

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Marie Bočková

Povrchový fenotyp nádorových kmenových buněk (CSC) lidských karcinomů

Surface phenotype of human carcinoma cancer stem cells (CSC)

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 12. 5. 2016

Podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli, panu RNDr. Karlu Drbalovi, PhD., za jeho cenné rady a vedení.

Obsah	
Zkratky.....	6
Abstrakt.....	7
Abstract.....	7
1 Úvod.....	1
2 Heterogenita buněk lidských nádorů	3
2.1 Onkogenní teorie a vlastnosti nádorových buněk	4
2.2 EMT	5
3 Karcinomy	6
3.1 Karcinom močového měchýře	6
3.1.1 Molekulární charakteristika BCa	6
3.1.2 Diagnostická stadia	11
4 Nádorové kmenové buňky	13
4.1 Původ CSC	13
4.2 Význam CSC pro cílení léčby.....	14
5 Metody studia CSC a jejich povrchových znaků.....	14
5.1 In-vitro sferoidy	15
5.2 Xenotransplantační modely.....	15
5.2.1 Myší imunodeficientní modely.....	15
5.2.2 Zebříčka (Danio rerio)	16
5.3 Expresní profilování.....	17
6 Povrchový fenotyp nádorových kmenových buněk karcinomu močového měchýře (BCa CSC).....	18
6.1 Tři molekulárně a funkčně charakterizované subtypy BCa související s CSC	18
6.2 <i>Jednotlivé genové podpisy BCa CSC</i>	19
6.2.1 CD44 ^{v6} ⁺ MUC1 ⁻	19

6.2.2	CD44+ buňky indukující nádor (a z nich odvozené znaky)	20
6.2.3	Genový otisk HTC (a z něj odvozené znaky)	22
6.2.4	Otisk „buňky původu“ (a z něj odvozené znaky)	24
6.2.5	Další znaky	25
6.2.6	Přehled vybraných povrchových znaků BCa CSC	26
7	Závěr	26
8	Seznam použité literatury	28

Zkratky

BCa, BLCA	bladder cancer	nádor močového měchýře
CSC	cancer stem cell	nádorová kmenová buňka
HTC	Highly Tumorigenic Cell	jiné označení CSC
T-IC	Tumor Inducing Cell	jiné označení CSC
COO	Cell Of Origin	jiné označení CSC
MIBC	muscle-invasive bladder cancer	svalovinu-napadající karcinom moč. měchýře
NMIBC	non-muscle-invasive bladder cancer	povrchový karcinom moč. měchýře
TCGA	The Cancer Genome Atlas	
BRCA	karcinom prsu	
LUAD	plicní adenokarcinom	
LUSC	plicní skvamózní karcinom	
HNSC	karcinom hlavy a krku	
GBM	glioblastom	
UCEC	karcinom endometria	
OV	serózní karcinom ovaria	
KIRC	karcinom renálních buněk	
COAD	střevní adenokarcinom	
LAML	akutní myeloidní leukémie	
READ	rektální adenokarcinom	
NBS	Network Based Stratification	
KRT	keratin	
COCA	Cluster Of Clusters Assignment	
TLR	Toll-like receptory	

Abstrakt

Nádor se sestává z heterogenní masy buněk, které lze - podobně jako zdravé orgány a tkáně lidského těla - rozdělit dle morfologických, funkčních či expresních hledisek na jednotlivé buněčné populace. Populaci buněk, která dává vznik všem těmto buněčným liniím, označujeme jako nádorové kmenové buňky (CSC). Tyto CSC nejen že mají vlastnosti běžných kmenových buněk, tj. schopnost sebeobnovy a dát vzniku heterogenní populaci diferencujících se buněk, ale jsou zpravidla také nejodolnější subpopulací v nádoru, která je vysoce odolná vůči léčbě a způsobuje reziduální nemoc. Znalost CSC biomarkerů jednotlivých typů nádorů významně zvýší účinnost léčby, která může být skrze tyto biomarkery lépe zacílena. Hledání unikátního genového otisku pro CSC jednotlivých nádorových onemocnění je umožněno díky tak zvaným –omickým přístupům, zvláště charakteristice povrchového proteomu buněk, jehož prostřednictvím buňka komunikuje s okolím. Dnes je známo, že CSC karcinomu močového měchýře exprimují ve vysokých množstvích CD44, CD90 a CD49f, které jsou používané k identifikaci těchto buněk, mezi ostatními znaky ještě jmenujme molekulu CD47 s imunopresivní funkcí.

Abstract

Tumor is composed of a heterogenous mass of cells. Similar to normal healthy organs and tissues, these can be divided into individual cellular subpopulations according to morphology, function and expression patterns. A subpopulation of cells that are able to give rise to all of these cellular lineages is referred to as cancer stem cells (CSC). CSCs have the capabilities of normal stem cells such as the self-renewal and the ability to give rise to a heterogenous population of differentiated cells. Usually, this is the most resistant subpopulation within a tumor, highly non-responsive to therapy. Doing so, they are the cause of residual disease. Characterisation of CSC markers of individual tumor types is beneficial since it enables higher therapy efficacy via targeting this cell population. The -omics approaches to characterisation of the surface proteome bring a broader view into the field when searching for a unique gene signature of specific cancer stem cell types. It has been found that these cells can be identified based on the high expression levels of CD44, CD90 and CD49f. Among other markers, CD47 is an important marker for its immunosuppressive function.

1 Úvod

Rakovina je celosvětově jednou z častých příčin úmrtí, zvláště v rozvinutých zemích [1]. Podle tkáně, ve které se nádor utvořil, rozlišujeme několik druhů rakovinných onemocnění, mezi nimi například karcinomy jako nádory epitelálního původu.

Karcinom močového měchýře (BCa, z angl. „bladder carcinoma“) patří mezi nejčastější onkologická onemocnění na světě. Dle progresu jej lze rozdělit na papilární neinvazivní karcinom - NMIBC (asi 80 % případů) a svalovinu napadající karcinom - MIBC (zbylých 20 % případů) [2].

Nádor je komplexní heterogenní masa buněk, které nesou alespoň některé ze základních znaků. Mezi ně patří přetrvávající signalizace k proliferaci, angiogenezi, unikání růstovým inhibičním faktorům, umožnění neomezeného počtu buněčných cyklů, zvýšená rezistence k buněčné smrti a schopnost buněk se šířit organismem a způsobit metastáze. Dále mají nádory schopnost změnit svůj metabolismus - přepnout na aerobní glykolýzu (Warburgův efekt). Nestabilní genom produkující velké množství mutací jim poskytuje různé strategie úniku před kontrolou imunitním systémem a schopnost jím manipulovat. Nádorové buňky vytváří ve svém okolí mikroprostředí specifické právě pro transformované buňky [3]. V buňce, která prochází nádorovou transformací, dochází k mnoha procesům a změnám na molekulární úrovni, především se jedná o přestavbu cytoskeletu buňky, který je zodpovědný za její morfologii a motilitu, příkladem takového procesu může být tzv. epitelálně-mezenchymální tranzice (EMT), přeměna původního epitelu na mesenchymální buňky, které jsou rezistentní vůči pro-apoptickým signálům a schopné invaze [4]. EMT je jedním z možných způsobů vzniku nádorových kmenových buněk [5], [6] neboť během něj buňka přechází do „více kmenového“ stavu.

Morfologie nádorových buněk i jimi specificky exprimované molekuly ukazují, že nádor napodobuje stavbu zdravé tkáně, z níž je odvozen. To znamená, že se nejedná o uniformní hmotu, ale o heterogenní, organizovanou populaci [7] [8].

Již v 70. letech potvrdili Mackillop a kol. [7] a Buick a kol. [9], že karcinom je tvořen subpopulacemi buněk s odlišnými charakteristikami. Pouze frakce nádorových buněk byla schopna na agarových a methylcelulóзовých substrátech vytvořit kolonie. Schopnost růstu těchto buněk bez adheze k povrchu, která je prokázána formací sferoidů a je znakem jejich kmenovosti, potvrdila platnost teorie nádorových kmenových buněk (CSC) i pro BCa. CSC jsou buňky, které mají schopnost asymetrického dělení – dají vznik jak

kmenové buňce, tak buňce, která se bude dále diferencovat do různých nádorových buněčných subtypů. CSC jsou zodpovědné za komplexitu nádoru [10].

CSC díky své odolnosti přežívají konvenční radioterapii a chemoterapii [11], například díky expresi ABC (ATP Binding Cassette) transportérů, které buňku zbavují toxinů. Tyto buňky jsou izolovány jako tzv. „side-population“, soubor buněk, které se dokáží zbavit barviva Hoechst 33342.

CSC svou rezistencí způsobují opakované nálezy nádorů u týchž pacientů. Studium povrchového fenotypu CSC si klade za cíl odhalit unikátní molekulární biomarkery pro CSC u konkrétních typů nádorů, což umožní zvýšit účinnost léčby skrze cílení na tyto buněčné populace. U BCa se může například jednat o blokování povrchové molekuly CD47, které umožní zneškodnění CSC imunitním systémem [12].

Při znalosti specifických znaků lze izolovat CSC tříděním fluorescenčně značených buněk na základě exprese těchto biomarkerů, nebo lze izolovat CSC právě jako „side population“. Následně je potřeba ověřit tumorigenní potenciál získané populace. Nejlepší test schopnosti indukovat nádor je implantace do imunokompromitovaného *in vivo* modelu, u BCa nejčastěji do NSG myšího kmene.

Celogenomové studie s následným statistickým zpracováním dnes umožňují plošně studovat povrchové i intracelulární charakteristiky buněk a zaznamenávat trendy objevující se s postupem onemocnění. Studie transkriptomu, proteomu a expresních profilů jsou zásadní pro co nejširší charakteristiku CSC subpopulace [8, 13, 14]. V současnosti známe expresní profily různých druhů karcinomu močového měchýře, na jejichž základě dokážeme předpovídat vývoj onemocnění [15], subpopulace CSC u tohoto onemocnění však ještě není komplexně charakterizována. Ta by měla být popsána pomocí genového otisku (z anglického „gene signature“), tedy souboru genů, které svou expresí odlišují tuto populaci od ostatních.

Povrch každé buňky je po celou dobu její existence spolu se sekretomem významným místem komunikace buňky s prostředím. Molekuly prezentované na povrchu buňky podávají zásadní informaci buňkám imunitního systému. Jejich případná aktivace či tolerance je určována tímto signálem. Tok informací přes membránu však běží obousměrně. Membrána obsahuje receptory, často spojené s intracelulárními kinázami nebo fosfatázami, které jsou součástí signalizačních kaskád přenášejících přijatou informaci až do jádra [16].

Povrch buňky je proto nesmírně cenným zdrojem informací o buňce jako takové a o dějích, které v ní probíhají. Zároveň je jako její vnější vrstva nejpřístupnější částí jak pro výzkum, tak pro léčebné účely. Znalost povrchového fenotypu CSC je proto pro další vývoj nových léčebných postupů a prostředků zásadní [14] [17].

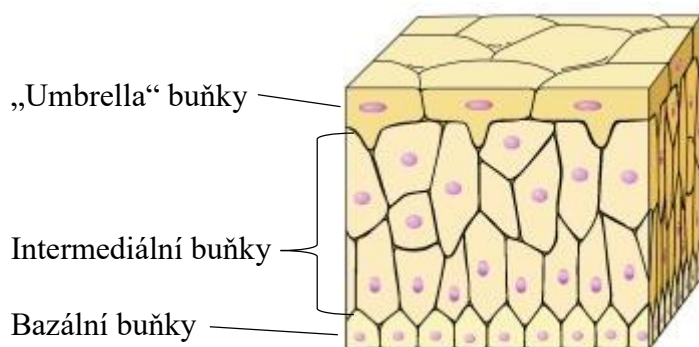
V současné době se výzkumu BCa CSC, tedy kmenových buněk karcinomu močového měchýře, věnuje mnoho výzkumných týmů. Mezi nejvýznamnější patří skupina ze Stanfordské univerzity (USA), v jejímž čele stojí Irving Weissman, dále tým z Medicínského centra John Hopkins v Baltimore (USA) pod vedením Xiaobing He a skupina pod vedením Garret Dancik z University of Colorado. Z evropských center jmenujme Laboratoř klinické biochemie na univerzitě v Aarhus (Dánsko), kterou vede Lars Dyrskjöt.

2 Heterogenita buněk lidských nádorů

Inspirován studii normálních a leukemických kmenových buněk prováděl R. N. Buick a kol. v sedmdesátých letech pokusy s buňkami z biopsií a výplachů močového měchýře pacientů trpících karcinomem. Prokázal, že frakce nádoru je schopna růst bez přichycení k pevnému podkladu [9]. Buňky takto vybavené jsou mobilní a mohou se dostat vaskulaturou do krve jako tzv. cirkulující nádorové buňky.

Dle morfologie lze rozdělit buňky zdravého urotelu na malé kulaté buňky nasedající na bazální laminu, podlouhlé buňky, u kterých nebyla zjištěna aktivní alkalická fosfatáza, tvoří střední vrstvu polygonálních buněk (cca 60 % buněk), a největší buňky tvořící superficium urotelu, tzv. umbrella cells (viz Obr. 1). Asi 10 % bazálních buněk lze klasifikovat jako kmenové buňky. Mezi jejich nejvýznamnější biomarkery patří integrin $\beta 4$, KRT 14 a p63 [18].

Obr. 1. Stavba zdravého urotelu (Převzato z [19]).



V neoplastickém urotelu byly v souladu s předchozím zjištěny dva typy buněk –malé kulaté, obsahující aktivní alkalickou fosfatázu (stejně jako kmenové buňky normálního urotelu), a velké podlouhlé, které měly nepatrně odlišnou morfologii od zdravého urotelu (podlouhlejší). Velké superficiální buňky byly nalezeny jen v malém množství a jejich charakteristika se neshodovala se znaky zdravé tkáně. Vzorky neoplastického urotelu vysazené na plotny opět měly na rozdíl od zdravé tkáně schopnost tvořit kolonie bez přilnutí k podkladu [7], což znamená, že buňky jsou mobilní a schopné tvořit metastáze. Zdá se tedy, že nádor mimikuje stavbu normální nepoškozené tkáně [20] [8]. Například cytokeratiny jsou rodina proteinů, na základě jejichž exprese lze stratifikovat zdravý i nádorem postižený urotel. Zastoupení různých druhů cytokeratinů v proteomu je pro rakovinné buňky charakteristickým a stálým znakem, často dochází k vzájemně vylučné expresi jejich různých druhů [14]. Zatímco pro bazální vrstvu buněk je charakteristická exprese KRT 17, který je u nádorových buněk navýšen a vyskytuje se u 60 % z nich, v superficiální části urotelu je exprimován KRT18 [21]. KRT 20 je také znakem „umbrella cells“. Expresí KRT20 je vzájemně vylučná s expresí KRT5, který je naopak právě biomarkerem bazálních buněk urotelu [14].

Nádor se skládá z nádorových kmenových buněk a z nich odvozených buněk diferencovaných. Stupeň diferenciacie nádoru je důležitým prognostickým znakem, neboť z něj lze usuzovat na jeho pokročilost a stádium [22].

Mimo tyto typy buněk se v nádoru vyskytují charakteristické fibroblasty, tzv. CAF (cancer associated fibroblast), které mají podíl na vytváření lokálního prostředí vhodného pro růst nádoru. Zatím ne úplně známými mechanismy kooperují s nádorovými buňkami, především s CSC, které dokáží atrahovat, a podporují jejich růst a invazi [23].

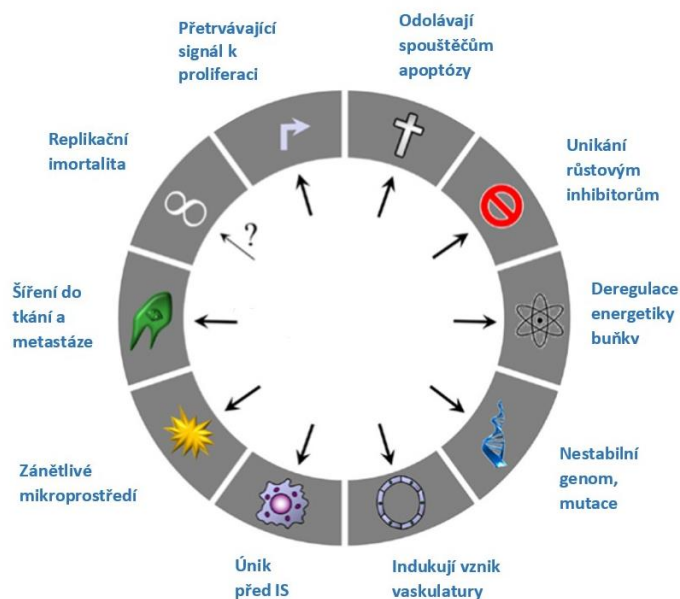
Nádorové mikroprostředí je vytvářeno vedle CAF také tak zvaným nádorovým stroma, tedy buňkami v těsném okolí nádoru. Ty mohou produkcí chemokinů do místa nádoru přitahovat buňky imunitního systému. Infiltrace imunitních buněk je asociována se špatnou prognózou a vysokou návratností onemocnění jak u BCa, tak například u karcinomu prsu [24] [16].

2.1 Onkogenní teorie a vlastnosti nádorových buněk

Navzdory širokému spektru buněk interagujících v nádoru lze charakterizovat vlastní nádorové buňky několika základními vlastnostmi (viz Obr. 2). Zpravidla dokáží produkovat růstové faktory, které parakrinně či autokrinně stimulují jejich povrchové

receptory pro tyto molekuly. Proliferační aktivita těchto buněk je zpravidla zapříčiněna i mutantními variantami signálních drah. Podobně dokáží ovlivnit okolní zdravé buňky a donutit je fungovat k prospěchu nádoru. Příkladem je produkce *SHH*, která je běžná ve zdravém urotelu a časných fázích nádoru. Okolní buňky přijímají tento signál a jako odpověď produkují diferenciační faktory. U invazivních forem BCa se hladina *SHH* snižuje a urotel se nediferencuje. Je prokázáno, že zablokováním odpovědi na *Shh* signalizaci dojde ke zhoršené prognóze onemocnění u myších modelů [25].

Obr. 2 Převzato a upraveno podle [3].



Dále Hannahan a Weinberg popisují schopnost metabolického obratu na aerobní glykolýzu (tzv. Warburgův efekt) a schopnost vyhýbat se atakům imunitního systému. Obě tyto unikátní vlastnosti významně přispívají k vytváření nádorového mikroprostředí a tak k zajištění vhodných podmínek pro jeho rozvoj [3].

2.2 EMT

Mezi ostatními znaky se věnujme snížení exprese či inaktivující mutaci E-kadherinu, které jsou v karcinomech běžné. E-kadherin je základní zprostředkovatel buněčné adheze, jehož absence umožňuje nezávislost na přilnutí k podkladu (bazální lamině) a umožňuje tak pronikání do nových tkání. Tyto změny jsou součástí procesu zvaného epiteliálně-mesenchymální tranzice (EMT), který je častým doprovodným znakem nádoru. Tento transdiferenční proces se běžně v těle odehrává při hojení, kdy dochází ke změně fenotypu buňky z epiteliálního na fibroblastový. To je zapříčiněno působením faktorů

jako například TGF- β . Dále dochází ke zvýšení produkce vimentinu, fibronectinu a N-kadherinu. Naopak snížená produkce E-kadherinu umožní buňce rozrušení adherens junctions a změnu morfologie. U BCa se mesenchymální fenotyp vyskytuje hlavně u MIBC. EMT je jeden z možných způsobů vzniku CSC (viz 4.1 Původ CSC) [26] [27]. Transdiferenciací v mesenchymální typ buňky se také zvyšuje její motilita a vzniká migratorní BCa CSC, což umožňuje šíření BCa CSC v těle a vznik metastáz [28].

3 Karcinomy

Nádorová onemocnění nejrůznější klasifikace jsou častou příčinou úmrtí v rozvojových i ve vyvinutých zemích. Podle celosvětových statistik bylo v roce 2002 zaznamenáno 10,9 milionu nových případů a 6,7 milionu těchto onemocnění bylo fatálních [29]. V roce 2012 došlo k nárůstu na 8,2 milionu úmrtí a bylo odhadováno 14,1 milionu nových případů rakoviny [30]. Pro srovnání, dle Světové Zdravotnické Organizace (WHO) byla v téže roce nejčastější příčinou smrti ischemická choroba srdeční, zodpovědná za 7,4 milionu úmrtí, tedy méně, než nádorová onemocnění v souhrnu [1]. Nádory jsou stále aktuální hrozbou a jejich výzkum je prioritou mnoha center po celém světě. Ačkoliv 57 % nádorových onemocnění se ve světovém měřítku vyskytuje v rozvojových zemích, v přepočtu na obyvatele hrozí vyšší riziko rakoviny v zemích rozvinutých. Se zvyšující se životní úrovní a prodlužující se délkou života lze očekávat nárůst výskytu rakoviny i v méně rozvinutých zemích. Rizikové skupiny jsou však specifické pro jednotlivé typy nádorů [30].

3.1 Karcinom močového měchýře

Tato práce se zabývá především karcinomy, zejména karcinomem močového měchýře. Výskyt BCa je nejhojnější především ve vyspělých částech světa, tj. v Evropě, Severní Americe, západní Asii a severní části Afriky. V roce 2012 přibylo 429 800 případů, 165 100 bylo fatálních. V porovnání se statistikami z roku 2002 má příbytek BCa v průběhu let rostoucí tendenci. Rizikovou skupinou jsou kuřáci, navíc se BCa vyskytuje především u mužů [30].

3.1.1 Molekulární charakteristika BCa

Projekt The Cancer Genome Atlas (TCGA) stanovil na základě analýzy DNA a RNA, expresních hladin proteinů a epigenetických změn 12 základních druhů rakoviny dle tkáně, ve které došlo k rozvoji onemocnění. Tyto druhy jsou děleny do dalších subtypů.

Charakteristika rakoviny závisí nejen na tkáni původu, ale také na vlastnostech buněk, ze kterých je nádor odvozen. Jako všechny tkáně je nádorová hmota odvozena z kmenových buněk (CSC). Právě jejich charakterizace a studium jsou nezbytné, abychom získali komplexní pohled na interakce, které se v nádoru odehrávají. Proto Hoadley a kol. v roce 2014 představili novou klasifikaci nádorových onemocnění opírající se (spíše než o tkáň původu) o genomické rysy (mutace, snížená či zvýšená exprese jistého znaku). Byly provedeny genomické studie 3527 vzorků, mezi nimiž bylo zastoupeno všech 12 původních typů onemocnění. Následná statistická zpracování byla provedena tak, aby brala v potaz násobné analýzy genomu vzorků, které dále řadila do skupin dle nalezených shod. Studie byla provedena na základě tzv. COCA klasifikace (Cluster Of Clusters Assignment), tedy násobné analýzy, která jako data pro druhou analýzu používá výsledky získané z prvního roztržení nádorů a na jejich základě přeorganizovává původní klasifikaci. COCA umožňuje porovnat výstupy získané z analytických studií sestavujících klasifikaci na základě různých typů dat (mRNA-Seq, miRNA-Seq, DNA methylace, počet kopií DNA, proteinová exprese, somatické bodové mutace). Takto bylo určeno 11 typů nádorů, z nichž pouze 5 odpovídalo původnímu TCGA dělení. Ostatních 6 skupin obsahuje nádory z různých tkání (konvergují), nebo jsou naopak subtypy původní TCGA klasifikace zařaditelné do více COCA skupin (divergují) [31].

Jako příklad konvergence slouží skupina skvamózních nádorů močového měchýře (BLCA), hlavy a krku (HNSC) a karcinom plic (LUSC), které tvoří dohromady jednu obsáhlou COCA skupinu označovanou jako C2-skvamózní. Tato onemocnění sdílí řadu společných molekulárních znaků (mezi nimi zvýšenou expresi TP63, PIK3CA a SOX2), která může být zapříčiněna i vzájemnou příbuzností CSC těchto nádorů.

Tab. 1.

		Název COCA skupiny												
		C1- LUAD	C2- skvamózní	C3- BRCA, luminální	C4- BRCA, bazální	C5- KIRC	C6- UCEC	C7- COAD/READ	C8- BLCA	C9- OV	C10- GBM	C11	C12	C13- AML
Výskyt původních TCGA skupin	BLCA	BLCA	BLCA	BLCA	BLCA	BLCA	BLCA	BLCA	BLCA	BLCA	BLCA	BLCA	BLCA	BLCA
	BRCA	BRCA	BRCA	BRCA	BRCA	BRCA	BRCA	BRCA	BRCA	BRCA	BRCA	BRCA	BRCA	BRCA
	LUAD	LUAD	LUAD	LUAD	LUAD	LUAD	LUAD	LUAD	LUAD	LUAD	LUAD	LUAD	LUAD	LUAD
	LUSC	LUSC	LUSC	LUSC	LUSC	LUSC	LUSC	LUSC	LUSC	LUSC	LUSC	LUSC	LUSC	LUSC
	HNSC	HNSC	HNSC	HNSC	HNSC	HNSC	HNSC	HNSC	HNSC	HNSC	HNSC	HNSC	HNSC	HNSC
	GBM	GBM	GBM	GBM	GBM	GBM	GBM	GBM	GBM	GBM	GBM	GBM	GBM	GBM
	UCEC	UCEC	UCEC	UCEC	UCEC	UCEC	UCEC	UCEC	UCEC	UCEC	UCEC	UCEC	UCEC	UCEC
	OV	OV	OV	OV	OV	OV	OV	OV	OV	OV	OV	OV	OV	OV
	KIRC	KIRC	KIRC	KIRC	KIRC	KIRC	KIRC	KIRC	KIRC	KIRC	KIRC	KIRC	KIRC	KIRC
	COAD	COAD	COAD	COAD	COAD	COAD	COAD	COAD	COAD	COAD	COAD	COAD	COAD	COAD
	LAML	LAML	LAML	LAML	LAML	LAML	LAML	LAML	LAML	LAML	LAML	LAML	LAML	LAML
	READ	READ	READ	READ	READ	READ	READ	READ	READ	READ	READ	READ	READ	READ

Takto označené TCGA skupiny jsou zastoupeny v dané COCA skupině
 Skupiny C11 a C12 byly pro malý počet zastoupených vzorků vyřazeny
 Zkratky: BLCA-karcinom močového měchýře (v této práci označován jako BCa), BRCA-karcinom prsu, LUAD-plicní adenokarcinom, LUSC-plicní skvamózní karcinom, HNSC-karcinom hlavy a krku, GBM-glioblastom, UCEC-karcinom endometria, OV-serózní karcinom ovaria, KIRC-karcinom renálních buněk, COAD-střevní adenokarcinom, LAML-akutní myeloidní leukémie, READ-rektální adenokarcinom
 Podle [31]

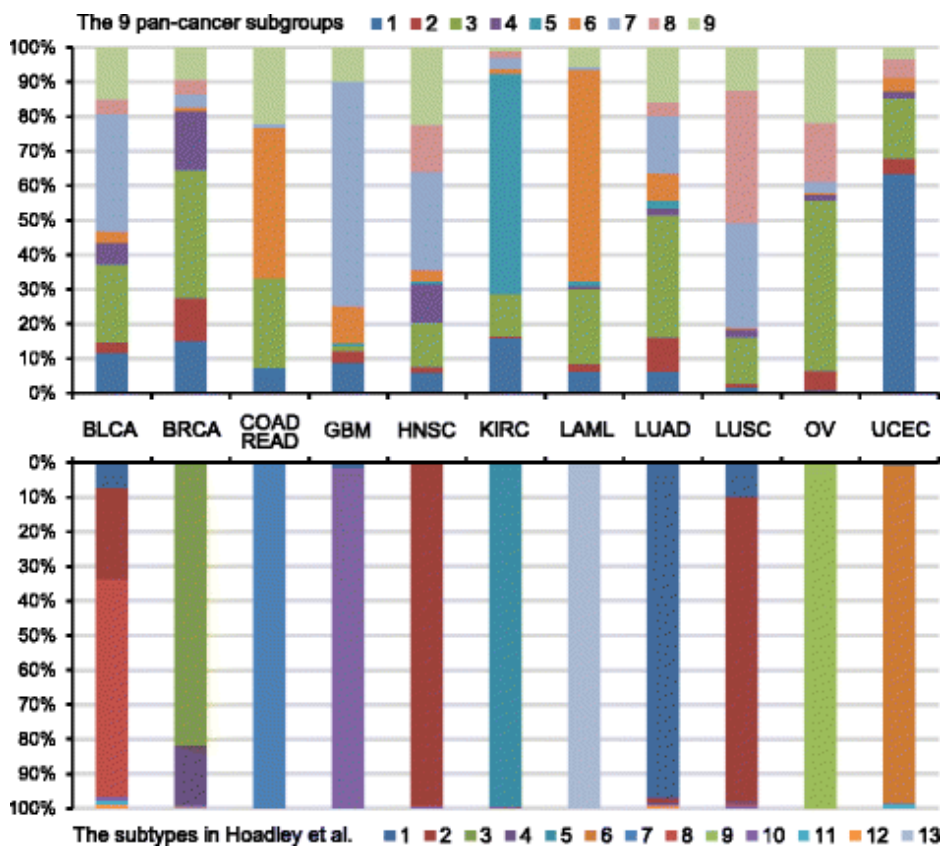
Naproti tomu nejvyšší diverzita byla zjištěna u BCa, který byl zastoupen v 7 z 11 skupin, ale spadá především do 3 COCA skupin: C2 skvamózní, dále do skupiny plicních adenokarcinomů C1 a nejčtenější skupiny C8 nádorů vyskytujících se pouze v močovém měchýři. U skupiny C8 je většinou zvýšená exprese transmembránového receptoru HER2, který je významným proonkogenním regulátorem buněčného cyklu. Naproti tomu C2 BCa se vyznačují znaky EMT - nízká hladina E-kadherinu, vysoká hladina fibronektinu a N-kadherinu (viz 2.2 EMT) [31]. Inverzní exprese těchto adhezivních molekul a receptoru HER2 je podle mého názoru vodítkem poukazujícím na odlišný původ těchto subtypů BCa a tudíž i jejich odlišný vývoj. Probíhající EMT v kategorii C2 je možným zdrojem BCa CSC, zatímco v jiných skupinách nebyly tyto znaky nalezeny a jejich BCa CSC tak pravděpodobně vznikají jiným procesem (viz 4.1 Původ CSC).

Ač se COCA klasifikace od tissue-of-origin liší jen v 10 % případů, její zohlednění při analýze klinických dat umožňuje přesnější predikci vývoje karcinomu [31].

Další studie (NBS, network-based stratification, tedy metoda umožňující členění nádorů na základě podobnosti mutovaných oblastí) z roku 2015 pracuje s 3299 vzorky z 12 TCGA typů [32]. Za cíl si vytyčila uspořádat nádorová onemocnění do skupin na základě

molekulární podoby a počtu přeživších pacientů, což autoři shledali jako nedostatečně zohledněné u Hoadley a kol. [31]. Na základě přítomnosti hypermethylace, změny počtu kopií či somatické mutace byly nádory rozděleny do 3 základních skupin. Dále byly děleny druhy genetických a epigenetických změn podle toho, co ovlivňují (fosforylace, buněčná adheze, remodelace chromatinu) a aplikací NBS na tato data byly nádory rozděleny do 9 skupin, které nezohledňují tkáň původu nádoru. Tyto skupiny jsou vzhledem k TCGA klasifikaci více heterogenní. Ačkoliv skupina 4 se skládá především ze zástupců BRCA a skupina 5 z KIRC, ostatní skupiny zahrnují zástupce více TCGA typů. BLCA je nejhojněji zastoupen ve skupinách 1 (11 %), 3 (22 %), 7 (33 %) a 9 (14 %), ve skupině č. 5 není zastoupen vůbec [32], což je rozdílné oproti zjištění Hoadley a kol., kde je BLCA zastoupen ve stejné skupině jako KIRC (viz Tab. 2). Na druhou stranu podobně jako v Hoadley a kol. je zde BLCA asociován ve skupině č. 7 s HNSC a LUSC. Pojítkem této skupiny je delece na chromozomu 9p21, kvůli níž dochází mimo jiné k deleci tumor-supresorových cyklin-dependentních kináz 2A a 2B.

Tab. 2. Srovnání COCA a NBS klasifikace s ohledem na tkáň původu. Tabulky ukazují TCGA subtypy, barevně jsou v nich rozlišeny skupiny nalezené Liu a kol. (horní graf) a Hoadley a kol. (spodní graf).



Zkratky: BLCA-karcinom močového měchýře (v této práci označován jako BCa), BRCA-karcinom prsu, LUAD-plicní adenokarcinom, LUSC-plicní skvamózní karcinom, HNSC-karcinom hlavy a krku, GBM-glioblastom, UCEC-karcinom endometria, OV-serózní karcinom ovaria, KIRC-karcinom renálních buněk, COAD-střevní adenokarcinom, LAML-akutní myeloidní leukémie, READ-rektální adenokarcinom

Převzato z [32]

Tato NBS klasifikace se více liší od původní TCGA klasifikace než COCA klasifikace (viz Tab. 2). Přesto se členění podle NBS shoduje s klinickými daty. Proto může být taková klasifikace užitečná při hledání genomických a epigenetických změn během kancerogeneze, neboť více zohledňuje molekulární podstatu, ač nezanedbává klinický výstup. Specificky pro BCa mi přijde tato klasifikace významná proto, že dělí BCa do 8 kategorií (na rozdíl od COCA, kde je BCa zastoupen sice v 7 skupinách, ale 2 z nich byly pro nízký počet reprezentantů vyřazeny) a zohledňuje tak vysokou heterogenitu BCa. Pomocí NBS klasifikace tak dokážeme rozeznat více subtypů onemocnění BCa.

Jiná studie provedená Zhong a kol. porovnávala výsledky získané celo-exomovým sekvenováním s těmi z analýzy pouze setu genů (kombinované s NBS). Ukázalo se, že analýzou méně dat, tedy genů v setech FoundationOne (240 genů), PanCan (127) and TruSeq (48), lze získat přesnější informace pro predikci dalšího vývoje, bereme-li v potaz i klinická data [33], což je přístup odlišný od předchozí COCA klasifikace, která shromažďuje data z 5 -omických platforem. Bohužel Zhong a kol. zkoumal význam těchto setů genů jakožto predikčních biomarkerů pouze pro CRC, HNSC, KIRC, LUAD a UCEC, jeho platnost pro BCa tedy není ověřena. Tento objev má přínos především pro kliniku.

O původní TCGA klasifikaci se také opírá studie z roku 2015 Martinez-Ledesma a kol., která stanovila sadu genů, na základě jejichž exprese lze predikovat fatálnost onemocnění. Kombinací NBS s Coxovým testem autoři vytyčili soubor 41 genů s predikční hodnotou. Bohužel je tento nástroj aplikovatelný na některé druhy nádorů pouze s omezenou platností, statisticky malá shoda mezi charakteristickou expresí zjištěných biomarkerů a klinickým výstupem byla nalezena například u OV. Naproti tomu pro BCa a COAD/READ byly tyto biomarkery (SMAD2, RUNX2, ABTB1, ST5, CEBPB, SETDB1, CEBPG) zjištěny jako velmi prediktivní. Tzv. C-index posledních dvou jmenovaných byl téměř roven 1, což znamená vysokou shodu mezi vypočteným rizikem onemocnění a klinickým výsledkem [34].

Pokud jsou známy expresní profily a jejich odlišnost v rámci různých stádií a typů nádoru, lze tak rychle a přesně klasifikovat vzorek. K rozlišení povrchového karcinomu urotelu, karcinomu skvamózních buněk a karcinomu urotelu s diferenciovanými skvamózními buňkami existují různé sety znaků [35]. Karcinomu skvamózních buněk je charakterizován jako pozitivní pro KRT14 a desmoglein-3 a zároveň negativní pro GATA3, uroplakin III a S100P, naproti tomu karcinom přechodného urotelu se jeví jako GATA3⁺, uroplakin III⁺, v případech pokročilého stádia a invaze do lamina propria byla zaznamenána i pozitivita pro KRT14 [35]. Uroplakiny jakožto proteiny zodpovědné za tvorbu tzv. uroteliálních plaků, které se podílí na soudržnosti urotelu a znemožňují bakteriální invazi skrz tkáň, jsou pro BCa typické. Analýza RNA v BCa buňkách ukázala, že „umbrella cells“ specificky exprimují kromě uroplakinu III také uroplakiny Ia a II. Naproti tomu uroplakin Ib je přítomen ve všech buňkách urotelu [36].

Spojením laboratorních dat s klinickými lze statistickou analýzou ověřit platnost nalezených znaků a jejich význam v prognostice *in vivo*. Tak byl například nalezen 12-genový expresní profil charakteristický pro predikci vývoje NMIBC [37]. Porovnáním profilů nádorů ze 17 pacientů byl sestaven soubor 88 genů, jejichž exprese se mezi jednotlivými vzorky nejvíce lišila. Analýzou těchto 88 genů u 115 vzorků BCa bylo objeveno 12 genů (z nich jmenujme alespoň deregulaci tumor-supresorové cyklin-dependentní kinázy 25b, zvýšenou expresi COL4A1 a COL18A1, a sníženou expresi COL4A3BP, jehož exprese je charakteristická pro buňky přežívající chemoterapie), které v 82 % případů dokázaly určit, zda dojde k progresi do MIBC.

Expresní data neposkytují pouze informace o odlišnosti různých linií, ale analýzou více dat lze určit naopak i obecné znaky a trendy daného onemocnění. Tak bylo zjištěno 831 genů diferenciózně exprimovaných v karcinomech močového měchýře. Produkce 33 proteinů byla oproti normální tkáni zvýšena, u 85 genů byla naopak snížena [38]. U pokročilého BCa byla navíc podobně jako v předchozí studii zvýšena produkce ubikvitin-konjugačního enzymu UBE2, dále kmenového znaku SOX2.

3.1.2 Diagnostická stadia

Klinika rozlišuje 3 základní typy BCa. Nejmírnější a nejčastější formou je svalovinu nenapadající, povrchový karcinom, angl. non-muscle-invasive BCa (NMIBC). Tato forma onemocnění se eradikuje hlavně transurethrální resekci (TUR, tj. odstranění tumoru skrz urethru), nebo vakcinací pomocí bacillus Calmette-Guérin. V pokročilejších

stádiích i cystektomicky. NMIBC se často postupně vyvine do „muscle-invasive“ BCa (MIBC) - formy, která prorůstá do svalové vrstvy močového měchýře. MIBC je nebezpečnější, léčí se neoadjuvantní chemoterapií (např. cisplatina), tedy pomocnou terapií, která je podávána před chirurgickým odstraněním nádoru. Zatímco NMIBC se vyznačuje převážně papilárním charakterem, nebezpečnější MIBC se skládá z více morfologických typů buněk a často tvoří metastáze v plicích a v játrech. Nejkritičtější typem BCa je lokálně pokročilá, metastatická BCa, jejíž léčba vyžaduje taktéž chemoterapii spolu s radikální cystektomií [39].

Pro tzv. staging, tedy určování stupně nádoru, se používá jak materiál odebraný pomocí TUR, tak pozorování tkáně pomocí magnetické rezonance (MRI) a tomografie (CT), především se zaměřením na svalovinu, jejíž poškození nádorem je znamením jeho pokročilého stádia [39]. Podle diferenciací nádorových buněk („grading“) rozlišujeme 3 stupně: stupeň 1, kdy jsou buňky diferencované, stupeň 2 a stupeň 3 u kterých postupně diferencovanost buněk klesá [40].

Podle klasické nomenklatury označujeme jako pT0 fázi nádoru, která nejeví známky residuální nemoci. pTa je označení pro neinvazivní papilární nádor, který nenapadá lamina propria. pT1 je charakterizován průnikem do lamina propria, ale nikoliv do svaloviny. Tyto 3 podskupiny spadají do kategorie superficiálních nádorů, zatímco následující jsou nádory invazivními. Nádor klasifikovaný jako pT2 proniká do svaloviny, pT3 zasahuje okolní měkké tkáně, pT4 je nejzávažnější formou onemocnění, ve které dochází k napadení přilehlých orgánů [2].

3.1.2.1 Laboratorní diagnostika

Odhaduje se, že 35-48 % případů BCa zasahujícího lamina propria (pT1) přejde v průběhu 3 let do invazivní formy [41]. Pomocí RNA sekvenace zkoumající dohromady 5561 genů byl zjištěn genový otisk, pomocí kterého lze od sebe rozeznat progresivní a neprogresivní formu BCa. Zjištěný profil se skládal z 80 genů se zvýšenou a 101 genů se sníženou expresí v progresivním pT1 oproti neprogresivnímu. Mezi geny se zvýšenou expresí patří například histon-deacetyláza HDAC5 a vaskulární epiteliální růstový faktor VEGFA. Naopak snížená exprese byla zaznamenána u kaspázy CASP8, kinázy MAP3K a glykoproteinu CD44, jehož vysoká hladina je znakem BCa CSC. To znamená, že zastoupení CSC s progresí nádoru klesá. Charakteristická exprese byla zjištěna u genů ovlivňujících buněčný cyklus a adhezi [15], což je logické, protože pronikání do nové

niky vyžaduje růst stávajícího nádoru i schopnost migrace do svaloviny Na základě molekulární charakteristiky tedy lze předvídat vývoj onemocnění.

4 Nádorové kmenové buňky

CSC mají podobné charakteristiky jako normální kmenové buňky zdravých tkání [20] [42]. Mezi další vlastnosti nádorových kmenových buněk patří zvýšená resistance ke konvenčním chemoterapiím, jejíž přímý důsledek se v klinické praxi projevuje opakovaným výskytem onemocnění u daného pacienta, tzv. reziduální nemocí [43].

Nádorové kmenové buňky mají v literatuře mnoho názvů, nejčastěji jsou zmiňovány jako „cancer stem cells“ (CSC) [44]. Některé studie je označují jako „tumor inducing cells“ (TIC) [14], progenitorové nádorové buňky [13]. V této práci se držím obecného značení CSC, případně BCa CSC (bladder carcinoma-cancer stem cell) pro CSC nádoru močového měchýře.

4.1 Původ CSC

Existuje více teorií o původu nádorových kmenových buněk. Protože z podstaty CSC se jedná o nediferencované buňky, jedna z možností pracuje s myšlenkou dediferenciace již jednou diferencovaných buněk v dané tkáni. Tato teorie se zakládá na experimentech prokazujících, že vhodnou manipulací lze buňku dostat do stavu pluripotence, vznikají tzv. iPC (induced pluripotent cell) [45]. *In vitro* je prokázáno, že indukovanou expresí telomerázy hTERT, mutantní variantou H-RasV12 a SV40 Large-T (LT) a Small-T (ST) antigenů, které jsou zodpovědné za inhibici tumorsupresorových drah p53 a pRB, lze fibroblasty transformovat na buňky nesoucí vlastnosti CSC [46]. *In vivo* se pak může jednat o již zmíněný transdiferenciační proces EMT (viz 2.2 EMT).

Hlavním mechanismem vzniku CSC a tedy i celého karcinomu jsou však mutace. Současné poznatky vedou k tomu, že mutací bazálních kmenových buněk urotelu vznikají BCa CSC pouze svalovinu napadajícího karcinomu, zatímco superficiální BCa vzniká z CSC, které jsou mutacemi odvozené od „umbrella cells“ [13].

Klonální původ nádoru potvrzuje studie z roku 2012, která sekvenací 66 jednotlivých buněk pocházejících z 1 MIBC přechodných buněk zjistila, že v tomto případě buňky opravdu měly společného předka. Zároveň se ukázalo, že následný vývoj nádoru vedl u těchto buněk k různým mutačním změnám, podle kterých je bylo možné rozdělit na dvě následné subpopulace [47].

4.2 Význam CSC pro cílení léčby

CSC vytváří celou komplexní hmotu nádoru. V kombinaci s EMT jsou dokonce v návaznosti na invazi nádoru do nových nik zodpovědné za tvorbu metastází a jsou nejodolnější částí nádoru [27, 44]. Při úplné eradikaci CSC u pacienta lze předpokládat, že dojde ke snížení rizika minimální reziduální nemoci, kterou způsobují právě reziduální CSC [11]. Nepřímá i přímá eradikace buněk nesoucích nádorové biomarkery u melanomu a hepatocelulárního karcinomu vedoucí k zastavení růstu nádoru tyto myšlenky potvrdilo [48]. Podobné snahy byly vyvinuty i u BCa - například zvýšení míry apoptózy u CD44⁺ BCa CSC vedlo k eliminaci nádorů [49]. Jiný způsob využití znalosti BCa CSC k jejich eliminaci nabízí terapeutická blokáce molekuly CD47, která je na CSC exprimovaná ve větší míře, čímž je umožněna fagocytóza CSC imunitním systémem pacienta (viz 6.2.2 CD44⁺ buňky indukující nádor)[14].

5 Metody studia CSC a jejich povrchových znaků

Jedním ze způsobů izolace potenciálních nádorových kmenových buněk je izolace na základě podobnosti s uroteliálními kmenovými buňkami [50] [20], se kterými je spojuje například exprese proteinu p63 [51] a některých embryonálních kmenových proteinů (*NANOG*, *NOTCH1*, *SOX2*) [44]. Kmenovost takto vyčleněných populací buněk je ověřována implantací do živých imunokompromitovaných organismů, nebo pozorováním tvorby sferoidů [52].

Další možností je izolace „side population“ (SP) a její následná charakterizace na molekulární úrovni. Tyto buňky mají transmembránové přenašeče obsahující ATP-vazebnou a transmembránovou doménu, které jim umožňují přenos látky přes membránu. Slouží jako „drug-efflux“ transportéry, zbavují buňky látek pro ně škodlivých. Za patologických stavů buňku zbavují léků, čímž zajišťují přežití nádorové populace. Tak buňky odolávají běžně používaným chemoterapeutikům (například doxorubicin nebo paclitaxel [11]). Právě buňky takto izolované bývají obohaceny o vlastnosti kmenových buněk [44] a o kmenové proteiny (*Nanog*, *Notch1*, *SOX2*) [44].

Na základě předchozích výzkumů lze pro jednotlivé typy nádorů sestavit soubor protilátek [35], [21], které jsou v populaci našeho zájmu specificky exprimované. Protilátkou obarvené vzorky jsou zkoumány fluorescenční mikroskopií. Takt lze získat informaci nejen o tom, zda dochází k expresi předem vybraného znaku, ale také o jeho lokalizaci v rámci nádoru či orgánu.

Po převedení tkáně na jednobuněčnou suspenzi lze fluorescenčně značené buňky třídit pomocí FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting). Populace nesoucí určitý znak dokážeme získat přesně vytríděné a tedy uniformní a zároveň je můžeme kvantifikovat [36], [14].

Po izolaci populace našeho zájmu je třeba ověřit, že se opravdu jedná o buňky s kmenovými vlastnostmi. To lze potvrdit několika způsoby:

5.1 In-vitro sferoidy

Mezi nejběžnější způsoby ověřování schopnosti vytvořit komplexní nádor patří zkoumání 3D sferoidů, které vznikají množením a diferenciací progenitorových buněk. Existuje mnoho způsobů výsevu CSC a pěstování různých druhů sferoidů, pro výzkum CSC znaků je podstatné znát fenotyp buněk, ze kterých je odvozen daný sferoid. Proto je výhodný výsev po 1 buňce, tak je zachována klonalita jednotlivých sferoidů. Pro správný růst se používají tzv. média kmenových buněk obohacená například o epidermální a fibroblastový růstový faktor [52]. Ačkoliv je metoda zkoumající sferoidy snadná, jedná se pouze o *in-vitro* experiment. Podle neurologických studií tato metoda nadsazuje počet kmenových buněk až o 1 řád [53]. Zdá se, že nejen CSC jsou schopné dát vznik sferoidům, proto byl vyvinut SSS (Standardized Sphere Score) parametr, který tento nepoměr upravuje [54].

Další velkou nevýhodou sferoidů je dle mého názoru i fakt, že v porovnání s reálnou situací v nádoru jsou limitovány difuzí živin, neboť nedochází ke vzniku nové vaskulatury a celkově jsou vytrženy z kontextu organismu. Pokud necháme sferoidy dorůst pouze malých rozměrů, je limitace difuzí zanedbatelná. *In-vivo* implantace buněk do imunodeficientních modelových organismů je přesnější, metoda *in-vitro* sferoidů je však ekonomicky dostupná.

5.2 Xenotransplantační modely

K ověřování kmenového charakteru *in vivo* se používá implantace buněk do zvířecích modelů.

5.2.1 Myší imunodeficientní modely

V současné době existuje mnoho myších imunodeficientních modelů, do kterých lze CSC implantovat, abychom ověřili schopnost indukovat komplexní nádor. Hojně využívaným modelem jsou tzv. NSG (NOD/LtSz-SCID IL2rgtm1Wjl/Szj) myši. Změnou prvního exonu genu *IL2rg* došlo k úplné ztrátě tohoto genu pro γ řetězec receptoru pro

interleukin 2. Odebráním jeho funkce je znemožněn správný a úplný proces maturace NK buněk, T- a B-lymfocytů. Oproti normálním laboratorním myším, které se dožívají 3-4 let, se NSG myši dožijí pouze 90 týdnů, což stále poskytuje dostatečnou dobu k pozorování vývoje po implantaci zkoumané populace buněk. Nádorové buňky transplantované do NSG myši nemusí být obohaceny o „basement membrane-like matrix“, neboli Matrigel, který byl nezbytný pro uchycení nádoru v předchozích modelech, ale zároveň mohl zkreslovat výsledky, je pouze třeba je ozařovat [55]. Přesto mají tyto myši jednu omezující vlastnost pro výzkum nádorů, a sice nepřítomnost lymfatických uzlin, do kterých v normálním organismu často pronikají metastáze. Ve své práci je používá Volkmer a kol. [8].

Další dlouho a často využívaný kmen vznikl mutací genu aktivujícího rekombinaci a genu γ řetězce cytokinového receptoru. Tyto dvě změny vedly k odstranění funkce lymfocytů, které nemohou vytvářet své receptory [56]. *RAG2- γ c-* myši vykazují vysokou schopnost uchytit lidské buňky a jsou tak vhodným nástrojem pro studium CSC. Ve své studii BCa CSC, která je pro tuto práci klíčová, je používá například Chan a kol. [14]. Stručný přehled výběru myších imunodeficientních kmenů je i s jejich charakteristikou a pracemi, které je využívají, uveden v Tabulce 3.

Tab. 3. Výběr myších imunodeficientních kmenů, převzato a upraveno podle [55]

Kmen	Mutovaný gen	Charakteristika	Nevýhody	Studie
SCID	<i>Prkdc^{scid}</i>	Chybí funkční T- a B-buňky	Přítomnost NK buněk, krátká životnost	
NSG	<i>Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}</i>	Chybí funkční T-, B- a NK-buňky, dlouhá životnost, snadno přijímají lidské implantáty	Chybí lidské MHC a cytokiny	[57]
CD1-Nude	<i>Foxn1^{nu}</i>	Chybí T-buňky	Nízká úspěšnost uchycení lidských nádorových buněk, aktivní NK buňky	[58]
RAG2- γ c-	<i>RAG2-γc-</i>	Chybí funkční T a B buňky a NK buňky		[14]

5.2.2 Zebřička (*Danio rerio*)

Vedle myších kmenů se ke studiu CSC v posledních letech uplatňuje nový modelový organismus *Danio rerio* (Danio pruhované, anglicky „zebra fish“). Jeho použití umožňuje

množství homologií v genomu člověka a zebřičky [59]. Zásadní jsou homologie klíčových domén, díky nimž je vývoj rakoviny v těchto organismech biologicky téměř totožný, zvláště co se týče genů kódujících onkogeny, genů buněčného cyklu a tumor-supresorových genů [60]. Výhodou je průhledné tělo a malá velikost, které umožňují pohodlnou *in vivo* fluorescenční mikroskopii. Největší výhodou je ale imunitní systém, který není potřeba nijak imunokompromitovat před implantací zkoumaných kmenových buněk do larvy [60], což zlevňuje a zjednodušuje proces.

Pro výzkum BCa nebyl tento organismus zatím využit, ale zkoumány na něm byly jiné karcinomy, například gliom a melanom [61].

5.3 Expresní profilování

RNA sekvenace poskytuje klíčové informace o buněčné populaci. Mnohé typy sekvenování nové generace (NGS) zrychlují a zlevňují celý proces. Porovnáním sekvenačních dat z nádoru se zdravou tkání lze hledat mutace, které jsou příčinou patologických stavů buňky. Avšak pokud pracujeme s organismem, jehož genom již byl v minulosti osekvenován a anotován, což je případ výzkumu BCa CSC u lidí, nabízí se rychlejší, dostupnější metoda zkoumání expresních profilů pomocí „microarray“.

Expresní profily vzorků lze získat extrakcí RNA a následnou hybridizací nejčastěji s komerčně syntetizovanými sondami. Porovnáním se zdravou populací lze najít geny důležité pro vývoj onemocnění. Celý proces je následován poměrně náročnou analýzou dat [31]. „Microarray“ hybridizační studie expresních profilů většinou neposkytují informaci o genomové DNA, ale pouze o vybraných genech. Dnešní metody umožňují paralelní hybridizaci desítek prób najednou, a tak poskytují dostatečné množství informací o exprimovaných genech.

Metoda RNA profilování umožnila analýzu souboru genů unikátně diferenciatně exprimovaných ve třech formách BCa: NMIBC (povrchový nádor), povrchový nádor s CIS („carcinoma in situ“, tj. léze v přiléhajícím urotelu) a MIBC (svalovinu napadající nádor). Na základě takto zjištěného genového otisku, sestávajícího z 16 genů, lze usuzovat na přítomnost CIS [62].

6 Povrchový fenotyp nádorových kmenových buněk karcinomu močového měchýře (BCa CSC)

V dnešní době bylo provedeno mnoho genomických studií snažících se nalézt unikátní genové otisky různých stádií a typů onemocnění BCa. Na základě takového otisku lze stanovit typ onemocnění a rizika s ním spojená [15]. Existují i snahy nalézt genový otisk BCa CSC (např. [21] [50]), který umožní zefektivnit léčbu (viz 4.2 Význam CSC pro cílení léčby). Ve výzkumu BCa CSC se často uplatňují poznatky o kmenových buňkách zdravé tkáně. Hledání znaků BCa CSC se tedy mimo jiné odvozuje od znaků bazálních buněk urotelu.

6.1 Tři molekulárně a funkčně charakterizované subtypy BCa související s CSC

Na základě diferenciální exprese keratinů a povrchových znaků rozlišuje Volkmer a kol. 3 typy buněk v BCa: bazální ($KRT14^+KRT5^+KRT20^-$, resp. $CD44^+CD49f^+CD90^+$), intermediální ($KRT14^-KRT5^+KRT20^-$, resp. $CD44^+CD49f^+CD90^-$) a diferencovaný ($KRT14^-KRT5^-KRT20^+$, resp. $CD44^-CD49f^+CD90^-$). Podle přítomnosti těchto znaků lze rozlišit bazální, intermediální a diferencovaný typ buněk. Podle statistických zpracování vzorků 492 pacientů je právě bazální typ spjat se špatnou prognózou onemocnění. Kolem 50 % vzorků se však v této studii nepodařilo klasifikovat. Poté byla provedena i analýza KRT14 jakožto prognostického znaku. KRT14 je exprimován v nediferencované bazální a střední vrstvě buněk. Bylo prokázáno, že jeho přítomnost znamená v průměru kratší věk dožití pacienta. KRT14 je tedy prognostickým vodítkem [8].

Další studie zkoumající bazální typ BCa 85 pacientů s MIBC, která nalezla 40-genový soubor charakteristický právě pro bazální BCa, zjistila, že buňky bazálního typu jsou k růstu povzbuzovány pozitivní autokrinní smyčkou stimulující jejich EGFR. Při blokaci amphiregulinu, jednoho z ligandů EGFR, došlo ke snížení růstu buněk z buněčné linie bazálního MIBC [63]. Tyto výsledky jsou povzbudivé pro použití inhibice EGFR signalizace v léčebném procesu.

Studie založená na statistickém zpracování veřejně dostupných dat z ChIP-sekvenování (chromatinová imunoprecipitace) opět dělí BCa do tří kategorií, tentokrát na základě exprese jiných genů: urobazální, genomicky nestabilní a SCC-subtyp, které odpovídají třem typům rozlišeným expresí keratinů. Tyto třídy mezi sebou navzájem odlišuje především proliferační aktivita, která výrazně stoupá směrem od urobazálního typu. Dvě posledně jmenované kategorie se vyznačují růstem nezávislým na bazální lamině. Tato

klasifikace je aplikovatelná i na karcinom prsu [64], o jehož příbuznosti s BCa víme už na základě COCA klasifikace.

Tab. 4. Povrchové znaky bazálního typu BCa

	Znak	Zdroj		Znak	Zdroj
Keratiny	KRT14	[8]	Povrchové znaky	CD90	[8]
	KRT5			CD44	
	KRT17	[21]		CD49f (ITGA6)	
		CD248			
				COL1A1	

6.2 Jednotlivé genové podpisy BCa CSC

Během let výzkumu byly pro BCa CSC zjištěny následující genové podpisy.

6.2.1 CD44v6⁺MUC1⁻

Zkoumáním přítomnosti znaků bazálních uroteliálních buněk u CSC byla zjištěna mimo jiné specifická exprese 2 významných znaků. **CD44v6** je jakožto povrchový glykoprotein exprimován jak bazálními buňkami zdravého urotelu tak nádorové masy. V nádorových buňkách se ale vyskytuje i ve vrstvách blíže k povrchu. Naopak pro epitely typický **MUC1 (CD227)** na površích této subpopulace chybí. Další specifický povrchový znak **FGFR3**, byl u těchto buněk zvýšen, ale pro izolaci BCa CSC se jako přínosné ukázaly pouze předchozí dva. Buňky nesoucí jeden z těchto znaků (CD44v6⁺, MUC1⁻) mají proliferační potenciál a jsou schopné tvořit kolonie z jediné buňky [50].

CD44 je povrchový glykoprotein zodpovědný za adhezi buněk k extracelulární matrix. Výskyt jeho abnormálních isoform (zvláště exonu v6) je spojen s agresivitou karcinomů. V roce 2014 byla provedena studie, která říká, že přítomnost CD44v6 v moči pacientů je dostatečným znakem k důkazu přítomnosti NMIBC v těle [65]. Již roku 2005 však bylo prokázáno, že CD44v6⁺ buňky z buněčných linií odvozených z BCa mají oproti CD44⁺ buňkám vyšší proliferační aktivitu [66], což neodpovídá vlastnostem CSC, které se dělí jen pomalu, a expresní studie na buněčných liniích ukázala, že se zvyšujícím se stupněm onemocnění se exprese CD44v6 snižuje [65]. Zdá se, že CD44v6 tedy nelze považovat za znak, na jehož základě by bylo možné izolovat CSC, ale má význam jako diagnostický ukazatel pokročilosti nádoru. Přínosná je i možnost neinvazivně stanovením jeho přítomnosti v moči diagnostikovat NMIBC.

6.2.2 CD44⁺ buňky indukující nádor (a z nich odvozené znaky)

Chanova studie z roku 2009 ukázala, že buňky izolované z nádorů pokročilého stupně jsou úspěšnější při tvorbě nových nádorů po transplantaci do myších imunodeficitních modelů [14]. Další charakteristika BCa CSC byla založena na zjišťování exprese znaků epiteliální diferenciace, a to **CD133**, **CD49f**, **CD166**, **CD105**, **CD117** a **CD44**. CD44⁺ buňky byly na rozdíl od ostatních znaků nalezeny ve většině vzorků (13/14), kde představovaly od 3 % do 36,6 %. CD44⁺ buňky byly již při nízkých dávkách (100-1000 buněk) schopné vytvořit nádor v RAG2⁻/γc⁻ myši. Toto číslo je sice vysoké, ale frakce CD44⁺ je velká a zřejmě neobsahuje pouze BCa CSC. Směrodatná je úroveň exprese CD44, spíše než jeho pouhá přítomnost. CD44⁻ buněk je k vytvoření nádoru potřeba o dva řády více. CD44⁺ buňky mají velké jádro a jsou tvarově uniformní, zatímco CD44⁻ subpopulace obsahuje morfologicky různé buňky a vykazuje vzhled diferencované tkáně. Analýza expresních profilů CD44^{high} buněk odhalila soubor 477 genů se zvýšenou expresí u této populace. Buňky vykazující tento genový otisk Chan nazývá jako T-IC (tumor-initiating cells). Mezi aktivací tohoto otisku a invazivitou nádoru byla nalezena pozitivní korelace [14]. Naopak represe těchto znaků se vyskytuje u neinvazivních forem onemocnění a souvisí s delší dobou mezi opětovnými výskyty onemocnění. Mimo pozitivitu pro CD44 se BCa CSC shodují s normálními bazálními uroteliálními buňkami i v diferenciální expresi intracelulárních proteinů KRT5 a KRT20 (viz 6.1 Tři molekulárně a funkčně charakterizované subtypy BCa související s CSC).

Dalším významným znakem BCa CSC je **CD47**, který je exprimován na 80 % nádorových buněk, především v okrajových částech masy. Podstatné je, že vysoká hladina exprese CD47 kolokalizuje s CD44^{high} populací [14]. CD47 se jeví jako potenciálně přínosný znak pro klinické využití. Jeho přítomnost je charakteristická pro buňky tělu vlastní, ve vysokých množstvích především na kmenových buňkách. Jeho interakce se SIRPα molekulou makrofágů zabraňuje fagocytóze příslušné buňky a chrání tak tělo před autoimunitní reakcí [12]. Pro makrofágy je buňka exprimující CD47 neviditelná. Proto je jejich exprese zásadní právě v okrajových částech nádoru, které jsou vystaveny okolí [14]. Okrajové buňky nádoru vykazují fenotyp CD44^{high} / CD47^{high}, což odhaluje strategii stavby nádoru, kde periferie chrání jádro. Inkubací CD47⁺ nádorových buněk s CD47 monoklonální protilátkou v přítomnosti makrofágů byla umožněna fagocytóza *in vitro* [14]. Z toho lze vycházet při vývoji nových léčebných strategií.

Důležitým znakem je i **CD24** (alternativní receptor P-selektinu), který je významným znakem CSC řady karcinomů a jeho přítomnost je nezbytná pro tvorbu metastáz [67]. BCa CSC s otiskem T-IC vykazují fenotyp CD44⁺CD24⁻. Na základě nálezu CD24 v CSC-obohacených populacích buněk karcinomu prsu, slinivky a vaječníku byla zkoumána exprese tohoto znaku také u BCa. Zajímavostí je, že CD24⁺ subpopulace nádoru se neshodovala s CD44^{high}/CD47^{high} buňkami, přesto byla nalezena statisticky významná pozitivní korelace mezi přítomností těchto znaků a úmrtností pacientů a to jak pro CD24 tak pro CD44. Exprese CD24 na povrchu nádorových buněk má význam v prognostice, ale na budoucí průběh onemocnění lze usuzovat pouze v kontextu současného stádia nemoci [57].

CD24 byl navíc vysoce exprimován v sekundárních metastatických nádorech odvozených z BCa. Blokování monoklonální protilátkou zpomalilo růst metastáz. Zvýšená exprese CD24 dokonce vedla k vyšší proliferaci metastáz v plicích [67].

Ačkoliv má CD24 podobně jako CD44 vypovídací hodnotu co se prognózy týče, a navíc je nezbytný pro invazi BCa do plic, jeho role v BCa CSC je diskutabilní, neboť CD24⁺ populace buněk není zcela totožná s CD44^{high} BCa CSC.

O rok novější studie navazující na předchozí znovu dokázala, že ne všechny CD44⁺ buňky indukují ve zvířecích modelech tumory. Proto autoři navrhují jiný otisk - kombinaci znaků CD44⁺/ALDH1A1⁺, což je typ intracelulární aldehyddehydrogenázy [68]. ALDH1A1 se navíc běžně nevyskytuje ve zdravém urotelu, ale pouze v nádorem postižené tkáni. Klonogenní potenciál CD44⁺ALDH1A1⁺ subpopulace a ALDH1A1⁺ subpopulace byl navíc srovnatelný a zároveň vyšší než u subpopulace CD44^{high}, což dokazuje významnou roli tohoto znaku.

CD44^{high} subpopulace buněk je zároveň zodpovědná za rekurenci onemocnění u pacientů skrze její zvýšenou rezistenci k cisplatině, standardnímu léčivu. Studie z roku 2012 ukazuje, že blokáci proteinu tepelného šoku HSP90 v CD44^{high} buňkách dochází při podání cisplatinu ke snížení jejich rezistence. To se děje kvůli zvýšené míře apoptózy, která je způsobena zablokováním HSP90 [49].

Na základě exprese výše uvedených znaků dokážeme předvídat, zda dojde k rozvoji onemocnění do MIBC. CD44 je sice jako znak BCa CSC velmi senzitivní, ale není dostatečně specifický, aby pouze na základě tohoto jediného znaku bylo možné izolovat čistou populaci BCa CSC.

6.2.3 Genový otisk HTC (a z něj odvozené znaky)

Studie 55 lidských vzorků invazivního BCa, která na základě exprese lamininového receptoru RPSA (značeného protilátkou 67LR), vytřídila vysoce nediferencovanou populaci [21]. RPSA navíc ukázal silnou kolokalizaci s biomarkerem uroteliálních kmenových buněk KRT17. Exprese RPSA byla zvýšena u 80 % buněk invazivních nádorů pokročilého stádia. *In vivo* kolokalizace s KRT17, exprimovaným pouze v bazální části urotelu, byla prokázána i histochemicky na řezech z primárních nádorů [21].

Expresní profily RPSA⁺ buněk ukázaly zvýšenou aktivitu Wnt signální kaskády. Komponenty této dráhy jsou zodpovědné za udržování nediferencovaného stavu kmenových buněk [69]. Stejným způsobem byl nalezen soubor 1079 genů zvaný HTC (highly tumorigenic cells), jejichž exprese byla u RPSA⁺ buněk významně změněna oproti RPSA⁻ a na jejichž základě lze tyto buňky odlišit. Jedná se o geny zodpovědné za proliferaci, apoptózu, růst a transkripční faktory. 60 % bazálních buněk (KRT17⁺) se zvýšenou hladinou RPSA mělo schopnost tvořit nádory po transplantaci do „nude“ myši postrádajících T-buňky. Naopak *in vitro* pokusy na buněčných liniích neprokázaly shodu pro expresi KRT17 a RPSA. Spolu s RPSA byl studován protein **CD66c** (jedna z izoform CEACAM). Bazální buňky s fenotypem CD44⁺CD66c⁻ vykazovaly mnohonásobně větší potenciál tvořit nádory než CD44⁺CD66c⁺ [21]. CD66c je tedy negativní znak BCa CSC, který pomáhá v nadbytečném množství CD44⁺ buněk specifikovat ty, které mají kmenové vlastnosti. Jiná isoforma, **CD66e**, byla stejně tak označena jako negativní znak ve studii expresních profilů zkoumající SOX4⁺ BCa CSC z roku 2015. Naproti tomu exprese receptorů růstových faktorů **FGFR1** a **FGFR3** zde byla oproti zdravé tkáni významně zvýšena [70].

Zvýšenou expresi vykazuje i **CD49f**, na nějž u bazálních buněk urotelu poukázal i Volkmer a kol. [8] (viz 6.1 Tři molekulárně a funkčně charakterizované subtypy BCa související s CSC). Jak již bylo řečeno, zjistil, že nejméně diferencovanou subpopulací buněk je populace CD90⁺CD44⁺CD49f⁺KRT14⁺. Vedle těchto znaků tyto buňky exprimují povrchové proteiny, které je odlišují od ostatních dvou kategorií, např. adhezivní molekuly **ICAM1**, integriny **ITGA5** a **ITGB2** a další povrchový protein **CD86**. V souladu s předchozími poznatky tato populace vykazovala fenotyp CD44^{high}. Xenotransplantací těchto buněk (CD90⁺CD49f⁺CD44⁺) do SCID myši se podařilo ověřit jejich tumorigenní potenciál. Bazální buňky byly jako jediné z celého nádoru v počtu 1000 buněk schopné vyvolat nádor. Zatímco CD49f je přítomen na všech buňkách

nádoru, ale na BCa CSC je jeho exprese zvýšena, CD90 se vyskytuje právě výhradně na této populaci.

Méně optimistické výsledky podala studie buněčných linií BCa. Ve všech 11 buněčných liniích byly detekovány CD49f⁺ buňky, **CD90⁺** taktéž, ale jejich zastoupení v různých liniích se výrazně lišilo od 0,75 % do 99,5 %. Lehce zvýšený klonogenní potenciál a cisplatinová rezistence byly zaznamenány pouze u čisté CD90⁺ frakce buněk vytríděné pomocí FACS. U populací obohacených o CD90⁺ buňky metodou magnetického MACS se tyto výsledky nepotvrdily. Výsledné populace vypěstované z CD90⁺ obohacených frakcí i z těch, ze kterých byly CD90⁺ buňky odebrány, měly srovnatelný podíl CD90⁺ a CD90⁻ buněk. Rezistence vůči cisplatině byla zvýšená také jen u FACS metodou vytríděné CD90⁺ populace. Při několikaměsíčním podávání cisplatinu nedošlo k navýšení CD90⁺ buněk, což bychom očekávali, pokud by tento znak byl spojen s kmenovostí buněk a s rezistencí k cisplatině [71]. Jedná se však o studii buněčných linií, jejíž vypovídací hodnota vzhledem k primárním nádorům je v porovnání s Volkmerovou prací nízká.

Genomickými studii [14], [21] nebyla zjištěna charakteristická exprese CD90, avšak Volkmerova studie jasně dokazuje, že tento znak charakterizuje vysoce nediferencovanou, kmenovou populaci v primárních nádorech.

V roce 2015 Cheah a kol. navrhl další genový otisk, který stanovuje BCa CSC jako CD90⁺**CD14⁺**. CD14 je molekula typická pro myeloidní buňky. Při injekci 10⁵ těchto buněk z linie MB49 a 639V do NSG myši byly po 4 a 8 týdnech (resp.) pozorovány indukované subkutánní nádory. Ač je počet buněk vysoký, lze předpokládat, že zmiňovaná populace obsahuje alespoň frakci BCa CSC. Dále bylo zjištěno, že CD14^{high} buňky se podílí na vytváření lokálního zánětlivého mikroprostředí, které podporuje proliferaci nádoru. Nejvyšší nárůst exprese oproti CD14^{low} buňkám byl zaznamenán u IL-6 (odpovědný za systémový zánět) a IL-8 (chemokin, chemoatraktant pro neutrofilní granulocyty). Dále produkují CD14^{high} buňky prozánětlivé signály jako jsou NO a prostaglandin E₂, a mají zvýšenou expresi „pattern-recognition“ receptorů TLR2, TLR3, TLR4 a TLR7, jejichž aktivace vede k produkci chemoatraktantů. Tyto buňky jsou schopné do nádoru přilákat myeloidní buňky. Zvyšují vaskularizaci nádoru, což umožňuje přísun živin do jeho vnitřních částí [72]. Význam CD14 jakožto BCa CSC znaku je diskutabilní. Přesto je potřeba zdůraznit jeho přínos pro růst nádoru při nastavení mikroprostředí.

Naproti tomu práce z roku 2015 ukazuje, že počet TLR2⁺ a TLR4⁺ BCa CSC je oproti normálním uroteliálním kmenovým buňkám snížen. **CD117**, další ze znaků, kterými se tato studie zabývá, je naproti tomu exprimován na srovnatelné úrovni jak u zdravých kmenových buněk, tak u CSC invazivního i papilárního BCa [73].

6.2.4 Otisk „buňky původu“ (a z něj odvozené znaky)

Současné genomické a statistické metody naznačují, že odvozování znaků CSC od bazálních buněk urotelu je relevantní pouze pro BCa CSC invazivní formy [14]. Pokud by se buňky svrchních vrstev urotelu vyvíjely pouze z buněk bazálních, těžko bychom našli vysvětlení pro vznik povrchového karcinomu. Předpokládá se, že kmenové buňky MIBC i NMIBC jsou odlišného původu a BCa CSC svalovinu napadajícího karcinomu jsou odvozeny od normálních progenitorových buněk urotelu [13]. To bylo zjištěno na základě tzv. „COO signature“, z anglického „Cell-Of-Origin“, znamenající buňka původu. Pomocí RNA profilování 8 vzorků urotelu byl stanoven tento COO podpis, tedy soubor 186 genů diferenciaciálně exprimovaných mezi bazálními a „umbrella“ buňkami. Mezi povrchovými znaky se jednalo o **CD27**, **CD37**, **CD36**, **CD93**, dále o podjednotky kolagenu **COL24A1**, **COL6A1**, a integrin **ITGA4**. Porovnáním tohoto otisku s předchozími otisky u MIBC bylo zjištěno, že buňky vykazující T-IC nebo HTC dosahují vysokého COO skóre, které reflektuje míru „bazálnosti“, resp. kmenovosti. To znamená, že buňky označené v literatuře jako CSC sdílí podobné znaky s uroteliálními kmenovými buňkami. Z toho soudím, že právě tyto kmenové buňky daly vzniknout MIBC CSC. COO otisk je také diagnostický ukazatel co se týče stádia onemocnění a zároveň i prediktivní nástroj. Statistické analýzy prokázaly, že klonální podoba každého nádoru je nezávisle na podobnosti CSC unikátní. To potvrzují i různé míry mutací jednotlivých onkogenů jako např. *p53*, *KDM6A* apod. [13].

Efektivním obranným mechanismem CSC, který byl studován mimo jiné i na buňkách NMIBC, je exprese ABC transportérů. Zvýšená exprese (konkrétně se jedná o **ABCG2** a **ABCB1**) byla zaznamenána u subpopulace rakovinných buněk, která byla schopna tvořit sferoidy a u níž byla navýšena i exprese CD44 a CD47, kromě toho tyto buňky exprimovaly nadměrné množství SOX2, což je obecný znak embryonálních kmenových buněk. ABCG2^{high} buňky navíc ve 100 % případů vedly po implantaci 10³ buněk do „CD1 nude“ myši k vytvoření nádoru, na rozdíl od ABCG2^{low} buněk. Porovnáním intenzity imunologického barvení preparátů s klinickými daty bylo zjištěno, že u pacientů s vyšší

expresí ABCG2 postupovalo onemocnění rychleji a ve srovnání s ABCG2^{low} pacienti se karcinom vrátil po kratší době [44].

Charakterizací SP, tedy populace buněk schopných zbavit se barviva Hoechst 33342 pomocí ABC transportérů, byla objevena také role **ITGAV (CD51, integrin α v)** v tumorigenezi BCa. Buňky z buněčné linie byly knock-outované v genu pro tento integrin a posléze byla ověřována jejich tumorigenicita. Knock-outované buňky vykazovaly sníženou schopnost růstu a jejich sferoidy nedosahovaly velikosti buněk nemodifikovaných. V návaznosti na zjištění Y. Su [68], kde navrhuje ALDH1 jako biomarker BCa CSC, byla kvantifikována populace ALDH1^{high} buněk v buněčné linii před a po delecí genu *ITGAV*. Podle očekávání se tato frakce snížila z 18 % na 3 % [74]. Zvýšená exprese *ITGAV* byla zaznamenána i u buněk vykazujících vysokou tumorigenicitu [21]. Tím se jen potvrdila platnost ALDH1 jakožto znaku BCa CSC. *ITGAV*-deletovaná subpopulace navíc vykazovala zvýšený poměr E-kadherinu k N-kadherinu, což znamená, že zrušením integrinu došlo k transformaci buněk spíše na epiteliální typ, (MET – opačný proces k EMT), což zabraňuje metastázám. Samotný *ITGAV* se tedy jeví jako funkčně významný znak BCa CSC.

6.2.5 Další znaky

Studie provedená v roce 2010 v Itálii na buňkách karcinomu přechodného urotelu byla zaměřena na znaky CSC jak povrchové (CD133), tak intracelulární (nestin, Oct-3/4). Zvláštní odolnost buněk prokázala jejich schopnost tvořit sferoidy v mediu bez séra obsahujícím pouze růstové faktory. V takto pěstovaných buňkách byl však zjištěn menší podíl CD133⁺ buněk (85 %) oproti kultuře kultivované za standardních podmínek (téměř 100 % adherentních buněk). CD133⁺ buňky byly dokonce nabohacené v kultuře, kde byla inhibována adheze buněk, což odpovídá představě, že tyto buňky mají kmenový charakter. Shoda mezi expresí CD133 a dalších kmenových znaků byla potvrzena, avšak takto izolované CSC nevytvořily nádory po transplantaci 10⁵ buněk do „CD1 nude“ myši postrádajících T-buňky [58]. Tento výsledek nemusí být považován za neúspěch, neboť xenotransplantace byla v této studii provedena pouze u 2 zástupců, což není dostatečné množství, když uvážíme, že při podobných pokusech s CD44⁺ CSC se uchytilo 5 ze 14 xenotransplantátů [75].

Pozitivní výsledky xenotransplantačních testů přinesla až studie, která se také opírá o koexpresi kmenových znaků Sox-2 a Oct-4 s CD133, ale pouze u buněčné linie J82.

Kromě toho CD133⁺ buňky prokázaly zvýšenou rezistenci vůči chemoterapii cisplatinou, vůči BCG a i radioterapii. Na rozdíl od předchozí studie se zde podařilo prokázat tumorigenicitu CD133⁺ populace i *in vivo*. CD133⁺ i CD133⁻ subpopulace buněk byly injikovány do myši v množství 10⁶ buněk, kde vytvořily subkutánní nádory. Nádory utvořené z CD133⁺ buněk dorostly větších rozměrů [76].

CD133 není dle cytometrických výsledků T-IC otisku koexprimován CD44^{high} buňkami [14], což opět zpochybňuje jeho význam jakožto znaku BCa CSC. Vzhledem k tomu, že pozitivní výsledky xenotransplantačních testů přinesly pouze studie z buněčných linií, nikoliv z tkáňových vzorků, nelze CD133 považovat za věrohodný znak BCa CSC.

6.2.6 Přehled vybraných povrchových znaků BCa CSC

Název znaku	Zdroj buněk, ve kterých byl prokázán	Pozitivní/negativní znak	Cit.	Význam, funkce	PB	Model
CD44	Vzorek tkáně	+	[14]	Rozlišení MIBC a NMIBC	10 ²	RAG2 ⁻ γc ⁻
CD44v6	Vzorek tkáně	+	[50]	Ukazatel pokročilosti onemocnění, vhodný diagnostický znak z moči	-	-
MUC1	Vzorek tkáně	-	[50]		-	-
CD133	Buněčná linie, vzorek tkáně	+	[58]		10 ⁶	CD1 nude
CD66c	Vzorek tkáně	-	[21]		10 ⁶	CD1 nude
ABCG2, ABCG1	Vzorek tkáně	+	[44]	Zodpovědný za drug efflux, detekce SP	10 ³	CD1 nude
CD24	Buněčná linie	-	[67]	Nezbytný pro tvorbu metastáz	-	-
CD14	Buněčná linie	+	[72]	Tvoří zánětlivé mikroprostředí	10 ⁵	NSG
ITGAV	Buněčná linie	+	[74]	Podílí se na EMT	-	-
CD90	Vzorek tkáně	+	[8]	Značí nediferencovanou populaci	10 ³	SCID
CD49f	Vzorek tkáně	+	[8]		10 ³	SCID
CD47	Vzorek tkáně	+	[14]	Obrana před imunitním systémem	-	-

PB = Počet buněk implantovaných do myši, Model = xenotransplantační model, ve kterém byla ověřena tumorigenicita

7 Závěr

Koncept nádorových kmenových buněk je již dlouho používaným a všeobecně přijímaným pojmem nádorové biologie. Jako CSC tedy označujeme buňky, které jsou

málo diferencované a dokáží svým dělením dát vznik jak samotným CSC tak buňkám diferencovaným. Schopnost vytvořit heterogenní nádorovou masu buněk je ověřována xenotransplantací do myších imunodeficitních modelů.

Specificky pro BCa CSC bylo za léta výzkumu prokázáno několik povrchových znaků.

CD44 je zásadním znakem pro charakterizaci BCa CSC. BCa CSC jsou označovány jako CD44^{high} a podobně je tomu i u CSC karcinomu prsu, střeva, hlavy a krku, prostaty a kůže (shrnuto v [14]). U BCa jsou CD44 a CD24 exprimované na různých populacích buněk, CD24⁺ populace buněk je u BCa zodpovědná za invazi karcinomu do dalších orgánů, především do plic. Negativním znakem BCa CSC je MUC1. MUC1 je opět důležitým hráčem v karcinomech obecně. MUC1-deficitní fenotyp je spojen s pokročilými stádii rakoviny prsu, naopak přítomen je téměř vždy v počátečních stádiích a v nádorech malých rozměrů [77].

Dalším znakem asociovaným s CD44⁺ u BCa CSC je vysoká exprese CD47. Tato molekula je významná pro svou schopnost zabránit fagocytóze makrofágy a nabízí se tak k využití jakožto cíl léčebných prostředků.

CD44v6, mutantní forma CD44, je klinicky významný znak, který může být v solubilní formě včasným biomarkerem NIMBC z moči [50].

BCa CSC fenotyp je charakterizovaný také vysokou expresí lamininového receptoru RPSA. Kromě toho tyto buňky vykazují fenotyp CD90⁺CD14⁺CD49f⁺CD66c⁻ [21]. Charakterizace zejména CD14⁺ epiteliální subpopulace je významná z hlediska vývoje nádoru, neboť právě tyto buňky exprimují mnoho TLR receptorů a jsou schopné nalákat do nádoru buňky myeloidní linie, které se podílí na dlouhodobém vytváření nádorového mikroprostředí.

Terapeuticky významná je exprese ABC-transportérů u BCa CSC. Ty jsou zodpovědné za rezistenci nádoru vůči terapii, neboť z nádorové buňky vypumpovávají chemoterapeutika. Taková populace se nazývá anglickým „side population“ (SP). Kromě BCa byla jejich exprese prokázána u CSC rakoviny prsu, tlustého střeva, jater a vaječníků (shrnuto v [78]), plic, prostaty a gliomu (shrnuto v [44]). U BCa CSC byl tento fenomén studován například na ITGAV⁺ subpopulaci buněk odvozené z SP. Po delecii tohoto integrinu charakteristického pro kmenovou populaci došlo k přeměně na epiteliální typ buněk [74]. Opačný proces, EMT, pak musí logicky vést k opačnému výsledku, tedy

k přeměně na mesenchymální, méně diferencovanou buňku, která následně snadněji metastazují.

CD133 je povrchový znak, který se užívá pro izolaci CSC nejen u BCa, ale také v karcinomu prsu, plic a v nádorech mozku a jater [78]. Přesto studie střevního karcinomu z roku 2008 naznačuje, že exprese CD133 není omezena pouze na CSC, ale spíše je charakteristická pro diferencované epiteliální buňky, a že oba typy buněk (CD133⁺ a CD133⁻) jsou schopné indukovat sferoidy *in vitro* a nádory *in vivo* [79]. Ani u BCa nejsou výsledky tohoto znaku optimistické. Jejich exprese se neshoduje s expresí CD44 a zdá se tedy, že CD133 není vhodným biomarkerem BCa CSC.

Znalost biomarkerů BCa CSC je zásadní pro vývoj nových léčebných postupů a prostředků. V dnešní době máme dostatek poznatků o tom, jakým povrchem se tyto buňky vyznačují, což je první krok k přípravě léků, které budou schopné eradikovat především BCa CSC a zamezí tak návratnosti onemocnění.

8 Seznam použité literatury

- [1] WHO | The top 10 causes of death. *WHO* [online]. 29. únor 2016 [vid. 2016-únor-29]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- [2] PROFESSIONALS, Sumedia-Online. Oncology Guidelines. *Uroweb* [online]. [vid. 2016-duben-28]. Dostupné z: <https://uroweb.org/individual-guidelines/oncology-guidelines/>
- [3] HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, roč. 144, č. 5, s. 646–674. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- [4] SAVAGNER, P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Annals of Oncology* [online]. 2010, roč. 21, č. Supplement 7, s. vii89-vii92. ISSN 0923-7534, 1569-8041. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdq292
- [5] VAN DER HORST, G., L. BOS a G. VAN DER PLUIJM. Epithelial Plasticity, Cancer Stem Cells, and the Tumor-Supportive Stroma in Bladder Carcinoma. *Molecular Cancer Research* [online]. 2012, roč. 10, č. 8, s. 995–1009. ISSN 1541-7786, 1557-3125. Dostupné z: doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0274
- [6] CHAFFER, Christine L., Ines BRUECKMANN, Christina SCHEEL, Alicia J. KAESTLI, Paul A. WIGGINS, Leonardo O. RODRIGUES, Mary BROOKS, Ferenc REINHARDT, Ying SU, Kornelia POLYAK, Lisa M. ARENDT, Charlotte KUPERWASSER, Brian BIERIE a Robert A. WEINBERG. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2011, roč. 108, č. 19, s. 7950–7955. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1102454108

- [7] MACKILLOP, W. J., J. P. BIZARRI a G. K. WARD. Cellular heterogeneity in normal and neoplastic human urothelium. *Cancer research*. 1985, roč. 45, č. 9, s. 4360–4365.
- [8] VOLKMER, Jens-Peter, Debashis SAHOO, Robert K. CHIN, Philip Levy HO, Chad TANG, Antonina V. KURTOVA, Stephen B. WILLINGHAM, Senthil K. PAZHANISAMY, Humberto CONTRERAS-TRUJILLO, Theresa A. STORM, Yair LOTAN, Andrew H. BECK, Benjamin I. CHUNG, Ash A. ALIZADEH, Guilherme GODOY, Seth P. LERNER, Matt VAN DE RIJN, Linda D. SHORTLIFFE, Irving L. WEISSMAN a Keith S. CHAN. Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2012, roč. 109, č. 6, s. 2078–2083. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1120605109
- [9] BUICK, R. N., T. H. STANISIC, S. E. FRY, S. E. SALMON, J. M. TRENT a P. KRASOVICH. Development of an agar-methyl cellulose clonogenic assay for cells in transitional cell carcinoma of the human bladder. *Cancer research*. 1979, roč. 39, č. 12, s. 5051–5056.
- [10] JORDAN, Craig T., Monica L. GUZMAN a Mark NOBLE. Cancer stem cells. *New England Journal of Medicine*. 2006, roč. 355, č. 12, s. 1253–1261.
- [11] ABDULLAH, Lissa Nurrul a Edward Kai-Hua CHOW. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine* [online]. 2013, roč. 2, s. 3. ISSN 2001-1326. Dostupné z: doi:10.1186/2001-1326-2-3
- [12] OLSSON, M., A. NILSSON a P.A. OLDENBORG. Target cell CD47 regulates macrophage activation and erythrophagocytosis. *Transfusion Clinique et Biologique* [online]. 2006, roč. 13, č. 1–2, s. 39–43. ISSN 12467820. Dostupné z: doi:10.1016/j.tracli.2006.02.013
- [13] DANCİK, Garrett M., Charles R. OWENS, Kenneth A. ICZKOWSKI a Dan THEODORESCU. A Cell Of Origin gene signature indicates human bladder cancer has distinct cellular progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)* [online]. 2014, roč. 32, č. 4, s. 974–982. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1002/stem.1625
- [14] CHAN, Keith Syson, Inigo ESPINOSA, Mark CHAO, David WONG, Laurie AILLES, Max DIEHN, Harcharan GILL, Joseph PRESTI, Howard Y. CHANG, Matt VAN DE RIJN, Linda SHORTLIFFE a Irving L. WEISSMAN. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2009, roč. 106, č. 33, s. 14016–14021. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0906549106
- [15] LIN, Xuanhui Sharron, Lan HU, Sandy KIRLEY, Mick CORRELL, John QUACKENBUSH, Chin-Lee WU a William Scott MCDUGAL. Differentiating progressive from nonprogressive T1 bladder cancer by gene expression profiling: Applying RNA-sequencing analysis on archived specimens. *Urologic oncology*

- [online]. 2014, roč. 32, č. 3, s. 327–336. ISSN 1078-1439. Dostupné z: doi:10.1016/j.urolonc.2013.06.014
- [16] THOMPSON, David B., Larry E. SIREF, Michael P. FELONEY, Ralph J. HAUKE a Devendra K. AGRAWAL. Immunological basis in the pathogenesis and treatment of bladder cancer. *Expert Review of Clinical Immunology* [online]. 2015, roč. 11, č. 2, s. 265–279. ISSN 1744-8409. Dostupné z: doi:10.1586/1744666X.2015.983082
- [17] MCCONKEY, David J., Sangkyou LEE, Woonyoung CHOI, Mai TRAN, Tadeusz MAJEWSKI, Sooyong LEE, Arlene SIEFKER-RADTKE, Colin DINNEY a Bogdan CZERNIAK. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urologic Oncology* [online]. 2010, roč. 28, č. 4, s. 429–440. ISSN 1873-2496. Dostupné z: doi:10.1016/j.urolonc.2010.04.008
- [18] KURZROCK, Eric A., Deborah K. LIEU, Lea A. DEGRAFFENRIED, Camie W. CHAN a Roslyn R. ISSEROFF. Label-retaining cells of the bladder: candidate urothelial stem cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* [online]. 2008, roč. 294, č. 6, s. F1415–F1421. ISSN 1931-857X, 1522-1466. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.00533.2007
- [19] BIRDER, Lori a Karl-Erik ANDERSSON. Urothelial Signaling. *Physiological Reviews* [online]. 2013, roč. 93, č. 2, s. 653–680. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00030.2012
- [20] DAMRAUER, Jeffrey S., Katherine A. HOADLEY, David D. CHISM, Cheng FAN, Christopher J. TIGANELLI, Sara E. WOBKER, Jen Jen YEH, Matthew I. MILOWSKY, Gopa IYER, Joel S. PARKER a William Y. KIM. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2014, roč. 111, č. 8, s. 3110–3115. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1318376111
- [21] HE, Xiaobing, Luigi MARCHIONNI, Donna E. HANSEL, Wayne YU, Akshay SOOD, Jie YANG, Giovanni PARMIGIANI, William MATSUI a David M. BERMAN. Differentiation of a Highly Tumorigenic Basal Cell Compartment in Urothelial Carcinoma. *Stem cells (Dayton, Ohio)* [online]. 2009, roč. 27, č. 7, s. 1487–1495. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1002/stem.92
- [22] JÖGI, Annika, Marica VAAPIL, Martin JOHANSSON a Sven PÅHLMAN. Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. *Uppsala Journal of Medical Sciences* [online]. 2012, roč. 117, č. 2, s. 217–224. ISSN 0300-9734. Dostupné z: doi:10.3109/03009734.2012.659294
- [23] ENKELMANN, Astrid, Joana HEINZELMANN, Ferdinand von EGGELING, Martina WALTER, Alexander BERNDT, Heiko WUNDERLICH a Kerstin JUNKER. Specific protein and miRNA patterns characterise tumour-associated fibroblasts in bladder cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [online]. 2010, roč. 137, č. 5, s. 751–759. ISSN 0171-5216, 1432-1335. Dostupné z: doi:10.1007/s00432-010-0932-6

- [24] YAN, Max, Nicholas JENE, David BYRNE, Ewan KA MILLAR, Sandra A O'TOOLE, Catriona M MCNEIL, Gaynor J BATES, Adrian L HARRIS, Alison H BANHAM, Robert L SUTHERLAND a Stephen B FOX. Recruitment of regulatory T cells is correlated with hypoxia-induced CXCR4 expression, and is associated with poor prognosis in basal-like breast cancers. *Breast Cancer Research : BCR* [online]. 2011, roč. 13, č. 2, s. R47. ISSN 1465-5411. Dostupné z: doi:10.1186/bcr2869
- [25] SHIN, Kunyoo, Agnes LIM, Chen ZHAO, Debashis SAHOO, Ying PAN, Edda SPIEKERKOETTER, Joseph C. LIAO a Philip A. BEACHY. Hedgehog Signaling Restrains Bladder Cancer Progression by Eliciting Stromal Production of Urothelial Differentiation Factors. *Cancer Cell* [online]. 2014, roč. 26, č. 4, s. 521–533. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2014.09.001
- [26] MANI, Sendurai A., Wenjun GUO, Mai-Jing LIAO, Elinor Ng. EATON, Ayyakkannu AYYANAN, Alicia Y. ZHOU, Mary BROOKS, Ferenc REINHARD, Cheng Cheng ZHANG, Michail SHIPITSIN, Lauren L. CAMPBELL, Kornelia POLYAK, Cathrin BRISKEN, Jing YANG a Robert A. WEINBERG. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* [online]. 2008, roč. 133, č. 4, s. 704–715. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2008.03.027
- [27] SINGH, Anurag a Jeffrey SETTLEMAN. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010, roč. 29, č. 34, s. 4741–4751.
- [28] GARG, Minal. Urothelial cancer stem cells and epithelial plasticity: current concepts and therapeutic implications in bladder cancer. *Cancer metastasis reviews* [online]. 2015, roč. 34, č. 4. ISSN 1573-7233. Dostupné z: doi:10.1007/s10555-015-9589-6
- [29] PARKIN, D. Max, Freddie BRAY, J. FERLAY a Paola PISANI. Global Cancer Statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2005, roč. 55, č. 2, s. 74–108. ISSN 1542-4863. Dostupné z: doi:10.3322/canjclin.55.2.74
- [30] TORRE, Lindsey A., Freddie BRAY, Rebecca L. SIEGEL, Jacques FERLAY, Joannie LORTET-TIEULENT a Ahmedin JEMAL. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2015, roč. 65, č. 2, s. 87–108. ISSN 1542-4863. Dostupné z: doi:10.3322/caac.21262
- [31] HOADLEY, Katherine A., Christina YAU, Denise M. WOLF, Andrew D. CHERNIACK, David TAMBORERO, Sam NG, Max D.M. LEISERSON, Beifang NIU, Michael D. MCLELLAN, Vladislav UZUNANGELOV, Jiashan ZHANG, Cyriac KANDOTH, Rehan AKBANI, Hui SHEN, Larsson OMBERG, Andy CHU, Adam A. MARGOLIN, Laura J. VAN'T VEER, Nuria LOPEZ-BIGAS, Peter W. LAIRD, Benjamin J. RAPHAEL, Li DING, A. Gordon ROBERTSON, Lauren A. BYERS, Gordon B. MILLS, John N. WEINSTEIN, Carter VAN WAES, Zhong CHEN, Eric A. COLLISSON, Christopher BENZ, Charles M. PEROU a Joshua M. STUART. Multi-platform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues-of-origin. *Cell* [online]. 2014,

- [32] LIU, Zhaoqi a Shihua ZHANG. Tumor characterization and stratification by integrated molecular profiles reveals essential pan-cancer features. *BMC Genomics* [online]. 2015, roč. 16, s. 503. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-015-1687-x
- [33] ZHONG, Xue, Hushan YANG, Shuyang ZHAO, Yu SHYR a Bingshan LI. Network-based stratification analysis of 13 major cancer types using mutations in panels of cancer genes. *BMC Genomics* [online]. 2015, roč. 16, č. 7, s. 1–8. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-16-S7-S7
- [34] MARTINEZ-LEDESMA, Emmanuel, Roeland G.W. VERHAAK a Victor TREVIÑO. Identification of a multi-cancer gene expression biomarker for cancer clinical outcomes using a network-based algorithm. *Scientific Reports* [online]. 2015, roč. 5, s. 11966. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep11966
- [35] GULMANN, Christian, Gladell P. PANER, Rugvedita S. PARAKH, Donna E. HANSEL, Steven S. SHEN, Jae Y. RO, Chandrakanth ANNAIAH, Antonio LOPEZ-BELTRAN, Priya RAO, Komal ARORA, Yong CHO, Loren HERRERA-HERNANDEZ, Randa ALSABEH a Mahul B. AMIN. Immunohistochemical profile to distinguish urothelial from squamous differentiation in carcinomas of urothelial tract. *Human Pathology* [online]. 2013, roč. 44, č. 2, s. 164–172. ISSN 00468177. Dostupné z: doi:10.1016/j.humpath.2012.05.018
- [36] HABUKA, Masato, Linn FAGERBERG, Björn M. HALLSTRÖM, Fredrik PONTÉN, Tadashi YAMAMOTO a Mathias UHLEN. The Urinary Bladder Transcriptome and Proteome Defined by Transcriptomics and Antibody-Based Profiling. *PloS one* [online]. 2015, roč. 10, č. 12 [vid. 2016-březen-07]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4687928/>
- [37] DYRSKJØT, L, T REINERT, A NOVORADOVSKY, T C M ZUIVERLOON, W BEUKERS, E ZWARTHOFF, N MALATS, F X REAL, U SEGERSTEN, P-U MALMSTRÖM, M KNOWLES, C HURST, J SORGE, M BORRE a T F ØRNTOFT. Analysis of molecular intra-patient variation and delineation of a prognostic 12-gene signature in non-muscle invasive bladder cancer; technology transfer from microarrays to PCR. *British Journal of Cancer* [online]. 2012, roč. 107, č. 8, s. 1392–1398. ISSN 0007-0920. Dostupné z: doi:10.1038/bjc.2012.412
- [38] ZARAVINOS, Apostolos, George I. LAMBROU, Ioannis BOULALAS, Dimitris DELAKAS a Demetrios A. SPANDIDOS. Identification of Common Differentially Expressed Genes in Urinary Bladder Cancer. *PLoS ONE* [online]. 2011, roč. 6, č. 4 [vid. 2016-březen-09]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0018135
- [39] *Bladder cancer: diagnosis and management / 1-recommendations / Guidance and guidelines / NICE* [online]. [vid. 2016-duben-20]. Dostupné z: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng2/chapter/1-recommendations>

- [40] PROFESSIONALS, Sumedia-Online. Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Uroweb* [online]. [vid. 2016-březem-21]. Dostupné z: <https://uroweb.org/guideline/bladder-cancer-muscle-invasive-and-metastatic/>
- [41] PASIN, Erik, David Y JOSEPHSON, Anirban P MITRA, Richard J COTE a John P STEIN. Superficial Bladder Cancer: An Update on Etiology, Molecular Development, Classification, and Natural History. *Reviews in Urology*. 2008, roč. 10, č. 1, s. 31–43. ISSN 1523-6161.
- [42] HATINA, J a W A SCHULZ. Stem cells in the biology of normal urothelium and urothelial carcinoma. *Neoplasma* [online]. 2012, roč. 59, č. 6, s. 728–736. ISSN 0028-2685. Dostupné z: [doi:10.4149/neo_2012_089](https://doi.org/10.4149/neo_2012_089)
- [43] ZHANG, Yi, Zhi WANG, Jin YU, Jia zhong SHI, Chun WANG, Wei hua FU, Zhi wen CHEN a Jin YANG. Cancer stem-like cells contribute to cisplatin resistance and progression in bladder cancer. *Cancer Letters* [online]. 2012, roč. 322, č. 1, s. 70–77. ISSN 1872-7980. Dostupné z: [doi:10.1016/j.canlet.2012.02.010](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.010)
- [44] HEPBURN, Anastasia C., Rajan VEERATTERAPILLAY, Stuart C. WILLIAMSON, Amira EL-SHERIF, Neha SAHAY, Huw D. THOMAS, Alejandra MANTILLA, Robert S. PICKARD, Craig N. ROBSON a Rakesh HEER. Side Population in Human Non-Muscle Invasive Bladder Cancer Enriches for Cancer Stem Cells That Are Maintained by MAPK Signalling. *PLoS ONE* [online]. 2012, roč. 7, č. 11 [vid. 2016-březem-01]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0050690](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050690)
- [45] ZHOU, Ting, Christina BENDA, Sarah DUNZINGER, Yinghua HUANG, Jenny Cy HO, Jiayin YANG, Yu WANG, Ya ZHANG, Qiang ZHUANG, Yanhua LI, Xichen BAO, Hung-Fat TSE, Johannes GRILLARI, Regina GRILLARI-VOGLAUER, Duanqing PEI a Miguel A ESTEBAN. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nature Protocols* [online]. 2012, roč. 7, č. 12, s. 2080–2089. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Dostupné z: [doi:10.1038/nprot.2012.115](https://doi.org/10.1038/nprot.2012.115)
- [46] SCAFFIDI, Paola a Tom MISTELI. In vitro generation of human cells with cancer stem cell properties. *Nature cell biology* [online]. 2011, roč. 13, č. 9, s. 1051–1061. ISSN 1465-7392. Dostupné z: [doi:10.1038/ncb2308](https://doi.org/10.1038/ncb2308)
- [47] LI, Yingrui, Xun XU, Luting SONG, Yong HOU, Zesong LI, Shirley TSANG, Fuqiang LI, Kate McGee IM, Kui WU, Hanjie WU, Xiaofei YE, Guibo LI, Linlin WANG, Bo ZHANG, Jie LIANG, Wei XIE, Renhua WU, Hui JIANG, Xiao LIU, Chang YU, Hancheng ZHENG, Min JIAN, Liping NIE, Lei WAN, Min SHI, Xiaojuan SUN, Aifa TANG, Guangwu GUO, Yaoting GUI, Zhiming CAI, Jingxiang LI, Wen WANG, Zuhong LU, Xiuqing ZHANG, Lars BOLUND, Karsten KRISTIANSEN, Jian WANG, Huanming YANG, Michael DEAN a Jun WANG. Single-cell sequencing analysis characterizes common and cell-lineage-specific mutations in a muscle-invasive bladder cancer. *GigaScience* [online]. 2012, roč. 1, č. 1, s. 12. ISSN 2047-217X. Dostupné z: [doi:10.1186/2047-217X-1-12](https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-12)

- [48] YANG, Zhen Fan, David W. HO, Michael N. NG, Chi Keung LAU, Wan Ching YU, Patricia NGAI, Patrick W.K. CHU, Chi Tat LAM, Ronnie T.P. POON a Sheung Tat FAN. Significance of CD90+ Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. *Cancer Cell* [online]. 2008, roč. 13, č. 2, s. 153–166. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2008.01.013
- [49] TATOKORO, Manabu, Fumitaka KOGA, Soichiro YOSHIDA, Satoru KAWAKAMI, Yasuhisa FUJII, Len NECKERS a Kazunori KIHARA. Potential role of Hsp90 inhibitors in overcoming cisplatin resistance of bladder cancer-initiating cells. *International Journal of Cancer* [online]. 2012, roč. 131, č. 4, s. 987–996. ISSN 1097-0215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.26475
- [50] YANG, Y. M. a J. W. CHANG. Bladder Cancer Initiating Cells (BCICs) Are Among EMA⁻ CD44v6⁺ Subset: Novel Methods for Isolating Undetermined Cancer Stem (Initiating) Cells. *Cancer Investigation* [online]. 2008, roč. 26, č. 7, s. 725–733. ISSN 0735-7907, 1532-4192. Dostupné z: doi:10.1080/07357900801941845
- [51] PIGNON, Jean-Christophe, Chiara GRISANZIO, Yan GENG, Jiayi SONG, Ramesh A. SHIVDASANI a Sabina SIGNORETTI. p63-expressing cells are the stem cells of developing prostate, bladder, and colorectal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2013, roč. 110, č. 20, s. 8105–8110. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1221216110
- [52] WEISWALD, Louis-Bastien, Dominique BELLET a Virginie DANGLES-MARIE. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia (New York, N.Y.)* [online]. 2015, roč. 17, č. 1, s. 1–15. ISSN 1522-8002. Dostupné z: doi:10.1016/j.neo.2014.12.004
- [53] PASTRANA, Erika, Violeta SILVA-VARGAS a Fiona DOETSCH. Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay For Stem Cells. *Cell stem cell* [online]. 2011, roč. 8, č. 5, s. 486–498. ISSN 1934-5909. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2011.04.007
- [54] ZHOU, Xiaochen, Gongxian WANG a Yi SUN. A Reliable Parameter to Standardize the Scoring of Stem Cell Spheres. *PLoS ONE* [online]. 2015, roč. 10, č. 5 [vid. 2016-březen-14]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0127348
- [55] ZHOU, Qianjun, John FACCIPONTE, Min JIN, Qiang SHEN a Qiang LIN. Humanized NOD-SCID IL2rg^{-/-} mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies. *Cancer Letters* [online]. 2014, roč. 344, č. 1, s. 13–19. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2013.10.015
- [56] GOLDMAN, Jacki P., Michael P. BLUNDELL, Lucien LOPES, Christine KINNON, D. I. SANTO, P. JAMES a Adrian J. THRASHER. Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor γ chain. *British journal of haematology*. 1998, roč. 103, č. 2, s. 335–342.

- [57] HOFNER, Thomas, Stephan MACHER-GOEPFINGER, Corinna KLEIN, Anja SCHILLERT, Christian EISEN, Steve WAGNER, Teresa RIGO-WATERMEIER, Irène BACCELLI, Vanessa VOGEL, Andreas TRUMPP a Martin R. SPRICK. Expression and prognostic significance of cancer stem cell markers CD24 and CD44 in urothelial bladder cancer xenografts and patients undergoing radical cystectomy. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* [online]. 2014, roč. 32, č. 5, s. 678–686. ISSN 10781439. Dostupné z: doi:10.1016/j.urolonc.2014.01.001
- [58] BENTIVEGNA, Angela, Donatella CONCONI, Elena PANZERI, Elena SALA, Giorgio BOVO, Paolo VIGANÒ, Silvia BRUNELLI, Mario BOSSI, Giovanni TREDICI, Guido STRADA a Leda DALPRÀ. Biological heterogeneity of putative bladder cancer stem-like cell populations from human bladder transitional cell carcinoma samples. *Cancer Science* [online]. 2010, roč. 101, č. 2, s. 416–424. ISSN 1349-7006. Dostupné z: doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01414.x
- [59] BLACKBURN, Jessica S. a David M. LANGENAU. Zebrafish as a model to assess cancer heterogeneity, progression and relapse. *Disease Models & Mechanisms* [online]. 2014, roč. 7, č. 7, s. 755–762. ISSN 1754-8411. Dostupné z: doi:10.1242/dmm.015842
- [60] ZHANG, Beibei, Yasuhito SHIMADA, Junya KUROYANAGI, Yuhei NISHIMURA, Noriko UMEMOTO, Tsuyoshi NOMOTO, Taichi SHINTOU, Takeshi MIYAZAKI a Toshio TANAKA. Zebrafish xenotransplantation model for cancer stem-like cell study and high-throughput screening of inhibitors. *Tumor Biology* [online]. 2014, roč. 35, č. 12, s. 11861–11869. ISSN 1010-4283, 1423-0380. Dostupné z: doi:10.1007/s13277-014-2417-8
- [61] YANG, Xiao-Jun, Wei CUI, Ai GU, Chuan XU, Shi-Cang YU, Ting-Ting LI, You-Hong CUI, Xia ZHANG a Xiu-Wu BIAN. A novel zebrafish xenotransplantation model for study of glioma stem cell invasion. *PloS One* [online]. 2013, roč. 8, č. 4, s. e61801. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0061801
- [62] DYRSKJØT, Lars, Mogens KRUHØFFER, Thomas THYKJAER, Niels MARCUSSEN, Jens L. JENSEN, Klaus MØLLER a Torben F. ØRNTOFT. Gene Expression in the Urinary Bladder A Common Carcinoma in Situ Gene Expression Signature Exists Disregarding Histopathological Classification. *Cancer Research* [online]. 2004, roč. 64, č. 11, s. 4040–4048. ISSN 0008-5472, 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3620
- [63] REBOUÏSSOU, Sandra, Isabelle BERNARD-PIERROT, Aurélien de REYNIÈS, May-Linda LEPAGE, Clémentine KRUCKER, Elodie CHAPEAUBLANC, Aurélie HÉRAULT, Aurélie KAMOUN, Aurélie CAILLAULT, Eric LETOUZÉ, Nabila ELAROUCI, Yann NEUZILLET, Yves DENOUX, Vincent MOLINIÉ, Dimitri VORDOS, Agnès LAPLANCHE, Pascale MAILLÉ, Pascale SOYEUX, Karina OFUALUKA, Fabien REYAL, Anne BITON, Mathilde SIBONY, Xavier PAOLETTI, Jennifer SOUTHGATE, Simone BENHAMOU, Thierry LEBRET, Yves ALLORY a François RADVANYI. EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Science Translational Medicine* [online]. 2014, roč. 6, č. 244, s. 244ra91-244ra91. ISSN 1946-6234, 1946-6242. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.3008970

- [64] ERIKSSON, Pontus, Mattias AINE, Srinivas VEERLA, Fredrik LIEDBERG, Gottfrid SJÖDAHL a Mattias HÖGLUND. Molecular subtypes of urothelial carcinoma are defined by specific gene regulatory systems. *BMC Medical Genomics* [online]. 2015, roč. 8, č. 1 [vid. 2016-březen-06]. ISSN 1755-8794. Dostupné z: doi:10.1186/s12920-015-0101-5
- [65] HATTORI, Shinichi, Keitaro KOJIMA, Kenichi MINOSHIMA, Masayoshi YAMAHA, Masanobu HORIE, Takahiro SAWAMURA, Arizumi KIKUCHI a Takashi DEGUCHI. Detection of Bladder Cancer by Measuring CD44v6 Expression in Urine With Real-time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Urology* [online]. 2014, roč. 83, č. 6, s. 1443.e9-1443.e15. ISSN 0090-4295. Dostupné z: doi:10.1016/j.urology.2014.02.013
- [66] KUNCOVA, J., Z. KOSTROUCH, M. VIALE, R. REVOLTELLA a V. MANDYS. Expression of CD44v6 correlates with cell proliferation and cellular atypia in urothelial carcinoma cell lines 5637 and HT1197. *Folia biologica*. 2005, roč. 51, č. 1, s. 3.
- [67] OVERDEVEST, Jonathan B., Shibu THOMAS, Glen KRISTIENSEN, Donna E. HANSEL, Steven C. SMITH a Dan THEODORESCU. CD24 Offers a Therapeutic Target for Control of Bladder Cancer Metastasis Based on a Requirement for Lung Colonization. *Cancer research* [online]. 2011, roč. 71, č. 11, s. 3802–3811. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0519
- [68] SU, Y., Q. QIU, X. ZHANG, Z. JIANG, Q. LENG, Z. LIU, S. A. STASS a F. JIANG. Aldehyde Dehydrogenase 1 A1-Positive Cell Population Is Enriched in Tumor-Initiating Cells and Associated with Progression of Bladder Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* [online]. 2010, roč. 19, č. 2, s. 327–337. ISSN 1055-9965, 1538-7755. Dostupné z: doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0865
- [69] KATOH, M. a M. KATOH. WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network. *Clinical Cancer Research* [online]. 2007, roč. 13, č. 14, s. 4042–4045. ISSN 1078-0432, 1557-3265. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2316
- [70] SHEN, He, Maxime BLIJLEVENS, Nuo YANG, Costakis FRANGOU, Kayla E. WILSON, Bo XU, Yinglong ZHANG, Lirui ZHANG, Carl D. MORRISON, Lori SHEPHERD, Qiang HU, Qianqian ZHU, Jianmin WANG, Song LIU a Jianmin ZHANG. Sox4 Expression Confers Bladder Cancer Stem Cell Properties and Predicts for Poor Patient Outcome. *International Journal of Biological Sciences* [online]. 2015, roč. 11, č. 12, s. 1363–1375. ISSN 1449-2288. Dostupné z: doi:10.7150/ijbs.13240
- [71] SKOWRON, Margaretha A., Günter NIEGISCH, Gerhard FRITZ, Tanja ARENT, Joep G. H. VAN ROERMUND, Andrea ROMANO, Peter ALBERS, Wolfgang A. SCHULZ a Michèle J. HOFFMANN. Phenotype plasticity rather than repopulation from CD90/CK14+ cancer stem cells leads to cisplatin resistance of urothelial carcinoma cell lines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* [online]. 2015, roč. 34 [vid. 2016-únor-24]. ISSN 0392-9078. Dostupné z: doi:10.1186/s13046-015-0259-x

- [72] CHEAH, Ming T., James Y. CHEN, Debashis SAHOO, Humberto CONTRERAS-TRUJILLO, Anne K. VOLKMER, Ferenc A. SCHEEREN, Jens-Peter VOLKMER a Irving L. WEISSMAN. CD14-expressing cancer cells establish the inflammatory and proliferative tumor microenvironment in bladder cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2015, roč. 112, č. 15, s. 4725–4730. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1424795112
- [73] STOPIGLIA, Rafael Mamprin, Wagner Eduardo MATHEUS, Patrick Vianna GARCIA, Athanase BILLIS, Mariana Anteghini CASTILHO, Vitor Hugo Figueiredo DE JESUS, Ubirajara FERREIRA a Wagner José FÁVARO. Molecular Assessment of Non-Muscle Invasive and Muscle Invasive Bladder Tumors: Mapping of Putative Urothelial Stem Cells and Toll-Like Receptors (TLR) Signaling. *Journal of Cancer Therapy* [online]. 2015, roč. 6, č. 2, s. 129–140. ISSN 2151-1934, 2151-1942. Dostupné z: doi:10.4236/jct.2015.62014
- [74] HORST, Geertje van der, Lieke BOS, Maaïke van der MARK, Henry CHEUNG, Bertrand HECKMANN, Philippe CLÉMENT-LACROIX, Giocondo LORENZON, Rob C. M. PELGER, Rob F. M. BEVERS a Gabri van der PLUIJM. Targeting of Alpha-V Integrins Reduces Malignancy of Bladder Carcinoma. *PLOS ONE* [online]. 2014, roč. 9, č. 9, s. e108464. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0108464
- [75] CHAN, Keith Syson, Jens-Peter VOLKMER a Irving WEISSMAN. Cancer stem cells in bladder cancer: a revisited and evolving concept. *Current opinion in urology* [online]. 2010, roč. 20, č. 5, s. 393–397. ISSN 0963-0643. Dostupné z: doi:10.1097/MOU.0b013e32833cc9df
- [76] HUANG, PENG, MASAMI WATANABE, HARUKI KAKU, HIDEO UEKI, HIROFUMI NOGUCHI, MORITO SUGIMOTO, TAKESHI HIRATA, HIROSHI YAMADA, KOHJI TAKEI, SHAOBO ZHENG, KAI XU, YASUTOMO NASU, YASUYUKI FUJII, CHUNXIAO LIU a HIROMI KUMON. Cancer stem cell-like characteristics of a CD133+ subpopulation in the J82 human bladder cancer cell line. *Molecular and Clinical Oncology* [online]. 2013, roč. 1, č. 1, s. 180–184. ISSN 2049-9450. Dostupné z: doi:10.3892/mco.2012.29
- [77] RAKHA, Emad A., Richard WG BOYCE, Dalia Abd EL-REHIM, Thomas KURIEN, Andrew R. GREEN, Emma C. PAISH, John FR ROBERTSON a Ian O. ELLIS. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Modern Pathology*. 2005, roč. 18, č. 10, s. 1295–1304.
- [78] DRAGU, Denisa L, Laura G NECULA, Coralia BLEOTU, Carmen C DIACONU a Mihaela CHIVU-ECONOMESCU. Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. *World Journal of Stem Cells* [online]. 2015, roč. 7, č. 9, s. 1185–1201. ISSN 1948-0210. Dostupné z: doi:10.4252/wjsc.v7.i9.1185
- [79] SHMELKOV, Sergey V., Jason M. BUTLER, Andrea T. HOOPER, Adilia HORMIGO, Jared KUSHNER, Till MILDE, Ryan ST. CLAIR, Muhamed BALJEVIC, Ian WHITE, David K. JIN, Amy CHADBURN, Andrew J.

MURPHY, David M. VALENZUELA, Nicholas W. GALE, Gavin THURSTON, George D. YANCOPOULOS, Michael D'ANGELICA, Nancy KEMENY, David LYDEN a Shahin RAFII. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133– metastatic colon cancer cells initiate tumors. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 2008, roč. 118, č. 6, s. 2111–2120. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI34401