologie a genetika

Vedoucí práce: doc. Mgr. Petr Beneš, Ph.D.

Rok: 2023

Počet stran: 74

Klíčová slova: Osteosarkom, tropomyosin 2, TPM2.3, izoforma, proliferace, migrace, prognostický faktor

Bibliographic record

Author: Andrea Rousová
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: The role of tropomyosin 2 in osteosarcoma progression

Degree Programme: Molecular biology and genetics

Supervisor: doc. Mgr. Petr Beneš, Ph.D.

Year: 2023

Number of Pages: 74

Keywords: Osteosarcoma, tropomyosin 2, TPM2.3, isoform, proliferation, migration, prognostic factor

Abstrakt

Tropomyosiny (TPM) jsou rodina aktin-asociovaných proteinů objevených ve svalových buňkách, kde je jejich hlavní úlohou regulovat připojení myozinových hlavic na aktinová filamenta během svalové kontrakce. Vyskytují se ovšem i v nesvalových buňkách, kde jako důležitá složka cytoskeletu ovlivňují dynamiku aktinových vláken a jejich přístupnost pro vazbu dalších aktin-asociovaných proteinů. V lidském genomu byly popsány 4 TPM geny, které díky alternativnímu sestřihu produkují více než 40 izoforem. Gen TPM2, na který jsme se zaměřili v této diplomové práci, dává vznik 4 izoformám – TPM2.1, TPM2.2, TPM2.3 a TPM2.4. Cílem této diplomové práce bylo analyzovat hladinu izoforem TPM2 v osteosarkomových buněčných liniích a charakterizovat vliv zvýšené hladiny izoformy TPM2.3 na fenotypové vlastnosti těchto buněk. Pro analýzu hladiny izoforem TPM2 byly využity 4 osteosarkomové buněčné linie – 2 parentální (HOS, SAOS-2) a 2 metastatické (143B, SAOS-LM5). Z výsledků vyplývá, že hladina celkového proteinu TPM2 i všech jednotlivých izoforem je snížená u metastatických linií. Nejvíce exprimované izoformy ve vybraných buněčných liniích jsou izoformy TPM2.1 a TPM2.3. Zatímco význam izoformy TPM2.1 v tumorigenezi byl již popsán v několika odborných publikacích, úloha TPM2.3 v progresi nádoru zatím zůstává neobjasněná. Proto jsme se rozhodli blíže analyzovat izoformu TPM2.3, konkrétně vliv její zvýšené exprese na vybrané vlastnosti vysoce metastatické osteosarkomové buněčné linie 143B. Naše výsledky ukazují, že po navýšení exprese TPM2.3 dochází u těchto buněk ke zpomalení jejich proliferace, snížené schopnosti tvořit kolonie v 2D i 3D prostředí a pomalejší migraci. Tyto výsledky naznačují, že izoformu TPM2.3 lze považovat za možný nádorový supresor u osteosarkomu.

Abstract

Tropomyosins (TPM) are family of actin-binding proteins discovered in muscle cells, where they regulate binding of myosin head to actin filament during muscle contraction. However, they can also be found in non-muscle cells as an important component of cytoskeleton. They regulate the dynamics of the actin filaments and access for other actin-binding proteins. Four different TPM genes were described in human genome. These genes produce more than 40 isoforms, due to alternative splicing. In my diploma thesis, we focus on the gene TPM2 and its four isoforms – TPM2.1, TPM2.2, TPM2.3 and TPM2.4. The aim of this thesis was to analyse the level of all TPM2 isoforms in osteosarcoma cell lines and characterize the role of TPM2.3 in regulation of their phenotypic characteristics. The analysis of the level of TPM2 isoforms expression was performed in four osteosarcoma cell lines. Two of them were parental (HOS, SAOS-2) and two of them were metastatic (143B, SAOS-LM5). The level of TPM2 protein as well as the level of all individual isoforms was lower in metastatic cell lines. Moreover, isoforms TPM2.1 and TPM2.3 were the most expressed isoforms in osteosarcoma cells. The role of TPM2.1 in tumour progression was described previously in several scientific publications, however, the role of TPM2.3 remains unknown. For this reason, we chose isoform TPM2.3 for detailed analysis. Specifically, we tested how the higher expression of TPM2.3 affects phenotypic properties of highly metastatic osteosarcoma cell line 143B. The results show slower proliferation, reduced 2D and 3D clonogenic capacity and inhibited migration of 143B cells with increased expression of TPM2.3 compared to parental cells. These results indicate that TPM2.3 isoform can be considered as tumour suppressor in osteosarcoma.

MUNI
SCI

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KOTLÁŘSKÁ 2, 611 37 BRNO
IČ: 00216224
DIČ: CZ00216224

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2022/2023

Ústav:	Přírodovědecká fakulta
Studentka:	Bc. Andrea Rousová
Program:	Molekulární biologie a genetika
Specializace:	Molekulární biologie a genetika

Ředitel *ústavu* PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Význam tropomyosinu 2 v progresi osteosarkomu
Název práce anglicky:	The role of tropomyosin 2 in osteosarcoma progression
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:
Osteosarkom je nejčastější maligní nádor kostní tkáně, který často vytváří plicní metastázy. Molekulární mechanismy regulující progresi osteosarkomu jsou však dosud poměrně neznámy. Naše předběžná data ukázala, že u vysoce agresivních osteosarkomových buněčných linií je snížená exprese tropomyosinu 2. Cílem této diplomové práce je analýza funkčního významu tropomyosinu 2 a jeho izoforem u tohoto nádorového onemocnění.

Vedoucí práce:	doc. Mgr. Petr Beneš, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Lucia Knopfová, Ph.D.
Datum zadání práce:	22. 9. 2021
V Brně dne:	7. 5. 2023

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Bc. Andrea Rousová, 5. 10. 2021
doc. Mgr. Petr Beneš, Ph.D., 6. 10. 2021
RNDr. Pavel Lízal, Ph.D., 8. 10. 2021

Čestné prohlášení

Tímto prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli doc. Mgr. Petru Benešovi, Ph.D. za věnovaný čas, vstřícnost a cenné rady, které mi poskytl během vedení mé diplomové práce. Děkuji také Mgr. Lucii Knopfové, Ph.D. za milé konzultace a ochotnou pomoc při experimentech. Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Janu Šmardovi, CSc. za umožnění vypracování diplomové práce v Laboratoři buněčné diferenciace na Ústavu experimentální biologie PřF MU. Všem členům laboratoře patří velký dík za vytvoření velmi přátelského kolektivu na pracovišti i mimo něj. Jmenovitě děkuji Mgr. Kamile Říhové a Mgr. Janě Pokludové za jejich pomoc v laboratoři a podporu, kterou mi věnovali, kdykoliv to bylo potřeba.

Práce byla podpořena projektem Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

.

Obsah

Seznam pojmů a zkratek 15

1 Úvod 17

1.1 Osteosarkom ... 17

1.1.1 Diagnóza a genetické predispozice osteosarkomu ... 19

1.2 Léčba ... 20

1.2.1 Operace ... 20

1.2.2 Chemoterapie ... 20

1.2.3 Imunoterapie ... 21

1.3. Prognostické markery osteosarkomu ... 22

1.4. Tropomyosin ... 23

1.4.1 Geny pro tropomyosin, izoformy tropomyosinu ... 23

1.4.2 Funkce tropomyosinu ... 25

1.4.3 Tropomyosin a aktin ... 26

1.5. Tropomyosin 2 ... 28

1.5.1 TPM2 a mechanické vlastnosti buňky ... 29

1.6 TPM a jeho izoformy ve vztahu k nádorům ... 29

1.6.1 Význam TPM2 v buněčné migraci a metastázování ... 30

1.7 Preliminární data z Laboratoře buněčné diferenciace k expresi TPM2 u osteogenního sarkomu ... 31

2 Cíle diplomové práce 33

3 Materiály a metody 34

3.1 Materiály ... 34

3.1.1 Buněčné linie ... 34

3.1.2 Kultivační média ... 34

3.1.3 Plazmidy ... 34

3.1.4 Protilátky ... 34

3.1.5 Primery ... 35

3.1.6 Enzymy ... 35

3.1.7 Chemikálie a roztoky ... 36

3.1.8 Přístroje ... 36
3.2 Metody ... 37
3.2.1 Kultivace a pasážování buněk ... 37
3.2.2 Zamražování buněk ... 38
3.2.3 Sklízení buněk ... 38
3.2.4 Příprava buněčných lyzátů pro westernový přenos ... 38
3.2.5 SDS-PAGE: elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu39
3.2.6 Westernový přenos ... 39
3.2.7 Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek ... 40
3.2.8 Izolace RNA ... 40
3.2.9 Přepis RNA do cDNA ... 41
3.2.10 Kvantitativní PCR v reálném čase ... 41
3.2.11 Konstrukce expresního vektoru pCDNA4/TO-TPM2.3-HA ... 41
3.2.12 Agarózová elektroforéza ... 43
3.2.13 Ligační reakce ... 43
3.2.14 Transformace bakterií teplotním šokem ... 43
3.2.15 Izolace plazmidové DNA ... 43
3.2.16 Příprava buněk 143B se zvýšenou expresí TPM2.3 ... 44
3.2.17 Transfekce metodou lipofekce ... 44
3.2.18 Analýza proliferace (sestrojení růstové křivky) ... 45
3.2.19 2D klonogenní analýza ... 45
3.2.20 3D klonogenní analýza (test tumorigenicity) ... 45
3.2.21 Scratch assay ... 45
3.2.22 Testování migrace metodou xCELLigence ... 46
3.2.23 Statistické zpracování dat ... 46

4 Výsledky 47

4.1 Stanovení hladiny TPM2 u osteosarkomových buněčných linií ... 47
4.1.1 Stanovení hladiny TPM2 na úrovni proteinů ... 47
4.1.2 Stanovení jednotlivých izoforem TPM2 na úrovni RNA ... 47

4.2. Příprava expresního vektoru 48
4.3. Příprava buněk s nadměrnou expresí TPM2 50
4.4. Vliv nadměrné exprese TPM2.3 na proliferaci buněk 143B 52
4.5 2D klonogenní analýza u TPM2.3 up klonů 52
4.6 3D klonogenní analýza (test tumorigenicity) u TPM2.3 up klonů 54
4.7 Vliv nadměrné exprese TPM2.3 na migraci buněk 55
4.7.1 Sledování migrace pomocí Scratch assay 55
4.7.2 Sledování migrace pomocí přístroje xCELLigence 57

5 Diskuze 58

5.1 Porovnání hladiny TPM2 u čtyř osteosarkomových linií 59
5.2 Zvýšení exprese TPM2.3 u metastatické osteosarkomové linie 143B 59
5.3 Snížená proliferace buněk s vyšší expresí TPM2.3 59
5.4 Snízená klonogenní kapacita buněk s vyšší expresí TPM2.3 60
5.5 Snížená rychlost migrace buněk s vyšší expresí TPM2.3 61
5.6 Navazující experimenty 63

6 Souhrn 65

7 Summary 66

8 Literatura 67

Seznam pojmů a zkratek

ALP – alkalická fosfatáza

APE1 – apurinová/apyrimidinová endonukleáza 1

APS – amonium perfulfát

CDK4 – cyklin-dependentní kináza 4

CTLA-4 – *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*

DFS – přežití bez nemoci; *disease-free survival*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – dimethylsulfoxid

ECM – extracelulární membrána

FBS – fetální bovinní sérum

HMW – vysokomolekulární; *high molecular weight*

IF-γ – interferon γ

IHC – imunohistochemie

IL-6 – interleukin 6

JASP – jasplakinolid

LDH – laktát dehydrogenáza

LFS – Li-Fraumeniho syndrom

LMW – nízkomolekulární ; *low molecular weight*

MMP – metalloproteinázy

MRI – magnetická rezonance

MSCs – mesenchymální kmenové buňky

NGS – sekvenování nové generace

ORF – otevřený čtecí rámec; *open reading frame*

OS – celkové přežití; *overall survival*

PD-1 – *programmed death receptor-1*

PVDF – polyvinyldifluoridová

RNAi – RNA interference

SDS	–	sodium dodecyl sulfát
TGF-β	–	*transforming growth factor β*
TPM	–	tropomyosin
TPM2	–	tropomyosin 2
TEMED	–	tetrametylendiamin

1 Úvod

1.1 Osteosarkom

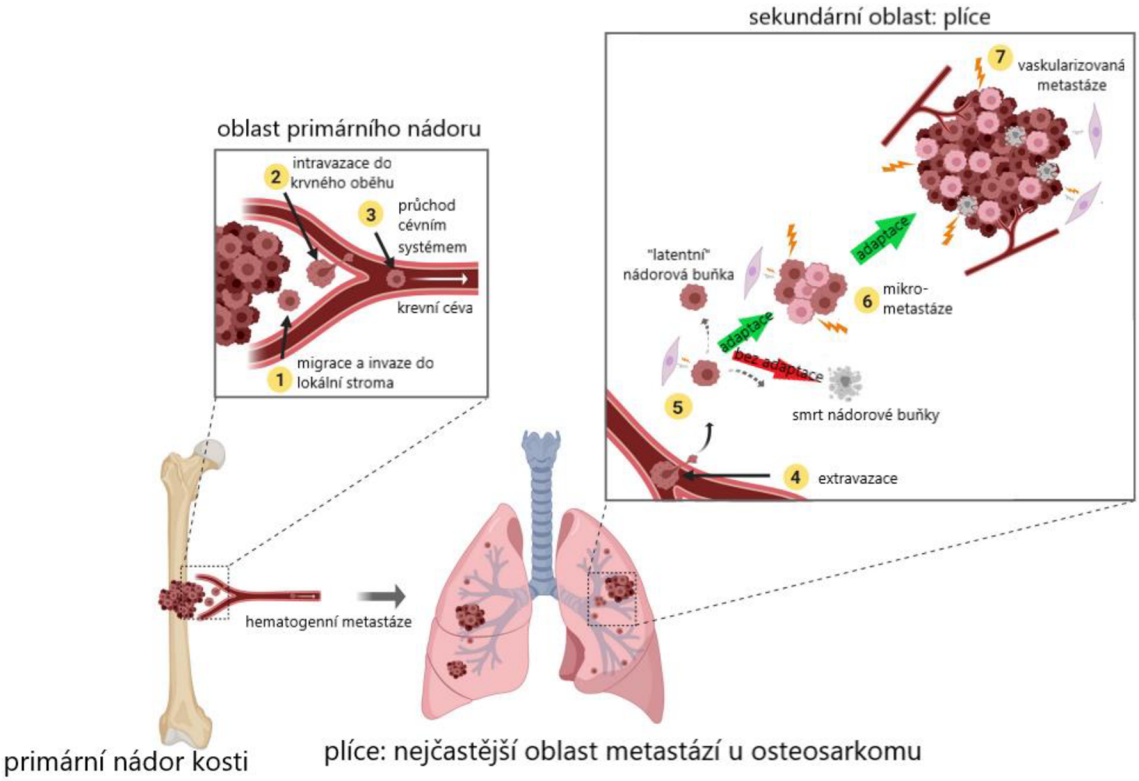
Osteosarkom je nejčastější maligní onemocnění kostí. Má bimodální rozložení v populaci, nejvíce se objevuje u dětí a mladistvých a druhou nejpostiženější skupinou jsou jedinci starší šedesáti let (Corre *et al.*, 2020). Podle amerického webu Cancer.Net aktualizovaného v únoru 2021 osteosarkom tvoří 2 % nádorových onemocnění u dětí do 14 let a 3 % u dětí mezi 15 a 19 lety. Přibližně 10 % diagnostikovaných jsou lidé přes 60 let (https://www.cancer.net/cancer-types/osteosarcoma-childhood-and-adolescence/statistics). Častěji bývají postiženi muži než ženy (Taran *et al.*, 2017).

Nádor se vyvíjí především v metafýze dlouhých kostí (femur, tibia, humerus), konkrétně v blízkosti růstové ploténky. Méně často může vznikat v kostech lebečních, pánevních nebo v čelistech (Corre *et al.*, 2020). Růstová ploténka je zodpovědná za aktivní vytváření kosti a elongaci, proto se osteosarkom většinou vyskytuje ve věku, kdy probíhá nejintenzivnější kostní růst, tedy i buněčné dělení, a buňky jsou náchylné na vznik mutací (Ferguson *et* Turner, 2018).

Kostní mikroprostředí je dynamické, vysoce specializované a komplexní mikroprostředí skládající se z kostních buněk (osteocyty, osteoblasty, osteoklasty), stromálních buněk (mesenchymální kmenové buňky, fibroblasty), buněk cévního endotelu a pericytů, imunitních buněk (makrofágy, lymfocyty) a mineralizované extracelulární matrix (Corre *et al.*, 2020). Vznik osteosarkomu je stále podnětem diskuze. Jednou z možných příčin vzniku osteosarkomu je změna v genetické informaci mesenchymálních kmenových buněk (MSCs) a jejich přeměna na maligní osteosarkomové buňky. Wang *et al.* (2017) dokázali, že po vypnutí exprese proteinu Rb a nadměrné expresi c-Myc dochází k přeměně MSCs a zároveň se zvyšuje jejich proliferace a snižuje rychlost stárnutí. Různé studie také poukazují na preosteoblasty a osteoblasty, vznikající z MSCs, jako na buňky, způsobující vzniku osteosarkomu (de Azevedo *et al.*, 2020).

Pro osteosarkom je typické brzké metastázování. V momentě diagnózy už se metastázy vytvořily přibližně u 20 % pacientů a u 90 % z nich se jedná o plicní metastázy. Pětiletá míra přežití pacientů s distálními metastázemi je pouze 15-30 % (Czarnecka *et al.*, 2020). Dalším častým místem s výskytem metastáz jsou kosti. Předpokládá se, že u většiny pacientů bez makrometastatického nálezu jsou založena mikrometastatická ložiska (Taran *et al.*, 2017).

V první fázi metastázování dochází k migraci buněk osteosarkomu z místa primárního nádoru do okolních tkání. Tento proces je závislý na schopnosti degradace bazální membrány a extracelulární matrix (ECM), což mohou způsobovat především proteiny z rodiny metaloproteináz (MMP) (Sheng *et al.*, 2021). Následně buňky osteosarkomu překonávají bariéru endotelových buněk a bazální membránu cév a dostávají se do krevního oběhu, ze kterého potom pronikají do cílového orgánu. Během třetí fáze metastázování se většina buněk z krevního oběhu dostává do plicního mikroprostředí. Pouze malá část nádorových buněk je schopná vytvořit detekovatelné metastáze. V krvi a plicním mikroprostředí jsou nádorové buňky vystaveny mnoha negativním vlivům, které se liší od původního kostního prostředí. Například je zde jiná koncentrace kyslíku a živin. Pokud se buňky adaptují na tyto podmínky, vytváří mikrometastáze, dochází k angiogenezi a proliferaci a vznikají vaskularizované makrometastatické léze (obr. 1) (Sheng *et al.*, 2021).



Obrázek 1: Schematické zobrazení tvorby plicních metastáz u osteosarkomu. Zdroj: Fan *et al.*, 2020 (upraveno).

1.1.1 Diagnóza a genetické predispozice osteosarkomu

Mezi typické příznaky výskytu osteosarkomu patří lokální bolest následována otokem a omezením pohybu kloubu. Při podezření na osteosarkom začíná stanovení přesné diagnózy lékařským vyšetřením s rentgenem. Nejčastějšími nálezy po rentgenovém vyšetření jsou hustá skleróza metafýzy, rozšíření měkkých tkání a kalcifikace (Ferguson *et* Turner, 2018). Dalším krokem je magnetická rezonance (MRI), pomocí které je možné posoudit stav měkké tkáně vzhledem k okolním tkáním, cévám a nervům a intra dřeňové rozšíření.

Diagnóza osteosarkomu nyní probíhá i pomocí imunohistochemických a sérových markerů. Pro diagnostiku osteosarkomu a predikci vývoje nádoru je důležité například zjistit hladinu alkalické fosfatázy (ALP) a laktát dehydrogenázy (LDH). Hladina ALP může být u pacientů s osteosarkomem zvýšená až o 40 %, což pozitivně koreluje s větším objemem nádoru a predikuje kratší dobu celkového přežití (*overall survival, OS)* (Jafari *et al*., 2020). V posledních letech se jako biomarker pro detekci a určení prognózy začaly testovat také molekuly miRNA. Díky své povaze mohou molekuly miRNA inhibovat onkogeny a nádorové supresory, což naznačuje, že by mohly mít roli v onkogenezi. Calin *et al.* (2002) dokázali, že miR15 a miR16 chybí nebo mají sníženou hladinu v případě chronické lymfocytární leukemie. Později byla dysfunkce miRNA dokázána i v případě osteosarkomu. Například snížená hladina miR-195 v séru pacientů s osteosarkomem může pravděpodobně sloužit jako sérový marker pro diagnózu osteosarkomu a zároveň předpovídá horší prognózu (Cai *et al.,* 2015).

Dalším markerem ukazujícím na výskyt osteosarkomu je změna v hladině určitých cytokinů. Například byly u osteosarkomu objeveny zvýšené hodnoty TGF-β (*transforming growth factor β*), IL-6 (interleukin 6) nebo MMP-9 (metaloproteináza 9), a proto mohou být tyto proteiny využívány jako biomarkery. IL-6 je produkován MSCs a podporuje proliferaci a metastázování a stejně jako zvýšená úroveň MMP-9 negativně ovlivňuje vývoj osteosarkomu a pomáhá predikovat horší prognózu pacienta (Zamborsky, 2019).

Existují syndromy, které predisponují pacienta k vývoji osteosarkomu. Jedním z nich je Li-Fraumeniho syndrom (LFS), při kterém je postižen mutací gen TP53, kódující protein p53, dobře známý jako důležitý nádorový supresor. Ztráta tohoto proteinu tedy zvyšuje šanci vzniku malignit nejen u pacientů s Li-Fraumeniho syndromem, protože i u sporadicky vzniklých případů dochází často k somatické ztrátě proteinu p53 (Correa, 2016). Dalším často inaktivovaným genem je Rb,

který také za normálních okolností funguje jako nádorový supresor. Jeho mutovaná forma způsobuje maligní nádor označovaný jako retinoblastom. Osteosarkom je druhé nejčastější nádorové onemocnění u pacientů s retinoblastomem (Desphadne *et* Hinds, 2006). Mutace v BLM helikáze způsobuje Bloomův syndrom a u těchto pacientů je obecně osteosarkom obvyklejší onemocnění než u běžné populace (Jafari *et al*., 2020). Pro vznik osteosarkomu jsou také predisponovaní pacienti trpící Pagetovou chorobou kostí (Shoaib *et al*., 2021). Pagetova choroba kostí je chronická a ohnisková porucha kostního metabolismu ústící typicky ve zvětšení a deformaci kostí v jedné nebo více oblastech kostry. Mezi hlavní komplikace onemocnění patří neoplastická transformace poškozené kosti. Většina vznikajících nádorů jsou osteosarkomy, v menší míře i fibrosarkomy a chondrosarkomy. Přibližně u 1 % pacientů s Pagetovou chorobou se vyvine osteosarkom, avšak riziko vzniku osteosarkomu je několik tisíckrát vyšší než v běžné populaci. Odhaduje se, že asi 20 % pacientů s osteosarkomem starších 60 let trpí Pagetovou chorobou kostí. Vznik nádorů signifikantně přispívá úmrtnosti pacientů s tímto onemocněním (Gennari *et al.*, 2019).

1.2 Léčba

Do roku 1970 byli pacienti s osteosarkomem léčeni výlučně amputací postižené končetiny. V 80. letech minulého století došlo k pokroku v operačních technikách, výzkumu efektivnějších chemoterapeutik a pre- a post-operační chemoterapeutické přídavné léčbě (Zhao *et al.*, 2021)

1.2.1 Operace

Cílem operace osteosarkomu je kompletní odstranění nádoru. Společně s pokrokem v zobrazovacích technikách, biomedicínském inženýrství a objevem pozitivního vlivu předoperační chemoterapie došlo k přesunu od amputace k tzv. končetinu zachovávajícím („limb salvage“) operacím (Taran *et al*., 2017).

1.2.2 Chemoterapie

Studie zabývající se vlivem chemoterapeutik na osteosarkom začaly v 70. letech 20. století, kdy byla chemoterapie používána jako přídavná léčba po operaci k zabránění formování lézí a metastáz, které nebyly operací kompletně odstraněny. Následně se chemoterapeutika začala využívat i předoperativně jako tzv. neoadjuvantní chemoterapie. Význam neoadjuvantní

chemoterapie spočívá například v možnosti brzké systematické léčby, která pomáhá zabránit vzniku mikrometastáz a snížení opakovaného vzniku onemocnění (Zhao *et al.*, 2021). Koncept neoadjuvantní chemoterapie byl přijat a převeden do klinické praxe a je stále využíván. Aktuálně patří mezi nejčastěji využívaná chemoterapeutika pro léčbu osteosarkomu doxorubicin, vysokodávkový methotraxát, cisplatina a ifosfamid (Zhao *et al.*, 2021). Délka léčby je obvykle 6-12 měsíců. Doxorubicin inhibuje topoizomerázu II, tím ovlivňuje replikaci DNA a způsobuje její poškození (Meredith *et* Dass, 2016). Jeho využití je omezené kvůli možnému kardiotoxickému účinku. Druhé nejčastěji používané chemoterapeutikum je cisplatina (Carrle *et* Bielack, 2006). Působí jako antineoplastické činidlo, stejně jako doxorubicin způsobuje poškození DNA, konkrétně vytváří vazby mezi DNA bázemi, inhibuje replikaci DNA a buněčné dělení (Dasari *et* Tchounwou, 2014). Vysokodávkový methotrexát může způsobit těžkou život ohrožující toxicitu, ale celkově je dobře tolerován u mladých pacientů (Carrle *et* Bielack, 2006).

1.2.3 Imunoterapie

Využití allogenních nádorových buněk jako imunogenu je považováno za jednu z prvních snah o aktivní imunoterapii osteosarkomu. Předchozí studie ukázaly, že je možné zvýšit čtyřleté přežití bez nemoci (DSF, *disease-free survival*) o 44 % při kombinaci imunoterapie a operace, v porovnání s pacienty léčené pouze operací (Jafari *et al.,* 2020).

Jednou z možností imunoterapie je využití vakcín obsahující nádorové peptidy, proteiny, autologní dendritické buňky nebo autologní či allogenní nádorové buňky. Cílem je stimulovat protinádorovou imunitní odpověď (Jafari *et al.*, 2020). Dendritické buňky společně s nádorovým lyzátem stimulují aktivaci cytotoxických T lymfocytů, zvyšují úroveň interferonu γ (IFN-γ) v séru a redukují plicní metastáze (He *et al.*, 2016). Existují studie, které ukázaly, že využití imunoterapie pomocí dendritických buněk u recidivujícího osteosarkomu se zdá být bezpečné bez vážných vedlejších účinků a způsobuje očekávanou imunitní odpověď (Jafari *et al.*, 2020).

K imunoterapii lze zařadit i léčbu pomocí mifamurtidu. Jedná se o syntetický lipofilní analog muramyl dipeptidu, peptidoglykanu obsaženého v bakteriální buněčné stěně, který je schopný aktivovat vrozený imunitní systém. Jeho tumoricidní efekt na mikroskopické metastáze je pravděpodobně způsobený stimulací monocytů a makrofágů asociovaných se zvýšenou úrovní prozánětlivých cytokinů. Význam využití mifamurtidu v léčbě osteosarkomu je v jeho schopnosti napodobit druh infekce napomáhající vymýcení reziduálních mikrometastáz, které nebyly

eliminovány systémovou chemoterapií. Kombinace chemoterapie, operace a využití mifamurtidu by mohlo přinést lepší výsledky léčby pro mladé pacienty (Múdry *et al.*, 2021). Důležitou roli ve zprostředkování efektivní protinádorové imunitní reakce hrají kontrolní body imunitního systému (*immune checkpoints*). Jde především o proteiny na povrchu nádorových buněk, proti kterým lze cílit protilátky. Bylo dokázáno, že PD-1 (*programmed death receptor-1*) je zapojen v patogenezi osteosarkomu. Exprese PD-1 je u osteosarkomu významně zvýšená a u pacientů koreluje s nepříznivou prognózou (Yu *et* Miao, 2016). CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) inhibuje funkci T lymfocytů a suprimuje protinádorovou imunitní reakci. Stejně jako PD-1, byla u osteosarkomu pozorována zvýšená exprese CTLA-4 (Wang *et al.*, 2016).

1.3 Prognostické markery osteosarkomu

Zavedení resekce a neoadjuvantní chemoterapie vedlo ke zvýšení pětileté míry přežití pacientů o více než 60 %. Avšak u velkého množství pacientů stále dochází k rozvoji resistence k léčivům, tvorbě metastáz a místním relapsům, a tedy k nepříznivému průběhu onemocnění. Proto je nezbytné nalézt užitečné prognostické markery a moci tak předpovědět velikost rizika a provést včasnou léčbu za účelem vylepšení míry přežití pacientů s osteosarkomem (Xin *et* Wei, 2020).

Změněnou hladinu některých proteinů při určitých fázích vývoje osteosarkomu lze považovat za ukazatele průběhu onemocnění. Například apurinová/apyrimidinová endonukleáza 1 (APE1), která je zapojená do oprav DNA typu bázové excize, apoptózy a buněčného cyklu může hrát roli v prognóze onemocnění. Zvýšená hladina APE1 byla nalezena u několika druhů nádorů (plic, vaječníku nebo prostaty). U osteosarkomu vyšší exprese APE1 koreluje s nižší dobou přežití (Zamborsky *et al.*, 2019).

Říhová *et al.* (2022) popsali funkci transkripčního faktoru c-Myb (kódován gen MYB) v progresi osteosarkomu a identifikovali tento protein jako negativní prognostický marker u osteosarkomu. Byl rovněž prokázán jeho vliv na růst, chemosensitivitu, migraci a metastatickou aktivitu u osteosarkomových buněčných linií (Říhová *et al.*, 2022).

Pomocí sekvenování nové generace (NGS) bylo objeveno několik molekul, které měly výrazně změněnou hladinu exprese u osteosarkomu. Jednou z těchto molekul je příklad cyklin-dependentní kináza 4 (CDK4), která kontroluje progresi buněčného cyklu regulací tranzice z fáze G1 do S fáze. U osteosarkomu byla detekována zvýšená exprese CDK4 korelující s metastatickým potenciálem

a horší prognózou. Zároveň bylo pozorováno, že po inhibici CDK4 dochází ke snížené buněčné proliferaci, růstu a migrace u osteosarkomu (Zhao *et al*, 2020).

Identifikace biomarkerů pro diagnózu a prognózu onemocnění, především v metastatické fázi, může přinést tolik potřebný nástroj pro včasnou diagnózu onemocnění a identifikaci potenciálních terapeutických cílů (Zamborsky *et al*., 2019).

Mnoho klinických studií identifikovalo další biomarkery asociované s osteosarkomem. Některé biomarkery by mohly být potenciálně využity ke sledování progrese nebo předpovědi prognózy osteosarkomu (Zamborsky *et al*., 2019), avšak dosud není žádný z těchto markerů využíván v klinické praxi. Pro možnost využívat již objevené biomarkery pro předpověď prognózy u osteosarkomu je důležité nejen provést další preklinické a klinické studie, ale také neustávat v hledání a objevování dalších biomarkerů, které by mohly sloužit jako potenciální prognostické faktory a terapeutické cíle u osteosarkomu.

1.4 Tropomyosin

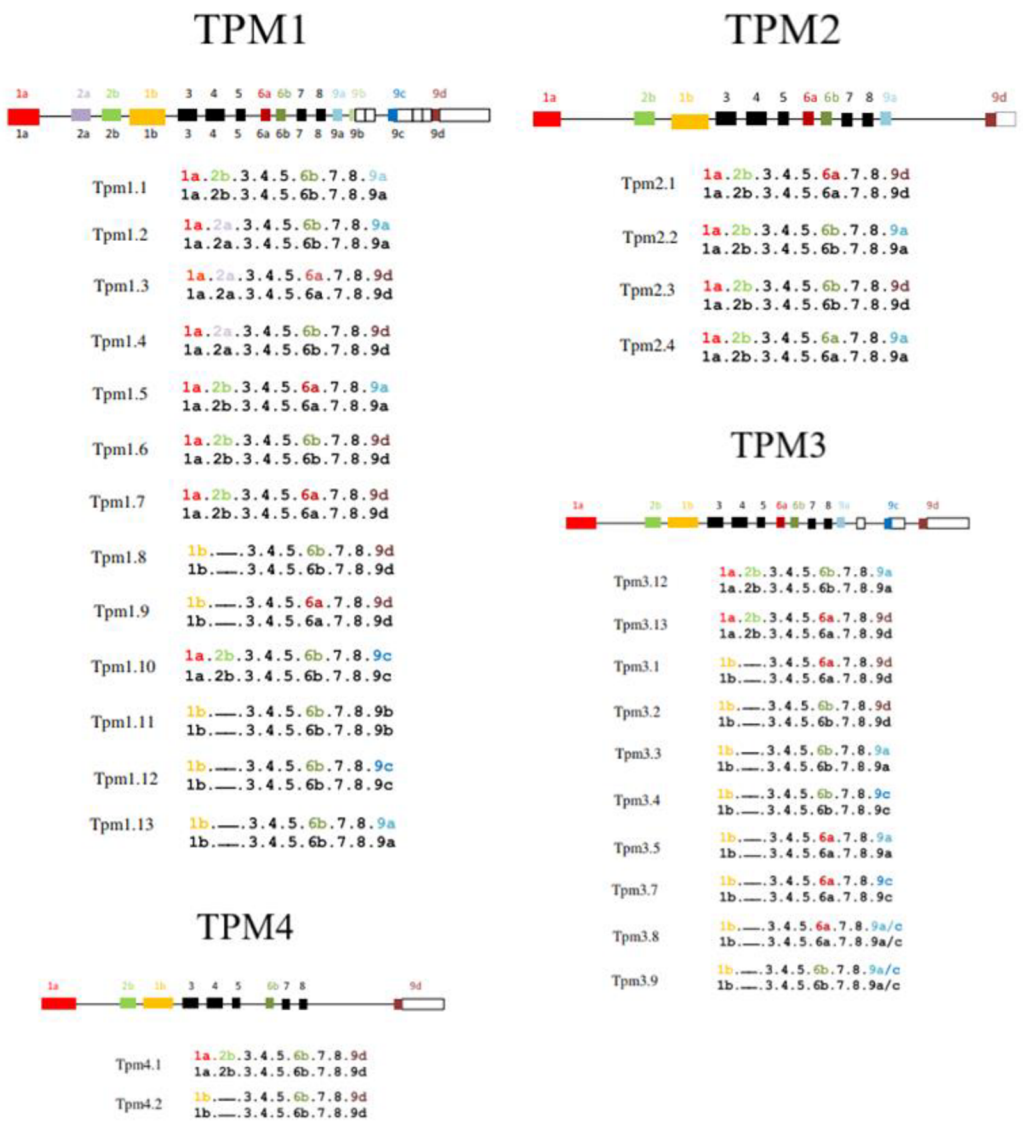
V roce 1946 byl ve svalových buňkách identifikován protein, jehož hlavní funkcí se ukázala být regulace interakce tenkých aktinových vláken s tlustými myozinovými vlákny během svalové kontrakce. Na základě podobností se svalovým myozinem, konkrétně ve složení aminokyselin a fyzikálních vlastnostech, dostal tento protein název Tropomyosin (TPM) s očekáváním, že by se mohlo jednat o prekurzor myozinu (Gunning *et al.*, 2008). Následující práce ovšem tuto domněnku vyvrátily a ukázalo se, že TPM je dimer dvou identicky velkých podjednotek a vyskytuje se i v nesvalových buňkách, ve kterých je jeho hlavní úlohou ovlivňovat stabilitu, respektive dynamiku aktinových filament (Wang *et* Coluccio, 2010).

1.4.1 Geny pro tropomyosin, isoformy tropomyosinu

V savčích buňkách existují 4 geny kódující tropomyosin: TPM1, TPM2, TPM3 a TPM4. Alternativní sestřih těchto genů, využití odlišných promotorů a různé polyadenylační signály mají za následek tvorbu přibližně 40 odlišných mRNA s plnou délkou ORF (*open reading frame*) (obr. 2) (Lin *et al.*, 2008). Geny pro TPM jsou v lidském genomu široce rozptýlené. Lokalizace TPM1 je na 15. chromozomu v oblasti 15q22, TPM2 se nachází v oblasti 9p13, TPM3 na lokusu 1q22 a TPM4 na 19p13 (Lin *et al.*, 2008). Historicky byly tropomyosiny také klasifikovány jako

vysokomolekulární (HMW, *high molecular weight*) a nízkomolekulární (LMW, *low molecular weight*). Vysokomolekulární tropomyosiny se skládají z 284 aminokyselin a obsahují exony 1a a 2, zatímco nízkomolekulární TPM obsahují 248 aminokyselin a chybí jim exon 2. Všechny TPM pak obsahují exony 3-9 (Gunning *et al.*, 2008).

Diverzita TPM izoforem je primárně způsobená alternativním sestřihem. Alternativní sestřih byl objeven u Drozofily, kde byly detekovány různé produkty genu TpmI v embryu a hrudníku (Gunning *et al.*, 2008). Následující studie dokázaly, že díky alternativnímu sestřihu lidského TPM1 genu dochází k produkci svalové i cytoskeletální izoformy.



Obrázek 2: Izoformy tropomyosinu vytvořené alternativním sestřihem 4 genů pro tropomyosiny: TPM1, TPM2, TPM3, TPM4. Zdroj: Geeves, *et al.*, 2015 (upraveno)

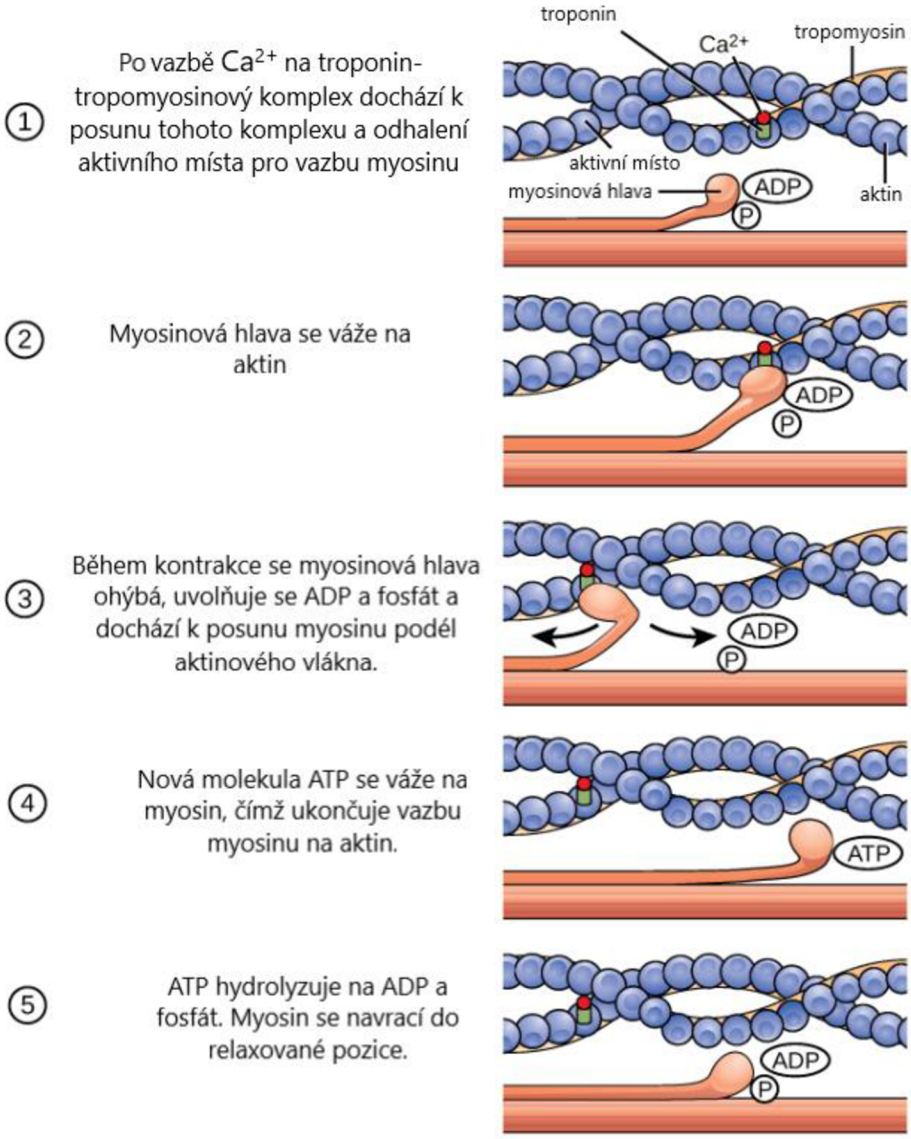
1.4.2 Funkce tropomyosinu

TPM izoformy jsou různě lokalizované v buňce a přispívají tak k mnoha různým funkcím.

Jedna z hlavních a nejznámějších funkcí TPM je jeho zapojení do svalové kontrakce. TPM tvoří ve svalových vláknech komplex s troponinem a celý tento komplex se váže na aktin. Při vazbě Ca^{2+} iontů k troponinu C na troponin-tropomyosinovém komplexu dochází k posunu tohoto komplexu a odhalení vazebného místa pro myosin. Myosinová hlavice se naváže na aktinové vlákno a při spotřebě ATP dochází k posunu aktinového vlákna, a tedy ke kontrakci svalu. Pohyb tropomyosinu nastává 12-17 ms před tím, než je možné detekovat mechanickou odpověď na svalovou aktivaci (obr.3) (Gunning *et al.*, 2008).

Bylo dokázáno, že TPM hraje roli také v morfogenezi. Například morfogeneze kosterních svalů je doprovázena změnami v expresi TPM izoforem. Cytoskeletální izoformy odvozené od všech 4 genů jsou exprimované v myoblastech, prekurzorech kosterního svalu. Během tvorby vícejaderné myotubuly dochází ke snížení exprese některých izoforem tropomyosinu, např. TPM3.1, TPM 2.1 a TPM1.6. Tyto izoformy jsou pak nahrazeny izoformami příčně pruhovaného svalstva, konkrétně TPM1.1, TPM2.2 a TPM3.12 (Hardeman *et al.*, 2020).

Existují alespoň dvě izoformy (TPM3.1 a TPM2.1), které regulují buněčnou adhezi. Interakcí TPM2.1 do aktinových vláken asociovaných s fokálními adhezemi vzniká komplex zodpovědný za vnímání napětí. Vytváří se kontraktilní jednotka podobná sarkomeře, která řídí kontrakci ve fokálních adhezích a předává sílu vnější matrix, čímž je následně umožněno měřit tuhost extracelulární matrix a regulovat buněčnou proliferaci (Hardeman *et al.*, 2020).



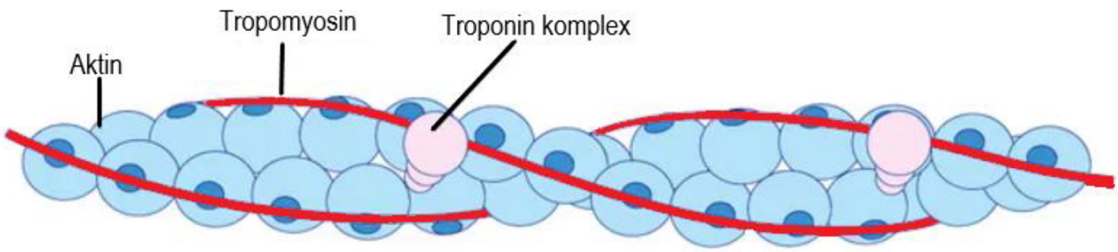
Obrázek 3: Molekulární mechanimus svalové kontrakce. Zroj: https://openstax.org/books/biology-2e/pages/38-4-muscle-contraction-and-locomotion (upraveno).

1.4.3 Tropomysin a aktin

Aktinový cytoskelet je komplexní organizovaná síť, složená z polárních lineárních aktinových vláken (F-aktin), zapojená do mnoha esenciálních procesů v buňce. Pomocí koordinované polymerizace aktinových vláken se v buňce tvoří tlak, může docházet ke kontrakci buněk a přetvářením zesíťovaných aktinových vláken asociovaných s membránou pomáhá určit tvar a rezistenci buněčného povrchu. Tyto aspekty jsou pak velmi důležité pro buněčnou migraci, interakci buňky s prostředím, mechanické vlastnosti buněčného povrchu, pohyb a morfogenezi buněčných organel (Svitkina, 2018). Chování aktinu je regulováno mnoha aktin-asociovanými

proteiny včetně TPM. TPM izoformy například chrání mikrofilamenta před gelsolinem, villinem a ADF/cofilinem, které by způsobily rozklad aktinových vláken (Wang *et* Coluccio, 2010).

Dimer TPM se váže podél aktinového vlákna a omotává aktinovou spirálu. Vazba monomeru k aktinu je slabá, ale tzv. head-to-tail interakce dimeru zvyšuje sílu vazby (obr. 4) (Wang *et* Coluccio, 2010).



Obrázek 4: Vazba tropomyosinu na aktinové vlákno. Zdroj: https://jackwestin.com/resources/mcat-content/specialized-cell-muscle-cell/presence-of-troponin-and-tropomyosin (upraveno).

V závislosti na tom, zda se jedná o HMW nebo LMW izoformu, se TPM dimer rozprostírá přes 6-7 aktinových jednotek. C-koncová doména TPM se může vázat k N-koncové doméně přilehlého TPM, což napomáhá stabilizovat TPM na aktinovém vláknu. Takto spojený dimer má přibližně 1000x vyšší afinitu k aktinu než samotný monomer (Manstein *et al.*, 2020).

Tropomyosinové isoformy cytoskeletu determinují funkci aktinových filament tím, že ovlivňují stabilitu aktinových filament a podporují nebo inhibují vazbu dalších aktin-asociovaných proteinů. Knock-down skupiny TPM izoforem v buněčných kulturách měl za následek redukci specifických aktinových struktur včetně mezibuněčných spojení a stresových vláken nebo expanzi lamellipodií (Manstein *et al.*, 2020).

Stresová vlákna jsou paralelní svazky 10-30 aktinových vláken, které drží pohromadě pomocí α-aktininu a dalších kroslinkujících proteinů, například fascinu, filaminu nebo fimbrinu. Existují dva druhy stresových vláken – ventrální a dorsální. Ventrální stresová vlákna jsou kontraktilní struktury umožňující buňce odpovědět na mechanickou sílu, přetvořit pojivové tkáně a vyvinout sílu na sousedící buňky. Dorsální stresová vlákna nejsou kontraktilní. Stresová vlákna v nepohyblivých buňkách jsou silná a relativně stabilní, zatímco v pohyblivých buňkách jsou tenká

a více dynamická (Pellegrin *et* Mellor, 2007). Hlavní nesvalové izoformy TPM nacházející se v kontraktilních stresových vláknech jsou TPM1.6, TPM1.7, TPM2.1, TPM3.1/3.2 a TPM4.2. Deplece jakékoli z těchto izoforem způsobuje narušení sítě stresových vláken (Tojkander *et al.*, 2011). To naznačuje, že tato síť je složena z různých typů aktinových vláken jejichž funkční vlastnosti jsou definovány podle typu asociovaného TPM. Zatím však stále není jasné, jak jsou konkrétní izoformy organizovány navzájem a jak vzhledem k dalším aktin-asociovaným proteinům. Rovněž nejsou dosud známy specifické funkce všech izoforem TPM asociovaných se stresovými vlákny (Manstein *et al.*, 2020).

1.5 Tropomyosin 2

TPM2, také označován jako β-TPM, je kódován genem *TPM2*, který se skládá z jedenácti exonů, jednoho promotoru a obsahuje vzájemně se vylučující interní exony 6a a 6b a dva rozdílné C-koncové exony 9a a 9b. Protein TPM2 vytváří dimer spirálovitého tvaru. Molekulová hmotnost monomeru je přibližně 33 kDa a je tvořen 284 aminokyselinami (Wang *et* Coluccio, 2010). Díky dvěma formám exonů 6 a 9, které se různě kombinují při alternativním sestřihu proteinu, vznikají 4 izoformy TPM2 – TPM2.1, TPM2.2, TPM2.3 a TPM2.4 (obr. 2).

TPM2 je exprimován v buňkách hladkého (izoforma TPM2.1) (Lin *et al.*, 2008) i kosterního svalstva (hlavní izoforma sarkomer je TPM2.2) (Manstein *et al.*, 2020). Vyskytuje se však i v nesvalových buňkách. Izoforma TPM2.1 byla detekována například ve střevních epiteliálních buňkách (Lin *et al.*, 2008), v plicních fibrocytech (Bradbury *et al.*, 2021), prsních epiteliálních buňkách (Shin *et al.*, 2017) atd.

Přítomnost TPM2.1 je nutná pro vnímání mechanických vlastností, buněčné adheze (Gunning *et* Hardeman, 2017), pomáhá zakládat fokální adheze, obnovuje stresová vlákna v transformovaných buňkách a má význam v procesu apoptózy a anoikis (buněčná smrt indukovaná oddělením od extracelulární matrix) (Manstein *et al.*, 2020). Přítomnost TPM2.1 ve fokálních adhezích může být důležitým faktorem pro vnímání apoptotických stimulů, například změn v aktinových filamentech. Zvýšená exprese TPM2.1 v buňkách B35 (myší neuroepiteliální buňky) podpořila expresi mnoha členů vnitřní apoptotické dráhy. Byla detekována zvýšená hladina proapoptotických proteinů Bak a Bax nebo antiapoptotických proteinů Mcl-1 a Bcl-2. Po navýšení apoptotických stimulů pomocí

jasplakinolidu (JASP), který stimuluje apoptózu cílením na aktin, došlo k degradaci Mcl-1 a Bcl-2. TPM2.1 tedy v buňce slouží nejen jako sensor pro anoikis, ale také navyšuje sensitivitu k vnitřní apoptotické dráze zvýšením exprese Bak a Bax a degradace anti-apoptotických proteinů Mcl-1 a Bcl-2 (Desouza-Armstrong *et al*, 2017).

1.5.1 TPM2 a mechanické vlastnosti buňky

Mechanosensing popisuje schopnost buňky vnímat informace z mikroprostředí zahrnující komponenty síly, stresu, napětí, tuhost substrátu, topologie a přilnavost. Tato schopnost je pro buňku kritická, aby dokázala odpovědět okolním mechanickým vjemům a přizpůsobit se měnícímu se prostředí. Na buněčné úrovni se tedy mechanobiologie zajímá o to, jakým způsobem buňka vnímá, interpretuje, odpovídá a adaptuje se na mechanické změny prostředí (Chen *et al.*, 2017).

Morfologické a mechanické vlastnosti nádorových buněk se dramaticky liší od normálních buněk. Nádorové buňky postrádají například senzory tuhosti. To může vysvětlovat jejich růst na měkkých i tuhých matrix. Obnovení vnímavosti tuhosti pomocí exprese cytoskeletálních proteinů v nádorových buňkách je blokováno stavem transformace (Tijore *et al.*, 2021)

Častým jevem u maligní transformace je snížení hladiny TPM2.1 nebo zvýšení exprese TPM3. Snížení poměru TPM2.1:TPM3 způsobuje ztrátu vnímavosti vůči tuhosti matrix a umožňuje růst transformovaným buňkám. Kvůli ztrátě citlivosti vůči tuhosti matrix mohou transformované buňky růst i na měkkých površích (Tijore *et al.*, 2021).

1.6 TPM2 a jeho izoformy ve vztahu k nádorům.

TPM byly označeny jako biomarkery buněčné transformace před 40 lety. Při buněčné transformaci bylo pozorováno snížení regulace především vysokomolekulárních tropomyosinových izoforem, což bylo spojeno se ztrátou stresových vláken v buňkách (Hardeman *et al.*, 2020).

Hlavní izoforma asociovaná s transformací je dle aktuálně dostupné literatury TPM2.1.

1.6.1 Význam TPM2 v buněčné migraci a metastázování

Cui *et al.* (2016) hodnotili expresi TPM2 v buněčných liniích rakoviny tlustého střeva. Předchozí studie prokázaly, že exprese TPM2 je snížená u kolorektálního adenomu v porovnání se zdravou tkání. To indikuje, že ztráta exprese TPM2 může přispívat k rozvoji rakoviny tlustého střeva. Cui *et al.* (2016) pomocí metylace v promotoru genu TPM2 docílili epigenetického umlčení TPM2. Po ztrátě exprese TPM2 byla pozorována vyšší proliferace a migrace buněk rakoviny tlustého střeva. U těchto buněk byla pozorována také zvýšená hladina aktivace RhoA. RhoA patří do rodiny GTPáz, které regulují strukturu aktinu a ovlivňují tak buněčnou migraci. Tyto výsledky tedy naznačují, že efekt TPM2 na progresi a migraci buněk nádoru tlustého střeva se uplatňuje prostřednictvím přímého nebo nepřímého vlivu na signální dráhu RhoA (Cui *et al.*, 2016).

K podobnému výsledku došli i Shin *et al.* (2017) při zkoumání vlivu izoformy TPM2.1 na kolektivní a ameboidní migraci u buněk karcinomu prsu. Pomocí metody RNAi dokázali, že hladina exprese TPM2.1 je snížená u nádorových buněk oproti netransformovaným buňkám. Následně byla pomocí RNA interference (RNAi) snížena exprese TPM2.1 a po provedení wound healing testu byla pozorována pomalejší kolektivní migrace. Shin *et al.* (2017) také analyzovali organizaci aktinového cytoskeletu u kontrolních a TPM2.1 depletovaných buněk. Zatímco u kontrolních buněk tvořila aktinová vlákna organizované lineární struktury v mezibuněčných kontaktech, u TPM2.1 depletovaných buněk bylo pozorováno narušení kortikálních aktinových vláken. Ztráta TPM2.1 vedla také ke zvýšené míře ameboidní migrace a invaze pravděpodobně prostřednictvím zvýšení Rho signalizace (Shin *et al.*, 2017).

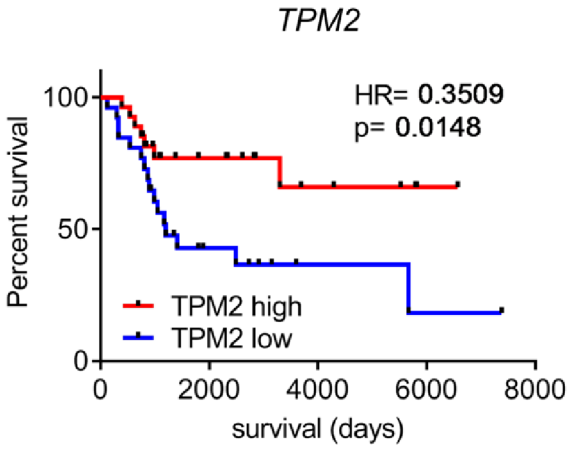
Duan *et al*. testovali roli TPM2 v progresi plicního adenokarcinomu. Prvním výstupem této studio bylo zjištění, že TPM2 mRNA je významně snížená ve tkáni plicního adenokarcinomu a pacienti s nižší hladinou TPM2 vykazují kratší čas dožití. Pomocí zvýšení a snížení exprese TPM2 byla také studována role TPM2 v proliferaci, schopnosti tvořit kolonie, v migraci a invazivitě. Kromě *in vitro* experimentů byla také testována rychlost růstu nádoru *in vivo*, kde se ukázalo, že zvýšená exprese TPM2 způsobila pomalejší růst nádoru, zatímco rychlejší postup onemocnění byl pozorován při snížené hladině TPM2. TPM2 byl tedy označen za prognostický faktor u plicního adenokarcinomu, protože projevuje anti-onkogenní funkci v progresi tohoto nádoru (Duan *et al.*, 2022). V tomto článku ovšem není zmíněná konkrétní izoforma, jejíž exprese byla zvyšována.

Wu *et al.* studovali význam TPM2 v progresi rakoviny prostaty. Zvýšení exprese TPM2.1 v nádorových buňkách vedlo k výrazně snížené proliferaci, schopnosti tvořit kolonie a zpomalené migraci a invazivitě. Pomocí hmotnostní spektrometrie a imunoprocipitace byla ověřena vazba TPM2 s proteinem PDLIM7, který umožňuje přechod transkripčního kofaktoru YAP1 do jádra, kde hraje úlohu v regulaci transkripce různých genů, včetně genů ovlivňující proliferaci, buněčný cyklus, migraci a pohyb buňky. Při zvýšení exprese YAP1 dochází k rychlejší progresi rakoviny prostaty. Pokud je v buňce nadměrné množství TPM2.1, dochází pravděpodobně ke kompetici mezi TPM2.1 a YAP1 o vazbu na PDLIM7. Tento mechanismus pravděpodobně stojí za sníženou progresí nádoru vyvolanou zvýšenou expresí TPM2.1 (Wu *et al.*, 2023).

Studium významu TPM2 však není omezeno pouze na nádorová onemocnění. Bylo dokázáno, že exprese TPM2 je také významně snížená například ve tkáni s aterosklerózou (chronické zánětlivé onemocnění cévní stěny). Protože je TPM2 zapojen v procesu svalové kontrakce, buněčném pohybu a dalších biologických procesech, je možné, že snížení exprese TPM2 vede u aterosklerózy k poruchám ve tvorbě a pohybu buněk hladko svalové vrstvy cév (Meng *et al.*, 2019).

1.7 Preliminární data z Laboratoře buněčné diferenciace k expresi TPM2 u osteogenního sarkomu

TPM2 byl určen jako možný prognostický marker na základě výsledků bioinformatické analýzy provedené na našem pracovišti (obr. 5).



Obrázek 5: Křivky celkového přežití u pacientů s osteosarkomem na základě rozdílné exprese genu TPM2 na úrovni RNA v nádorových tkáních osteosarkomu (dataset GSE66673).

Většina studií zabývající se významem TPM2 u nádorů byla omezena pouze na izoformu TPM2.1 a zatím nebyl popsán význam izoformy TPM2.3 během tumorigeneze a nádorové progrese. U osteosarkomů obecně data o roli TPM2 prakticky zcela chybějí. Z uvedených důvodů jsme se rozhodli zaměřit právě na izoformu TPM2.3 a charakterizovat blíže fenotyp osteosarkomových buněk po zvýšení hladiny exprese této izoformy.

2 Cíle diplomové práce

- Analýza exprese jednotlivých izoforem genu TPM2 u osteosarkomových buněčných linií na úrovni RNA a proteinů.
- Příprava osteosarkomové buněčné linie se zvýšenou expresí izoformy TPM2.3.
- Charakterizace fenotypových vlastností buněk s vyšší expresí TPM2.3.

3 MATERIÁLY A METODY

3.1 MATERIÁLY

3.1.1 Buněčné linie

HOS – parentální buněčná linie odvozená od lidského OSA (McAllister et al., 1971)

143B – metastatická buněčná linie odvozena od linie HOS (Hensler et al., 1994)

SAOS-2 – parentální buněčná linie odvozena od lidského OSA (Fogh et Trempe, 1975)

SAOS-LM5 – metastatická buněčná linie odvozena od linie SAOS-2 (Jia et al., 1999)

Kompetentní buňky NEB® Stable Competent Escherichia coli (New England BioLabs Inc., C3040)

3.1.2 Kultivační média

Kompletní kultivační médium DMEM („Dulbecco's Modified Eagle's Medium") high glucose (Biosera) obohacené o 10% fetální bovinní sérum (FBS) (Biosera), 2 mM L-glutamin (Lonza), 100 U/ml penicilin (Sigma-Aldrich) a 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich)

2xDMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich), 400 ml sterilní Milli-Q voda, 3,7 g $NaHCO_3$, 5 ml D-(+)-Glucose Solution (Sigma-Aldrich), 5 ml směs 100 U/ml penicilin (Sigma-Aldrich) + 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich), 10 ml 2 mM L-glutamin (Lonza), 10 ml Sodium pyruvate solution (Sigma-Aldrich), 100 ml fetální bovinní sérum (FBS) (Biosera)

3.1.3 Plazmidy

pCMV3-TPM2.3-HA (SinoBiological)

pcDNA4/TO (Invitrogen)

3.1.4 Protilátky

Primární protilátky:

anti-TPM2 (Invitrogen, PA5-91925 a 720307). Ředění 1:10000, králičí monoklonální protilátka

anti-α-tubulin (Abcam, ab7291). Ředění 1:10000, myší monoklonální protilátka

anti-HA-tag (CST, 2367S). Ředění 1:100, myší monoklonální protilátka

Sekundární protilátky:

králičí monoklonální protilátka IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) (CST 7076) – ředění 1:15000

myší monoklonální protilátka IgG konjugovaná s HRP (Sigma-Aldrich, A4914) – ředění 1:15000

3.1.5 Primery

Primery pro kvantitativní PCR v reálném čase (od 5‘ konce):

TPM 2.1(fw): ATGGCCTCAGAGGAGGAGTATT

TPM 2.1(rev): ACTTTGCCACAGACCTCTCG

TPM2.2(fw): AGGTGGCCGAGAGTAAATGTG

TPM2.2(rev): CTCGACGTTCTCCTCCTTGG

TPM2.3(fw): CCCAGGCGGACAAGTATTCC

TPM2.3(rev): CAGTTCCTCGCTAATGGCCT

TPM2.4(fw): TGGCCTCAGAGGAGGAGTAT

TPM2.4(rev): CTGGCCAAGGTCTCTTCTAGG

hGAPDH(fw): TCGGAGTCAACGGATTTGGT
hGAPDH(rev): TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC

3.1.6 Enzymy

T4-DNA ligáza (New England BioLabs, M0202S)

RNáza A (Macherey-Nagel, 740505)

Proteináza K (20 µl/ml) (Sigma-Aldrich, P2308)

HindIII (New England Biolabs, R0104S)

XbaI (New England Biolabs, R0146S)

KpnI (New England Biolabs, R0142)

3.1.7 Chemikálie **a roztoky**

Agaróza (Sigma)

Ampicilin (Sigma-Aldrich)

Kanamycin (Biotech)

Zeocin Selection Reagent (Life Technologies)

Trypsin (Sigma-Aldrich)

DMSO (Sigma Aldrich)

1x PBS – 80g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4, 23,1 g Na_2HPO_4, rozpuštěno v 1 l destilované H_2O, upraveno na pH 7,4 a sterilizováno autoklávováním 20 minut při 120 °C.

Clarity and Clarity Max ECL Western Blotting Substrates (Bio-Rad)

Lipofectamine® LTX & PLUS™ Reagent (invitrogen)

Opti-MEM (Gibco)

MTT činidlo (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) (Sigma-Aldrich)

0,05% krystalová violeť – 0,25 g krystalová violeť, 13,5 ml 37% formaldehyd, 50 ml 10xPBS, 5 ml methanol, doplněno destilovanou vodou do 500 ml.

Triton™ X-100 (Thermo Scientific)

BSA (Sigma Aldrich)

3.1.8 Přístroje

centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf)

centrifuga 5804 R (Eppendorf)

centrifuga 5417R (Eppendorf)

centrifuga Rotina 420R (Hettich)

centrifuga EBA 12 (Hettich)

spektrofotometr NanoPhotometer (Implen)

inverzní mikroskop DM IL LED (Leica)

laminární box MSC-Advantage (ThermoFisher Scientific)

CASY® Cell Counter + Analyser Systém Model TT (Roche-Innovatis)

CO_2 inkubátor Heracell 150 (Thermofisher Scientific)

termobločky Thermo Shaker TS-100 (Biosan)

aparatura pro elektroforézu (Bio-Rad)

zobrazovací systém G:BOX Chemi XT (SYNGENE)

čtečka destiček Synergy HT (BioTek)

třepačka ProBlot™ Rocker (Labnet)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

termocykler MJ Research PTC-200 (DNA ENGINE)

průtokový cytometr BD FACSVerse (BD Biosciences)

Další použité materiály jsou uvedeny u jednotlivých metod.

3.2 METODY

3.2.1 Kultivace a pasážování buněk

Buněčné kultury byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5 % CO_2. Při pasážování bylo z Petriho misky odsáto médium a byly přidány 3 ml trypsinu. S trypsinem byly buňky inkubovány přibližně 2 minuty při 37 °C. Po uvolnění byla požadovaná část buněk přenesena do nové Petriho misky s čerstvým médiem.

3.2.2 Zamražování buněk

Z 10ml Petriho misky s buněčnou kulturou bylo odsáto živné médium a byly přidány 3 ml trypsinu, se kterým byly buňky inkubovány při 37 °C asi 2 minuty. Po uvolnění byly buňky přeneseny do 15ml zkumavky obsahující 6 ml média za účelem inaktivace trypsinu. Následně byly buňky centrifugovány při 290 g po dobu 4 minut. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k peletu byl přidán 1 ml zamražovacího roztoku (DMSO a FBS v poměru 1:9) a buněčná suspenze byla přenesena do zamražovací zkumavky. Buňky byly uchovány v tekutém dusíku při -196 °C.

3.2.3 Sklízení buněk

Z Petriho misky s buněčnou kulturou bylo odsáto živné médium a byly přidány 3 ml trypsinu, se kterým byly buňky inkubovány při 37 °C asi 2 minuty. Po uvolnění byly buňky přeneseny do 15ml zkumavky obsahující 6 ml média za účelem inaktivace trypsinu. Následně byly buňky centrifugovány při 290 g po dobu 4 minut. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, k peletu byl přidán 1 ml 1xPBS a suspenze byla přenesena do mikrozkumavky. Následně byla buněčná suspenze centrifugována při 290 g po dobu 4 minut. Byl odsát supernatant a buněčný pelet byl uchován v – 80 °C, případně byl ihned lyzován pro další experimenty.

3.2.4 Příprava buněčných lyzátů pro westernový přenos

Buňky byly nasazeny v počtu $5x10^5$ do 10 ml Petriho misky s médiem a byly kultivovány při 37 °C po dobu 48 hod v případě buněčných linií 143B a HOS a po dobu 72 hod v případě buněčných linií SAOS-2 a SAOS-LM5. Následně byly sklizeny podle postupu v kapitole 2.2.3.

K buněčnému peletu byl přidán 2x CSB lyzační pufr (6,9 ml H_2O, 2 ml glycerolu, 2 ml 20% SDS sodium dodecyl sulfátu (SDS), 1,2 ml 1M Tris-Cl (pH = 6,8), 0,5 ml 0,2% bromfenolové modři v 1M Tris-Cl (pH 6,8)) bez merkaptoethanolu a bromfenolové modři (objem lyzátu závisel na množství buněčného peletu). Vzorky s lyzačním pufrem byly 5 min inkubovány při teplotě 98 °C a následně byla pomocí komerčního kitu DC Protein Assay Kit (Biorad) změřena koncentrace proteinů ve vzorcích. Koncentrace byla pomocí 2xCSB srovnána na stejnou hodnotu, vzorky byly smíchány s kompletním 2xCSB pufrem v poměru 1:1 a lyzáty byly naneseny na SDS-PAGE nebo uchovávány v -20 °C.

3.2.5 SDS-PAGE: elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu

Nejprve byl připraven polyakrylamidový gel.

Roztok pro 10% dolní dělicí gel byl připraven smícháním následujících roztoků a chemikálií:

4,9 ml destilovaná H_2O

2,4 ml 40% akrylamid

2,5 ml 1,5M Tris-Cl (pH 8,8)

100 µl 10% SDS 75 µl amonium persulfát (APS)

7,5 µl tetrametyletylendiamin (TEMED)

Roztok pro 4% horní zaostřovací gel byl připraven smícháním následujících roztoků a chemikálií:

5,6 ml destilovaná H_2O

790 µl 40% akrylamid

940 µl 1M Tris-Cl (pH 6,8)

75,2 µl 10% SDS

30 µl amonium persulfát (APS)

10 µl tetrametyletylendiamin (TEMED)

Po nalití horního gelu byl mezi skla vložen hřebínek. Po zatuhnutí byla skla s gelem umístěna do elektroforetické aparatury, byl dolit elektroforetický pufr a hřebínek byl vyjmut. 1 x elektroforetický (running) pufr byl připraven smícháním 10 ml SDS, 100 ml 10× elektroforetického/přenosového pufru (15 g Tris Base, 72,5 g glycinu, doplněno destilovanou H_2O do objemu 500 ml) a destilovanou H_2O do objemu 1000 ml.

Aparatura byla připojena ke zdroji napětí. Pro průchod horním gelem bylo aplikováno napětí 80 V, poté bylo napětí zvýšeno na 120 V. Elektroforéza byla zastavena v momentě, kdy hrana barvičky (bromfenolová modř) opouštěla gel.

3.2.6 Westernový přenos

Polyvinyldifluoridová membrána (PVDF) byla hydratována v methanolu. Blotovací „sendvič“ byl sestaven v přenosovém transfer pufru v pořadí: porézní destička, 3x filtrační papír Whatman (Sigma-Aldrich), polyakrylamidový gel, PVDF membrána, 3x filtrační papír Whatman, porézní

destička. Tento „sendvič byl uzavřen svorkou a přenesen do přenosové aparatury spolu s chladicí jednotkou. Celá aparatura byla naplněna 1x přenosovým pufrem, ponořena do ledové lázně a přenos proteinů probíhal 60 min při konstantním napětí 100 V.

1x přenosový (transfer) pufr: 100 ml elektroforetického/přenosového pufru, 200 ml methanolu, 700 ml destilované vody.

3.2.7 Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek

Po přenosu byla membrána blokována v 5% roztoku sušeného mléka po dobu minimálně 60 minut za stálého třepání. Následně byla inkubována s primární protilátkou naředěnou v roztoku 5% mléka přes noc. Po inkubaci byla membrána třikrát po dobu 5 minut promyta v TBS-Tween (500 ml TBS, 375 µl Tween-20). Dále byla membrána inkubována se sekundární protilátkou (v roztoku 5% mléka) konjugovanou s HRP po dobu 60 minut za stálého třepání. Opět byla membrána promyta v TBS-Tween třikrát po dobu 5 minut a následně dvakrát v TBS (12,5 ml Tris-Cl (pH = 8), 14,4 ml 5M NaCl, 473,1 ml destilované H_2O) po dobu 2 minut.

Membrána byla osušena ubrouskem a byl na ni nanesen substrát Clarity ECL Western Blotting Substrate nebo Clarity Max ECL Western Blotting Substrate a proběhla vizualizace pomocí přístroje Vilber Fusion Solo S. Pro kontrolu nanesení stejného množství všech vzorků byla využita detekce proteinu α-tubulinu. Po detekci signálu z protilátek byla membrána nabarvena pro nespecifickou vizualizace proteinů pomocí 0,2% barvicího roztoku amidové černi v pro ověření nanesení stejného množství proteinů.

3.2.8 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byly buňky nasazeny v počtu $5x10^5$ na 10 ml Petriho misku s růstovým médiem. Kultivace proběhla při 37 °C po dobu 48 hod v případě buněčných linií 143B a HOS a po dobu 72 hod v případě buněčných linií SAOS-2 a SAOS-2-LM5. Po uplynutí doby kultivace byly buňky sklizeny podle postupu v kapitole 2.2.3. Izolace RNA proběhla pomocí komerčního kolonkového kitu GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) podle doporučeného postupu výrobce. Koncentrace a čistota RNA byly změřeny na spektrofotometru a RNA byla skladována při -80 °C.

3.2.9 Přepis RNA do cDNA

K přepisu izolované RNA do cDNA byl využit komerční kit QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) a postupovalo se na základě doporučení od výrobce. Teplota pro skladování cDNA byla -20 °C.

3.2.10 Kvantitativní PCR v reálném čase

Pro každou reakci byla připravena 20µl směs obsahující 10 µl KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix, 2x, 2 µl směsi primerů (5 µM forward i reverse) (viz 2.1.5), 7 µl PCR vody a 1 µl cDNA. Jednotlivé reakční směsi byly pipetovány do jamek 96 jamkové destičky. Bylo analyzováno množství jednotlivých izoform TPM2 (TPM2.1, TPM2.2. TPM 2.3 a TPM2.4) a hGAPDH. Kvantifikace hGAPDH byla použita pro normalizaci množství cDNA mezi vzorky. K vyhodnocení byla využita metoda $\Delta\Delta C_t$.

Podmínky PCR reakce:

Počáteční denaturace	95 °C, 10 min
45 cyklů amplifikace	95 °C, 30 sec
	60 °C, 60 sec
Křivka tání	95 °C, 5 sec → 65 °C, 60 sec → zvyšování teploty o 0,06 °C za sekundu až do 97 °C
Chlazení	40 °C, 30 sec

3.2.11 Konstrukce expresního vektoru pCDNA4/TO-TPM2.3-HA

Cílem experimentu bylo vyštěpit DNA fragment odpovídající TPM2.3-HA z plazmidu pCMV3-TPM2.3-HA a přenést jej do plazmidu pCDNA4/TO.

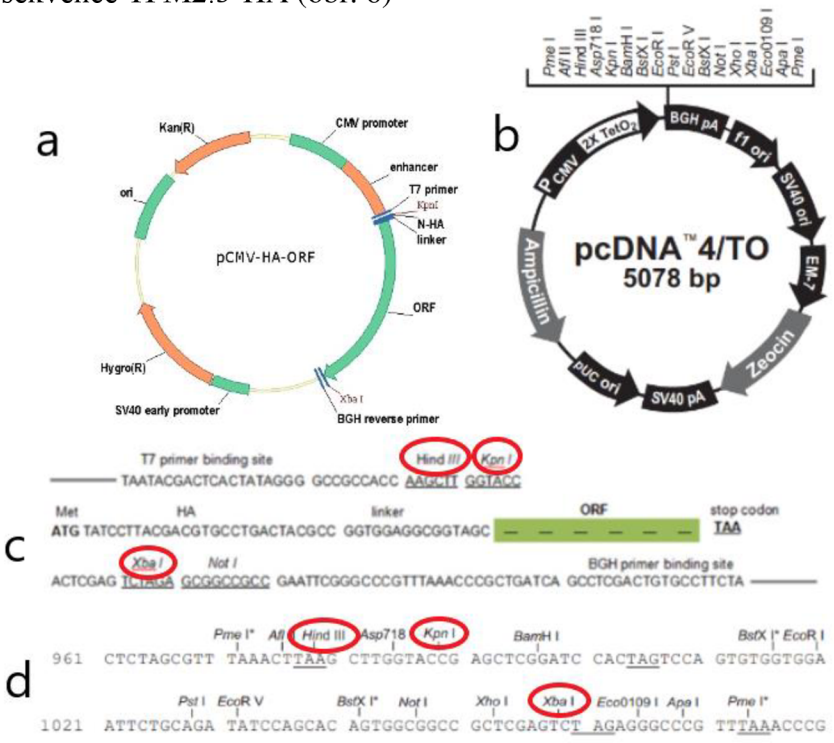
Nejprve byla připravena reakční štěpicí směs smícháním 1 µg plazmidu pCMV3-HA-TPM2.3, 2 µl 10x restrikčního pufru NEBuffer™ 2.1 (New England Biolabs, B7202S), 1 µl restrikčního enzymu a H_2O do celkového objemu 20 µl. Druhá štěpicí směs obsahovala 1 µg plazmidu pCDNA4/TO, 2 µl 10x restrikčního pufru NEBuffer™ 2.1 (New England Biolabs, B7202S), 1 µl restrikčního enzymu a H_2O do celkového objemu 20 µl. Směsi byly inkubovány při 37 °C 3 hodiny. Produkty štěpení byly separovány pomocí agarózové elektroforézy (viz kapitola 3.2.12) a DNA fragmenty byly z gelu izolovány pomocí komerčního kitu Column DNA Lego Kit (Top-Bio). Při izolaci se postupovalo podle návodu výrobce. Následovala ligační reakce (viz kapitola

3.2.13). Ligační směs byla uchována na ledu a poté byla použita k transformaci bakterií *E. coli* (viz kapitola 2.2.10).

Pro konstrukci expresního vektoru pCDNA4/TO-TPM2.3-HA byly využity tři restrikční endonukleázy: HindIII, XbaI a KpnI. Bylo připraveno celkem 5 reakčních štěpicích směsí, které obsahovaly následující enzymy/kombinace enzymů:

1. štěpicí reakce obsahovala 1 µl HindIII a 1 µl XbaI
2. štěpicí reakce obsahovala 1 µl KpnI a 1 µl XbaI
3. štěpicí reakce obsahovala 1 µl HindIII
4. štěpicí reakce obsahovala 1 µl XbaI
5. štěpicí reakce obsahovala 1 µl KpnI

Dvě různé kombinace restrikčních endonukleáz (HindIII/XbaI a KpnI/XbaI) byly použity z toho důvodu, že plazmid s cílovým fragmentem TPM2.3-HA (pCMV3-TPM2.3-HA) obsahuje restrikční místa pro všechny tři enzymy a teoreticky tak bylo možné obě tyto kombinace využít k získání DNA sekvence TPM2.3-HA (obr. 6)



Obrázek 6: Použité plazmidy pCMV3-TPM2.3-HA (a), pCDNA4/TO (b) a části sekvence DNA těchto plazmidů s vyznačenými cílovými místy pro jednotlivé restrikční enzymy. c: DNA sekvence pCMV3, d: DNA sekvence pCDNA4/TO.

3.2.12 Agarózová elektroforéza

Pro přípravu 2% agarózového gelu byl 1 g agarózy rozpuštěno v 50 ml 1 x TAE pufru (40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA). Po rozvaření a ochlazení na cca 55 °C bylo přidáno barvivo GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) v poměru 1:20 000 a agaróza byla nalitá do vaničky s hřebínkem. Po zatuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické aparatury tak, aby jamky byly u záporného pólu a po odstranění hřebínku byla vanička naplněna 1x TAE pufrem. Vzorky byly naneseny po smíchání s nanášecím pufrem (6x Gel Loading Dye Purple – New England Biolabs). Elektroforéza běžela při konstantním napětí 80 V, dokud nebyla bromfenolová modř ve ¾ délky vaničky (přibližně 1 hodinu). DNA byla vizualizovány pomocí přístroje SYNGENE G:BOX Chemi XT. Jako velikostní marker byl použit 2-log DNA ladder (0,1-10,0 kbp) (New England BioLabs, N3200)

3.2.13 Ligační reakce

K ligaci bylo smícháno 1 µl štěpeného plazmidu, 3 µl fragmentu DNA kódujícího TPM2.3-HA a 4,5 µl PCR vody. Směs byla inkubována při 45 °C 5 minut a následně přenesena na 2 minuty na led. Dále byl přidán 1 µl 10x ligačního pufru (T4-DNA Ligase Reaction Buffer - New England Biolabs, B0202S), 0,5 µl T4-DNA ligázy a směs se ligovala přes noc při 16 °C v termocycleru MJ Research PTC-200.

3.2.14 Transformace bakterií teplotním šokem

K 15 µl kompetentních buněk *E. coli* byl přidán 1 µl ligační směsi a tato směs byla ponechána 30 min na ledu. Následně byl proveden teplotní šok při 42 °C po dobu 45 s a směs byla opět umístěna 5 min na ledu. Poté bylo přidáno 600 µl růstového LB média (trypton 10 g/l, kvasinkový extrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l) a bakterie byly inkubovány 60 min při teplotě 37 °C. Dále byla směs centrifugována při 6000 g 1 minutu, byl odpipetován téměř všechen supernatant, pelet byl suspendován, nanesen na agarovou plotnu s ampicilinem (50 µg/ml) a rozetřen pomocí hokejky. Nakonec proběhla inkubace přes noc při 37 °C.

3.2.15 Izolace plazmidové DNA

Jedna bakteriální kolonie *E. Coli* byla pomocí sterilního očka inokulovaná do 5 ml LB média s přídavkem ampicilinu (50 µg/ml) a kultivována přes noc při stálém třepání při teplotě 37 °C.

Plazmidová DNA byla izolována pomocí komerčního kitu E.Z.N.A. ® Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tek) dle doporučeného postupu výrobce. Výsledná koncentrace a čistota byly měřeny na spektrofotometru.

3.2.16 Příprava buněk 143B se zvýšenou expresí TPM2.3

Plazmidová DNA pCDNA4/TO-TPM2.3-HA byla použita k transfekci metodou lipofekce (viz kapitola 3.2.17). Po 24 hodinách od transfekce byla provedena selekce pomocí roztoku zeocinu. K 143B lacZ mCherry buňkám na 10 ml misce bylo přidáno 40 µl zeocinu. Výsledná koncentrace zeocinu byla 0,4mg/ml. Selekce probíhala 14 dní. Přeživší buňky byly expandovány, následně spočítány pomocí přístroje CASY® a naředěny kultivačním médiem na výslednou koncentraci 3 buňky na 1 ml média. Z této zkumavky bylo pipetováno 200 µl směsi do každé jamky na 96-jamkové destičce. Takto byly buňky kultivovány v termostatu při 37 °C. Po přibližně 10 dnech byly vybrány jamky, které obsahují právě jednu kolonii nádorových buněk. Po dostatečném nárůstu byly buňky přeneseny na větší 24-jamkovou a následně i na 6-jamkovou destičku. Identifikace klonů, u nichž došlo ke zvýšení exprese TPM2.3 proběhla pomocí westernového přenosu a detekce primární protilátkou anti-TMP2 a anti-HA-tag. Jako kontroly byly použity parentální buněčná linie 143B mock-transfekované buňky, které byly transfekovány plazmidem pCDNA4/TO.

3.2.17 Transfekce metodou lipofekce

Buňky byly nasazeny v počtu $5x10^5$ na 10 ml kultivační misku a byly kultivovány 24 hodin při 37 °C. Následně bylo smícháno 100 µl média Opti-MEM (Invitrogen), 1,5 µg plazmidové DNA a 1,5 µl činidla Lipofectamine Plus (Invitrogen). Směs byla inkubována 10 minut při pokojové teplotě. V další mikrozkumavce bylo smícháno 100 µl Opti-MEM s 4 µl Lipofectamine LTX Reagent (Invitrogen) a tato směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí doby inkubace byla směs z první zkumavky přenesena do druhé zkumavky a po smíchání proběhla další inkubace 30 minut při pokojové teplotě. Poté bylo 200 µl transfekční směsi nakapáno na misku s buňkami. Buňky byly následně inkubovány při 37°C.

3.2.18 Analýza proliferace (sestrojení růstové křivky)

Buňky byly nasazeny současně na čtyři 6-jamkové destičky v počtu $2x10^4$ buněk (čas = 0) do 2 ml kultivačního média s 10 % sérem. Po 24, 48, 72 a 96 hodinách od nasazení byl zjišťován celkový počet buněk v jamce pomocí přístroje CASY®. Po 48 hodinách od nasazení bylo všem zbývajícím buňkám vyměněno médium.

3.2.19 2D klonogenní analýza

Buňky byly nasazeny v počtu $5x10^2$ na 5 ml misku. Po 3 dnech bylo buňkám vyměněno médium. Po 7 dnech bylo buňkám odsáto médium, bylo přidáno 2 ml 0,05% krystalové violeti a buňky byly barveny po dobu 20 minut za stálého třepání. Následně byla krystalová violeť odstraněna a misky byly omyty pod tekoucí destilovanou vodou. Po vyschnutí (cca 24 hodinách) byly kolonie spočítány.

3.2.20 3D klonogenní analýza (test tumorigenicity)

Nejprve bylo připraveno 2xDMEM médium a sterilní 1,2% a 0,3% agaróza ve vodě. Rozvařená sterilní 1,2% agaróza byla vytemperovaná na 42 °C a poté smíchána s připraveným 2xDMEM médiem v poměru 1:1. Takto byla směs nanesena po 2 ml do jamek na 6-jamkové destičce a ponechána 30 minut do úplného zatuhnutí. Následně byly připraveny buňky. Do 15ml zkumavky bylo přeneseno 1500 buněk do 3 ml média 2xDMEM. 0,3% agaróza, byla rozvařena a vytemperovaná na 42 °C. Vytemperovaná agaróza a médium s buňkami byly smíchány 1:1 a naneseny do jamek tak, aby bylo nasazeno $5x10^2$ buněk na jamku. Takto připravená směs v jamkách byla ponechána zatuhnout 30 minut při pokojové teplotě a následně bylo do každé jamky přidáno 1,5 ml kompletního kultivačního média DMEM s 10 % séra. Médium bylo měněno pravidelně po 3 dnech a kultivace buněk proběhla v inkubátoru při 37°C po celkovou dobu 14 dní. Po 14 dnech bylo do každé jamky přidáno 100 µl 500 µg/ml MTT, proběhla 2hodinová inkubace a následně byly jamky vyfoceny a byly spočítány vytvořené kolonie.

3.2.21 Scratch assay

Kontrolní buňky 143B lacZ mCherry a 143B lacZ mCherry pCDNA4/TO byly nasazeny v počtu $2,6x10^5$ na 24 jamkovou destičku do 0,5 ml kompletního kultivačního média s 10 % sérem. Buněčné klony 143B lacZ mCherry TPM2.3 up C1 a B3 byly vzhledem k pomalejšímu růstu

nasazeny v počtu $3x10^5$ na 24 jamkovou destičku. Buňky byly kultivovány 24 hodin v inkubátoru při 37 °C. Po 24 hodinách byly v jednotlivých jamkách špičkou pipety vytvořeny rýhy. Buňky byly vyfoceny v čase 0 a následně po 3, 6, 9 a 12 hodinách. Po dokončení experimentu byly velikost a podíl rýhy vyhodnoceny pomocí programu ImageJ.JS.

3.2.22 Testování migrace metodou xCELLigence

Buňky byly nasazeny v počtu $1x10^6$ a kultivovány v médiu DMEM s 10 % FBS při 37 °C po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách bylo médium vyměněno za DMEM bez séra a k buňkám byl přidán mitomycin C v koncentraci 0,001 mg/ml. Následovala kultivace při 37 °C po dobu 3 hodin. Poté byly buňky odlepeny ode dna kultivační misky s pomocí EDTA v 1xPBS, převedeny do buněčné suspenze a spočítány. Dále byly buňky naředěny do výsledné koncentrace $7x10^5$/ml. Do jamek spodní destičky bylo pipetováno 175 µl média DMEM s 10 % sérem a do jamek horní destičky byly nasazeny buňky v počtu $7x10^4$ v objemu 100 µl. Měření migrace probíhalo po dobu 5 hodin.

3.2.23 Statistické zpracování dat

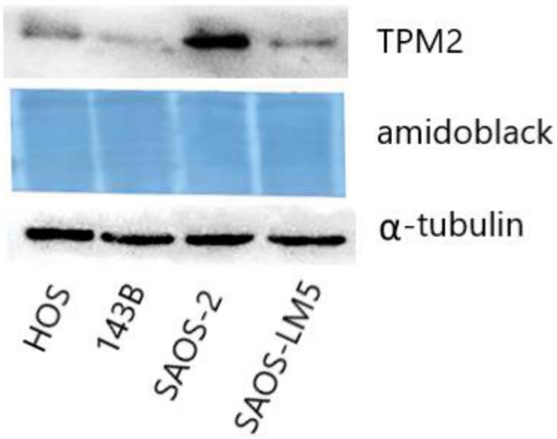
Ke statistické analýze získaných dat byl použit program GraphPad Prism 8. Pro testování rovnosti dvou středních hodnot (průměrů) byl použit nepárový Mann-Whitney test. Za statisticky významný byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

4 Výsledky

4.1 Stanovení hladiny TPM2 u osteosarkomových buněčných linií

4.1.1 Stanovení hladiny TPM2 na úrovni proteinů

Nejprve byla stanovena hladina TPM2 na úrovni proteinů u čtyř lidských osteosarkomových buněčných linií (parentální HOS, SAOS-2 s nízkou metastatickou aktivitou a od nich odvozených vysoce metastazujících linií 143B a SAOS-LM5) pomocí metody westernového přenosu (obr. 7). Při porovnání množství TPM2 v parentální linii ve srovnání s metastatickou linií bylo prokázáno, že v parentálních liniích je vyšší množství TPM2. Výraznější rozdíl byl pozorován u dvojice SAOS-LM5 a SAOS-2.

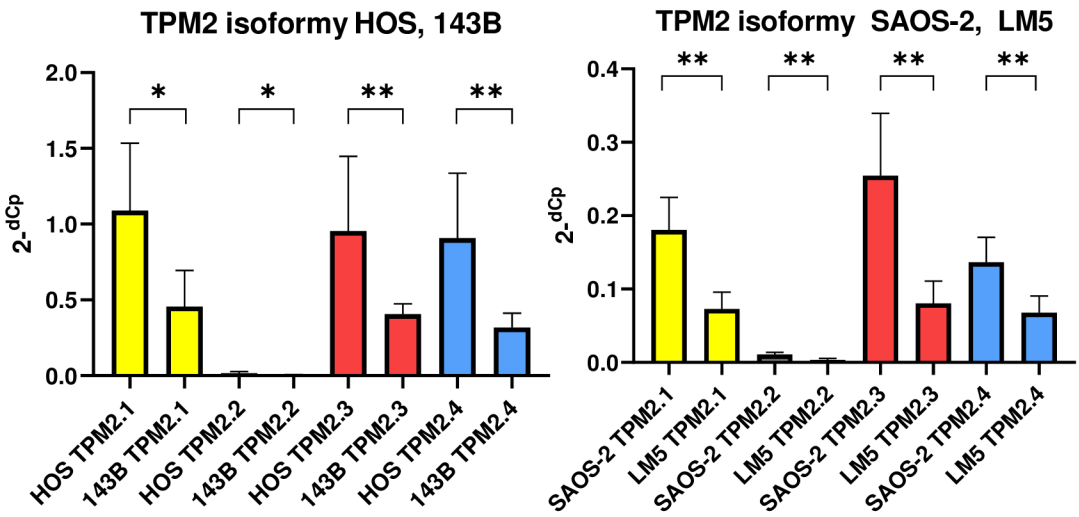


Obrázek 7: Celková hladina TPM2 u parentálních (HOS, SAOS-2) a metastatických (143B, SAOS-LM5) osteosarkomových buněčných linií byla detekována pomocí westernového přenosu. Pro kontrolu nanesení stejného množství proteinů v jednotlivých vzorcích byla provedena detekce α-tubulinu a nespecifické barvení proteinů 0,2% roztokem amidové černi.

4.1.2 Stanovení hladiny jednotlivých izoforem TPM2 na úrovni RNA

Ke stanovení hladiny TPM2 na úrovni RNA byla využita metoda kvantitativní PCR v reálném čase. Z výsledků vyplývá, že hladina mRNA všech izoforem TPM2 je nižší u metastatických buněčných linií 143B a SAOS-LM5 v porovnání s parentálními buněčnými liniemi HOS a

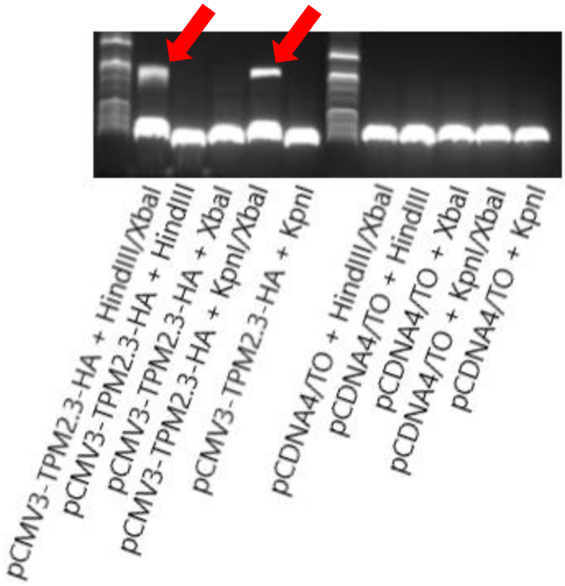
SAOS-2. Dále lze pozorovat, že izoforma TPM2.2 se v těchto buněčných liniích téměř nevyskytuje, zatímco izoformy TPM2.1 a TPM2.3 jsou nejvíce abundantní (obr. 8).



Obrázek 8: Relativní množství mRNA izoforem genu TPM2 v parentálních (HOS, SAOS-2) a metastatických (143B, LM5) osteosarkomových buněčných liniích detekovaná pomocí metody kvantitativní PCR v reálném čase s využitím specifických primerů. Data jsou průměrem z pěti nezávislých opakování. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky. *, **: statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p<0,05$, $p<0,01$. Hodnoceno Mann-Whitneyho testem.

4.2 Příprava expresního vektoru

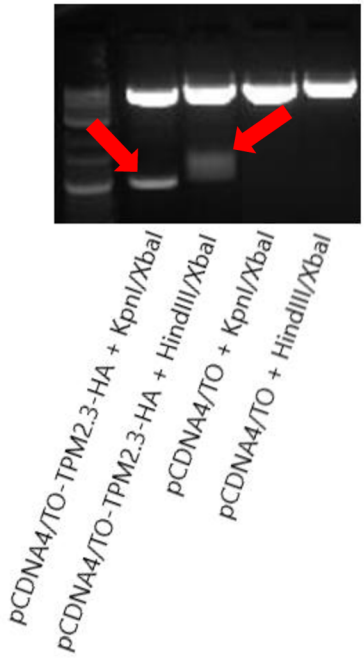
Zvýšení hladiny exprese izoformy genu TPM2.3 u buněčné linie 143B bylo provedeno pomocí štěpení plazmidů pCMV3-HA-TPM2 a pCDNA4/TO (obr. 9). Štěpení proběhlo 3 různými restričními enzymy – HindIII, KpnI a XbaI. Použití jednoho enzymu v restrikční směsi bylo využito jako kontrola, že je daný enzym funkční, zatímco štěpení dvěma restrikčními enzymy sloužilo k vyštěpení požadovaného fragmentu. Pro vyštěpení celého fragmentu TPM2.3-HA byly využity dvě kombinace enzymů (HindIII/XbaI a KpnI/XbaI). Po linearizaci plazmidu pCDNA4/TO a získání požadovaného úseku TPM2.3-HA došlo k jejich spojení za vzniku expresního vektoru pCDNA4/TO-TPM2-HA.



Obrázek 9: Snímek z agarózové elektroforézy zobrazující výsledek štěpicích reakcí plazmidů pCDNA4/TO a pCMV3-TPM2.3-HA restrikčními enzymy HindIII, XbaI, KpnI. Šipkami jsou označeny vyštěpené fragmenty DNA obsahující sekvenci genu TPM2.3-HA.

Úspěšná konstrukce expresního vektoru pCDNA4/TO-TPM2.3-HA byla ověřena štěpením výsledného vektoru (obr. 10) a následně také sekvenací.

Na základě výsledků štěpení finálního vektoru a kontrolního plazmidu a rozdělení úseků DNA pomocí agarózové elektroforézy byl pro přípravu buněk s nadměrnou expresí vybrán vektor pCDNA4/TO-TPM2.3-HA připravený štěpením restrikčními enzymy KpnI a XbaI. Důvodem zvolení této kombinace enzymů namísto kombinace HindIII/XbaI bylo vyštěpení neostrého a menšího fragmentu DNA při použité těchto enzymů v porovnání s kombinací KpnI/XbaI.



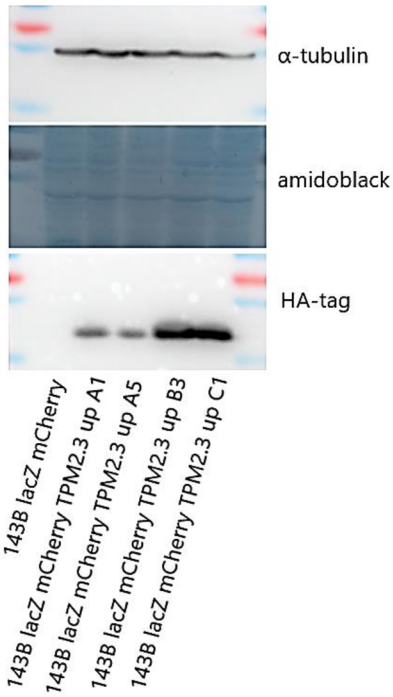
Obrázek 10: Snímek z agarózové elektroforézy zobrazující výsledek štěpicích reakcí výsledného vektoru pCDNA4/TO-TPM2.3-HA a kontrolního plazmidu pCDNA4/TO restrikčními enzymy HindIII, XbaI, KpnI. Šipkami jsou označeny vyštěpené fragmenty DNA obsahující sekvenci genu TPM2.3-HA.

4.3 Příprava buněk s nadměrnou expresí genu TPM2.3

Buňky 143B byly metodou lipofekce transfekovány vytvořeným expresním vektorem pCDNA4/TO-TPM2.3-HA. Následně proběhla selekce Zeocinem a metodou limitního ředění byly vytvořeny klony pocházející z jediné buňky.

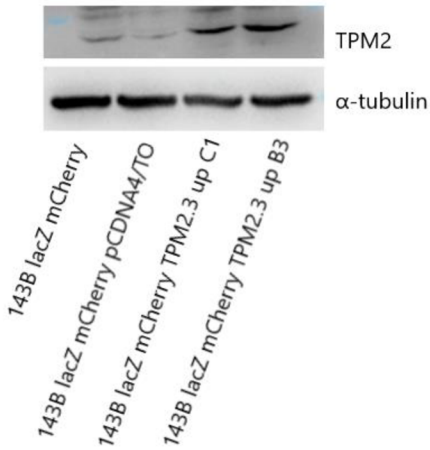
U všech buněčných klonů byla detekována hladina TPM2 pomocí westernového přenosu. Hladina TPM2 byla porovnávána vůči kontrolním buňkám 143B lacZ mCherry. Pro ověření nadměrné exprese TPM2 byla nejprve použita specifická monoklonální protilátka proti Hemagglutininovému tagu (obr. 11).

Celkem bylo získáno 18 klonů se zvýšenou expresí TPM2.3 a pro další experimenty byly použity dva nezávislé klony B3 a C1



Obrázek 11: Ověření zvýšení exprese TPM2.3 na úrovni proteinů. Pro detekci TPM2.3 byla použita specifická protilátka anti-HA-tag. Pro kontrolu nanesení stejného množství proteinů v jednotlivých vzorcích byla provedena detekce α-tubulinu a nespecifické barvení proteinů 0,2% roztokem amidové černi.

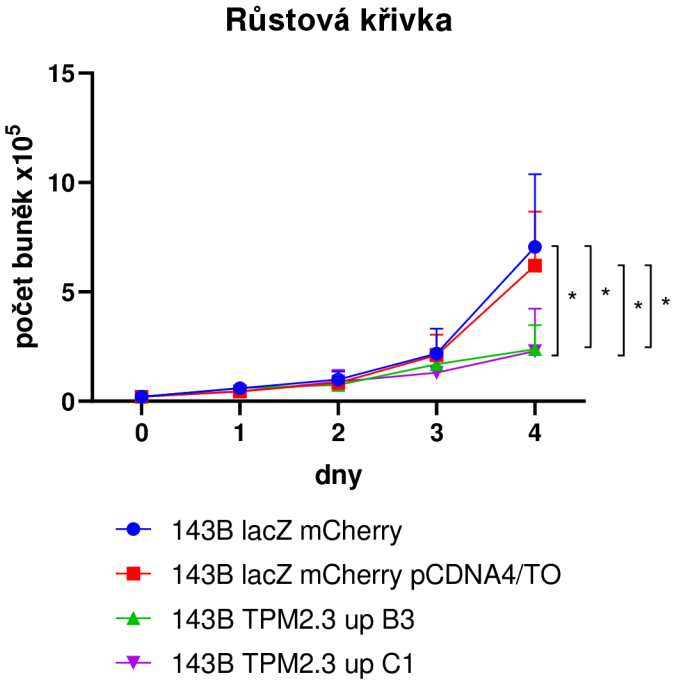
Následně byla pro vizualizaci TPM2 v našich buňkách použita protilátka anti-TPM2 (PA5-91925) (obr. 12).



Obrázek 12: Ověření zvýšení exprese TPM2.3 na úrovni proteinů. Pro detekci TPM2.3 byla použita specifická protilátka anti-TPM2 (PA5-91925). Pro kontrolu nanesení stejného množství proteinů v jednotlivých vzorcích byla provedena detekce α-tubulinu.

4.4 Vliv nadměrné exprese TPM2.3 na proliferaci buněk 143B

Všechny buňky byly nasazeny v počtu $2x10^4$ na 6jamkové destičky do kompletního kultivačního média s 10% FBS (čas = 0). Následně byly buňky spočítány pomocí přístroje CASY® po 24, 48, 72 a 96 hodinách. Celkem byly provedeny 4 nezávislé opakování, v každém opakování byly buňky nasazeny v duplikátu. Nakonec proběhlo statistické vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými klony a kontrolními buňkami (obr. 13). Klony zvýšeně exprimující TPM2.3 rostly pomaleji než kontrolní wt a mock-transfekované buňky. Rozdíl mezi rychlostí proliferace klonů a kontrol je statisticky významný.

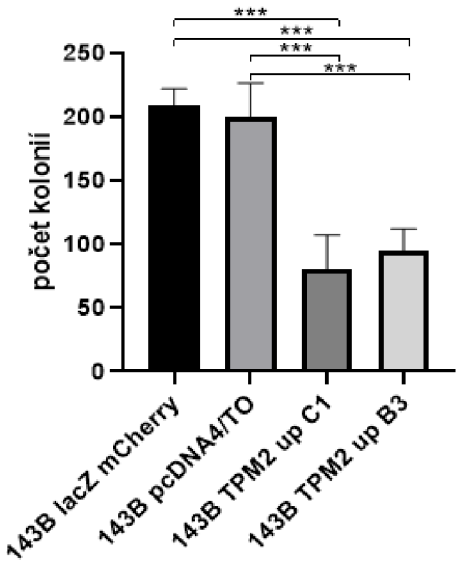


Obrázek 13: Zvýšení exprese TPM2.3 snižuje rychlost proliferace buněk 143B. Data jsou průměrem ze čtyř nezávislých opakování. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky. *: statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p<0,05$. Hodnoceno Mann-Whitneyho testem.

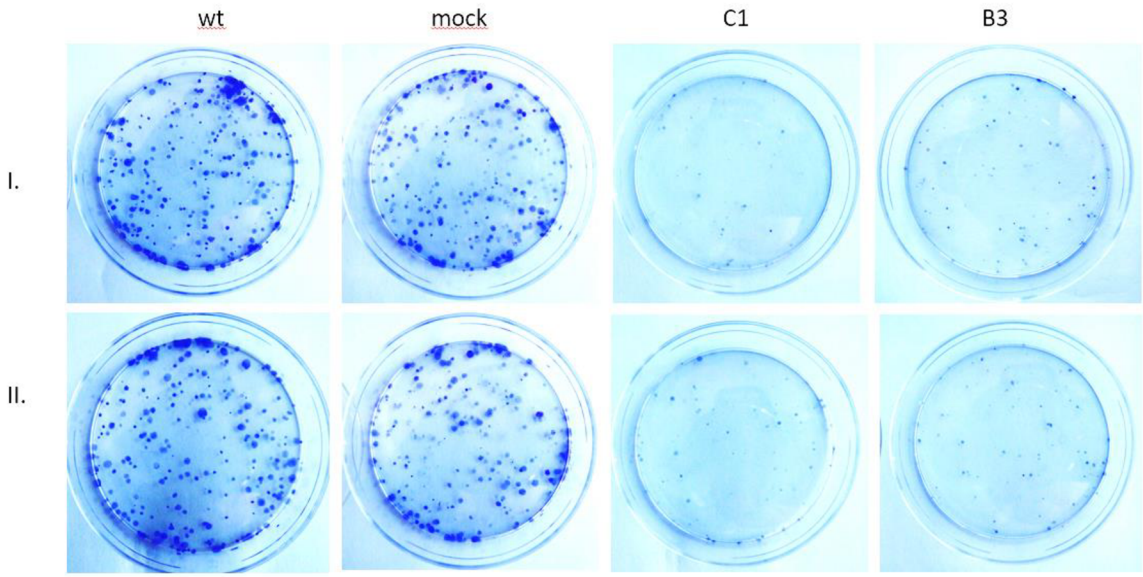
4.5 2D klonogenní analýza u TPM2 up klonů

Během klonogenní analýzy sledujeme, zda a v jaké míře se z jednotlivých buněk vytváří buněčné kolonie. Buňky byly nasazeny v počtu $5x10^2$ buněk na 5 ml misku do kompletního kultivačního média s 10% FBS. Po 7 dnech byly buňky fixovány, obarveny krystalovou violetí a buněčné kolonie byly spočítány (obr.15). Celkem byly provedeny 4 nezávislé opakování, v každém opakování byly buňky nasazeny v duplikátu. Výsledky ukazují, že klony zvýšeně exprimující

TPM2.3 mají v 2D prostředí statisticky významně sníženou klonogenní kapacitu oproti buňkám kontrolním (obr. 14 a 15).



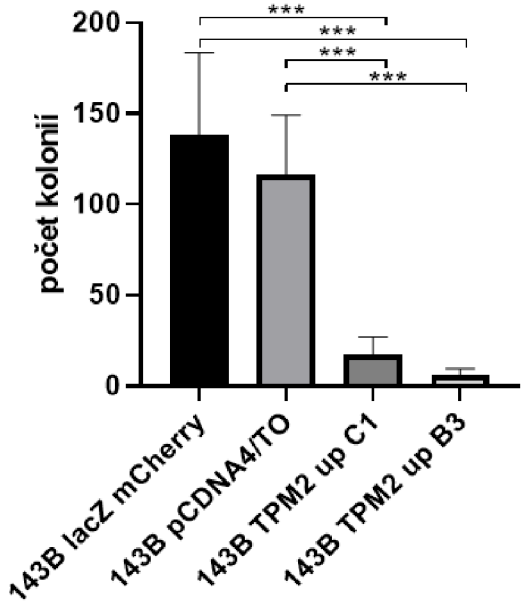
Obrázek 14: Zvýšení exprese TPM2.3 snižuje schopnost buněk 143B vytvářet kolonie v 2D prostředí. Výsledný počet kolonií je průměrem ze čtyř nezávislých opakování. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky. ***: statisticky významný rozdíl na hladině významnosti p<0,001. Hodnoceno Mann-Whitneyho testem.



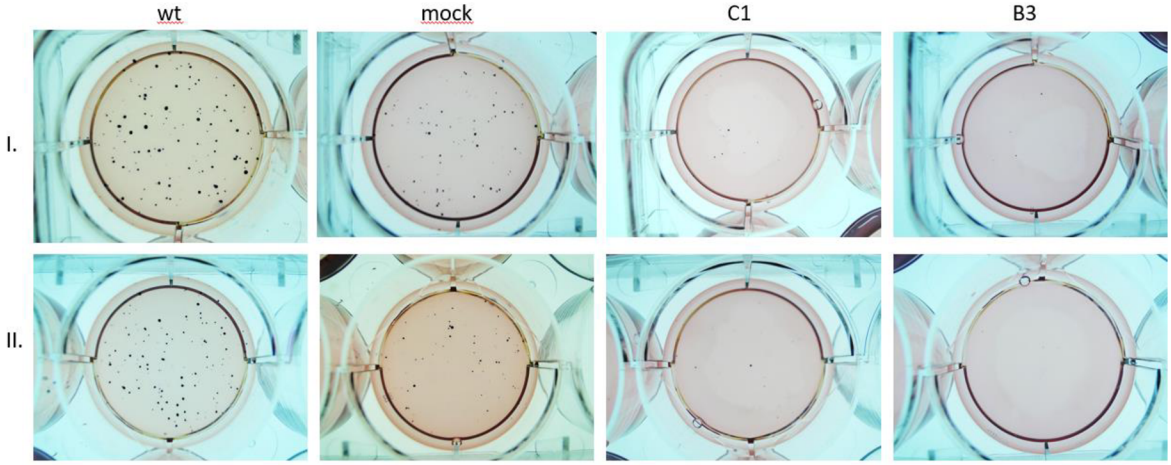
Obrázek 15: Reprezentativní příklad výsledku 2D klonogenní analýzy. Foceno po 7 dnech kultivace a následné fixaci a obarvení kolonií krystalovou violetí.

4.6 3D klonogenní analýza (test tumorigenicity)

Schopnost buněk tvořit kolonie bez přichycení k substrátu byla otestovaná pomocí 3D klonogenní analýzy. Buňky byly nasazeny v počtu $5x10^2$ buněk na 6jamkovou destičku do média obsahujícího 0,15 % agarózy. Buňky byly kultivovány při 37 °C po dobu 14 dní a kompletní kultivační médium s 10 % FBS bylo měněno vždy po 3 dnech. Po 14 dnech byly kolonie obarveny 500 µg/ml MTT a následně po dvou hodinách spočítány (obr. 17). Celkem byly provedeny 4 nezávislé opakování, v každém opakování byly buňky nasazeny v duplikátu. Z výsledků lze odvodit, že zvýšená hladina TPM2 ovlivňuje schopnost vytvářet kolonie i v prostředí bez přichycení k pevnému podkladu (obr. 16 a 17).



Obrázek 16: Zvýšení exprese TPM2.3 snižuje schopnost buněk 143B vytvářet kolonie v 3D prostředí. Výsledný počet kolonií je průměrem ze čtyř nezávislých opakování. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky. ***: statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p<0,001$. Hodnoceno Mann-Whitneyho testem



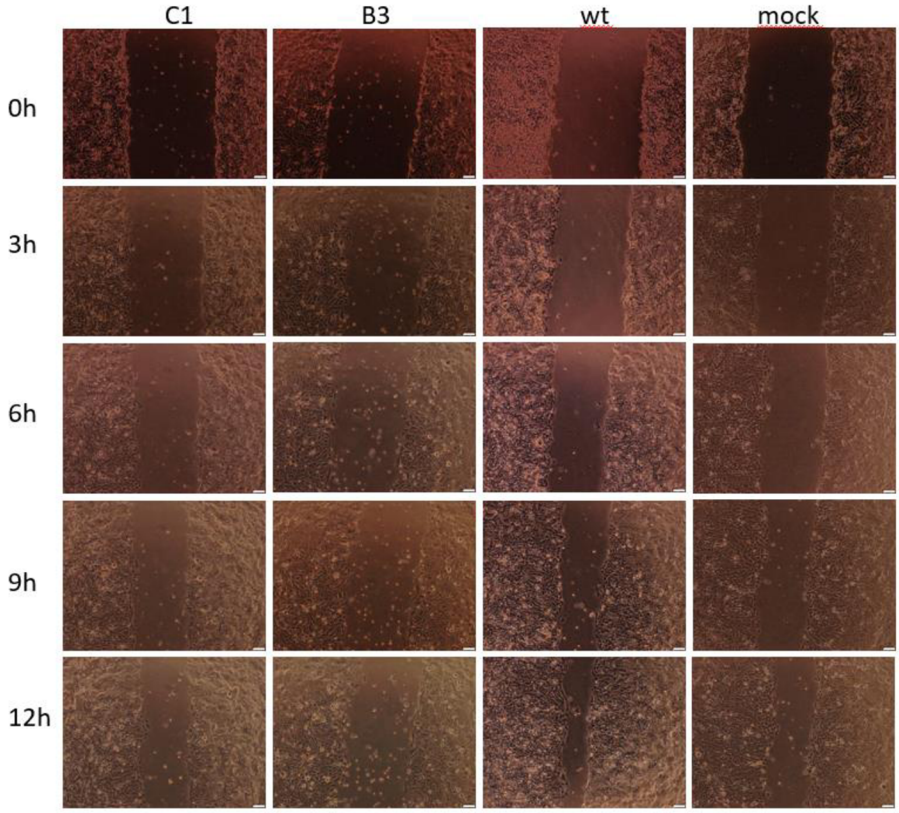
Obrázek 17: Reprezentativní příklad výsledku 3D klonogenní analýzy. Foceno po 14 dnech kultivace a následném obarvení kolonií pomocí MTT.

4.7 Vliv nadměrné exprese TPM2.3 na migraci buněk 143B

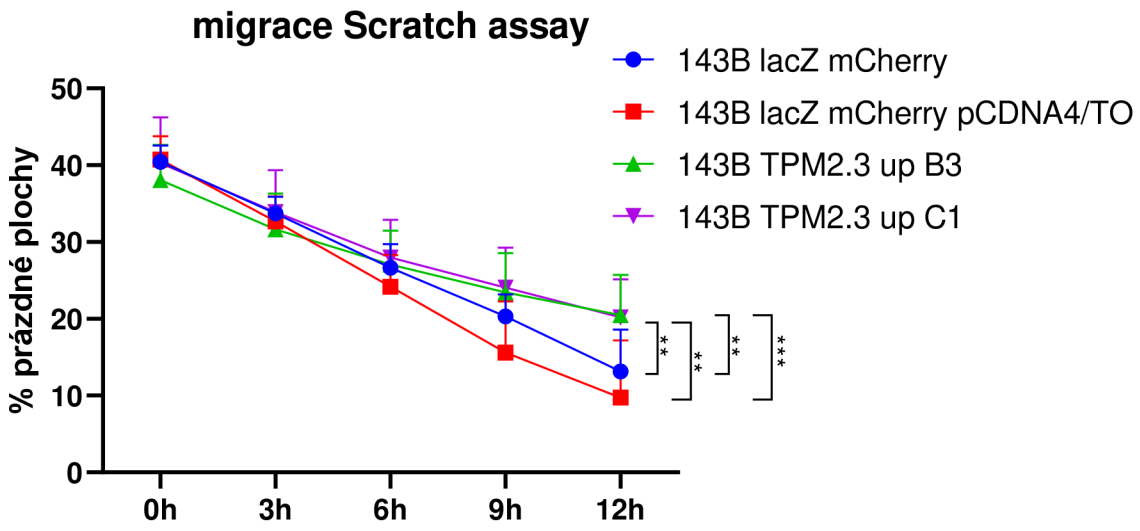
4.7.1 Sledování migrace pomocí Scratch assay

Rychlost migrace byla testována pomocí metody scratch assay. Buňky byly nasazeny v počtu $3x10^5$ v případě TPM2 up klonů C1 a B3 a v počtu $2,6x10^5$ v případě kontrolních buněk 143B lacZ mCherry a 143B lacZ mCherry pCDNA4/TO na 24-jamkovou destičku do 0,5 ml kompletního kultivačního média. Rozdílný počet nasazených buněk byl z důvodu pomalejší proliferace TPM2.3 up klonů. Pro dosažení 100% konfluence buněk 24 hodin po nasazení bylo nutné nasadit větší množství těchto klonů. Po 24 hodinách kultivace při 37 °C byly v jednotlivých jamkách špičkou pipety vytvořeny rýhy. Buňky byly vyfoceny v čase 0 a následně byly foceny pravidelně po 3 hodinách po dobu 12 hodin (obr. 18). Po dokončení experimentu byly velikost a podíl rýhy vyhodnoceny pomocí programu ImageJ.JS. Celkem byla hodnocena migrace u 12 nezávislých jamek.

Pomocí statistického vyhodnocení bylo prokázáno, že buněčné klony 143B TPM2.3 up B3 a C1 migrují pomaleji (tzn. rýha se zmenšuje pomaleji v čase) oproti kontrolním 143B mock-transfekovaným i 143B wilde type buňkám (obr. 19).



Obrázek 18: Reprezentativní fotky průběhu migrace.

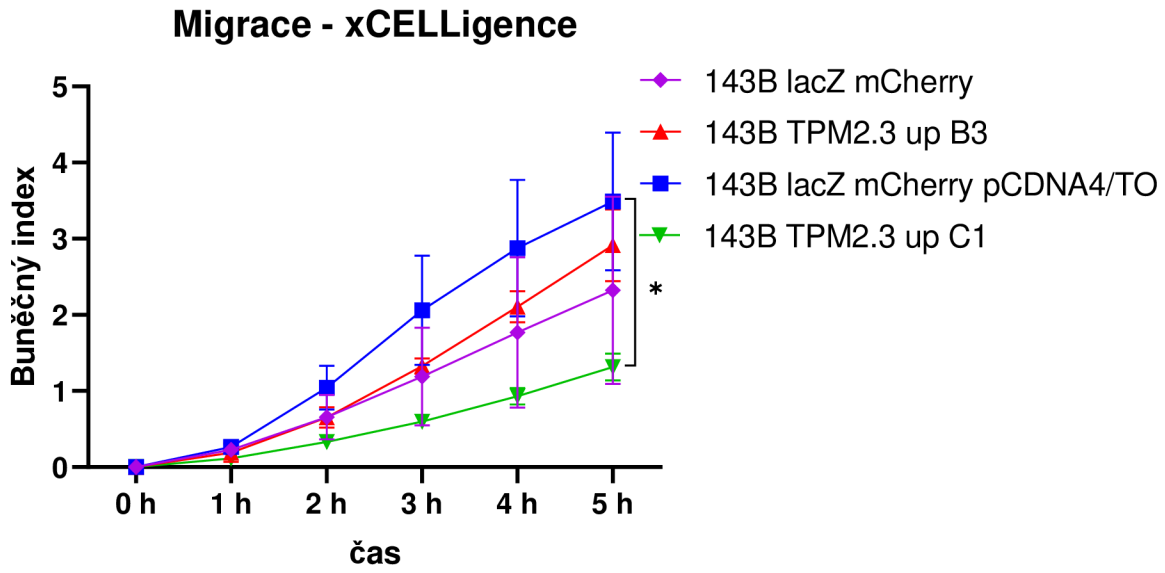


Obrázek 19: Zvýšení exprese izoformy TPM2.3 inhibuje migraci buněk 143B. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky. U každého vzorku bylo hodnoceno 12 nezávislých jamek. **, ***: statisticky významný rozdíl na hladině významnosti p<0,01; p<0,0001. Hodnoceno Mann-Whitneyho testem

4.7.2 Sledování migrace pomocí přístroje xCELLigence

Před začátkem experimentu bylo nutné inkubovat buňky v DMEM médiu bez séra s přidáním mitomycinu C v koncentraci 0,001 mg/ml po dobu 3 hodin. Do jamek destičky bylo nasazeno $7x10^4$ buněk a migrace byla sledována 5 hodin.

Po 5 hodinách lze pozorovat statisticky významný rozdíl v naměřeném buněčném indexu a tedy i migraci mezi klonem s vyšší expresí TPM2.3 C1 a mock-transfekovanými buňkami (obr. 20). Klon B3 migruje také pomaleji než mock-transfekované buňky, ale rozdíl nebyl statisticky významný. Buněčný index vyjadřuje schopnost buněk migrovat. Tedy čím vyšší buněčný index, tím vyšší migrace buněk. Vzhledem k tomu, že jsem doposud provedla pouze 3 opakování tohoto experimentu, považuji výsledky za preliminární data a v budoucnosti budou provedena další opakování.



Obrázek 20: Zvýšení exprese izoformy TPM2.3 způsobuje pomalejší migraci buněk 143B oproti mock-transfekovaným buňkám. Výsledný buněčný index v čase je průměrem ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky. *: statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p<0,05$. Vzhledem k nízkému počtu opakování hodnoceno t- testem.

5 Diskuze

Osteosarkom je nejmalignější onemocnění kostí a jeho léčba už několik desítek let probíhá pomocí chemoterapeutik, která vykazují řadu nežádoucích účinků a jejichž účinnosti proti metastazující formě nemoci není dostatečná. I proto má výzkum osteosarkomu *in vitro* pomocí lidských osteosarkomových buněčných linií smysl pro hledání nejen prognostických a diagnostických markerů, ale také možné alternativní cílené léčby, která by mohla doplnit nebo dokonce nahradit stávající léčbu.

Tropomyosin reguluje změny v dynamice aktinových filament během buněčné migrace, morfogeneze a cytoplazmatické migrace. Umlčení exprese TPM2 bylo pozorováno u více typů nádoru (Meng *et al.*, 2019). U prsního karcinomu je snížená hladina TPM2.1 indukovaná hypoxií spojená s horší prognózou onemocnění, tvorbou metastází v lymfatických uzlinách, chemorezistencí na paclitaxel a kratším celkovým přežitím (Zhang *et al.*, 2018). Hladina TPM2 je výrazné snížená i v tkáních kolorektálního adenomu a kolorektálního karcinomu (Luo *et al.*, 2009) nebo u spinocelulárního karcinomu (Jazii *et al.*, 2006), glioblastomu (Mitchell *et al.*, 2019) a dalších.

Během tvorby metastáz se nádorové buňky oddělí od původní nádorové tkáně a migrují do oblasti nového cílového orgánu. Protože jsou tyto procesy neodmyslitelně spojené s buněčným pohybem, a tedy i buněčným cytoskeletem, je možné, že aktin-asociovaný protein TPM2 je zapojený v procesu tvorby nádoru a metastáz (Meng *et al.*, 2019). A právě metastáze jsou nejčastější příčinou úmrtí pacientů s nádorovými onemocněními, včetně pacientů s osteosarkomem.

Jak bylo zmíněné výše (kapitola 1.2), gen TPM2 je po translaci alternativně sestřižen a tvoří 4 izoformy lišící se exony 6 a 9 – TPM2.1, TPM2.2, TPM2.3 a TPM2.4.

Zatímco význam tropomyosinové izoformy TPM2.1 v progresi různých typů nádorových onemocnění byl popsán již v několika odborných článcích, zatím neexistuje studie zabývající se konkrétně izoformou TPM2.3. Také z tohoto důvodu jsme se rozhodli zaměřit právě na izoformu TPM2.3, která je v osteosarkomových buňkách vysoce exprimována, a charakterizovat blíže fenotyp těchto buněk po zvýšení hladiny exprese této izoformy.

5.1 Porovnání hladiny TPM2 u čtyř osteosarkomových linií

V této diplomové práci byla nejprve měřena hladina exprese TPM2 na úrovni proteinů, a to pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy a westernového přenosu. Byla porovnávána hladina TPM2 u čtyř buněčných linií, z nichž dvě byly parentální (HOS, SAOS-2) a dvě metastatické (143B, SAOS-LM5). Z výsledků je patrné, že u každé dvojice se nižší hladina TPM2 vyskytuje u metastatické buněčné linie. Tyto výsledky korespondují s celkovou hladinou proteinu, tedy s expresí všech izoforem, protože neexistuje protilátka specifická pro konkrétní izoformu TPM2.

Exprese TPM2 na úrovni RNA byla měřena pomocí kvantitativní PCR v reálném čase. Zde už bylo možné analyzovat množství každé izoformy zvlášť. Z výsledků je patrné, že v testovaných osteosarkomových buněčných liniích se prakticky téměř nevyskytuje RNA izoforma TPM2.2, zatímco izoformy TPM2.1 a TPM2.3 jsou vysoce exprimované. Také lze pozorovat, že stejně jako u hladiny celkového TPM2 na úrovni proteinu se snižuje i množství RNA každé izoformy u metastatických buněčných linií 143B respektive SAOS-LM5.

Tyto výsledky tedy ukazují, že deregulace hladiny TPM2.3 pravděpodobně přispívá rovněž k poklesu celkové hladiny TPM2 pozorované metodou westernového přenosu.

5.2 Zvýšení exprese TPM2.3 u metastatické osteosarkomové linie 143B

Pro zvýšení exprese TPM2.3 a následující *in vitro* experimenty byla vybrána buněčná linie 143B. Tato buněčná linie je odvozená od osteosarkomové buněčné linie HOS. Vznikla transformací HOS buněk onkogenem *KRAS* (Hensler *et al.*, 1994) a je charakteristická velkou agresivitou a vysokým metastatickým potenciálem.

5.3 Snížená proliferace buněk s vyšší expresí TPM2.3

Jednou z hlavních charakteristik transformovaných buněk je jejich zvýšená rychlost proliferace mimo jiné i z důvodu schopnosti tvorby vlastních růstových signálů, a tedy jejich nezávislosti na růstových faktorech tvořící se v mikroprostředí normální zdravé tkáně (Hanahan *et* Weinberg, 2000). Rychlost proliferace zajímá autory v mnoha publikacích zabývajících se vlastnostmi nádorů a nádorových buněk. Vliv zvýšené a snížené exprese TPM2 na proliferaci studovali Duan *et al.* u plicního adenokarcinomu. Z výsledků jejich studie vyplývá, že zvýšená exprese TPM2 zpomaluje

buněčný růst a naopak, snížená exprese TPM2, které bylo dosaženo za pomocí shRNA, urychluje proliferaci buněk plicního adenokarcinomu (Duan *et al.*, 2022).

Stejného výsledku dosáhli také Cui *et al.*, jejichž studie prokázala, že při vyšší expresi TPM2.2 buňky kolorektálního karcinomu proliferují pomaleji než buňky s nižší expresí TPM2.2 (Cui *et al.*, 2016).

K výrazně snížené proliferaci došlo také po zvýšení exprese TPM2.1 v buňkách rakoviny prostaty (Wu *et al*, 2023).

Náš experiment tento trend potvrdil i u osteosarkomové buněčné linie 143B v případě izoformy TPM2.3. Souhrnně lze tedy uzavřít, že zvýšená exprese izoforem genu TPM2 snižuje rychlost proliferace u řady různých nádorových buněčných linií. Lze tedy uzavřít, že rozdílné izoformy TPM2 ovlivňují rychlost proliferace metastatických osteosarkomových buněk a že zvýšení exprese TPM2.3 potlačuje růst osteosarkomové buněčné linie 143B.

5.4 Snížená klonogenní kapacita buněk s vyšší expresí TPM2.3

Pomocí klonogenní analýzy lze měřit schopnost jediné buňky vytvořit buněčnou kolonii, která je standardně definována jako alespoň 50 buněk vytvořených dělením původně z jedné buňky (Franken *et al.*, 2006). Schopnost vytvořit kolonii je důležitý fenotypový znak vyžadující určitý čas a několik buněčných dělení. Pro vývoj nádoru je schopnost tvořit kolonie z jedné buňky klíčová například při tvorbě metastáz.

Klonogenní analýza je významný široce používaný experimentální přístup stále využívaný jako tzv. zlatý standard pro testování například vlivu léčiv nebo genomových úprav na proliferativní vlastnosti buněk *in vitro*. Schopnost tvořit kolonie V 2D prostředí na kultivační misce v klasickém kultivačním médiu byla analyzována u vytvořených klonů nadměrně exprimujících TPM2.3. Po týdenní kultivaci jsme u těchto klonů pozorovali sníženou klonogenní kapacitu.

Další vlastností nádorových buněk je schopnost růst na měkkých i tuhých podkladech. Tato vlastnost jim umožňuje osidlovat odlišné tkáně. U mnoha typů nádorových buněk, které jsou schopny růst na měkkém podkladu byla pozorována velmi nízká hladina TPM2.1. Upravení hladiny TPM2.1 způsobilo, že buňky ztratily schopnost růstu na měkkém podkladu. Wolfenson *et al.* (2016) otestovali vliv TPM2.1 na růst bez pevné matrix pomocí testu na měkkém agaru.

Zatímco prsní epitelové buňky MCF-10A bez změny hladiny TPM2.1 nepřežily dvoutýdenní kultivaci, jejich deriváty s vypnutou expresí TPM2.1 proliferovaly a tvořily kolonie. Tímto bylo potvrzeno, že TPM2.1 je nutný pro správné snímání tuhosti podkladu, a tedy potlačuje růst na měkkých matrix (Wolfenson *et al.*, 2016).

Schopnost růst v prostředí bez ukotvení k membráně byla v mé práci otestována pomocí testu tumorigenicity. Buňky byly nasazeny do 3D prostředí tvořeném dvěma různými procentuálními koncentracemi měkkého agaru. Po 14-denní kultivaci bylo možné sledovat nižší klonogenní kapacitu klonů u buněk se zvýšenou expresí TPM2.3 v porovnání s kontrolními buňkami. Bylo tedy potvrzeno, že zvýšení exprese TPM2.3 přispívá nejen k snížené klonogenní kapacitě, ale také snížená schopnost buněk růst bez přichycení k pevnému podkladu.

5.5 Snížená rychlost migrace buněk s vyšší expresí TPM2.3

Buněčná migrace je nedílnou součástí metastázování a je potřebná prakticky v každém kroku metastatické kaskády (Poulinot *et al.*, 2013). Je definovaná jako řízený pohyb buněk po substrátu, například po bazální membráně, extracelulární matrix (ECM) nebo plastové desce (Kramer *et al.*, 2013). Protože buněčná migrace je závislá na dynamické polymeraci/depolymeraci aktinu (Schaks *et al.*, 2019) a dynamiku aktinu ovlivňuje řada aktin-asociovaných proteinů, mezi nimi i TPM2, je relevantní studovat rychlost buněčné migrace u buněk s vyšší hladinou TPM2.

Z odborné literatury je zřejmé, že změna exprese TPM2 ovlivňuje schopnost migrace buněk. Snížení hladiny TPM2 vedlo k rychlejší migraci buněk plicního adenokarcinomu (Duan *et al.*, 2022) Naopak po zvýšení exprese TPM2.2 bylo možné pozorovat sníženou rychlost migrace u buněk kolorektálního karcinomu (Cui *et al.*, 2016) nebo v případě TPM2.1 u buněk rakoviny prostaty, kde byla zpomalená migrace a invazivita způsobena pravděpodobně prostřednictvím kompetice TPM2 s transkripčním faktorem YAP1 o vazbu s proteinem PDLIM7 (Wu *et al.*, 2023).

Já jsem pro měření rychlosti migrace využila metodu Scratch assay nebo také Wound healing assay. Jedná se o metodu, která je široce využívaná ke studiu migrace buněk na 2D povrchu. Pomocí špičky pipety se na kultivační misce obsahující konfluentní vrstvu buněk vytvoří rýha a pomocí mikroskopu lze sledovat migraci buněk z intaktní zóny směrem do místa rýhy. Buněčný pohyb lze pak spočítat měřením zmenšování plochy rýhy v různých časových intervalech, dokud se rýha „nezahojí“. Výhodou této metody je její jednoduché provedení, snadné vyhodnocení a

analýza a samozřejmě nízká cena. Mezi nevýhody patří častokrát nestejná velikost rýhy, nedostatčená standardizace metody mezi laboratořemi a nemožnost využití pro neadherentní buňky nebo chemotaxi (Kramer *et al.*, 2013).

Z pozorování migrace buněk se zvýšenou hladinou TPM2.3 pomocí Scratch eseje je možné vyvodit, že zvýšená hladina TPM2.3 u 143B potlačuje jejich migraci. Na obrázku 18 lze vidět jasné rozdíly v rychlosti migrace klonů 143B TPM2.3 up B3 a C1 oproti kontrolním buňkám. Tento trend byl potvrzen i po statistickém vyhodnocení dat.

V kapitole Výsledky je uvedeno, že kontrolní wilde type a mock-transfekované buňky byly nasazeny v počtu $2{,}6 \times 10^5$, zatímco klony s výšenou expresí TPM2.3 byly nasazeny v počtu $3{,}0 \times 10^5$. Důvodem rozdílného počtu nasazených buněk byla nutnost dosažení 100% konfluence, ke které došlo až po optimalizaci a takovémto počtu nasazených buněk (pravděpodobně z důvodu pomalejší proliferace TPM2.3 up klonů).

Tento experiment bude zopakován s použitím mitomycinu C, který zastavuje buněčnou proliferaci a umožňuje tak sledovat migraci buněk bez možného ovlivnění výsledků pomalejší proliferací buněk zvýšeně exprimující TPM2.3.

Další metoda, která umožňuje sledovat rychlost migrace buněk je s využitím přístroje xCELLigence. Jedná se o technologii, která je založená na principu Boydenovy komůrky, umožňující sledování buněčného pohybu v reálném čase. Buněčný analyzátor v reálném čase zahrnuje analytické a kontrolní jednotky a speciální jednorázovou kultivační desku zapojenou do elektrického obvodu. Mikroelektrody s napětím 22 mV pokrývají 80 % povrchu destičky a umožňují tak kontinuální monitorování buněk. Nasazení buněk do jamek vede ke zvýšené impedanci elektrického proudu, podle toho, jak buňky adherují na povrch mikroelektrod a zabraňují tak elektrickému proudění. Tento systém umožňuje sledování buněčné migrace, invazivity, proliferace, adheze a efektu chemotaxe a cytotoxicity v reálném čase (Bouchalová *et* Bouchal, 2022).

Výsledky pozorování migrace v reálném čase pomocí přístroje xCELLigence zčásti potvrzují to, co bylo pozorováno pomocí metody scratch assay, a tedy, že buněčné klony s vyšší expresí TPM2.3 migrují pomaleji než kontrolní mock-transfekované buňky. Ovšem rychlost migrace kontrolních 143B wilde type buněk byla výrazně nižší.

Abychom mohli pozorovat migraci buněk bez vlivu buněčné proliferace, byly buňky kultivovány s mitomycinem C, a to po dobu 3 hodin. Na základě nižšího počtu opakování a snížené důvěryhodnosti kontrolních wilde-type buněk považujeme tato data za preliminární a v budoucnu plánujeme měření doplnit o další opakování a pro kontrolu využít 143B lacZ mCherry buňky z jiného zamražení.

5.6 Navazující experimenty

Dalším navazujícím krokem pro potvrzení úlohy genu TPM2 v progresi osteosarkomu by měla být charakterizace fenotypu lidských osteosarkomových buněk 143B po snížení hladiny exprese genu TPM2. K tomuto účelu by mohla být použita metoda CRISPR-Cas9 mutageneze a vytvoření buněčných klonů bez exprese genu TPM2. Druhou možností by mohlo být využití RNAi i, kdy by k umlčení exprese TPM2 došlo na posttranskripční úrovni. Při snižování hladiny TPM2 by bylo možné vytvořit buňky bez celkové hladiny TPM2 nebo zacílit na exon 6b specifický pro izoformy TPM2.2 a TPM2.3. Protože z analýzy hladiny izoforem pomocí metody kvantitativní PCR v reálném čase vyplývá, že izoforma TPM2.2 se v našich buňkách prakticky nevyskytuje, mohlo by to být bráno jako specifický knock-out izoformy TPM2.

V této diplomové práci byly experimenty *in vitro* provedeny na vysoce metastatické lidské buněčné linii 143B. Dalším krokem pro evaluaci výsledků by bylo vhodné využít další lidské osteosarkomové buněčné linie a ověřit na nich výsledky získané na linii 143B.

Z výsledků vyplývá, že zvýšení hladiny TPM2.3 vede ke snížené migraci buněk, což naznačuje možný vliv na metastatickou aktivitu buněk. Tento poznatek by bylo vhodné otestovat také i *in vivo*. Bylo dokázáno, že u atymických myší dochází po intratibiální injekci buněk 143B k tvorbě plicních metastáz už po 4 týdnech od injekce. Po 6 týdnech byl pozorován podobný výsledek, pouze metastatické léze byly větší (Luu *et al.*, 2005). Ve studii Říhová *et al* (2022) bylo možné pozorovat plicní metastáze dokonce už po 3 týdnech od injekce v imunodeficientním myším kmeni NRG (Říhová *et al.*, 2022).

Protože tropomyosin 2 patří mezi aktin-asociované proteiny a ovlivňuje jeho stabilitu a dynamiku, pochopitelně by mohla být studována dynamika aktinu, a to například při proliferačních experimentech nebo při studování buněčné migrace. Dále by bylo jistě zajímavé porovnat interakce dalších aktin-asociovaných proteinů v buňkách se změněnou (zvýšenou/sníženou)

expresí TPM2.3 vůči kontrolním buňkám. Stejně tak by mohlo být zajímavé u těchto buněk pozorovat jejich mechanické vlastnosti.

Léčba osteosarkomu dnes probíhá tradičně pomocí kombinované léčby skládající se z chirurgického odstranění primárního nádoru a podáváním chemoterapeutik před- i postoperativně. Standardní chemoterapeutický protokol pro léčbu vysokostupňového osteosarkomu zahrnuje vysokodávkový methotrexát, doxorubicin, cisplatinu a/nebo ifosfamid (Meazza *et* Scanagatta, 2016). Protože umlčení TPM2 vedlo ke stabilizaci lysozomů a cytoskeletu mimo jiné i u buněk osteosarkomu (konkrétně u buněčné linie U-2-OS), a tedy ke zvýšení citlivosti vůči cisplatině (Groth-Pederson *et al.*, 2012), mohlo by být zajímavé pozorovat vliv změněné hladiny TPM2.3 na citlivost/rezistenci vůči běžně používaným chemoterapeutikům. Dalším příkladem vlivu TPM2 k rezistenci vůči chemoterapii je studie Zhang *et al.* (2018). V této studii byl zkoumán vliv nízké exprese TPM2.1 na citlivost k chemoterapii v buňkách nádoru prsu. Konkrétně testovali jedno z nejpoužívanějších terapeutik při léčbě nádoru prsu, paclitaxel. Z výsledků jejich studie vyplývá, že pacientky s nízkou expresí TPM2 jsou méně citlivé na léčbu tímto chemoterapeutikem a tento druh léčby pro ně není doporučován (Zhang *et al.*, 2018)

V neposlední řadě by bylo možné provést i klinickou studii analyzující prognostický význam TPM2 u pacientů s osteosarkomem.

6 Souhrn

Význam tropomyosinu 2 v progresi osteosarkomu

1. Pomocí westernového přenosu jsme porovnali množství TPM2 na úrovni proteinů u čtyř lidských osteosarkomových buněčných linií. Byla detekována vyšší hladina TPM2 u parentálních buněčných linií vhledem k metastatickým.
2. Protože produkt genu TPM2 je alternativně sestřižen a tvoří 4 různé izoformy, u těchto osteosarkomových buněčných linií byla pomocí metody kvantitativní PCR v reálném čase porovnána také hladina těchto izoforem na úrovni RNA. Hlavním výstupem tohoto experimentu je zjištění, že ve vybraných buněčných liniích se téměř nevyskytuje izoforma TPM2.2 a že množství RNA všech izoforem je vyšší u parentálních buněčných linií.
3. Dále byl vytvořen konstrukt obsahující sekvenci pro tvorbu izoformy TPM2.3, který byl transfekcí přenesen do metastatické buněčné linie 143B a byly tak vytvořené buněčné klony s trvale zvýšenou expresí izoformy TPM2.3. Izoforma TPM2.3 byla vybrána protože dosud nebyla popsána její role v tumorigenezi a tvorbě metastáz.
4. Po vytvoření buněčných klonů s vyšší expresí TPM2.3 byly charakterizovány jejich fenotypové vlastnosti. Vzhledem ke kontrolním buňkám bylo u těchto klonů možné sledovat sníženou rychlost dělení, sníženou schopnost tvořit kolonie v 2D nebo 3D prostředí a také nižší schopnost migrovat.
5. Na základě uvedených výsledků se izoforma TPM2.3 jeví u osteosarkomu jako nádorový supresor.

7 Summary

The role of tropomyosin 2 in osteosarcoma progression

1. The level of TPM2 protein was analysed using western blotting in 4 human osteosarcoma cell lines. TPM2 expression was higher in parental cell lines in comparison to the metastatic ones.
2. Four different isoforms are created by alternative splicing of TPM2 transcript. Thus, we evaluated the RNA level of all 4 isoforms in osteosarcoma cell lines using quantitative real-time PCR. The results showed that isoform TPM2.2 barely occurs in the cell lines and that the RNA level of all isoforms is higher in parental cell lines.
3. Next, a construct containing a sequence of isoform TPM2.3 was created and transfected to the highly metastatic osteosarcoma cell line 143B. Clones with stable overexpression of TPM2.3 were selected. The isoform TPM2.3 was chosen as there are no data about its role in tumorigenesis and metastasis formation.
4. We performed several experiments to analyse phenotypic properties of TPM2.3 overexpressing 143B cells. We observed slower proliferation, lower ability to form colonies in 2D and 3D conditions, and reduced ability to migrate in these cells co.
5. For making concrete conclusions about the role of TPM2 in osteosarcoma progression, subsequent research is needed. However, according to our preliminary results, TPM2.3 might be a tumour suppressor in osteosarcoma.

8 Literatura

Bouchalova P., Bouchal P. Current methods for studying metastatic potential of tumor cells. 2022. Cancer Cell Int. 22(1):394.

Bradbury P., Nader C. P., Cidem A., Rutting S., Sylvester D., He P., Rezcallah M. C., O'Neill G. M., Ammit A. J. Tropomyosin 2.1 collaborates with fibronectin to promote TGF-β_1-induced contraction of human lung fibroblasts. 2021. Respir Res. 22(1):129.

Cai H., Zhao H., Tang J., Wu H. Serum miR-195 is a diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. 2015. J Surg Res. 194(2):505-510.

Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C. M. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. 2002. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(24):15524-9.

Carrle D., Bielack S. S. Current strategies of chemotherapy in osteosarcoma. 2006. Int Orthop. 30(6):445-51.

Chen Y., Ju L., Rushdi M., Ge C., Zhu C. Receptor-mediated cell mechanosensing. 2017. Mol Biol Cell. 28(23):3134-3155.

Clark M. A., Douglas M., Choi J. *Biology 2e*. Texas: OpenStax, 2018 (cit. 2023-02-06). Dostupné z: https://openstax.org/books/biology-2e/pages/38-4-muscle-contraction-and-locomotion

Corre I., Verrecchia F., Crenn V., Redini F., Trichet V. The Osteosarcoma Microenvironment: A Complex But Targetable Ecosystem. 2020. Cells. 9(4):976.

Correa H. Li-Fraumeni Syndrome. 2016. J Pediatr Genet. 5(2):84-8.

Cui J., Cai Y., Hu Y., Huang Z., Luo Y., Kaz A. M., Yang Z., Chen D., Fan X., Grady W. M., Wang J. Epigenetic silencing of TPM2 contributes to colorectal cancer progression upon RhoA activation. 2016. Tumour Biol. 37(9):12477-12483.

Czarnecka A. M., Synoradzki K., Firlej W., Bartnik E., Sobczuk P., Fiedorowicz M., Grieb P., Rutkowski P. Molecular Biology of Osteosarcoma. 2020. Cancers (Basel). 12(8):2130.

Dasari S., Tchounwou P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. 2014. Eur J Pharmacol. 740:364-78.

de Azevedo J. W. V., de Medeiros Fernandes T. A. A., Fernandes J. V. Jr, de Azevedo J. C. V., Lanza D. C. F., Bezerra C. M., Andrade V. S., de Araújo J. M. G., Fernandes J. V. Biology and pathogenesis of human osteosarcoma. 2020. Oncol Lett. 19(2):1099-1116.

Deshpande A., Hinds P. W. The retinoblastoma protein in osteoblast differentiation and osteosarcoma. 2006. Curr Mol Med. 6(7):809-17.

Desouza-Armstrong M., Gunning P. W., Stehn J. R. Tumor suppressor tropomyosin Tpm2.1 regulates sensitivity to apoptosis beyond anoikis characterized by changes in the levels of intrinsic apoptosis proteins. 2017. Cytoskeleton (Hoboken). 74(6):233-248.

Duan P., Cui J., Li H., Yuan L. Tropomyosin 2 exerts anti-tumor effects in lung adenocarcinoma and is a novel prognostic biomarker. 2022. Histol Histopathol. 14:18514.

Fan T. M., Roberts R. D., Lizardo M. M. Understanding and Modeling Metastasis Biology to Improve Therapeutic Strategies for Combating Osteosarcoma Progression. 2020. Front Oncol. 10:13.

Ferguson J. L., Turner S. P. Bone Cancer: Diagnosis and Treatment Principles. 2018. Am Fam Physician. 98(4):205-213.

Fogh J., Trempe G. New Human Tumor Cell Lines. 1975. In Fogh J. (eds). Human Tumor Cells in Vitro. Springer, Boston, MA. 115-159.

Franken N. A., Rodermond H. M., Stap J., Haveman J., van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. 2660. Nat Protoc. 1(5):2315-9.

Geeves M. A., Hitchcock-DeGregori S. E., Gunning P. W. A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms. 2015. J Muscle Res Cell Motil. 36(2):147-53.

Gennari L. , Rendina D., Falchetti A., Merlotti D. Paget's Disease of Bone. 2019. Calcif Tissue Int. 104(5):483-500.

Groth-Pedersen L., Aits S., Corcelle-Termeau E., Petersen N. H., Nylandsted J., Jäättelä M. Identification of cytoskeleton-associated proteins essential for lysosomal stability and survival of human cancer cells. 2012. PLoS One. 7(10):e45381.

Gunning P. W., Hardeman E. C. Tropomyosins. 2017. Curr Biol. 27(1):R8-R13.

Gunning P., O'Neill G., Hardeman E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. 2008. Physiol Rev. 88(1):1-35.

Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer. 2000. Cell. 100(1):57-70.

Hardeman E. C., Bryce N. S, Gunning P. W. Impact of the actin cytoskeleton on cell development and function mediated via tropomyosin isoforms. 2020. Semin Cell Dev Biol. 102:122-131.

He Y. T., Zhang Q. M., Kou Q. C., Tang B. *In vitro* generation of cytotoxic T lymphocyte response using dendritic cell immunotherapy in osteosarcoma. 2016. Oncol Lett. 12(2):1101-1106.

Hensler P. J., Annab L. A., Barrett J. C., Pereira-Smith O. M. A Gene Involved in Control of Human Cellular Senescence on Human Chromosome 1q. 1994. Mol Cell Biol. 14(4): 2291-7.

Jafari F., Javdansirat S., Sanaie S., Naseri A., Shamekh A., Rostamzadeh D., Dolati S. Osteosarcoma: A comprehensive review of management and treatment strategies. 2020. Ann Diagn Pathol. 49:151654.

Jazii F. R., Najafi Z., Malekzadeh R., Conrads T. P., Ziaee A. A., Abnet C., Yazdznbod M., Karkhane A. A., Salekdeh G. H. Identification of squamous cell carcinoma associated proteins by proteomics and loss of beta tropomyosin expression in esophageal cancer. 2006. World J Gastroenterol. 12(44):7104-12.

Jia S. F., Worth L. L., Kleinerman E. S. A nude mouse model of human osteosarcoma lung metastases for evaluating new therapeutic strategies. 1999.Clin Exp Metastasis. 17(6): 501-6.

Kramer N., Walzl A., Unger C., Rosner M., Krupitza G., Hengstschläger M., Dolznig H. In vitro cell migration and invasion assays. 2013. Mutat Res. 752(1):10-24.

Lin J. J., Eppinga R. D., Warren K. S., McCrae K. R. Human tropomyosin isoforms in the regulation of cytoskeleton functions. 2008. Adv Exp Med Biol. 644:201-22.

Luo Y. X., Cui J., Wang L., Chen D. K., Peng J. S, Lan P., Huang M. J., Huang Y. H., Cai S. R., Hu K. H., Li M. T., Wang J. P. Identification of cancer-associated proteins by proteomics and downregulation of β-tropomyosin expression in colorectal adenoma and cancer. 2009. Proteomics Clin Appl. 3(12):1397-406.

Luu H. H, Kang Q., Park J. K., Si W., Luo Q., Jiang W., Yin H., Montag A. G., Simon M. A., Peabody T. D., Haydon R. C., Rinker-Schaeffer C. W., He T. C. An orthotopic model of human osteosarcoma growth and spontaneous pulmonary metastasis. 2005. Clin Exp Metastasis. 22(4):319-29.

Manstein D. J., Meiring J. C. M., Hardeman E. C., Gunning P. W. Actin-tropomyosin distribution in non-muscle cells. 2020. J Muscle Res Cell Motil. 41(1):11-22.

McAllister R. M., Gardner M. B., Greene A. E., Bradt C., Nichols W. W., Landing B. H. Cultivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma. 1971. Cancer. 27(2): 397-402

Meazza C., Scanagatta P. Metastatic osteosarcoma: a challenging multidisciplinary treatment. 2016. Expert Rev Anticancer Ther. 16(5):543-56.

Meng L. B., Shan M. J., Qiu Y., Qi R., Yu Z. M., Guo P., Di C. Y., Gong T. TPM2 as a potential predictive biomarker for atherosclerosis. 2019. Aging (Albany NY). 11(17):6960-6982.

Meredith A. M., Dass C. R. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. 2016. J Pharm Pharmacol. 68(6):729-41.

Mitchell C. B., Black B., Sun F., Chrzanowski W., Cooper-White J., Maisonneuve B., Stringer B., Day B., Biro M., O'Neill G. M. Tropomyosin Tpm 2.1 loss induces glioblastoma spreading in soft brain-like environments. 2019. J Neurooncol. 141(2):303-313.

Múdry P., Kýr M,. Rohleder O., Mahdal M., Staniczková Zambo .I, Ježová M., Tomáš T., Štěrba J. Improved osteosarcoma survival with addition of mifamurtide to conventional chemotherapy - Observational prospective single institution analysis. 2021. J Bone Oncol. 28:100362.

Pellegrin S., Mellor H. Actin stress fibres. 2007. J Cell Sci. 120(Pt 20):3491-9.

Pouliot N., Pearson H. B., Burrows A. Investigating Metastasis Using In Vitro Platforms2000-2013. Madame Curie Bioscience Database. Landes Bioscience.

Rathore R., Van Tine B. A. Pathogenesis and Current Treatment of Osteosarcoma: Perspectives for Future Therapies. 2021. *J Clin Med*. 10(6):1182.

Říhová K., Dúcka M., Zambo I. S., Vymětalová L., Šrámek M., Trčka F., Verner J., Drápela S., Fedr R., Suchánková T., Pavlatovská B., Ondroušková E., Kubelková I., Zapletalová D., Tuček Š., Múdry P., Krákorová D. A., Knopfová L., Šmarda J., Souček K., Borsig L., Beneš P. Transcription factor c-Myb: novel prognostic factor in osteosarcoma. 2022. Clin Exp Metastasis. 39(2):375-390.

Schaks M., Giannone G., Rottner K. Actin dynamics in cell migration. 2019. Essays Biochem. 63(5):483-495.

Sheng G., Gao Y., Yang Y., Wu H. Osteosarcoma and Metastasis. 2021. Front Oncol. 11:780264.

Shin H., Kim D., Helfman D. M. Tropomyosin isoform Tpm2.1 regulates collective and amoeboid cell migration and cell aggregation in breast epithelial cells. 2017. Oncotarget. 8(56):95192-95205.

Shoaib Z., Fan T. M., Irudayaraj J. M. K. Osteosarcoma mechanobiology and therapeutic targets. 2022. Br J Pharmacol. 179(2):201-217.

Svitkina T.M. Ultrastructure of the actin cytoskeleton. 2018. Curr Opin Cell Biol. 54:1-8.

Taran S. J, Taran R., Malipatil N. B. Pediatric Osteosarcoma: An Updated Review. 2017. Indian J Med Paediatr Oncol. 38(1):33-43.

Tijore A., Yao M., Wang Y. H., Hariharan A., Nematbakhsh Y., Lee Doss B., Lim C. T., Sheetz M. Selective killing of transformed cells by mechanical stretch. 2021. Biomaterials. 275:120866.

Tojkander S., Gateva G., Schevzov G., Hotulainen P., Naumanen P., Martin C., Gunning P. W., Lappalainen P. A molecular pathway for myosin II recruitment to stress fibers. 2011. Curr Biol. 21(7):539-50.

Wang C. L., Coluccio L. M. New insights into the regulation of the actin cytoskeleton by tropomyosin. 2010. Int Rev Cell Mol Biol. 281:91-128.

Wang J. Y., Wu P. K., Chen P. C., Lee C. W., Chen W. M., Hung S. C. Generation of Osteosarcomas from a Combination of Rb Silencing and c-Myc Overexpression in Human Mesenchymal Stem Cells. 2017. Stem Cells Transl Med. 6(2):512-526.

Wang S. D, Li H. Y, Li B. H, Xie T., Zhu T., Sun L. L., Ren H. Y., Ye Z. M. The role of CTLA-4 and PD-1 in anti-tumor immune response and their potential efficacy against osteosarcoma. 2016. Int Immunopharmacol. 38:81-9.

Wolfenson H., Meacci G., Liu S., Stachowiak M. R., Iskratsch T., Ghassemi S., Roca-Cusachs P., O'Shaughnessy B., Hone J., Sheetz M. P. Tropomyosin controls sarcomere-like contractions for rigidity sensing and suppressing growth on soft matrices. 2016. Nat Cell Biol. 18(1):33-42.

Wu, Z., Ge, L., Ma, L. *et al.* TPM2 attenuates progression of prostate cancer by blocking PDLIM7-mediated nuclear translocation of YAP1. 2023. *Cell Biosci* 13, 39

Xin S., Wei G. Prognostic factors in osteosarcoma: A study level meta-analysis and systematic review of current practice. 2020. J Bone Oncol. 21:100281.

Yu F., Miao J. Significant association between cytotoxic T lymphocyte antigen 4 +49G>A polymorphism and risk of malignant bone tumors. 2013. Tumour Biol. 34(6):3371-5.

Zamborsky R., Kokavec M., Harsanyi S., Danisovic L. Identification of Prognostic and Predictive Osteosarcoma Biomarkers. 2019. Med Sci (Basel). 7(2):28.

Zhang J., Zhang .J, Xu S., Zhang X., Wang P., Wu H., Xia B., Zhang G., Lei B., Wan L., Zhang D., Pang D. Hypoxia-Induced TPM2 Methylation is Associated with Chemoresistance and Poor Prognosis in Breast Cancer. 2018. Cell Physiol Biochem. 45(2):692-705.

Zhao J., Dean D. C., Hornicek F. J., Yu X., Duan Z. Emerging next-generation sequencing-based discoveries for targeted osteosarcoma therapy. 2020. Cancer Lett. 474:158-16

Zhao X., Wu Q., Gong X., Liu J., Ma Y. Osteosarcoma: a review of current and future therapeutic approaches. 2021. Biomed Eng Online20(1)

Cancer.net. USA: American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2005 (cit. 2023-05-03). Dostupné z: https://www.cancer.net/

Presence of Troponin and Tropomyosin. (citováno. 2023-03-11). Dostupné z: https://jackwestin.com/resources/mcat-content/specialized-cell-muscle-cell/presence-of-troponin-and-tropomyosin