

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra Buněčné biologie



Bc. Marie Rajtmajerová

Exprese CD47 a jeho topologie na povrchu primárních buněk karcinomu močového měchýře
při interakci s makrofágy

CD47 expression and topology on the surface of primary bladder carcinoma cells in
interaction with macrophages

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně na základě konzultací se školitelem, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani žádná její část nebyla předložena k získání jiného titulu.

V Praze, 30. 4. 2018

Marie Rajtmajerová

Velmi děkuji všem spolupracovníkům, díky kterým vznikla tato diplomová práce. Velký dík patří zejména Karlu Drbalovi za vedení při návrhu experimentů, analýze, i při psaní, za jeho trpělivost a cenné rady. Dále děkuji Jiřímu Hatinovi, Michaele Kripnerové a Kateřině Houfkové z Ústavu Biologie IV. LF UK v Plzni za kultivaci buněk pro fenotypizaci linie RT112 Heidelberg a pomoc při provedení qPCR experimentu. Dále děkuji Meritxell Alberich Jorda za věnování buněčné linie s inducibilní expresí CEBPa, Michalu Šrámkovi a Zdeňkovi Hodnému za věnování primerů pro qPCR. Velmi děkuji Abhishku Koladiyovi za poskytnutí patientských dat pro SNE analýzu a zástupcům Urologického oddělení Thomayerovy nemocnice Kataríně Otavové a Romanu Zachovalovi za zprostředkování klinických vzorků. V neposlední řadě patří dík všem členům laboratoře tvořícím příjemný pracovní kolektiv, a především mému manželovi a rodině za všechnu podporu, kterou mi během studia dodávali.

Abstrakt

CD47 je tak zvaný „don't-eat-me“ signál, který chrání buňky před fagocytózou. Jeho zvýšená exprese na nádorových buňkách otevírá novou možnost pro protinádorovou terapii. Monoklonální protilátky, které jsou dnes v klinických testech, blokují vazbu CD47 k inhibičnímu receptoru SIRPA na povrchu makrofágů, a tím zvyšují jejich fagocytickou funkční kapacitu. Proto umožňují pohlcení fagocytózou a následnou likvidaci nádorových buněk. To, zda bude buňka zlikvidována, závisí na úrovni celkové exprese, strukturní konformaci a stechiometrii CD47.

Cílem mé diplomové práce je testování a příprava metod pro zmapování expresních parametrů CD47 metodou průtokové cytometrie (FCM), kvantitativní PCR (qPCR) a mikroskopie. K dosažení tohoto cíle jsem porovnávala detailní vazebné vlastnosti komerčně dostupných protilátek v kompetičních testech na buněčných liniích. Po provedení tSNE analýzy jsem porovnávala expresi CD47 s expresí dalších povrchových receptorů na primárních buňkách pacientů s karcinomem močového měchýře. Zde jsem se zaměřila na expresi CD47 v rámci diferenciačního kontinua nádoru. Abych lépe porozuměla vztahu mezi expresí CD47 a diferenciačním stádiem nádorové buňky, provedla jsem qPCR a porovnávala expresi CD47 s vybranými transkripčními faktory. Následně jsem u dvou vybraných buněčných linií ověřila správnost metodiky pro kvantifikaci probíhající fagocytózy v patientských vzorcích a její funkční odblokování vybranými CD47 protilátkami.

Klíčová slova: CD47, povrchová exprese, 3D mikroskopie, transkripční program, fagocytóza, makrofág, karcinom, nádorová kmenová buňka, nádorová imunoterapie

Abstract

CD47 is a so-called „don't eat me“ signal, which protects cells from phagocytosis. Its high expression on tumor cells brings new perspective to the tumor therapy. Monoclonal antibodies, which are these days undergoing clinical trials, prevent CD47 binding to the SIRPA inhibitory receptor on macrophages, and so they enhance their phagocytic functional capacity. In this way they enable phagocytic removal of tumor cells. Overall expression, structural conformation and stoichiometry of CD47 on a particular cell predestine whether it will be phagocytised.

The aim of the thesis is to develop and test methods to characterise expression parameters of CD47 via flow cytometry (FCM), quantitative PCR (qPCR) and microscopy. To achieve this goal I performed competition tests of commercially available antibodies in order to characterise their binding epitopes on cell lines. After performing tSNE analysis of primary BCa patient samples I correlated CD47 expression with other cell surface markers. I focused on CD47 expression in various differentiation stages of the tumor. To better understand the relationship between CD47 expression and differentiation status of cells I performed qPCR analysis of particular transcription factors. Using cell lines I examined method for phagocytosis quantification, which will be used to measure phagocytosis rate in patient samples in the future.

Key words: CD47, surface expression, 3D microscopy, transcription program, phagocytosis, macrophage, carcinoma, cancer stem cell, tumor immunotherapy

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
Obsah.....	7
Seznam zkratek.....	9
1. Úvod	10
2. Současný stav poznání.....	11
2.1. Nádor, definice, vlastnosti.....	11
2.1.1. Nádor močového měchýře.....	11
2.1.1. Koncept nádorových kmenových buněk a souvislost s CD47.....	13
2.2. Struktura CD47	16
2.3. CD47 a 3 klíčové charakteristiky exprese	17
2.3.1. Funkce CD47 v nádorové a zdravé tkáni	19
2.3.2. Interakce CD47 se SIRPA blokuje fagocytózu	20
2.3.3. Aktivace fagocytózy	21
2.4. Charakteristika CD47 mAbs.....	22
2.4.1. Klinické studie blokující osu CD47/SIRPA	23
2.5. Vazební partneři CD47.....	26
2.5.1. Vazba s integriny	27
2.5.2. Trombospondin	27
2.5.3. Faktory ovlivňující expresi CD47.....	28
2.5.3.1. EMT a související transkripční faktory (TF).....	30
2.5.4. Využití inhibice inhibičních imunitních kontrolních bodů	30
3. Cíle	33
4. Materiály	34
4.1. Buněčné linie	34
4.2. Klinické vzorky karcinomu močového měchýře	34
4.3. Kultivační média	34
4.4. Protilátky	35
4.5. Molekulárně biologické soupravy a chemikálie pro qPCR	35
4.6. Ostatní chemikálie.....	35
4.7. Přístroje a software	36
5. Metody	36
5.1. Titrace mAbs a kompetiční test.....	36

5.2.	Zpracování a analýza patientských vzorků.....	37
5.3.	Test fagocytární aktivity	38
5.4.	Fenotypizace povrchových znaků buněčné linie RT112 Heidelberg a měření transkripce vybraných genů pomocí qPCR.....	38
5.5.	Indukce CD47 pomocí CEBPa.....	40
5.6.	Bioinformatická analýza koregulace exprese genů	40
6.	Výsledky.....	41
6.1.	Titrace protilátek a kompetiční test	41
6.2.	Fenotypizace patientských vzorků	47
6.3.	Test fagocytární aktivity	53
6.4.	Fenotypizace buněčných linií rodiny RT112 a měření exprese TF pomocí qPCR	56
6.5.	Indukce exprese CD47 pomocí ektopické indukce CEBPa.....	60
6.6.	Bioinformatická analýza koregulace exprese genů	60
7.	Diskuze.....	61
7.1.	Titrace protilátek a kompetiční test	61
7.2.	Fenotypizace patientských vzorků	62
7.3.	Test fagocytární aktivity	63
7.4.	Fenotypizace buněčných linií rodiny RT112 a měření intracelulární exprese pomocí qPCR	65
8.	Závěr	66
9.	Doplňující informace	66
10.	Seznam použité literatury	72

Seznam zkratek

ITIM	Immunotyrosine inhibitory motif	Imunotyrosinový inhibiční motiv
IAP	Integrin Associated Protein	Jiný název pro CD47
ADCC	Antibody Dependent Cell Cytotoxicity	Bun. cytotoxicita záv. na
	protilátkách	
CDC	Complement Dependent Cascade	Komplementová kaskáda
BCa	Bladder Carcinoma	Karcinom močového měchýře
TF	Transcription factor	Transkripční faktor
TAM	Tumor-associated macrophage	Nádorový makrofág
IS	Imunne system	Imunitní systém
mAb	Monoclonal antibody	Monoklonální protilátka
CSC	Cancer stem cells	Nádorové kmenové buňky
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	Kvantitativní PCR
FCM	Flow cytometry	Průtoková cytometrie
NK buňky	Natural Killer cells	Přirození zabíječi, NK buňky
MFI	Mean Fluorescence Intensity	Průměrná fluorescenční intenzita
RT	Reverse Transcription	Reverzní transkripce
SNE	Stochastic Neighbor Embedding	

1. Úvod

Vedle klasické adaptivní imunitní odpovědi (T buněčné klony nebo protilátky cílící nově vzniklé AA-mutace v kontextu MHC-I nebo nativní nádorově-specifické antigeny na nádorových buňkách) a přirozené ochrany (NK buňky cílící stresem indukované neklasické MHC-Ib – MICA/MICB na nádorových buňkách nebo z nich mizející MHC-I histokompatibilní antigeny) je další nově objevenou součástí protinádorové imunitní odpovědi fagocytická aktivita makrofágů, která cílí mizející CD47 molekulu [1]. Za fyziologických podmínek slouží CD47 jako obrana vlastních zdravých buněk díky své vazbě na inhibiční SIRPA receptor makrofágů, který brání odstranění buňky nesoucí CD47 [2]. Jeho zvýšená exprese na nádorových buňkách zároveň znemožňuje makrofágům účinně odstranit neoplázii. Zvýšená exprese byla prokázána u pevných i krevních nádorů [3–5], zvláště u buněk kmenového charakteru [6]. Proto se CD47 stal cílem nádorových terapeutik, která jsou dnes ve fázi klinických testů (viz Tab. 2, shrnuto v [7]).

Naopak snížení exprese CD47, nebo změny jeho uspořádání na membráně, fagocytózu dané buňky umožní [8–10].

Molekulární mechanismy, které stojí za schopností tohoto proteinu zabránit fagocytóze, nebo ji naopak umožnit například v případě starých buněk, jsou popsány zatím pouze u zdravých buněk [9–12]. Pro budoucí úspěch terapie blokující tento imunitní kontrolní bod je nezbytné detailně popsat specifické molekulární formy CD47 exprimované na nádorových buňkách a jejich vliv na inhibici fagocytózy. Konkrétně se jedná o stupeň oligomerizace, míru exprese a konformaci exprimovaného proteinu.

V této práci se zabývám mapováním expresních parametrů CD47 v nádoru. Proto jsem provedla kompetičních FCM testy. Díky získaným datům jsem uspořádala jednotlivé klony CD47-specifických protilátek (mAbs) do několika skupin podle podobnosti jejich reaktivity. Vybrané klony z každé skupiny v budoucnosti budou sloužit k charakterizaci exprese molekulárních druhů CD47, protože jsou specifické pro různé epitopy, a tudíž i různé formy CD47.

Dále jsem provedla test fagocytární aktivity buněčných linií OV10 a THP-1 v přítomnosti blokujících a neblokujících klonů monoklonálních protilátek proti CD47. Tento test v budoucnu poslouží k měření fagocytózy probíhající v patientských vzorcích.

Z výsledků kompetičního i fagocytárního testu je zřejmé, že nízkoafinní protilátky MEM-120, MEM-122 a MEM-133 reagují s podobným epitopem CD47. Naproti tomu klon BRIC-126, který je klonem blokujícím vazbu CD47-SIRPA [13], reaguje odlišně od této skupiny.

Dále jsem se věnovala vztahu CD47 ke kmenovému charakteru buněk. Tento aspekt je terapeuticky významný, protože nádorová kmenová buňka (CSC) je schopna ze své definice vytvořit komplexní, heterogenní nádorovou tkáň v xenotransplantačním modelu [14, 15]. Tyto buňky jsou také rezistentní k chemoterapeutickým prostředkům a jejich přežívání v organismu i po zdánlivém vyléčení nádoru způsobuje opakující se ataky onemocnění [16, 17]. Pomocí analýzy vícerozměrných cytometrických dat jsem studovala expresi CD47 právě u této populace, která je u karcinomu močového měchýře definována fenotypem CD90⁺CD44⁺CD49f⁺ [18].

Expresi vybraných transkripčních faktorů asociovaných s kmenovostí buněk jsem pak měřila pomocí qPCR a porovnávala s expresí CD47, CD44, CD49f a CD90 kvantifikovanou pomocí FCM. Získaná data jsem dále porovnávala s bioinformatickou analýzou transkripčních faktorů provedenou v programu Genevestigator.

2. Současný stav poznání

2.1. Nádor, definice, vlastnosti

V souvislosti s prodlužující se délkou života se nádorová onemocnění stávají jednou z nejrozšířenějších civilizačních chorob. Podle statistik WHO pro rok 2015 se objevila mezi 10 nejčastějšími příčinami úmrtí ve vyvinutých zemích hned na 3 příčkách. Konkrétně se jedná o nádory respiračního traktu, prsu, tlustého střeva a rekta [19]. Nedostatečná znalost fungování nádoru a především nepředvídatelnost léčby vede k vysokému zájmu o tuto oblast ve výzkumných týmech po celém světě.

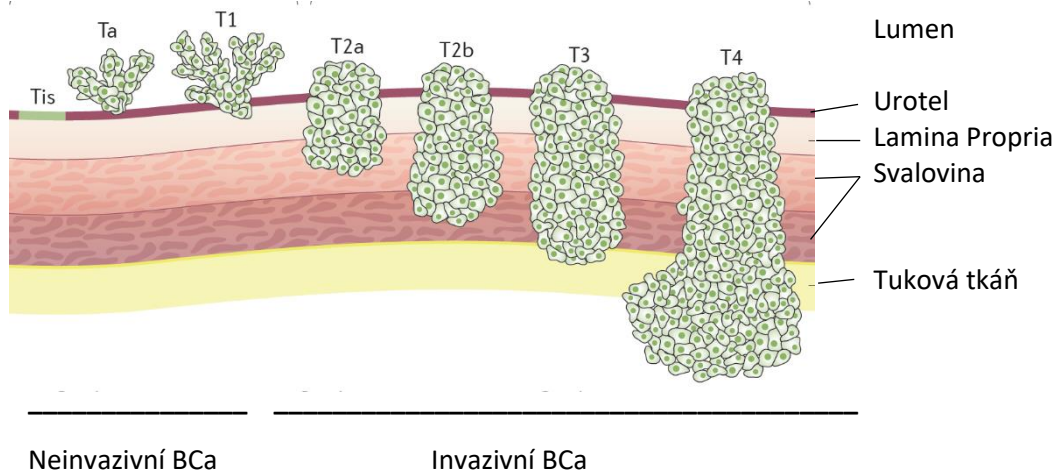
Nádorové buňky mají mnoho charakteristik, mezi něž patří i schopnost uniknout imunitnímu systému (IS) [20], jehož úkolem je udržení homeostázy v těle. Právě imunoterapie nádorů založená na aktivaci příslušných imunitních buněk a mechanismů se dnes rychle rozvíjí a je účinným nástrojem na poli léčby (viz kapitola 2.4.1.).

2.1.1. Nádor močového měchýře

Nádor močového měchýře (Bladder Carcinoma, BCa) patří mezi karcinomy, tedy nádory epitelů. Jedná se o onemocnění s vysokou prevalencí, ale v porovnání s ostatními

nádory s relativně nízkou mortalitou. S incidencí 429 800 nových případů se v roce 2012 BCa zařadil na sedmou příčku mezi nádorovými onemocněními. V témže roce vedlo ke smrti pacienta 165100 případů [21]. Nejvíce ohroženou skupinou jsou muži, kuřáci.

Obr. č. 1 ukazuje jednotlivá stádia BCa podle toho, do kterých tkání nádor proniká. Část nádoru, která roste směrem do lumen, se nazývá exofytická, naopak část pronikající směrem do svaloviny je invazivní. „Staging“, neboli rozdělení nádorů do stádií podle zasažené tkáně, není jediným kritériem klasifikace BCa. Podle toho, jak jsou buňky diferencovány, rozlišujeme 3 stupně („grades“), od diferencovaného nádoru (1. stupeň), po nádor nediferencovaný (3. stupeň) [22].

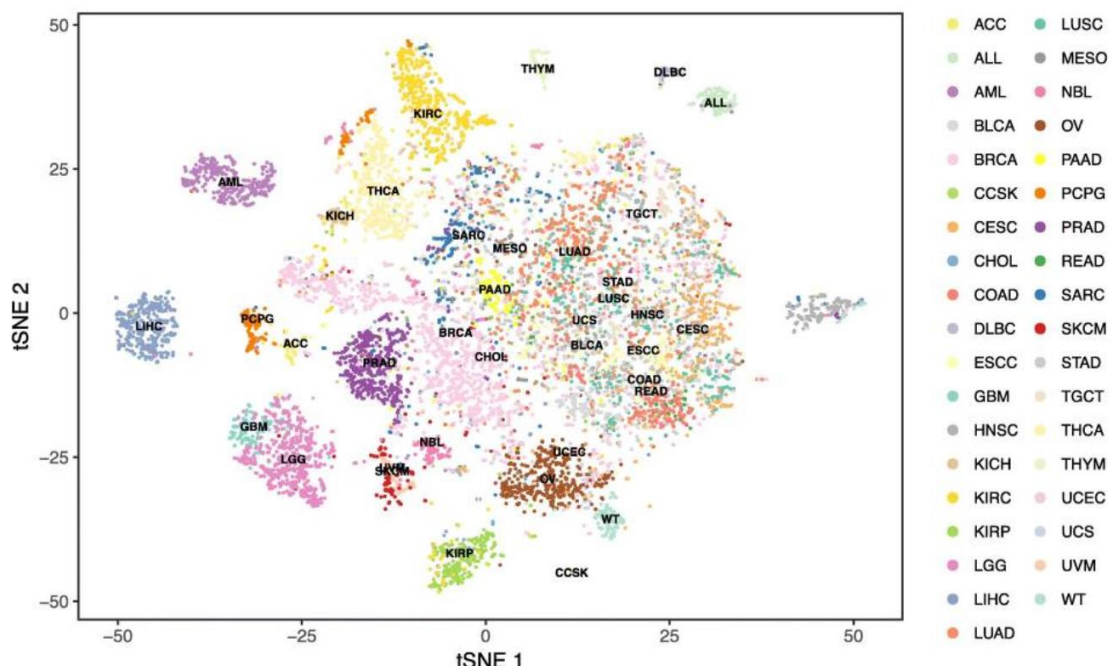


Obr. č. 1 Stádia BCa podle zasažené tkáně (TIS = „tumor in situ“). Upraveno podle [22].

Nádory vznikají – stejně jako zdravá tkáň dospělého jedince – ze somatických buněk kmenového charakteru (nádorová kmenová buňka, z anglického: „Cancer Stem Cell“ – CSC). Mutace, které způsobily maligní zvrát dané CSC, je pak možné pozorovat i u dceřiných buněk nádorové masy. Tento typ onemocnění je vhodné tedy členit podle mutačních změn na v buňkách, které toto onemocnění vyvolaly. Proto s ohledem na tyto parametry přišla v roce 2015 skupina Liu a kol. s klasifikací nádorových onemocnění na základě molekulární charakteristiky a klinických dat, která dělí všechna nádorová onemocnění do 9 skupin, z nichž 8 obsahuje zástupce BCa [23]. Tato studie reflektuje heterogenitu BCa. Podobně i Hoadley a kol. vytvořila o rok dříve systematiku členící nádory do 11 skupin, BCa je zde zařazen v 7 skupinách [24]. Tato klasifikace je však založena pouze na přítomnosti molekulárních změn jako jsou změny

exprese, DNA methylace, počet kopií DNA a somatické bodové mutace. Obě výše zmiňované studie však našly příbuznost BCa především s nádory prsu, plic, endometria a hlavy a krku [23, 24]. Z molekulárního hlediska je BCa velice diverzifikované onemocnění.

Příbuznost BCa a karcinomu prsu je zřejmá i z výsledků práce z roku 2017, kde autoři rozřadili pomocí xCell nástroje, který za tímto účelem vyvinuli, různé druhy nádorů podle jejich příbuznosti na základě mikroprostředí. To bylo umožněno na základě porovnání zastoupení genových otisků přiřazených specifickým buněčným typům [25]. Kromě karcinomu prsu je zde patrná příbuznost s kolorektálním adenomem a glioblastomem (viz obr. 2).



Obr. 2. Příbuznost nádorových onemocnění podle výsledků xCell. Převzato z [25].

Studie z roku 2017 člení invazivní BCa pouze do 5 skupin, a to na základě „microarray“ dat 412 pacientů [26]. Tyto subtypy jsou prognosticky relevantní, protože dělí pacienty podle předpokládané odpovědi na terapii [26].

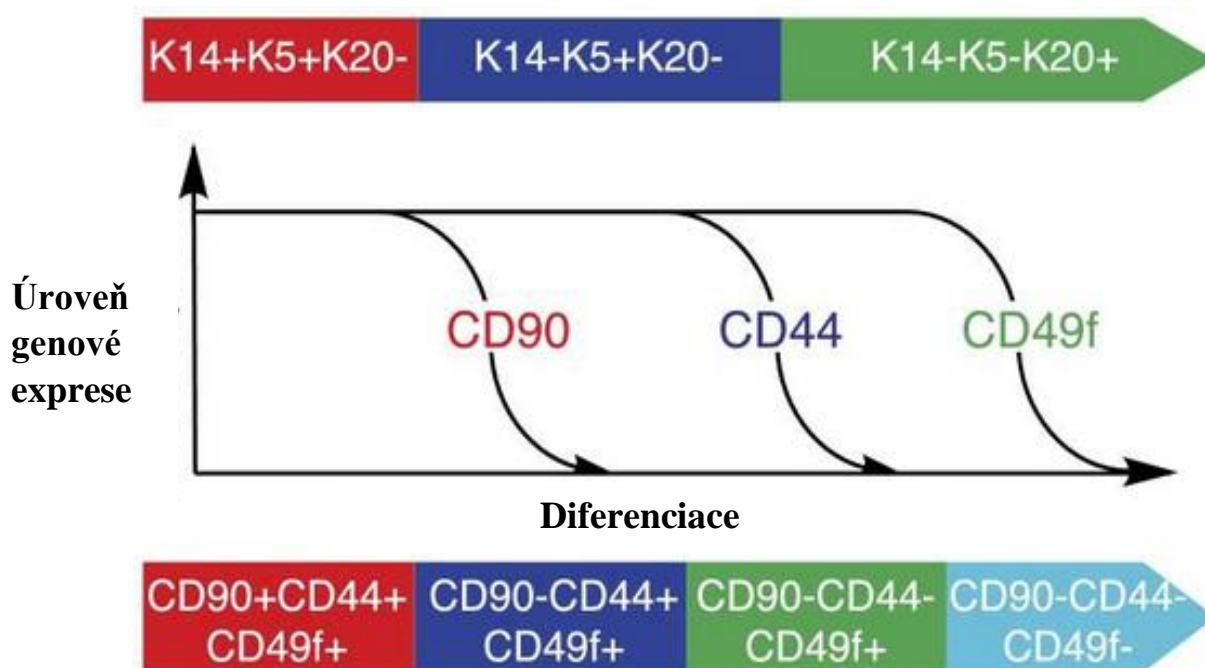
2.1.1. Koncept nádorových kmenových buněk a souvislost s CD47

U BCa bylo zjištěno, že buňky nesoucí povrchový protein CD90 mají progenitorové vlastnosti a lze je označit jako CSC [18]. Ještě přesněji jsou BCa CSC charakterizovány jako $CD90^+CD44^{high}CD49^{high}$ [18] (viz Obr. 3). Podle této a dalších studií z laboratoře Irvinga L. Weismana (Stanford University, CA, U.S.A.) jsou právě tyto buňky schopné po

xenotransplantaci do imunodeficitního SCID myšního modelu indukovat růst nádoru, a to včetně následných více diferenciovaných buněčných populací, které nenesou tyto znaky [18]. Přesto bylo možné takto definovanou kmenovou populaci identifikovat pouze u 50 % pacientů v dané studii. Subpopulace CD90⁺ buněk navíc vykazuje zvýšenou rezistenci vůči cisplatině, přičemž rezistence vůči protinádorovým terapeutikům je jednou z charakteristik CSC [27]. CD44 je prvním znakem BCa CSC, objeveným již v roce 2009 ve stejné laboratoři. CD44⁺ buňky mají taktéž vysokou expresi KRT5, který je znakem bazálních, tedy nediferencovaných buněk epitelu močového měchýře. Korelace exprese keratinů a povrchových znaků je vhodným nástrojem pro hledání kmenové populace, protože exprese keratinů v diferenciacním kontinuu buněk je popsána (viz obr. 3). Xenotransplantační testy ukázaly, že při implantaci 10²-10³ CD44⁺ buněk do RAG2⁻/γc⁻ myši dojde k vytvoření heterogenního nádoru [6]. V ideálním případě by měla růst nádoru indukovat již jediná CSC transplantovaná do zvířecího modelu, z čehož lze vyvodit, že klíčová je zřejmě míra exprese CD44 a ne jeho pouhá přítomnost, a BCa CSC tedy musí být označeny jako CD44^{high}. Navíc není CD44 jediným funkčním znakem odlišujícím CSC od zbytku nádoru. Proto ani takto nelze kompletně popsat tuto specifickou populaci.

Na práci Volkmer a kol. navazuje studie z r. 2016, kde autoři pomocí xenotransplantace buněk do myších modelů a korelace s patientskými daty potvrdili, že tento model má prognostický význam, protože pacienti s bazálním subtypem mají nižší šanci na přežití, než ti s diferencovaným BCa [28].

Souvislost mezi buňkou původu a typem nádoru dále popisuje Batavia a kol. Neinvazivní nádory podle nich pochází z intermediární vrstvy urotelu, zatímco invazivní karcinom vzniká z bazálních KRT5⁺ buněk [29]. Odlišné dělení neinvazivních BCa nabízí transkriptomová studie z roku 2016. Autoři zde dělí onemocnění do 3 tříd, kde první a druhá třída jsou luminálního charakteru, ale liší se agresivitou onemocnění. Třetí třída odpovídá bazálnímu typu a je charakteristická vysokou expresí CD44. CD90 a CD133 jsou nabohacené u třídy druhé. Obě tyto třídy mají vysokou expresi KRT14 [30].



Obr. 3 Změny v expresi povrchových znaků a keratinů během diferenciace BCa buňky (převzato z [18]). K14 = cytokeratin 14, K5 = cytokeratin 5, K20 = cytokeratin 20.

Právě bazální typ je nejméně diferencovaný a je pojítkem mezi různými studiemi. Genomická studie 238 pacientů dělí BCa do 4 skupin. Luminální BCa je charakteristický zvýšenou expresí KRT20 a spadá sem 41 % invazivních BCa, dalších 29 % z nich je zde klasifikováno jako bazální subtyp s vysokou expresí KRT5, KRT14, KRT16 a TF MYC. Dále tato studie přichází s unikátní skupinou nediferencovaného imunitního BCa, kam patří 11 % zkoumaných vzorků s variabilní expresí bazálních znaků, ale silně infiltrovaných imunitními buňkami. Tato infiltrace je pozorovatelná i u posledního, tzv. luminálního imunitního subtypu, který navíc exprimuje znaky luminálního BCa [31].

Studie invazivního BCa z roku 2018 dělí toto onemocnění do dvou skupin: bazální BCa a diferencovaný BCa [32]. Na základě tohoto dělení jsou autoři schopni předem stanovit dobu přežití pacienta. Analýza deregulovaných buněčných drah v těchto subtypech BCa odhalila vysokou expresi CTLA-4 a PD-L1 u bazálního BCa. Na základě tohoto zjištění autoři navrhnou použití terapeutik blokujících tyto proteiny přednostně u pacientů s bazálním BCa. Dále se tento subtyp vyznačuje deregulací diferenciačního faktoru Stat3, zatímco u diferencované subtypu převažuje deregulace PPARG [32].

Dělení invazivního BCa do dvou skupin, luminální a bazální, předkládá i práce z roku 2014 [33]. Bazální BCa exprimuje vysoké množství KRT5 a KRT14 a CD44 a celkově je jeho genový otisk velmi podobný bazálnímu subtypu nádoru prsu, naopak pro luminální BCa je charakteristický KRT20 a uroplakiny [33]. Stejně dělení je odvozeno i z celogenomového profilování mRNA z téhož roku, které navíc odhalilo, že vysoká aktivita p53 je zodpovědná za rezistenci BCa vůči chemoterapii [34].

Zcela nový subtyp, který neodpovídá žádnému z výše uvedených, je tzv. „claudin-low“ BCa, tedy BCa s nízkou expresí kladinu. Tento typ lze identifikovat na základě exprese setu 40 genů a vyznačuje se vysokou expresí CTLA-4, PD-1 a je silně infiltrován imunitními buňkami [35].

Jak přesně souvisí exprese CD47 se stavem diferenciací nádorové buňky není zatím známo. Nádorové buňky mají vesměs vysokou expresi CD47, v případě některých nádorů lze jako CD47⁺ označit až 100 % neoplastických buněk [5]. Výše zmiňovaná studie nádoru močového měchýře prokázala, že CD44^{high} subset BCa buněk má oproti CD44^{low} významně zvýšenou expresi CD47 [6]. U pevných nádorů bylo stejně jako u nádorů hematopoietického původu dokázáno, že vyšší míra exprese CD47 u konkrétního pacienta znamená nižší šanci na přežití a je tedy negativním prognostickým znakem [36, 37].

Jiná studie BCa z roku 2014 přináší celkový pohled na BCa v kontextu celého močového měchýře pomocí endoskopické mikroskopie. Po zavedení CD47 mAbs do lumen močového měchýře lze pomocí fluorescenčního mikroskopu přesně lokalizovat nádor. Autoři dokládají, že tzv. „umbrella cells“, tedy buňky, které jsou na vnitřní (luminální) straně urotelu, jsou ve zdravé tkáni CD47⁺, nebo ho exprimují nedetekovatelné množství [38].

2.2. Struktura CD47

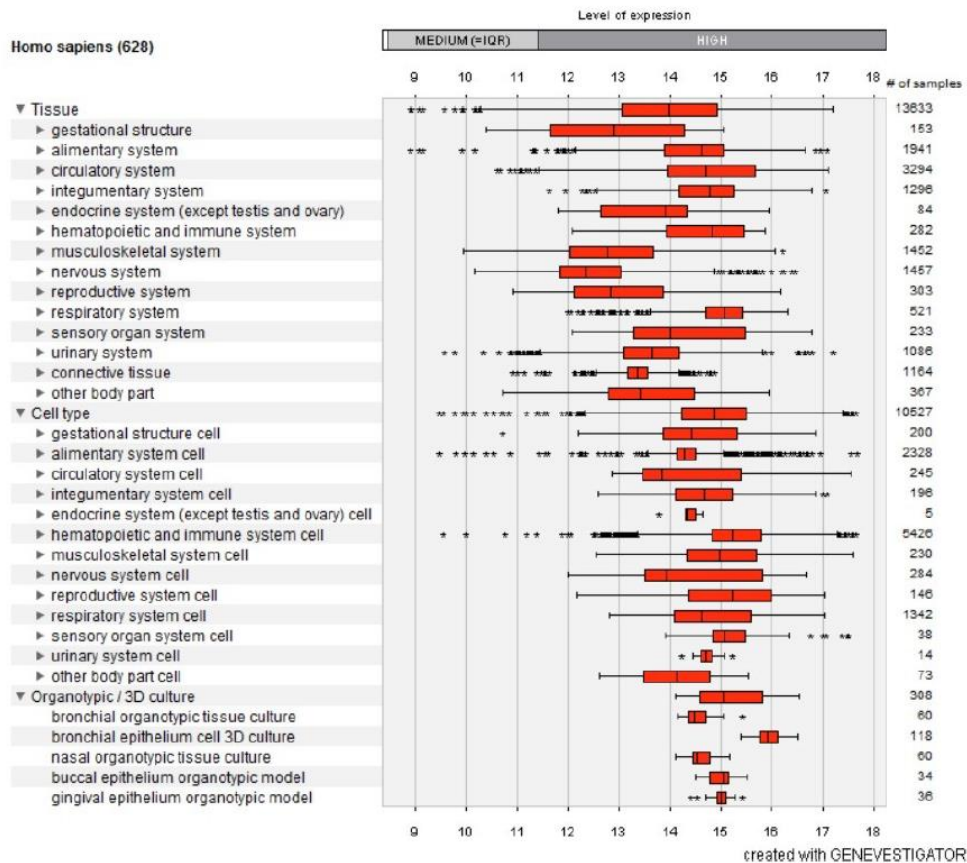
CD47 je protein, který prochází pětkrát membránou. Na extracelulární straně se nachází rozsáhlá imunoglobulinová doména. Jednotlivé transmembránové úseky se skládají z helikálních struktur, které jsou v cytoplazmatickém i extracelulárním prostoru propojené smyčkami. C konec se nachází na intracelulární straně a v různých buněčných typech se vyskytuje v různých sestřihových variantách [1].

Různé sestřihové varianty jsou přednostně exprimovány v určitých tkáních těla. Nejběžnější izoformy *in vivo* jsou formy č. 2 a č. 4. Isoforma č. 1 je nejkratší, ze všech známých alternativních forem. Isoforma č. 2 se vyskytuje především na povrchu imunitních buněk,

fibroblastu a endotelu. Stejné buněčné typy exprimují i izoformu č. 3, ačkoliv pouze v nepatrném množství. Naopak v játrech a slinných žlázách se izoforma č. 3 vyskytuje přednostně. Isoforma č. 4, která je charakteristická nejdelší cytoplasmatickou sekvencí, je zase specifická pro periferní neurony a mozkové buňky [1].

2.3. CD47 a 3 klíčové charakteristiky exprese

CD47 je exprimovaný na všech buňkách lidského těla, kterým zajišťuje ochranu před fagocytickým odstraněním. Jeho exprese však není stálá a rovnoměrná. Analýza provedená pod vedením mého školitele zaměřená na rozsah exprese ve zdravé a nádorové tkáni je na obr. 4. Ve zvýšené míře ji lze pozorovat například na progenitorových buňkách [12, 39, 40]. Erytrocyty a leukocyty sice vykazují stejnou míru exprese, ale liší se uspořádáním molekul CD47 na membráně, což může ovlivňovat interakce okolních buněk s touto molekulou [41].



Obr. 4 Exprese CD47 v různých tkáních těla a v neopláziích, zpracováno pomocí Genevestigator, autor J. Kuzmik [42]. Na ose x je vynesena exprese CD47 v logaritické škále (\log_2).

S rostoucím stářím buňky dochází buď ke snížení exprese CD47 (erytrocyty, trombocyty) [8], nebo ke shlukování molekul CD47, což bylo prokázáno u myších lymfocytárních buněk a u lidské T-buněčné linie Jurkat [11]. Korelace mezi snížením exprese a stádiem apoptózy byla potvrzena u fibroblastů a neutrofilů, naopak buňky Jurkat vykazovaly v apoptotickém stádiu tvorbu shluků CD47 na membráně [9]. Oba tyto mechanismy umožní rozpoznání makrofágem a odstranění nežádoucí buňky z těla, čímž je zajištěna homeostáza potřebná pro správné fungování organismu.

Studie z roku 2015 však přichází se zcela opačnými výsledky, které dokazují, že během apoptózy je úroveň exprese CD47 neměnná a naopak vlivem rozpuštění lipidových raftů dochází k rozvolnění shluků CD47, které jsou přítomné za normálních podmínek [11]. Tomu ale odporuje tvrzení z roku 2001, že CD47 je pouze volně asociován s periferií lipidových raftů (shrnutí v [43]). Změny ve stechiometrii CD47 v průběhu života buňky, zejména ve stádiu apoptózy, proto musí být důkladněji studovány, zejména pak na buňkách nádorových.

Změna konformace CD47 vyvolaná oxidativním prostředím navíc indukuje vazbu TSP-1, čímž vzniká nové vazebné místo pro SIRPA [10]. Vazba C-koncového peptidu 4N1K odvozeného z C-terminální domény TSP-1 k molekule CD47 slouží k opsonizaci buňky pro fagocytózu. Vazebná místa 4N1K a SIRPA se buď překrývají, nebo jsou blízko sebe a dochází tak ke stérickému bránění, které za normálních okolností znemožňuje vazbu obou partnerů najednou [44]. Teprve po oxidaci CD47, která je způsobena oxidativním stresem a stárnutím, dochází k vazbě obou těchto partnerů zároveň a ke spuštění fagocytózy skrze CD47, který slouží jako „eat-me“ signál [10]. Výsledky této práce však musí být nahlíženy s opatrností, protože v experimentu byla použita koncentrace 4N1K o 10^3 mol/l vyšší, než je její fyziologická hodnota trombospondinu. Při takové koncentraci je dynamika vazeb odlišná a 4N1K se váže i na zdravé, neoxidované erytrocyty [45].

Pro výslednou signalizaci skrze CD47 (aktivační či inhibiční vzhledem ke spuštění fagocytózy) je tedy zásadní nejen úroveň exprese, ale i jeho stechiometrie a konformace.

Ze stejných důvodů pravděpodobně dochází i k selektivnímu snížení exprese CD47 u některých onemocnění. Například u syndromu hemofagocytární lymfohistiocytosy tak dochází k odstranění krevních kmenových buněk [39]. Naopak u aterosklerózy, která je příčinou infarktů myokardu a mrtvic, dochází k defektu v odstraňování starých a apoptotických buněk, které zůstávají uvnitř cév. Při použití CD47 protilátky dochází k obnovení mechanismů, které tyto nežádoucí buňky z těla odstraní [46].

CD47 je exprimován také na téměř všech buňkách pevných nádorů a to jak na původních neopláziích tak na buňkách metastáz. Ukazuje to studie nádorů ovária, močového měchýře, prsu, jater, tlustého střeva a glioblastomu z roku 2012 [5].

Studie z roku 2018 zabývající se extracelulárními váčky (EV), které jsou prostředkem komunikace mezi buňkami a jsou negativním prognostickým znakem u některých nádorových onemocnění, dokládá, že tyto EV nesou specifický obsah RNA, který je určen jejich povrchovým fenotypem. CD47⁺ EV jsou například bohaté na miR-320a, která cílí hsp20 a je příčinou srdeční ischemie [47]. Tyto výsledky však byly získány na EV odvozených od T-buněčných linií.

Jiná práce stejného autorského kolektivu však na EV buněk karcinomu prsu dokazuje, že CD47 na EV na rozdíl od nádorových buněk neslouží jako „don't eat me“ signál. Autoři se domnívají, že to může být způsobeno příliš malou velikostí EV, která nestačí k aktivaci SIRPA receptorů v dostatečném množství, aby byla fagocytóza blokována [48]. Tento efekt může však být zapříčiněn i odlišným uspořádáním CD47 na membráně, jak již bylo zmíněno

2.3.1. Funkce CD47 v nádorové a zdravé tkáni

Zdravé erytrocyty přežívají v krevním oběhu až 120 dní, zatímco erytrocyty zbavené povrchového CD47 jsou z krve odstraněny v řádu hodin [49]. Stejně výsledky vykazují i trombocyty [8]. CD47 je totiž tzv. „don't eat me“ signál, který se významně podílí na udržení stálého vnitřního prostředí. Jeho vazba na SIRPA inhibiční receptor na fagocytující buňce, například makrofágu, totiž zabrání této buňce fagocytovat [49].

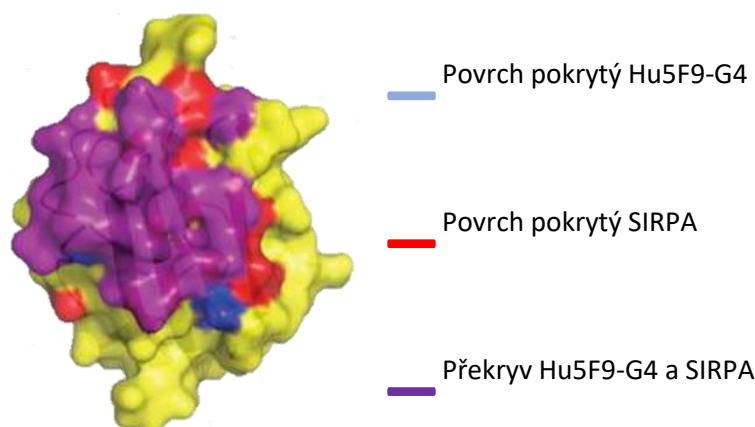
U karcinomu ovária a glioblastomu bylo zjištěno, že vysoká exprese mRNA pro CD47 je negativním prognostickým znakem [5]. Tato studie také pomocí subkutánních xenograftů z NSG myši ověřila, že ke zvýšení úrovně fagocytární aktivity při zablokování CD47 protilátkou dochází i u TAMs (tumor-associated macrophages). Dále zkoušeli v této studii léčbu xenotransplantátů nádorů v myších pomocí CD47 protilátek. Nádory byly vyléčeny a zlikvidovány včetně CSC, protože ani během 4-měsíčního monitorování po skončení léčby nedošlo k relapsu nádoru. U spontánně metastazujícího vzorku nádoru močového měchýře transplantovaného do NSG myši bylo patrné snížení počtu metastáz při léčbě CD47-mAb z 24 metastáz v lymfatických uzlinách u negativní kontroly na 1 metastázu u léčené myši [5]. Podobná studie z roku 2012 potvrdila tyto výsledky i pro nádor hladkého svalstva - leiomyosarkom [50].

2.3.2. Interakce CD47 se SIRPA blokuje fagocytózu

SIRPA je exprimován na myeloidních, především na fagocytujících buňkách [51], skládá se ze tří extracelulárních imunoglobulinových domén, transmembránové a cytoplasmatické domény. N-koncová extracelulární doména interaguje s CD47, což spouští intracelulární kaskádu vedoucí k inhibici fagocytózy [37]. Molekulární podstata tohoto efektu spočívá v přítomnosti tyrosinových zbytků v intracelulární doméně SIRPA uspořádaných do tzv. ITIM motivu [52]. Po vazbě CD47 a SIRPA dochází k fosforylaci těchto zbytků, což aktivuje SHP fosfatázy, což vede k defosforylaci myosinu IIA a inhibici fagocytózy [52]. SIRPA je za nativních podmínek exprimován na buňkách ve formě dimeru. Ten je tvořen interakcí ektodomén. Místo pro tuto vazbu je však odlišné od místa pro vazbu CD47. Experimentálně bylo ověřeno, že zablokování dimerizace SIRPA neblokuje vazbu CD47. Jedná se tedy o dvě na době nezávislé události, CD47 a SIRPA vytváří vazebné páry v poměru 1:1 nezávisle na dimerizaci SIRPA [53].

Autoři studie z roku 2016 dokládají, že SIRPA^{-/-} i CD47^{-/-} myši mají podobný fenotyp a nevykazují ve sterilních podmínkách žádné známky napadení vlastní tkáně. Vazbou CD47 a SIRPA tedy nedochází k přímé aktivaci, ale pouze k odstranění inhibičního mechanismu, který jinak fagocytóze brání. Po indukci kolitidy však oproti zdravé kontrole dochází k rozvoji mohutnější imunitní odpovědi. Makrofágy totiž primárně neútočí na vlastní tkáně, což je způsobeno dominancí IL-10 a TGF- β buňkami sleziny, které udržují makrofágy v neaktivním stavu. K fagocytóze vlastních buněk potřebují makrofágy aktivační signál, kterým je např. LPS a TNF- α [2]. Obecně je tedy nereaktivita makrofágů vůči vlastním buňkám zajištěna těmito dvěma mechanismy (IL-10 prostředí a exprese CD47), které se mohou částečně vzájemně kompenzovat, což dokazuje fakt, že SIRPA^{-/-} i CD47^{-/-} myši mají téměř dvojnásobně zvýšenou expresi IL-10 [2].

Z obr. 5 je zřejmé, že epitopy pro vazbu SIRPA a blokuující mAb se překrývají, a tudíž se vazba těchto molekul vzájemně vylučuje [54].



Obr. 5 IgV doména CD47 a epitopy pokryté vazbou se SIRPa a terapeutickou Hu5F9-G4 mAb (převzato z [54]).

2.3.3. Aktivace fagocytózy

In vitro studie nádoru močového měchýře prokázala, že při inkubaci buněk s monoklonální protilátkou proti CD47 byly nádorové buňky fagocytovány [55]. Podobně další studie myších imunodeficitních modelů ukazuje, že při inhibici CD47 nádory vykazují nižší schopnost uchytit se v organismu [56]. Tyto výsledky jsou připisovány zvýšení fagocytární aktivity makrofágů *in vivo*, která je logickým následkem znemožnění vazby CD47-SIRPA [57, 58].

Schopnost CD47 mAbs odblokovat fagocytózu byla od té doby mnohokrát potvrzena. Například studie z roku 2016 dokládá spuštění fagocytózy buněk glioblastomu po inkubaci s Hu5F9-G4 protilátkou [59]. *In vitro* byl stejný efekt potvrzen u buněk akutní myeloidní leukemie [36], ne-Hodgkinovského lymfomu [13], karcinomu plic [54, 56], karcinomu prsu [60], mnohačetného myelomu [55]. *In vitro* schopnost zamezit růstu nádoru byla prokázána u nádorů pankreatu [61], leiomyosarkomu [50], hepatocelulárního karcinomu [62] a karcinomu plic [54].

Ke spuštění fagocytózy však nestačí pouze odstranění negativního signálu, ale fagocytující buňka musí zároveň dostat aktivační signál v podobě kalretikulinu, nebo například fosfatidylserinu. Kalretikulin je na rozdíl od fosfatidylserinu přítomen i na neapoptotických buňkách. Na starých či apoptotických buňkách se váže na LRP (LDL-related receptor protein) na fagocytech a skrze tuto vazbu vzniká aktivační signál. U zdravých buněk je však tento signál blokován CD47-SIRPA interakcí [9]. Protichůdná role kalretikulinu a CD47 byla později potvrzena i na lidských leukémiích a karcinomech ovária a BCa [63].

Tento děj nemusí být plně autonomní pro makrofágy, ale studie z roku 2015 poukazuje na to, že terapie blokací CD47 souvisí s aktivací CD8⁺ T buněk, která je k jejímu správnému účinku nezbytná, protože při depleci těchto buněk dochází k významnému snížení účinku terapie [64]. V myších imunodeficitních modelech postrádajících T buňky má terapie CD47-mAbs účinky až po více než trojnásobné době podávání tohoto prostředku v porovnání s „wild type“ myši. Dále autoři dokládají, že právě dendritické buňky jsou díky zvýšené produkci IFN typu I zodpovědné za cross-priming a antigeně specifickou aktivaci těchto CD8⁺ T buněk [64].

2.4. Charakteristika CD47 mAbs

V současné době jsou komerčně dostupné desítky klonů CD47-specifických protilátek (viz vybrané klony v tab. 1). Informace o jejich epitopech a vzájemných interakcích však chybí.

Klon B6H12, který blokuje vazbu CD47-SIRPA a je jedním z nejhojněji používaných, je vysoce specifický pro lidské erythrocyty [65]. Vazba tohoto klonu není závislá na konformaci CD47 [10].

Z výsledků získaných za použití klonu B6H12 vyšly následné klinické testy, pro které byl vytvořen humanizovaný klon Hu-5F9G4 [66]. Další z blokujících klonů, BRIC126, reaguje kromě lidských erythrocytů i s prasečími, u nichž taktéž zabraňuje navázání SIRPA [65]. Ačkoliv má stejné účinky na vazbu CD47-SIRPA jako B6H12, pokrývá zřejmě jiný epitop. Klon CIKml, o kterém toho není jinak z literatury mnoho známo, má schopnost značit nejen lidské a prasečí, ale i kraví erythrocyty [65]. Z toho lze usuzovat opět na odlišný epitop od předchozích klonů.

Naproti tomu klon 2D3 je jediný, o kterém je známo, že neblokuje vazbu SIRPa, a neindukuje tedy fagocytózu, zároveň nereaguje s prasečími, krysími, myšimi, ani kravími erythrocyty [65]. Lze tak předpokládat, že tento klon má unikátní vazebné vlastnosti.

Vedle nízké afinity je zvláštností klonu MEM-120 a MEM-122 jejich izotyp (IgM), který tvoří pentamerní až hexamerní strukturu a obsahuje tak 5-krát více vazebných míst pro antigen. Právě vyšší valence umožňuje jejich stabilní vazbu na CD47. Oba klony byly vyvinuty mým školitelem.

Klon	Blokuje SIRPA	Indukuje fagocytózu	Váže monomery/shluky	Váže preferenčně konformaci	Blokuje THBS1	Izotyp
B6H12	Ano[5]	Ano [5]	vysokoafinní [67]	Nezávisle na konformaci [10]	Ano [44]	IgG1 kappa
2D3	Ne[68]	Ne [5]	Indukuje tvorbu shluků na erytrocytech, což vede ke zvýšení SIRPA vazby[65]			IgG1 kappa
1/1A4	Ano [69]					IgG2b
CC2C6	Ano[69]					IgG1 kappa
BRIC126	Ano[13]	Ano [5]				IgG2b
CIKm1						IgG1 kappa
MEM120			Nízkoafinní, shluky [41]			IgM
MEM122			Vyšší afinita než ostatní MEM [41]			IgM
MEM133			Nízkoafinní, shluky [41]			IgG2a
REA220						IgG1

Tab. 1 Vybrané klony CD47-specifických protilátek a jejich vlastnosti známé z literatury.

2.4.1. Klinické studie blokující osu CD47/SIRPA

V roce 2015 byla vyvinuta v laboratoři Irvinga Weissmana humanizovaná protilátka proti CD47 Hu5F9-G4 (pocházející z klonu 5F9). Myši byly imunizovány fúzním proteinem myši Fc části a lidské extracelulární domény CD47, indukované myši protilátky byly humanizovány a variabilní část takto vzniklé monoklonální protilátky byla následně přenesena na IgG4 [66]. To proto, aby byla snížena pravděpodobnost postižení zdravých buněk těla nesoucích CD47, protože IgG4 aktivuje nejméně efektorových mechanismů závislých na Fc.

Efekt této terapie tedy spočívá především v aktivaci fagocytózy makrofágy a zároveň se snaží vyvarovat zapojení dalších mechanismů jako jsou komplement (CDC) a buněčná toxicita závislá na protilátkách (ADCC), aby nebyl terapeutický účinek převážen negativními vedlejšími účinky. Během testování neprokázala tato protilátka na rozdíl od pozitivních kontrol schopnost indukovat u buněk akutní myeloidní leukémie ani ADCC ani CDC [66].

Pacientské vzorky byly xenotransplantovány do NSG imunodeficitních myší. Po aplikaci Hu5F9-G4 mAb došlo k eradikaci akutní myeloidní leukémie a také ke zvýšení účinnosti standardní protinádorové terapie rituximabem, mezi jehož účinky patří zvýšení exprese MHC II, indukce apoptózy a indukce ADCC a CDC [66]. Hu5F9-G4 byla denně podávána po dobu 2 týdnů imunodeficitním NSG myším po xenotransplantaci primárních lidských AML buněk. 2 z 10 myší, které vykazovaly nejvyšší míru uchycení nádoru, došlo po ukončení terapie k relapsu nádoru. Zbýlých 8 myší bylo touto terapií zcela vyléčeno a nádor se neobjevil ani během následujících 22 týdnů monitorovaných po ukončení léčby [66]. Studie nemalobuněčného karcinomu plic ze stejné laboratoře a tudíž se stejným designem (14-denní léčba Hu5F9-G4, NSG myší model) prokázala schopnost zmenšit objem nádoru na 1/5 v porovnání s nádory myší, kterým byla podávána negativní kontrola [54].

Vzhledem k vysoké expresi CD47 na erytrocytech byla jedním z kritických a precizně sledovaných parametrů anémie, jejíž vznik se nabízí jako možný vedlejší efekt. U NSG myší s xenotransplantovanou AML při léčbě Hu5F9-G4 došlo k rozvoji anémie, jejíž závažnost byla přímo úměrná množství Hu5F9-G4. Nežádoucí účinky terapie lze minimalizovat použitím bispecifické mAb jako například v práci z roku 2018 [70], kde současné cílení CD47 a EGFR vedlo ke zmenšení nádoru (xenotransplantátu v NOD/SCID myši), a zároveň oproti blokátorům pouze osy CD47/SIRPa nevedlo ke snížení počtu erytrocytů [70].

Od roku 2015 probíhají klinické studie Hu5F9-G4 mAb [71–74] (viz tab. 2).

Další humanizovanou protilátkou testovanou pro klinické využití je CC-90002. Tato protilátka byla vyvinuta firmou Celgene, ale literatura s jeho detailní charakteristikou není veřejnosti dostupná [75].

Kromě anti-CD47 mAbs byla vyvinuta také terapeutika odvozená od solubilního SIRPA proteinu, která fungují stejným způsobem. Do této skupiny patří TTI-621, což je N-terminální V doména SIRPA zfúzovaná s lidským IgG1, pro jejíž správnou funkci je nezbytná exprese FcγRII a FcγRI na makrofázích, protože vazbou na tyto receptory dochází ke spuštění fagocytózy [76].

TTI-621 v myším NOD/SCID modelu inhibuje růst B lymfomu a AML xenotransplantátů. V porovnání s dalšími anti-CD47 mAbs (CC2C6, 2D3, BRIC126, B6H12 a 5F9) navíc TTI-621 má velmi nízkou afinitu k lidským erytrocytům, což je zásadní předpoklad pro co nejmenší vedlejší efekt terapie, jakým je právě anémie.

Preklinický výzkum dokazuje, že účinek CD47-mAbs i vysoko-afinního SIRPA proteinu je umocněn kombinací s nádorově-specifickými terapeutickými protilátkami jako například rituximab [13, 77]. Pomocí myšího modelu pracujícího s myší anti-CD47 mAb bylo zjištěno, že antagonismus CD47 umocňuje účinek PD-L1 mAbs na melanomové buňky linie B16F10 [78]. Tyto výsledky nejsou překvapivé vzhledem k tomu, že kromě odblokování fagocytózy vede aplikace anti-CD47 mAbs k aktivaci makrofágů a tím k aktivaci adaptivního imunitního systému.

ALX148 je dalším testovaným terapeutikem, které bylo vytvořeno fúzí N-terminální D1 domény SIRPA s inaktivovaným Fc. Takto vytvořený protein váže lidský CD47 s $K_{DS}=0,14$ nM [79]. U hematologických nádorů bylo prokázáno, že ALX148 blokáci anti-fagocytického signálu zvyšuje efekt běžných terapeutik, jakými jsou daratumumab, rituximab, a obinutuzumab, způsobuje aktivaci dendritických buněk a nádorové makrofágy polarizuje směrem k prozánětlivému fenotypu. Kromě toho u myši, ani u primátů nebyly po aplikaci prokázány změny v počtu periferních krevních buněk [79].

Přesto je obtížné studovat efekt CD47-blokujících terapeutických mAbs na aktivaci adaptivního IS, a to proto, že testování těchto terapeutik bylo většinou prováděno především na imunokompromitovaných myších modelech, které právě adaptivní IS postrádají [66, 70, 76].

Terapeutika jsou testována na leukémiích, lymfomech, ale i pevných nádorech a do testů jsou přijímáni většinou pacienti s primárními i recidivujícími malignitami bez dalších zdravotních komplikací, jako jsou například onemocnění kardiovaskulárního systému a autoimunitní poruchy [71–74]. Využití fagocytózy, tedy mechanismu vrozené imunity, k terapii nádorového onemocnění je na tomto poli převratnou novinkou. Navíc při použití takovéto terapie lze předpokládat, že ani vysoká míra mutace nádorových buněk nebude schopna v průběhu času zajistit nádoru rezistenci vznikem „únikových klonů“, protože CD47⁻ buňky by byly taktéž odsouzeny k fagocytóze, protože takové jsou rozpoznány jako tělu cizí, nebo staré, určené k odklizení.

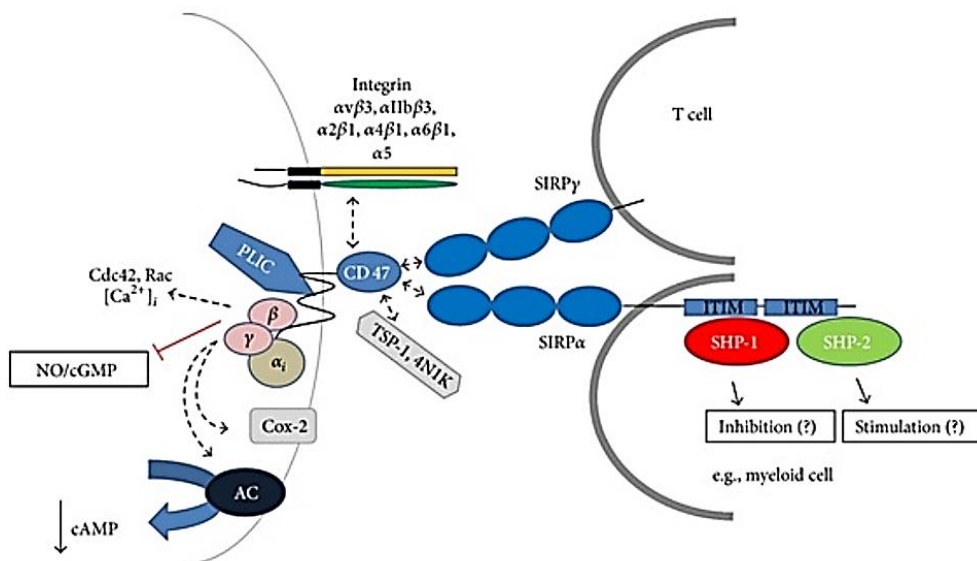
Začátek	Konec	ID	Počet pacientů	Terapeutikum	Investor	Strategie	Diagnóza	Fáze
srpen 2014	srpen 2017	NCT 0221 6409	96	Hu5F9-G4	Forty Seven, Inc.	Samostatně	Pevné nádory, lymfomy	I
březen 2015	leden 2018	NCT 0236 7196	100	CC-90002	Celgene Corporation	Samostatně	Pevné nádory, ne Hodgkinovský lymfom, násobný myelom	I
listopad 2015	březen 2017	NCT 0267 8338	30	Hu5F9-G4	Forty Seven, Inc.	Samostatně	AML	I
leden 2016	červen 2019	NCT 0266 3518	186	TTI-621	Trillium Therapeutics Inc.	Samostatně	Hematologické nádory	I
březen 2016	červenec 2019	NCT 0264 1002	78	CC-90002	Celgene Corporation	Samostatně	AML, myelodysplastický syndrom	I
září 2016	prosinec 2018	NCT 0289 0368	54	TTI-621	Trillium Therapeutics Inc.	Samostatně	Pevné nádory, mycosis fungoides	I
listopad 2016	březen 2018	NCT 0295 3509	72	Hu5F9-G4	Forty Seven, Inc.	Samostatně; kombinace s rituximabem	B-buněčný ne Hodgkinovský lymfom	I/II
listopad 2016	březen 2018	NCT 0295 3782	112	Hu5F9-G4	Forty Seven, Inc.	Samostatně; kombinace s cetuximabem	Pevné nádory, kolorektální karcinomy	I/II
únor 2017	prosinec 2019	NCT 0301 3218	110	ALX148	Alexo Therapeutics	Samostatně, nebo kombinace s atezolizumabem; kombinace s trastuzumabem	Pevné nádory, lymfomy	I

Tab. 2 Seznam klinických studií využívajících CD47-blokující terapeutika (Převzato z [7] a rozšířeno[80])

2.5. Vazební partneři CD47

CD47 se jako membránový protein účastní interakcí s extracelulární matrix a mezibuněčné komunikace.

Cis-interakce s CD95 (Fas) u T buněk je nezbytná pro indukci buněčné smrti, protože buňky s deletovaným CD47 po navázání FasL, ani anti-Fas mAb nejsou schopné spustit programovanou buněčnou smrt [81].



Obr. 6 Vazebné interakce CD47. Převzato z [40].

2.5.1. Vazba s integriny

CD47 bývá také označován jako IAP (z anglického „integrin-associated protein“, protein asociovaný s integriny), protože byl nejprve purifikován v komplexu s $\alpha v \beta 3$ integrinem [82]. Tato interakce je (podobně jako interakce s trombospondinem a SIRP α) zprostředkována extracelulární IgV doménou. Na rozdíl od dalších dvou zmíněných vazeb se však jedná o *cis* interakci. Později byla dokumentována *cis*-vazba na další integriny $\alpha IIb \beta 3$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha L \beta 2$, a $\alpha 4 \beta 1$ (shrnuto v [43]).

2.5.2. Trombospondin

Trombospondin je protein exprimovaný většinou tělních buněk. Kromě vazby CD47 interaguje s řadou membránových proteinů a proteinů extracelulární matrix a zprostředkovává tak kontakt mezi buňkami [83]. mezi jeho další receptory patří například výše zmíněné integriny, asociované s CD47, nebo CD36 [83]. Receptory CD47 a CD36 jsou asociovány skrze integrin $\alpha 6 \beta 1$ a při navázání trombospondinu či β -amyloidu na CD36 blokuje CD47 NO/cGMP signalizaci

Vazba s CD47 má vliv na adhezi buněk, aktivaci a agregaci trombocytů, apoptózu, proliferaci a podílí se na tvorbě zánětlivého prostředí [84]. Podle práce z roku 2012 navíc vazba trombospondinu (respektive jeho C-terminálního peptidu 4N1K) na CD47 opsonizuje staré erytrocyty pro fagocytózu [10].

Trombospondin dále zabraňuje *cis* asociaci CD47 s VEGFR2 svou vazbou na CD47 [85]. Při aktivaci (fosforylaci) VEGFR2 dojde k přenosu signálu na CD47 a spuštění

signalizačních drah vedoucích k angiogenezi (NO, PKC, PI3K). V přítomnosti trombospodinu je signalizace skrze VEGFR2 znemožněna a trombospodin tak přispívá k inhibici angiogeneze [85]. To je v souladu s výše zmiňovanou anti-angiogenetickou funkcí CD47 (viz kap. 2.5.3. Faktory ovlivňující expresi CD47).

2.5.3. Faktory ovlivňující expresi CD47

Vzhledem k fyziologické funkci CD47, jeho přednostní expresi v určitých místech nádoru a na nediferencovaných buňkách [38] předpokládám, že jeho exprese či naopak absence souvisí s udržení kmenového fenotypu buňky a zároveň schopností migrovat a metastazovat.

Epigenetické modifikace a exprese transkripčních faktorů jsou dva způsoby, jak buňka ovládá expresi proteinů. Oba tyto mechanismy souvisí se změnami v promotorové oblasti cílového genu. Promotor CD47 je atypický absencí charakteristické TATA oblasti a jeho jádro leží v oblasti -232 až -12 bp od iniciačního kodónu translace [86]. V promotoru CD47 byly nalezeny vazebné domény pro několik transkripčních faktorů: CREB, AP-2, MAZ, SP1 a **α -Pal/NRF-1**. Jeho vliv na expresi sestřihových variant CD47 byl studován na buněčných liniích i primárních buňkách hepatomu a neuroblastomu, kde byla potvrzena specifická exprese izoformy 1, 2 a 4 [86]. Indukovaná overexprese tohoto α -Pal/NRF-1 vedla ke zvýšení transkripční aktivity v promotorové oblasti CD47. Tento TF obecně zvyšuje expresi genů podporujících růst buňky.

Dále byla v promotorové oblasti CD47 nalezena vazebná sekvence pro **HIF-1 α** (5'-GCGTG-3') [60]. Ve své práci z roku 2015 Zhang a kol. dokazuje, že hypoxie, která je typickým znakem nádorového mikroprostředí, vede skrze tento TF ke zvýšení exprese CD47. Navíc buňky deficitní v tomto TF jsou významně více fagocytovány než buňky, které ho exprimují [60]. Pozitivní regulace CD47 skrze **HIF-1** (hypoxia-inducible factor 1) byla potvrzena u karcinomu prsu [60]. Vysoká úroveň exprese HIF souvisí s vyšším rizikem metastáz a s vyšší mortalitou [60].

Další regulátor, jehož vazebné místo bylo nalezeno v promotoru CD47, je všeobecný transkripční aktivátor **MYC** [87]. Kromě CD47 pozitivně reguluje i expresi adaptivního imunitního kontrolního bodu PD-L1. Snížená exprese MYC vede ke snížení exprese CD47 (na třetinu původní exprese) a PD-L1 (na tři čtvrtiny původní exprese). To však stačí k inaktivaci angiogeneze v nádoru a jeho regresi [87]. Při delecii MYC a současném zachování exprese CD47 a PD-L1 ale nedošlo k regresi nádorů [87]. Studie z roku 2013 naopak dokládá, že při signalizaci skrze CD47 dovnitř buňky dochází ke snížení exprese c-MYC a dalších kmenových

TF **OCT-4**, **SOX-2** a **KLF-4**. Naopak při ztrátě CD47 se zvyšuje exprese c-MYC a buňky se asymetricky dělí, což znamená, že aplikace antagonistů CD47 vede k obnově „self-renewal“ potenciálu [88]. Autoři také dokládají, že signalizací skrze CD47 lze ovlivňovat *in vivo* hladinu těchto kmenových TF. Například rovnováha mezi expresí CD47 a Sox2 může být v případě nefyziologického zánětu posunuta ve prospěch Sox2⁺ buněk, což napomáhá hojení. Vyšší exprese CD47 zároveň blokuje angiogenezi [88], což je ve shodě s výše zmiňovanou prací [87]. Rozpor mezi výše zmiňovanými studiemi je objasněn replikační studií z roku 2018. Ta potvrdila, že při zvýšené expresi MYC dochází k nespecifické aktivaci i těch genů v buňce, které byly před indukci abnormální exprese neaktivní [89].

Podle studie lidských embryonálních kmenových buněk (hESC) je exprese CD47 specifická pro populaci FOXA⁺ buněk a tyto buňky lze pomocí CD47 vyselektovat. Tyto buňky vykazují zvýšenou expresi SHH, FERD3L a SLIT2 [90]. U CD47⁺ progenitorových buněk mezencefalických dopaminergních neuronů byla zjištěna téměř dvojnásobná exprese Sox2 oproti CD47⁻ populaci, která navíc mezi 11. a 16. dnem diferenciaci klesla na méně než desetinu [90]. Exprese SHH je typická pro bazální vrstvu urotelu, a ztráta tohoto proteinu je spojována s tvorbou nádoru a jeho progresí do invazivního stádia [14].

U hepatocelulárního karcinomu bylo zjištěno, že zvýšená exprese CD47, která je způsobena faktorem **NFκB**, je zodpovědná za rezistenci nádoru vůči chemoterapii [91]. Tento TF je zodpovědný za vytvoření zánětlivého prostředí a produkci pyrogenů a dalších prozánětlivých cytokinů [91].

U buněčné linie se stabilně transfekovaným vektorem zaručujícím expresi **CEBPα** byla zjištěna 2,91krát zvýšená exprese CD47 [92]. CEBPα je tedy dalším významným faktorem zvyšujícím množství přítomného CD47. Zároveň bylo v roce 2016 dokázáno, že koexprese CEBPα s tzv. „OSKM koktejlem“ (OCT-4, SOX-2, KLF-4, MYC) způsobuje dediferenciaci lidských B buněk a vede až k tvorbě iPSC (indukované pluripotentní kmenové buňky) [93]. Exprese těchto TF způsobí rapidní dediferenciaci buňky, která vede již po jednom týdnu k produkci buněk exprimujících Nanog, který je typický embryonální TF zodpovědný za vysokou expresi OCT-4 [93].

Blízce příbuzný TF **CEBPβ** tvoří heterodimery s CEBPα. Mezi jím ovládané cílové geny patří například IL-1, IL-6 a TNFα, což jsou prozánětlivé proteiny indukované také NFκB signalizací, které jsou zodpovědné za zvýšení tělesné teploty. Dále indukuje expresi tzv. „multi-

drug transportérů“ ABCC2 [94] a ABCB1 [95], díky kterým se mohou buňky zbavovat látek jim nebezpečných, například léčiv, a jsou tak rezistentní vůči terapii.

2.5.3.1. EMT a související transkripční faktory (TF)

Rozšíření nádoru v těle je umožněno tzv. epiteliálně-mezenchymální přechod (epithelial-mesenchymal transition, EMT). EMT je děj, kdy dochází k přeprogramování buňky tak, aby byla schopna migrovat v těle [96]. Pro vytvoření metastázy je nutný následně i děj opačný, tzv. mezenchymálně-epiteliální přechod (MET), kdy naopak dochází ke změně ve prospěch epiteliálního fenotypu a buňka tak může v nové nise vytvořit metastázu [96, 97]. Všechny tyto procesy jsou umožněny změnami v epigenetické regulaci, která vede ke změně fenotypu buňky.

ZEB-1 je TF zodpovědný za indukci exprese IL-2, který podporuje diferenciaci T-buněk v thymu. Tento TF je dále zodpovědný za indukci metastáz u nádorů plic jako vedlejší efekt radioterapie [98].

Kromě ZEB-1 se na EMT podílí i jeho homolog ZEB-2 [99], dále SNAIL-1, TWIST-1 a TWIST-2 [100].

Aby byla buňka schopna vytvořit v místě, kam doputovala, metastázu, musí mít zároveň patřičné kmenové vlastnosti. Transkripční faktory a epigenetické změny zodpovědné za kmenový charakter i mobilitu buňky se tak vzájemně doplňují či překrývají.

2.5.4. Využití inhibice inhibičních imunitních kontrolních bodů

Stav IS závisí na rovnováze či nerovnováze aktivačních a inhibičních signálů. Inhibiční molekuly brání nadměrné aktivaci a autoimunitním reakcím. Inhibice těchto kontrolních imunitních bodů vede k aktivaci (nebo k přetrvání aktivovaného stavu) IS a lze ji tak využít jako terapeutický prostředek například u nádorů, kde je selhání IS předpokladem pro růst neoplázie [20].

Příkladem takové terapie jsou protilátky proti PD-1, PD-L1, CTLA-4. PD-1 a CTLA-4 jsou proteiny exprimované na T buňkách, tvoří vazbu s PD-L1, respektive s CD80/CD86. a tím zabraňují nadměrné aktivaci IS. Narušení osy CD80/CD86-CTLA-4 a PD-1-PD-L1 monoklonální protilátkou vede k odstranění inhibičního signálu, tedy ke kontinuální aktivaci příslušné T buňky, která následně zprostředkuje zneškodnění nádorových buněk. Blokátory PD-1-PD-L1 jsou dnes již používanou klinickou praxí i pro BCa: pembrolizumab, nivolumab

a durvalumab byly schváleny FDA v roce 2017, atezolizumab již o rok dříve, v květnu 2016 (vše shrnuto v [101]). Studie dokazují, že vlivem této léčby dochází k regresi i u velmi rezistentních nádorů a často k velmi dlouhé době přežití bez opětovného výskytu nádoru, ale například v případě inhibitorů PD-L1/PD-1 je terapie úspěšná pouze u 20-30 % pacientů [102]. Chybí jasně vymezená vstupní kritéria, podle kterých by bylo možné předem určit, pro které pacienty je léčba vhodná.

Inhibiční kontrolní body jsou nezbytnou součástí fungování nejen adaptivního, ale i přirozeného IS. Na rozdíl od výše zmíněných však inhibitory kontrolních bodů přirozeného IS zatím nejsou schváleny pro terapii nádorů.

Mechanismy funkce osy CD47-SIRPA byly popsány výše. Blokátory této osy jsou dnes testovány v klinických testech (shrnuté v [7], také viz tab. 2). Prediktivní stratifikace pacientů pro tuto léčbu zvýší její efektivitu. Proto je nezbytné studovat parametry CD47 na nádorových buňkách (exprese, stechiometrie, konformace), které ovlivňují jeho vazbu na SIRPA a tak zablkování fagocytózy.

V roce 2017 byla publikována práce charakterizující další kontrolní bod vrozené imunity. Je jím molekula MHC I exprimovaná na nádorových buňkách a inhibiční receptor makrofágů a NK buněk LILRB1 [103]. Exprese MHC I totiž koreluje se sníženou schopností makrofágů odstranit danou buňku. Analogicky k ose CD47-SIRPA dochází při zablkování LILRB1 signalizace monoklonální protilátkou k aktivaci fagocytózy. Při současném zablkování komponent obou os (CD47-SIRPA a MHC I-LILRB1) dochází k mnohonásobnému zvýšení fagocytické aktivity oproti kontrolám s blokací pouze jedné z těchto interakcí [103]. Schopnost LILRB1 vázat různé haplotypy MHC I je zajištěna vazbou na β -2-mikroglobulinovou podjednotku MHC I molekuly, která je společná všem haplotypům daného druhu. Zároveň je tato interakce právě druhově specifická [103].

V současnosti jedinou imunoterapií využívanou pro léčbu nádoru močového měchýře, který je objektem mého zájmu, je vakcína BCG (Bacillus Calmette-Guérin), jejíž aplikace vyvolá imunitní reakci proti nádoru. BCG se k terapii nádoru močového měchýře standardně používá již od roku 1977 a je aplikována pacientům s neinvazivní formou onemocnění, která představuje 75-80 % diagnostikovaných případů (Tis, T1, CIS) [104]. Jedná se o atenuovaný kmen *Mycobacterium bovis*, který byl již dříve používán k vakcinaci proti *Mycobacterium tuberculosis* [105]. Tato terapie snižuje pravděpodobnost progresu do invazivní formy

onemocnění až o 26-27 % [104]. Opět zde ale chybí klíč, podle kterého bychom byli schopni předem určit, zda bude daný pacient na léčbu odpovídat, či nikoli.

3. Cíle

Dlouhodobým cílem tohoto projektu je prediktivní stratifikace pacientů pro léčbu CD47-blokujícími mAbs. K dosažení tohoto cíle je zapotřebí nejprve dosáhnout minoritních cílů, které jsou ty hlavní pro moji diplomovou práci:

- Zmapování exprese CD47 a vybraných kmenových znaků v buněčných liniích BCa
- Charakterizace exprese CD47 na primárních buňkách BCa v kontextu nádorových kmenových buněk a jejich expresních profilů dle literatury
- Korelace výskytu zjištěných populací u různých pacientů v závislosti na stupni diferenciaci a vývoje nádoru („grading, staging“)
- Charakterizace epitopů CD47 na základě vazby maximálního počtu dostupných klonů CD47 monoklonálních protilátek v kompetičních FCM testech
- Na základě kompetičních testů stanovit klony specifické pro jednotlivé molekulární formy CD47 a sestavit panel protilátek
- Měření fagocytózy erytrocytů pomocí buněčných linií *in vitro* – ustanovení metodiky pro měření fagocytózy v patientských vzorcích včetně potvrzení inhibiční funkce protilátek

4. Materiály

Zkumavky 1,5ml a 2ml: Eppendorf

Zkumavky 15ml: Eppendorf

Zkumavky 50 ml: NUNC

96- a 384-jamkové destičky: Sigma-Aldrich

4.1. Buněčné linie

Fenotypizace buněčné linie: RT112 Heidelberg

Kompetiční test: Jurkat (ATCC)

THP-1 (DSMZ)

OV10 IAP+ (F. Lindberg, Washington University School of Medicine)

Měření fagocytózy *in vitro*: MonoMac-6 (DSMZ)

THP-1 (DSMZ)

Všechny buněčné linie pochází z ATCC (https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=cz) a z DSMZ (<https://www.dsmz.de/>), lidské erytrocyty byly separovány z plné krve zdravých dárců a byly ředěné v HBSS.

4.2. Klinické vzorky karcinomu močového měchýře

Vzorky nádoru močového měchýře byly poskytnuty spolupracujícími klinickými pracovišti Thomayerovou nemocnicí a Fakultní nemocnicí Motol v Praze během let 2014 – 2018. Vzorky byly odebrány během radikální cystektomie močového měchýře a rozděleny patologem na invazivní, exofytickou a normální část.

Tyto vzorky prošly kontrolním testováním kvality a přítomnosti nádorového fenotypu. Tkáňové bločky jsou skladovány v OTC (zdroj) po fixaci a stabilizaci v 30% sacharóze v -86 °C.

4.3. Kultivační média

- DMEM (10 % FCS), Sigma Aldrich, kultivace bez antibiotik, adherentní kultury
- RPMI (10 % FCS), Sigma Aldrich, kultivace bez antibiotik, suspenzní kultury lidských hematopoietických linií
- IMDM (5 % FCS), ÚMG AV ČR, kultivace bez antibiotik, linie OV10

4.4. Protilátky

<i>Antigen</i>	<i>Klon</i>	<i>Výrobce</i>	<i>Kat. č.</i>	<i>Fluorochrom</i>
CD47	B6H12	Invitrogen	17-0479-42	APC
CD47	2D3	Invitrogen	11-0478-42	FITC
CD47	CC2C6	Biologend	323108	PE
CD47	MEM122	Exbio	1F-225-T100	FITC
CD47	MEM122	Exbio	PB-225-T100	PB
CD47	MEM120	Exbio		Ascit
CD47	MEM133	Exbio		Ascit
CD47	CIKm1	HLDA Workshop	-----	Purifikát
CD47	BRIC126	HLDA Workshop	-----	Purifikát
CD49f	GoH3	Biologend	313606	FITC
CD44	IM7	Biologend	103056	PE/Dz594
CD90	5E10	Biologend	328120	AF700
CD31	WM59	Biologend	303122	BV605
CD326	9C4	Biologend	324226	BV650
CD45	HI30	Biologend	304048	BV785

4.5. Molekulárně biologické soupravy a chemikálie pro qPCR RNeasy Mini Kit 50, QIAGEN, kat. č. 74104

DNase I recombinant, Roche Diagnostics, REF. O4716728001

iTaq Universal SYBR Green Supermix, Cat. No. 172-5121, BIORAD

4.6. Ostatní chemikálie

- NaN₃: Sigma-Aldrich
- EDTA: Sigma-Aldrich
- KCl: Lachema
- NaOH: Lachema
- HCl: Lachema
- FBS: Biosera
- MgCl₂: Lachema
- HBSS: Sigma-Aldrich

- PBS: Sigma-Aldrich
- Hoechst 33342: Sigma-Aldrich
- Hoechst 33258: Sigma-Aldrich
- Liberáza TH: Sigma-Aldrich

4.7. Pístroje a software

- Průtokový cytometr BD™ LSR II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
- Centrifuga Eppendorf, 5810 R
- GentleMACS™ Dissociator
- Stratagene Mx3005P qPCR cykler, Agilent
- Thermal Cycler T100, Bio-Rad
- FlowJo v10.4, LLC, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
- GenEx v6, TATAA a multid, <http://www.biomcc.com/genex-software.html>
- Genevestigator, <https://genevestigator.com/gv/index.jsp>
- Cytobank, <https://www.cytobank.org/index.html>

5. Metody

5.1. Titrace mAbs a kompetiční test

Jednotlivé protilátky byly titrovány v rozsahu koncentrací ředění 1/5 až 1/2560 (viz Obr. 7) na ektopicky exprimovaném CD47 v buňkách linie OV10 (OV10 CD47+). Pro další experimenty jsem použila protilátky podle ředění v tabulce na Obr. 7, neboť při těchto koncentracích poskytují dostatečně silný pozitivní signál.

Kompetice protilátek byla měřena na 4 různých typech buněk, a sice na buňkách T-ALL linie Jurkat, OV10 CD47+ transfektantech (dále jen OV10), myeloidní THP-1 linie a na lidských erytrocytech separovaných z plně krve zdravých dárců. Abych se vyvarovala odchylkám způsobeným nepřesnostmi v pipetování a zároveň minimalizovala spotřebu protilátek, připravila jsem směsné vzorky obsahující všechny typy buněk. Buněčné linie proto byly nejprve značeny DDAO (pro kompetici s protilátkami značenými FITC) a CFSE (pro kompetici s protilátkami značenými APC a PE) v koncentracích 0,1 uM, 2,5 uM a 5 uM. Dále

byly buňky inkubovány 5 min na ledu s neznačenými blokujícími mAbs (BRIC126, CIK1, MEM-120, MEM-122, MEM-133, 2D3 a B6H12; všechny v koncentraci 1:20). Poté byly přidány značené protilátky klonů CC2C6, B6H12, 2D3 a MEM-122 a vzorky byly následně inkubovány a měřeny ve 4 různých experimentálních podmínkách: 10 min inkubace při 4 °C, 10 min inkubace při 37 °C, 1 hod inkubace při 4 °C, 1 hod inkubace při 37 °C.

5.2. Zpracování a analýza patientských vzorků

Vzorky tkáně BCa byly vloženy do disociačního roztoku (1 alikvot 0,15 Wunsch/mg liberázy TH ve 40 ml DMEM, 10% FCS) a disociovány v 37 °C po dobu 2-3 hodin za účelem vytvoření suspenze pomocí gentleMACS™ Dissociator. Buňky byly barveny 14 různými monoklonálními protilátkami pro charakterizaci jejich povrchového fenotypu, jako negativní kontroly byly změřeny separátní nebarvené vzorky. Kompenzační matice byla vypočtena automaticky z jednotlivě značených vzorků v programu FlowJo, ve kterém byla data dále zpracovávána.

CD47 byl značen protilátkou klonu CC2C6, který byl v naší laboratoři používán jako součást 14-ti barevného panelu pro fenotypizaci patientských BCa vzorků. Protože je ale tento klon konjugován s fykoerytrinem, z něhož získáváme příliš silný signál, nelze data správně kompenzovat, a proto je v současné době tento panel modifikován.

	V1-A	V3-A	V4-A	B1-A	B4-A	G1-A	V2-A	V5-A	V6-A	R1-A	R2-A	R3-A	G2-A	G5-A
V1-A	1,0000	0,0668	0,0329	0,0046	0,0000	-0,0001	0,4064	0,0241	0,0080	-0,0002	-0,0001	0,0000	0,0000	0,0000
V3-A	0,1901	1,0000	0,7022	0,0005	0,0175	0,2732	0,0114	0,4096	0,1640	0,2906	0,0426	0,3732	0,4493	0,5120
V4-A	0,1116	0,0591	1,0000	0,0003	0,0139	0,0013	0,0095	0,6368	0,1095	0,3857	0,0261	0,0118	0,0172	0,0581
B1-A	0,0040	0,0050	0,0020	1,0000	0,0080	0,0005	0,0482	0,0010	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000
B4-A	0,0065	0,0009	0,1217	0,0047	1,0000	0,0009	0,0028	1,2977	0,3184	0,5606	0,2098	0,1414	-0,0009	0,8556
G1-A	0,0003	0,0185	0,0067	0,0031	0,0197	1,0000	0,0010	0,0038	0,0006	0,0003	0,0000	0,0000	0,2782	0,0232
V2-A	0,2859	0,2709	0,1381	0,0290	0,0013	0,0020	1,0000	0,0912	0,0224	0,0005	-0,0023	0,0008	0,0008	0,0000
V5-A	0,0809	0,0010	0,0087	0,0004	0,0260	0,0001	0,0071	1,0000	0,2834	0,0254	0,0738	0,0452	0,0001	0,0535
V6-A	0,1181	0,0026	0,0044	0,0005	0,0003	0,0003	0,0121	0,0196	1,0000	0,0038	0,0037	0,0400	0,0002	0,0495
R1-A	0,0004	0,0001	0,0376	0,0001	0,0020	0,0001	0,0002	0,0156	0,0034	1,0000	0,0610	0,0254	0,0011	0,0443
R2-A	0,0072	0,0007	0,0014	0,0050	0,0258	0,0007	0,0036	0,3187	0,0842	0,1123	1,0000	0,4336	0,0043	0,3936
R3-A	0,0024	0,0002	0,0080	0,0005	0,0007	0,0005	0,0007	0,0047	0,1577	0,2279	0,0747	1,0000	0,0009	0,9803
G2-A	0,0009	0,0529	0,0267	0,0021	0,0945	0,4261	0,0006	0,0163	0,0031	0,0027	0,0001	0,0002	1,0000	0,1416
G5-A	0,0002	0,0002	0,0001	0,0004	0,0006	0,0076	0,0001	0,0003	0,0372	0,0003	0,0011	0,0182	0,0025	1,0000

Tab. 3 A Kompenzační matice vygenerovaná v programu FlowJo.

Pro tSNE analýzu byly vybrány živé a částečně i mrtvé buňky (viz Obr. 9). To proto, že u některých vzorků nebylo možné rozlišit přesnou hranici mezi těmito populacemi. Nejprve

jsem u všech vzorků vybrala populaci CD45⁺CD31⁻ (viz obr. 9), což je populace potenciálně nádorových buněk, protože neexprimuje ani leukocytární (CD45), ani endoteliální (CD31) znaky. Naproti tomu u nádorových buněk očekávám, že může, ale nemusí být zachována exprese CD326, což je znak epitelu, od kterého je BCa odvozen. Takto vybrané populace byly následně pomocí doplňku „Downsample plugin“ zmenšeny na 20000 buněk náhodným výběrem a následně byly všechny vzorky spojené do jednoho souboru podle typu tkáně (exofytická část nádor, invazivní část nádoru, normální urotel) („concatenation“).

Takto připravená data jsem dále analyzovala za pomoci doplňku „tSNE plugin“ (1000 iterací, perplexita=30, eta=200, theta=0,5). Tento plug-in slouží k automatické analýze víceparametrických dat a během následných iterací řadí příbuzné buňky tak, že ve výsledném grafu jsou nejbližší k sobě ty, které mají stejný, nebo podobný expresní profil a takové buňky pak vytváří shluky („cluster“). Naopak buňky nepříbuzné budou od sebe v grafu vzdáleny. Tato separace byla provedena na základě dat ze všech analyzovaných parametrů s výjimkou V1-A: Hoechst 33258, značícího DNA mrtvých buněk, protože při zahrnutí tohoto dominantního bimodálního kanálu by zbytečně docházelo k rozpadu všech shluků na dva menší, v případě, že obsahují živé i mrtvé buňky a vzniklý obraz by byl nepřehledný.

5.3. Test fagocytární aktivity

K tomuto experimentu byly použity buňky linií THP-1 a MonoMac6. Erythrocyty separované z plné krve zdravých dárců pomocí separace na Fickoll gradientu, byly značeny 10uM CFSE a 10 uM pHrodo. Dále byly inkubovány s různými CD47 mAb a s opsonizační protilátkou CD59. Poté byly erythrocyty a fagocytující buňky přeneseny do polystyrenové 96-jamkové desky, centrifugací (300 G) přivedeny do kontaktu a inkubovány 2 hodiny při 37 °C. Fagocytóza byla následně měřena při fyziologickém pH a dále po snížení pH na 4,1. Výsledky byly analyzovány za pomoci poměrného parametru pHrodo/CFSE.

5.4. Fenotypizace povrchových znaků buněčné linie RT112 Heidelberg a měření transkripce vybraných genů pomocí qPCR

Buňky linie RT112 Heidelberg jsem kultivovala za různých podmínek a následně jsem kvantifikovala expresi CD47 (CC2C6, Biolegend), CD90 (5E10, Biolegend), CD44 (IM7, Biolegend) a CD49f (GoH3, Biolegend) u odebraných vzorků. Vzorky značené přímo byly inkubovány taktéž 20 min s primárně značenou mAb (ředění 1:80). Po promytí byl k vzorkům přidán Hoechst 33342 pro diskriminaci živých a mrtvých buněk v koncentraci 0,1ug/ml.

RNA byla izolována pomocí komerčního kitu. Extrahovaná RNA byla vodou naředěna na 12,5 ng/ul. Následně jsem provedla reverzní transkripci. Reakce byla provedena ve dvojici při celkovém objemu každé rakce 20 ul obsahujícím 100 ng RNA. Pro zvýšení čistoty byly vzorky (8 ul vzorku + 2 ul H₂O) inkubovány s 2 ul DNázy I, reakce byla následně inhibována 10 min inkubací v 75 °C. K vzorkům byly následně přidány 2 ul RT MasterMix1 (= 1 ul náhodných hexamerů + 1 ul dNTPs v poměru 1:1:1:1, dále je MM1). Po 5 min v 65 °C a následném ochlazení na ledě bylo přidáno 6 ul RT MasterMix2 (= 4 ul pufru + 1 ul DTT + 1 ul SuperScript III RT, Invitrogen). Parametry následné RT jsou v tab. 4.

Následně byla kvantifikována exprese vybraných transkripčních faktorů (OCT-4, SOX-2, TWIST1, TWIST2, CEBPA, CEBPB, c-MYC, ZEB1, ZEB2) a povrchových receptorů CD44 a CD133 pomocí qPCR. Ke qPCR MasterMix (= 8,2 ul H₂O + 10 ul SYBR Greenu + 0,4 ul forward primeru + 0,4 ul reverse primeru) byl přidán 1 ul vzorku. Parametry (délka, počet a teplota cyklů jsou v Tab. 4).

Primery použité v experimentu byly darovány laboratoří Zdeňka Hodného, M.D., PhD., ÚMG, AV ČR:

Gen	Fwd primer	Rev primer
OCT-4	CAGCTTGGGCTCGAGAAG	CCTCTCGTTGTGCATAGTCG
SOX-2	CAAGATGCACAACCTCGGAGA	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC
TWIST-1	GCAGGACGTGTCCAGCTC	CTGGCTCTTCTCGCTGTT
TWIST-2	GCAAGAAGTCGAGCGAAGAT	GCTCTGCAGCTCCTCGAA
CEBPA	AGGAGGATGAAGCCAAGCAGCT	AGTGCGCGATCTGGAAGTGCAG
CEBPB	CGCTTACCTCGGCTACCA	ACGAGGAGGACGTGGAGAG
C-MYC	CCTACCCTCTCAACGACAGC	ACTCTGACCTTTTGCCAGGA
ZEB-1	GGCATAACCTACTCAACTACGG	TGGGCGGTGTAGAATCAGAGTC
ZEB-2	AATGCACAGAGTGTGGCAAGGC	CTGCTGATGTGCGAACTGTAGG
CD44	CCAGAAGGAACAGTGGTTTGGC	ACTGTCCTCTGGGCTTGGTGTT
CD133	TTTTGCGGTAAAACCTGGCTAA	CCATTTTCCATATTTTTCATG

Z naměřených hodnot byla vypočítána relativní hodnota exprese $R=2^{-\Delta Ct}$, kde ΔCt testovacího vzorku = Ct cílového genu - Ct house-keeping genu. Tyto hodnoty byly získány za použití programu GenEx v6 (<http://www.biomcc.com/genex-software.html>).

A.	Teplota	Čas	Opakování cyklu
Reverzní transkripce	65 °C	5 min	1
	0 °C	1 min	1
	25 °C	5 min	1
	50 °C	50 min	1
	70 °C	15 min	1
	15 °C	∞	1
qPCR	95 °C	10 min	1
	95 °C	30 s	40
	55 °C	1 min	
	72 °C	1 min	
	95 °C	1 min	1
	55 °C	30 s	1
	95 °C	30 s	1

Tab. 4 Průběh reverzní transkripce a kvantitativní PCR.

5.5. Indukce CD47 pomocí CEBPa

Buňky s inducibilní expresí CEBPa byly věnovány laboratoři Meritxell Alberich Jorda, ÚMG, AV ČR, a byly kultivovány v RPMI s estradiolem (1 uM/ml). Po 3 a 9 dnech indukce jsem kvantifikovala expresi CD47 protilátkou klonu CC2C6 (Biolegend, 1:80).

5.6. Bioinformatická analýza koregulace exprese genů

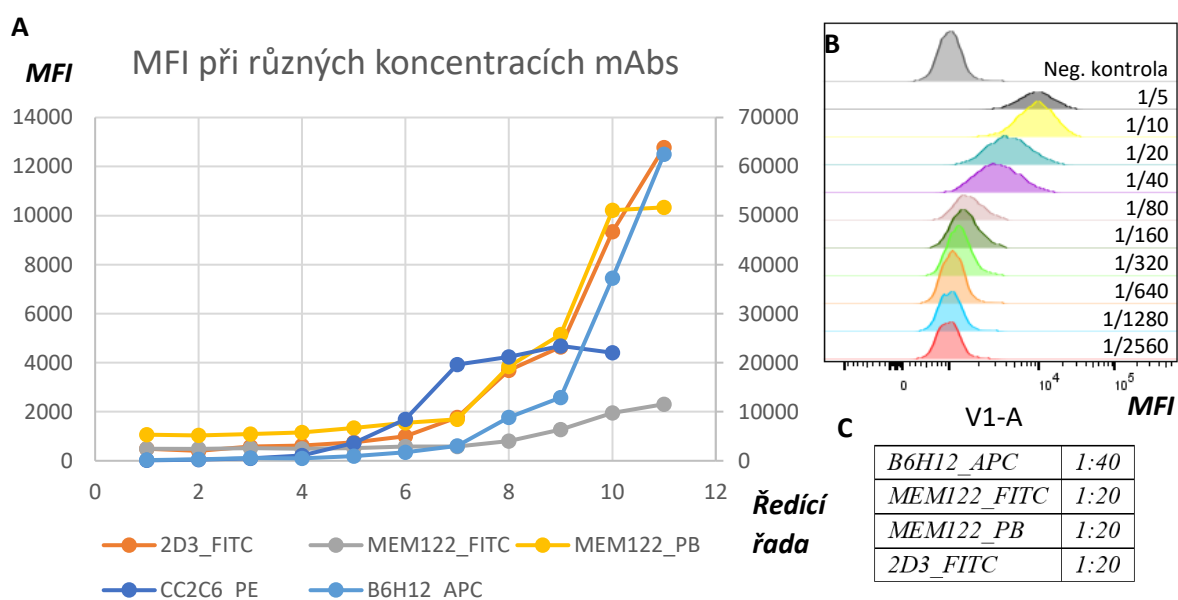
Pomocí programu Genevestigator® jsem provedla bioinformatickou analýzu s využitím nástroje „Gene Set Enrichment Analysis“. Díky datům z mRNA microarray experimentů zařazeným v této databázi v kategorii „Reactome pathways“ a „Gene Ontology“ jsem porovnávala expresi CD47 se skupinami genů, které jsou v Genevestigator zařazeny v těchto kategoriích. Ze skupin, ve kterých byl CD47 přítomen, jsem vybrala ty, které potenciálně funkčně souvisí se signalizací skrze CD47 (regulace fagocytózy, opsonizace, SIRPA interakce, trombospondinové interakce, přenos signálu, regulace endocytózy, imunitní procesy, regulace imunitních procesů, lokalizace buňky, regulace signalizace, signalizace povrchovými receptory) a v těchto skupinách jsem hledala geny, které jsem kvantifikovala v qPCR experimentu.

6. Výsledky

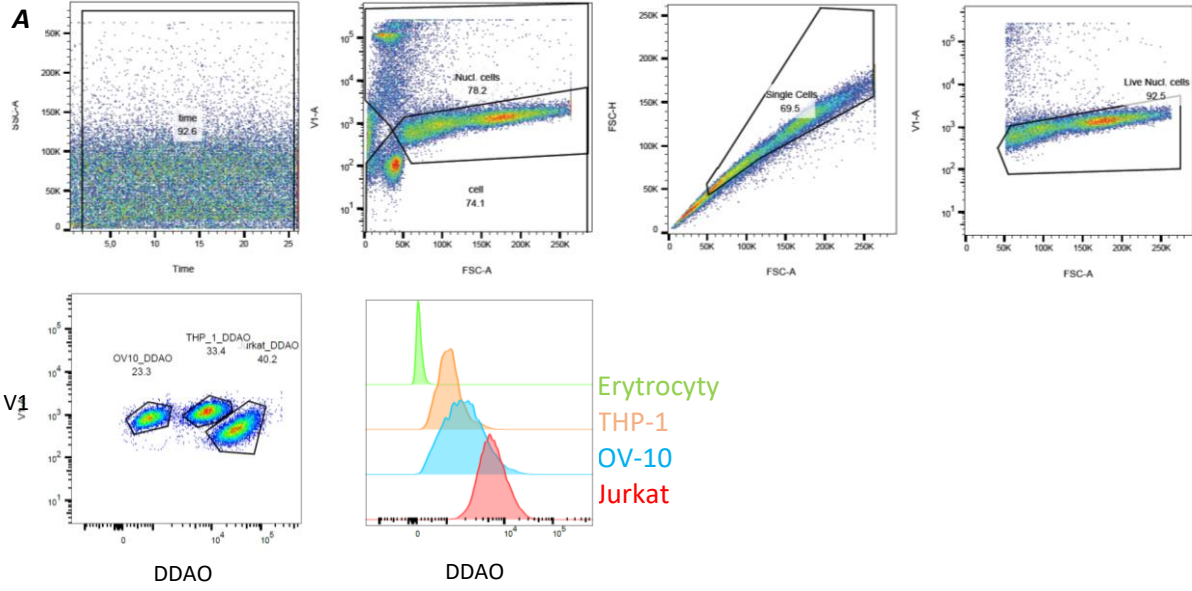
6.1. Titrace protilátek a kompetiční test

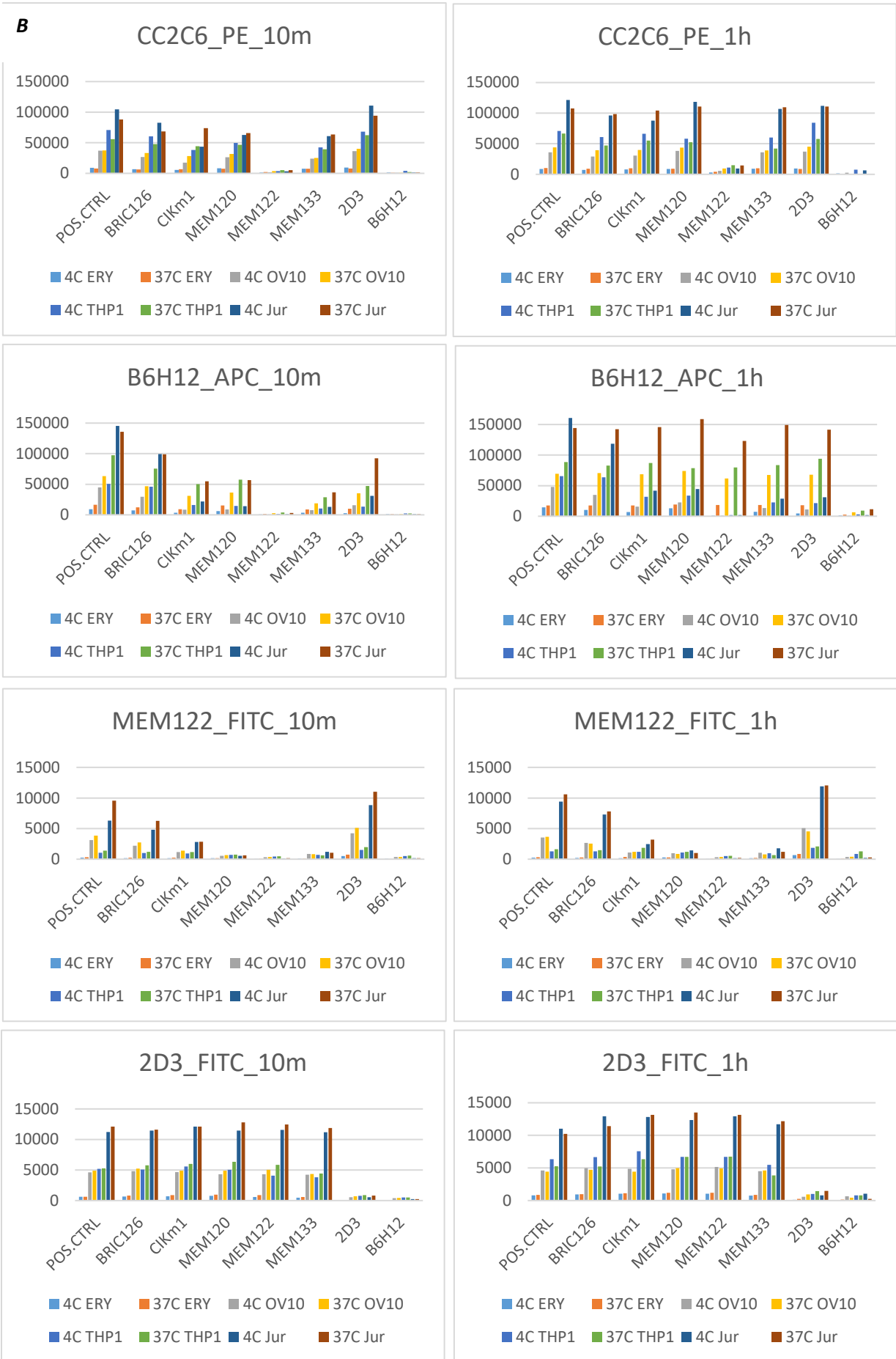
Před použitím všech značených protilátek jsem provedla jejich titraci. Pro další použití jsem zvolila koncentrace mAbs v tabulce na Obr. 7 C. Všechny mAbs jsou komerčně dostupné a byly dodány v saturačních koncentracích.

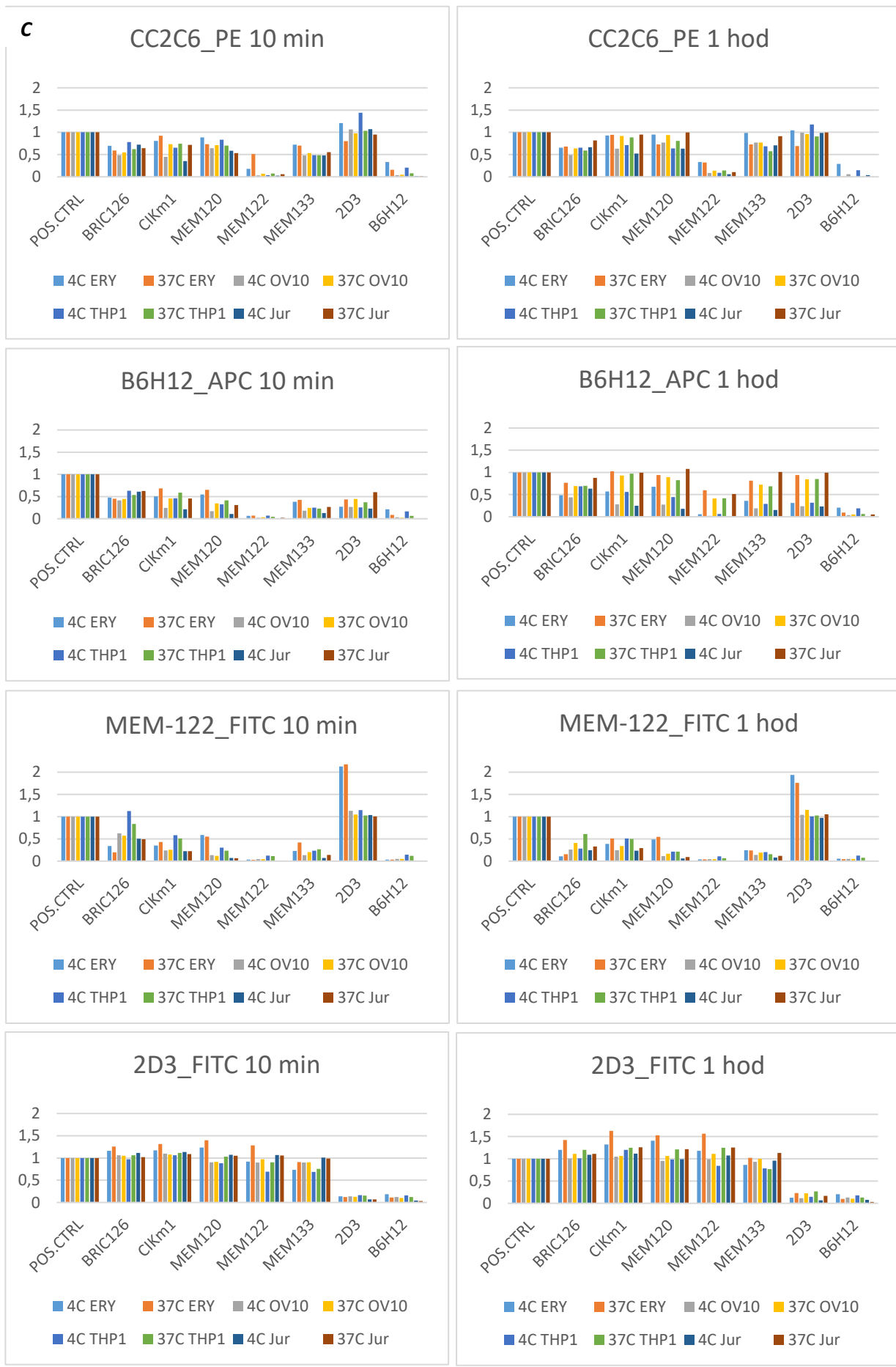
Pro studium molekulárních forem CD47 exprimovaných na buňkách biologického vzorku je nezbytné stanovit panel protilátek specificky reagujících s těmito jednotlivými formami. Proto jsem provedla kompetiční test různých klonů CD47-specifických mAb na Obr. 8. Takový test umožňuje získat informaci o tom, které mAbs pokrývají stejný epitop cílové molekuly, nebo stéricky brání navázání jiné protilátky



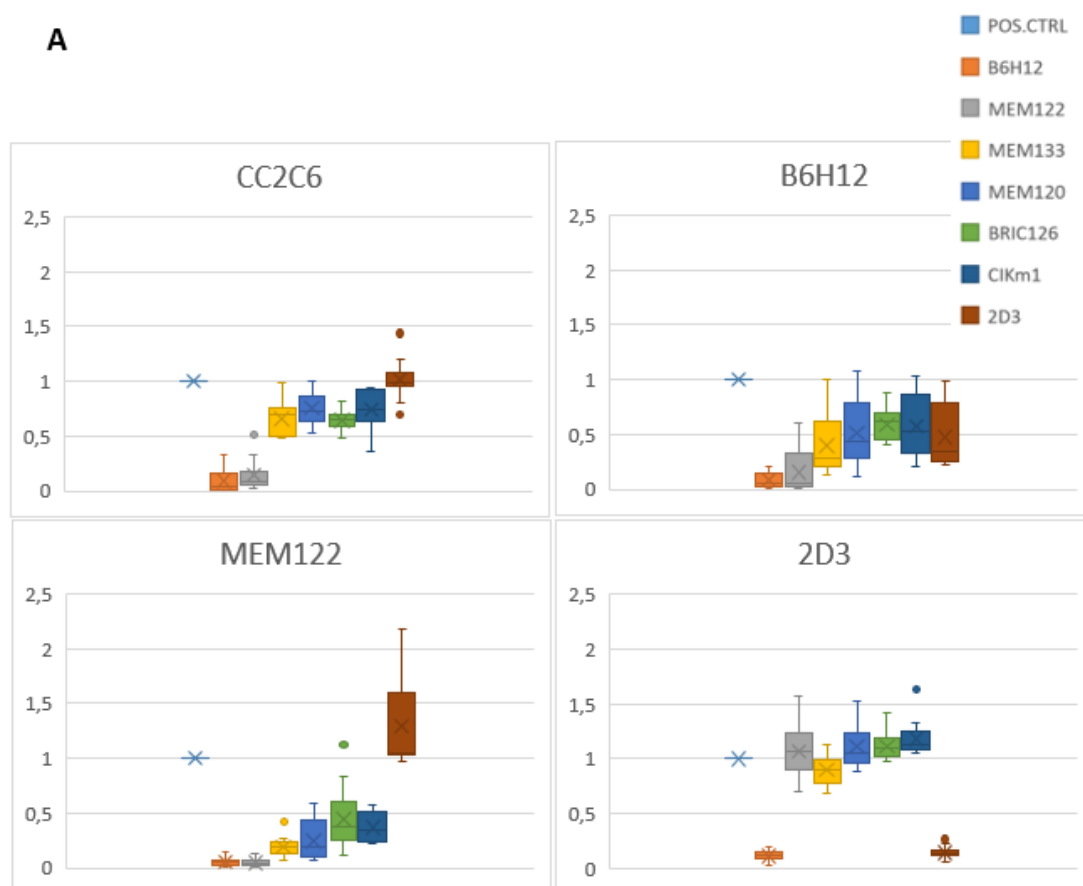
Obr. 7 A. Titrační křivky 4 různých protilátek, křivka klonu B6H12 je zobrazena na vedlejší ose. B. Histogramy fluorescenční intenzity různých koncentrací klonu MEM122_PB. C. Tabulka dále používaných koncentrací pro barvení danými protilátkami.

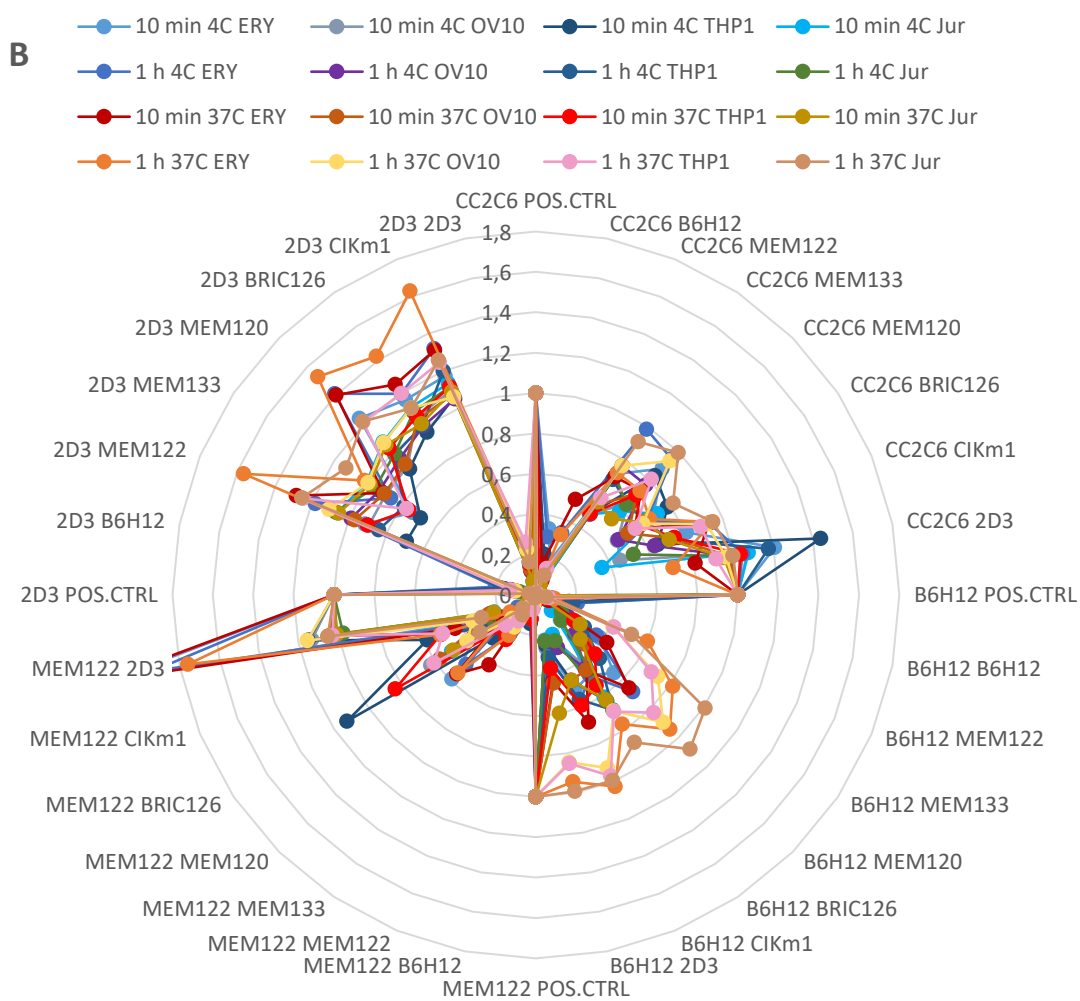






Obr. 8: **A.** Strategie ohraničení cílové populace (anglicky „gating“): zobrazena jsou data naměřená po 1 hodině inkubace při 4 °C pro klon MEM-122 blokováný klonem BRIC-126. **B.** Výsledky competičního testu (podíl vazebné aktivity) se značenými mAb CC2C6, MEM-122, B6H12 a 2D3 po 10 minutách a 1 hodině inkubace. Vynesená data jsou průměr ze 3 opakování téhož experimentu. **C.** Absolutní hodnoty výsledků jednoho z měření.

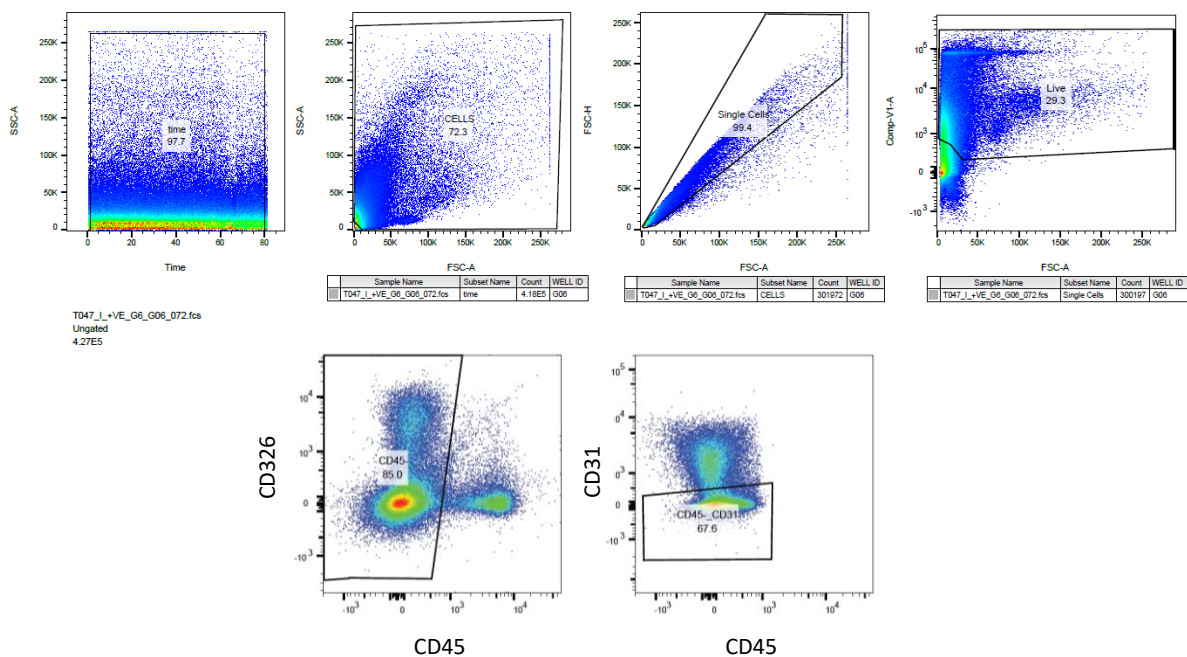




Obr. 20 A variabilita reaktivity mezi různými experimentálními podmínkami (teplota, doba inkubace). B Souhrnný graf relativních hodnot MFI kombinující všechny podmínky a všechny kombinace mAbs.

Na obr. 20 lze pozorovat trendy jednotlivých protilátek. Na základě těchto trendů lze testované protilátky podle podobnosti jejich reaktivity rozřadit do 3 skupin: **1. BRIC-126 a CIK1**, **2. MEM120, MEM-122 a MEM-133**, kdy MEM-133 kompetuje i při 4 °C silně s MEM-122 (MFI 3% u linie Jurkat) a méně s CC2C6 (MFI 26%), **3. 2D3, 4. B6H12 a CC2C6**. Podle reaktivity s protilátkou 2D3 se navíc významně podobají všechny protilátky prvních dvou zmiňovaných skupin.

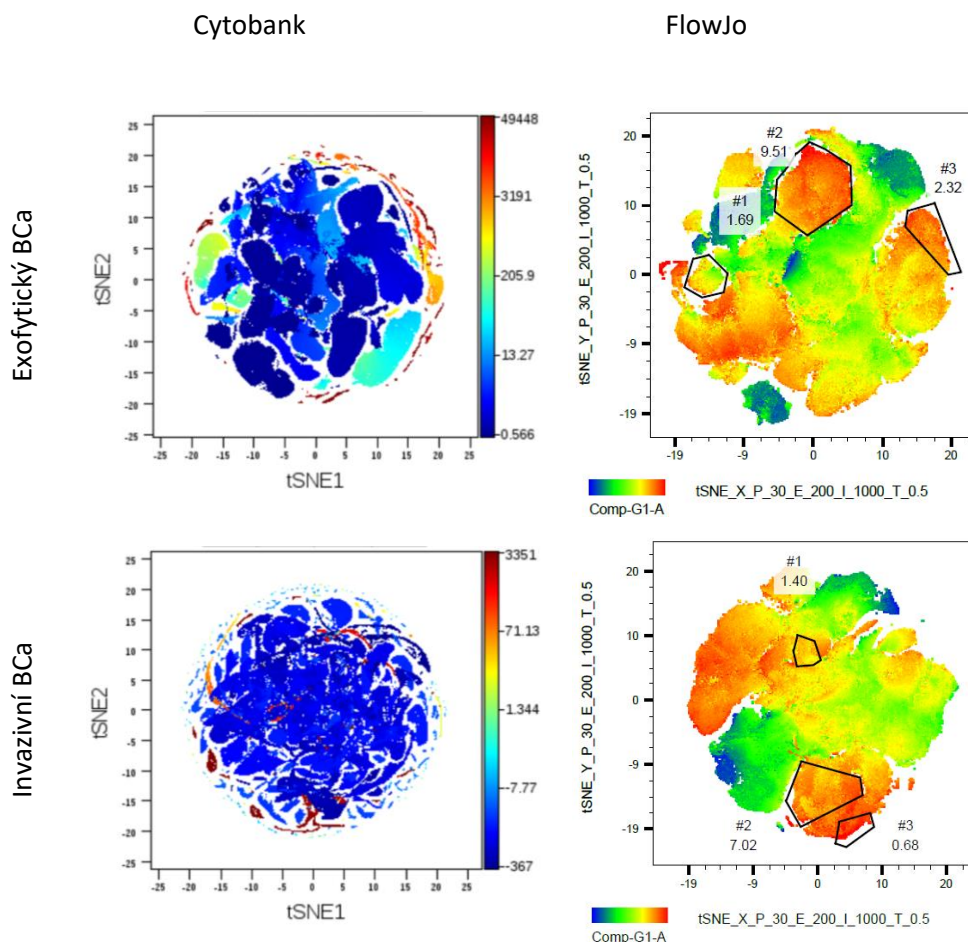
6.2. Fenotypizace patientských vzorků



Obr. 9 Výběr populací buněk pro tSNE analýzu.

„Stochastic neighbour embedding“ (SNE) analýza byla zpracována pomocí dvou různých programů. viSNE analýza vytvořená v programu Cytobank (<https://www.cytobank.org/index.html>) vykazuje lepší separaci jednotlivých populací než tSNE analýza ve FlowJo. Na druhou stranu CD47-pozitivní buňky jsou lokalizovány výhradně ve velmi malých shlucích „rozdobených“ v okrajích viSNE diagramu (viz Obr. 10), což je znak nesprávně provedené analýzy, většinou způsobené vysokou hodnotou „perplexity“ parametru. Tyto populace se navíc vzájemně prolínají natolik, že ani není možné je dále analyzovat. Proto byly pro další analýzu vybrány výsledky z tSNE analýzy ve FlowJo.

Jediný rozdíl mezi výše zmíněnými softwary spočívá v tom, že Cytobank bere jako výchozí nastavení osy pro SNE analýzu osy škálování Arcsinh. V programu FlowJo byla analýza provedena s daty zobrazenými na biexponenciální škále. Vzhledem k tomu, že SNE algoritmus Cytobank i FlowJo provádí analýzu na základě grafického zobrazení, nikoli matematických hodnot dat, je zřejmě tento rozdíl jednou z příčin odlišností ve výstupních hodnotách.

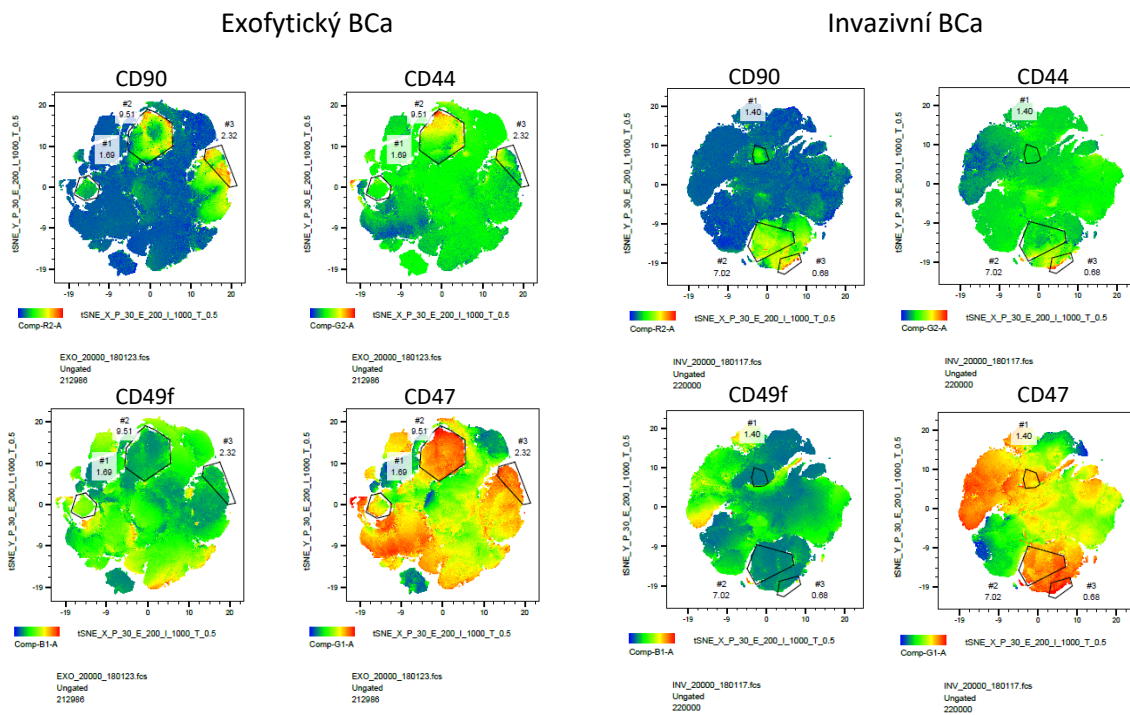


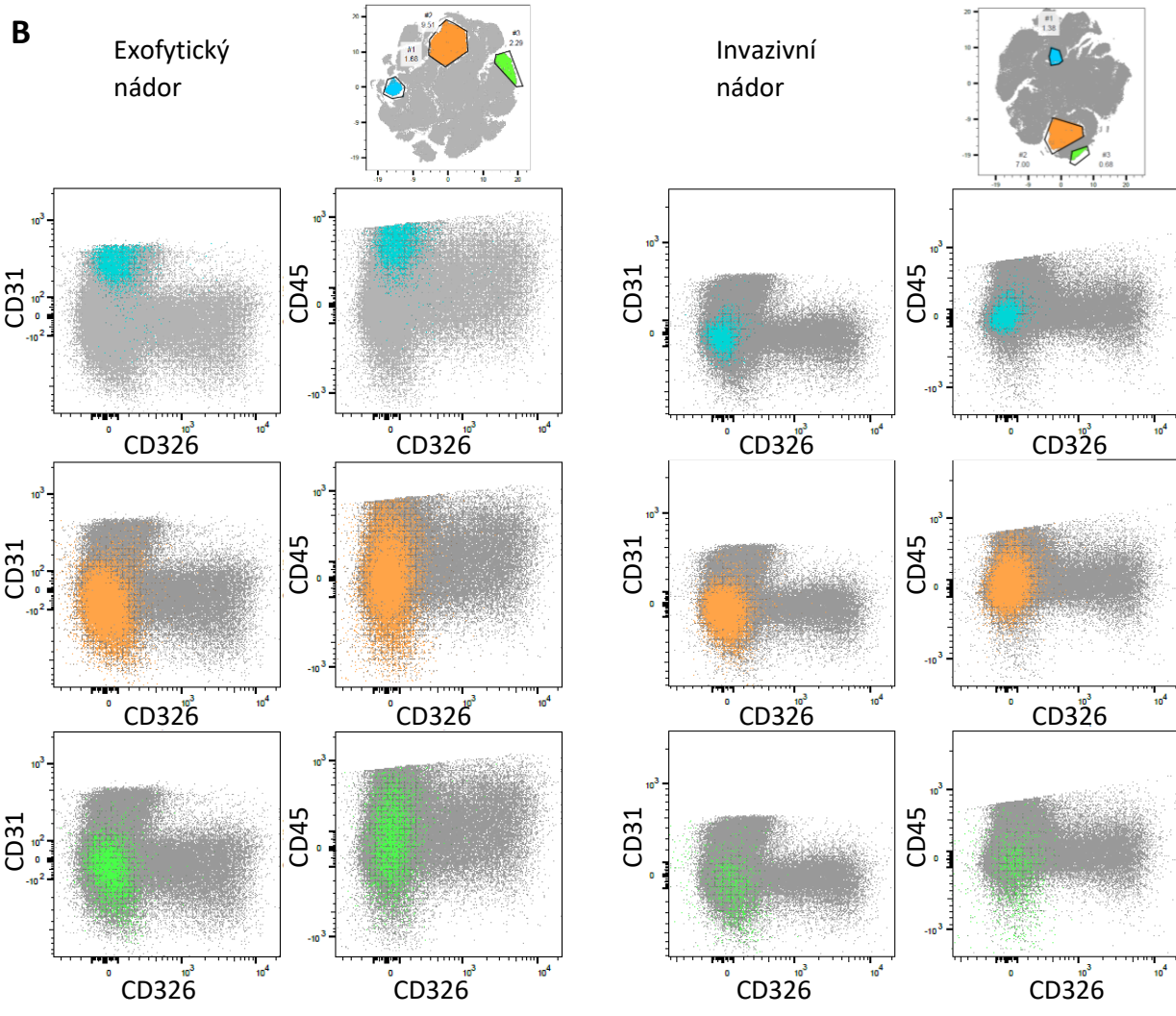
Obr. 10 Porovnání programů Cytobank (vlevo) a FlowJo (vpravo).

V tSNE plotech jsem manuálně vybrala $CD90^+CD44^+CD49f^+$ populace buněk, které fenotypově odpovídají nediferencované bazální (kmenové) populaci BCa (viz obr. 3). Dále jsem analyzovala expresi CD47 u těchto populací. Ze škálových zobrazení na obr. 11 vyplývá, že exprese CD90 je všeobecně nižší než u ostatních znaků. To odpovídá teorii, že jeho exprese je omezena pouze na buňky kmenového charakteru. Buňky exprimující CD90 zároveň silně exprimují CD47, ale exprese CD47 není specifická pouze pro $CD90^+$ populace.

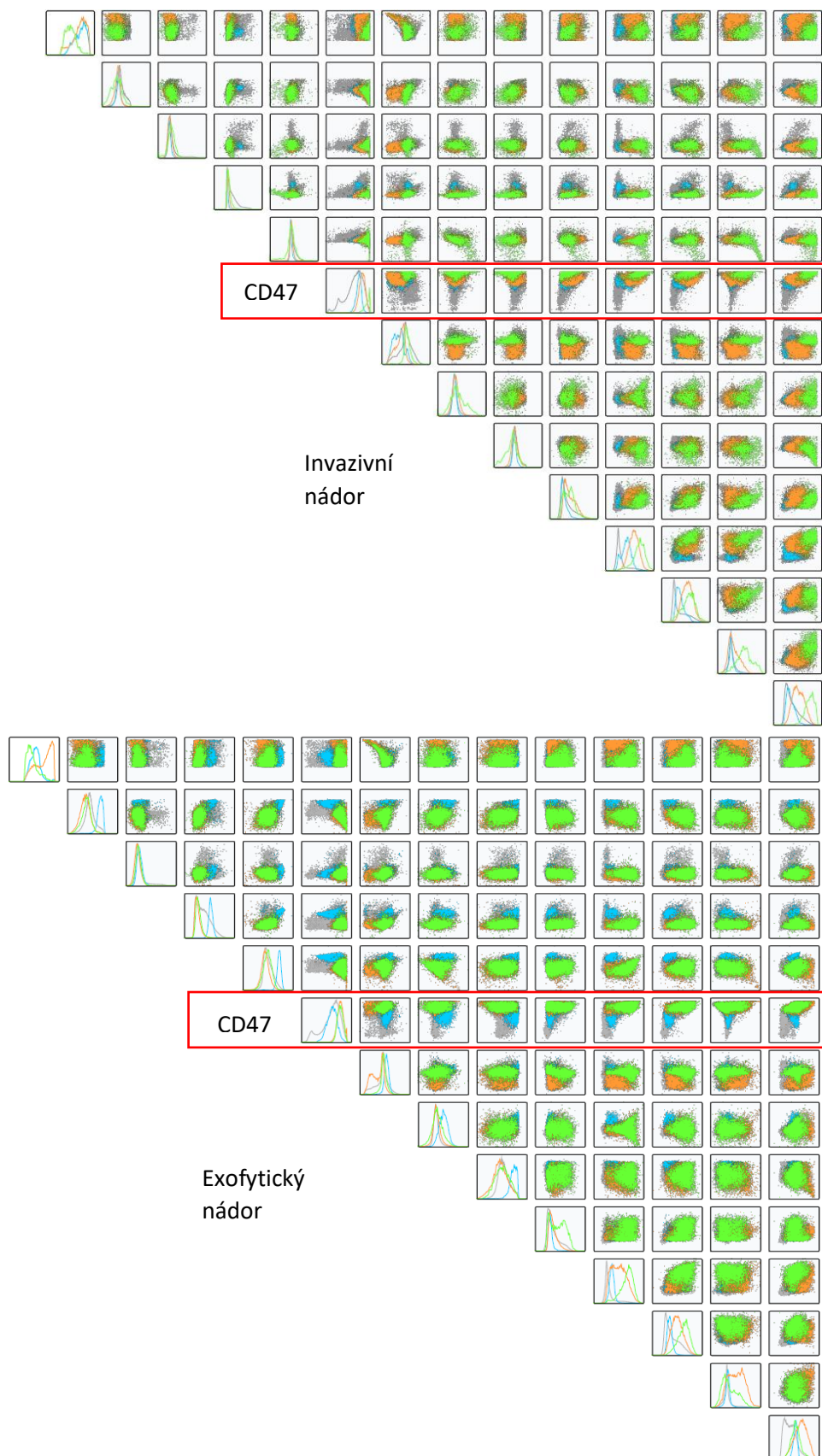
Na obr.11 B je ukázána zpětná analýza cílové populace, tzv. „backgating“, tedy zpětné zobrazení výsledných populací získaných ze SNE analýzy na parametrech původní „gatovací strategie“. U exofytického nádoru má populace #1 vyšší expresi CD31 i CD45. Ostatní vybrané populace jsou negativní na CD31, CD45 i CD326. Pravděpodobně se tedy jedná o nádorové buňky, které navíc již natolik změnily svůj fenotyp, že na rozdíl od zdravých uroteliálních buněk neexprimují typický epiteliální znak CD326.

A



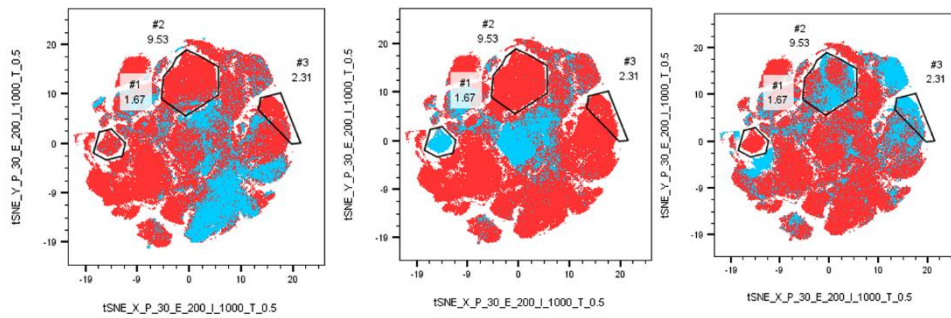


Obr. 11 A. Heat-mapy exprese CD90, CD44, CD49f a CD47. **B.** Exprese CD31, CD326 a CD45 u populací buněk vybraných z tSNE analýzy



Obr. 12 Souhrn exprese všech měřených znaků u vybraných populací.

Z obr. 13 je patrné, že zastoupení vybraných populací se mezi pacienty výrazně liší. Dokonce ani při porovnání pacientů podle typu nádoru (Tis, T1, T2, T3...) nevykazují tato data žádný trend (kompletní data viz 10. Doplnující informace).



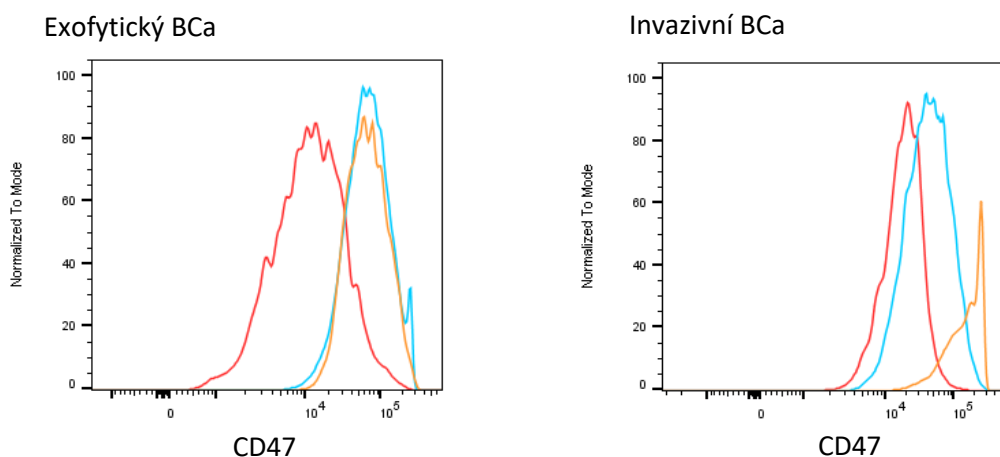
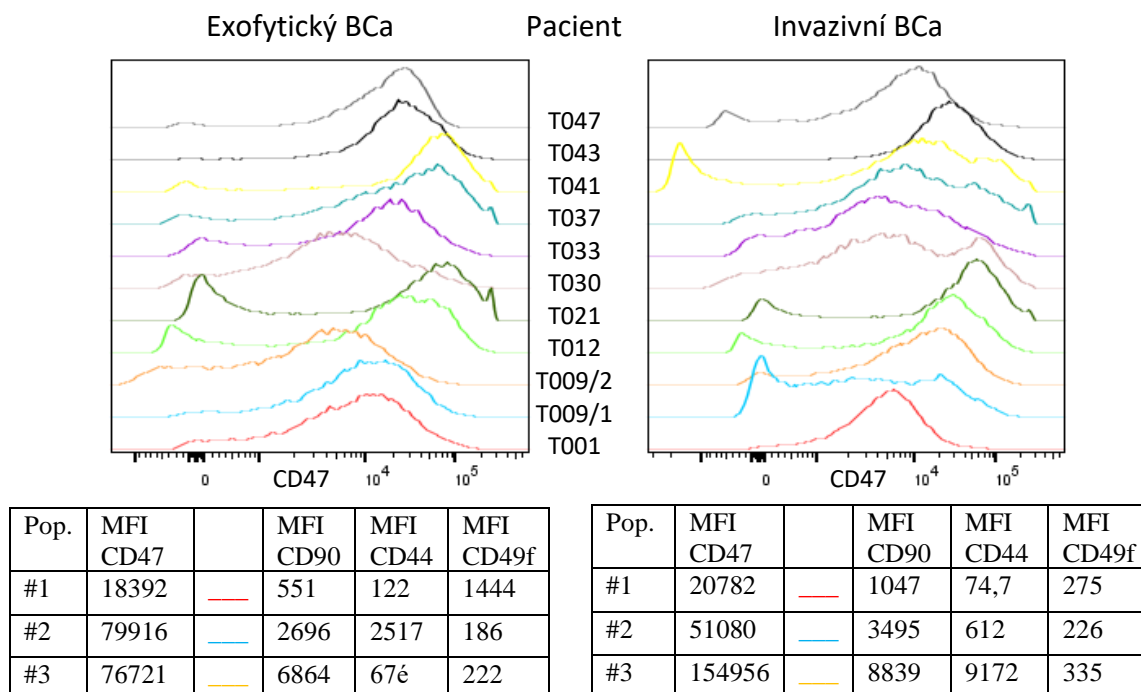
Pacient: T009

T010

T043

Obr. 13 Zastoupení jednotlivých populací u vybraných pacientů (pacient T009 a T10-typ T3a, pacient T043-typ T1).

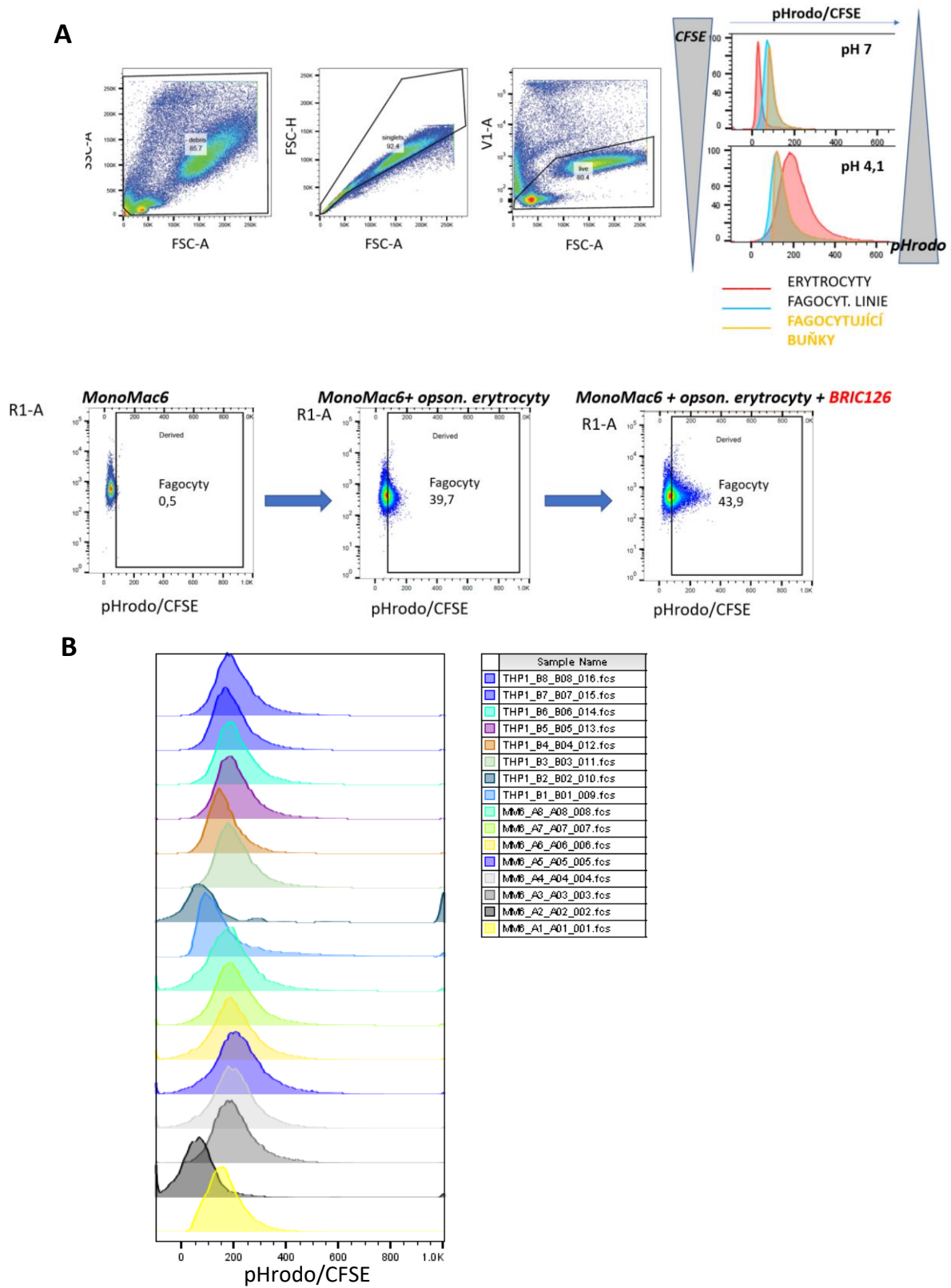
Obr. 14 ukazuje heterogenitu exprese CD47 mezi pacienty (A) a mezi vybranými populacemi nádorových buněk (B).



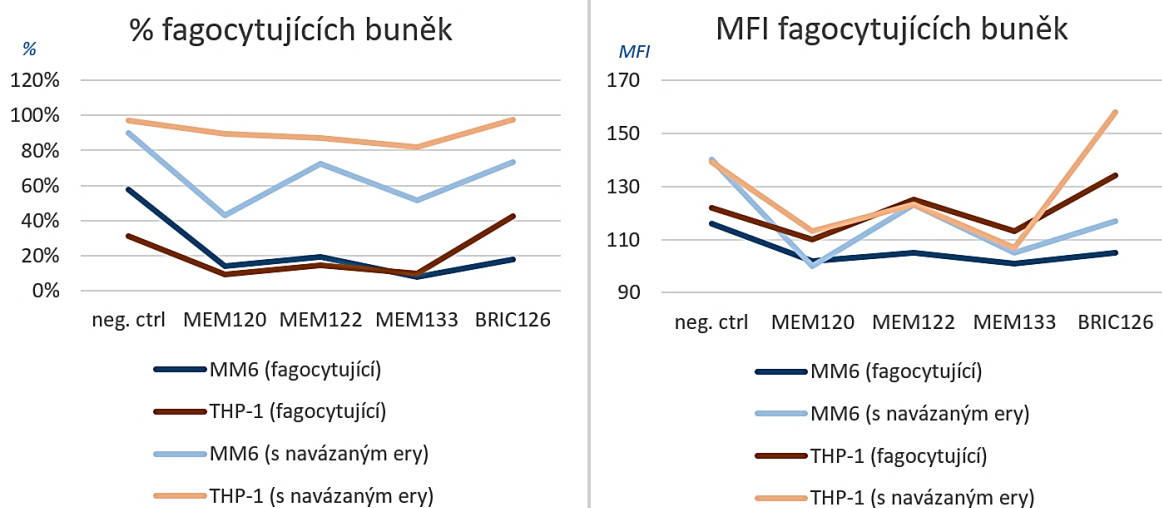
Obr. 14 Expres CD47 u jednotlivých pacientů a u vybraných populací.

6.3. Test fagocytární aktivity

Gatovací strategie měření míry probíhající fagocytózy je na obr. 15. Podíl fagocytujících buněk ze všech buněk fagocytární linie byl spočítán při pH 7 a pH 4,1. Při snížení pH totiž dochází k navýšení pozitivního signálu i u erytrocytů, které jsou pouze přichycené na povrchu buňky a způsobují tak falešný pozitivní signál. Rozdíl v těchto procentech představuje právě příspěvek erytrocytů přisedlých na buněčnou membránu makrofágů. Výsledný počet fagocytujících buněk je vypočítán jako počet $pH_{rodo}/CFSE^{poz}$ při pH7. Při pH4 měřím počet buněk, které fagocytovaly, nebo na sobě mají přisedlý erytrocyt a pravděpodobně jej teprve budou fagocytovat.



Obr. 15 A Výběr populací pro analýzu podílu fagocytujících buněk. B Poměrný signál pHrodo/CFSE erytrocytů při pH 4,1.

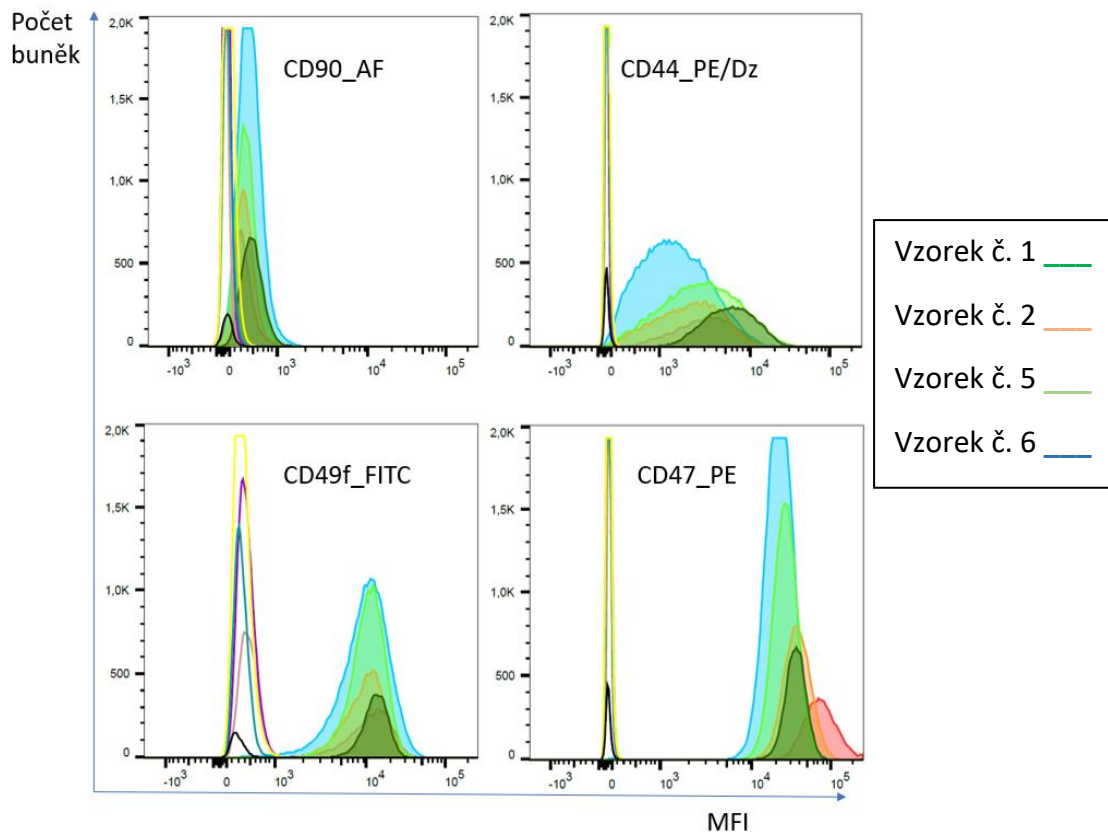


Obr. 16 Probíhající fagocytóza po zablokování CD47 vybranými klony protilátek (neg. ctrl=opsonizované erythrocyty inkubované s fagocyty bez CD47 mAbs).

Oproti negativní kontrole jsem získala velmi slabý signál při použití mAb BRIC126, a záporný signál v případě ostatních klonů. Tento rozdíl může být dán různou opsonizační aktivitou izotypů použitých mAbs (MEM-120 a MEM-122: IgM, MEM-133: IgG2a, BRIC126: IgG2b; viz tab. 1). Data byla získána pouze z jednoho opakování experimentu, proto je potřeba jej zopakovat se zpracováním připomínek (viz diskuze).

6.4. Fenotypizace buněčných linií rodiny RT112 a měření exprese TF pomocí qPCR

Tento experiment byl proveden ve spolupráci s Ústavem Biologie Lékařské Fakulty v Plzni Univerzity Karlovy v Praze. Kultivací v různých podmínkách (zejména různá konfluence buněk) jsem získala vzorky s různou expresí těchto kmenových znaků a CD47 (viz obr. 17), které jsem dále využila pro korelaci s expresí TF.



Obr. 17 Exprese kmenových znaků a CD47 u vzorků číslo 1, 2, 5 a 6.

VZ.	GAPD										TWIST			CD133
	H	HPRT	OCT4	SOX2	c-MYC	CEBPa	CEBPb	CD44	ZEB1	ZEB2	1	2		
1	21,945	29,34	29,945	27,975	25,675	27,315	28,615	25,25	28,865	30,96	30,715	30,195	30,44	
2	24,665	32,24	31,18	30,05	28,365	29,535	31,47	28,47	32,43	30,17	32,13	32,17	29,45	
3	21,2	27,745	30,455	27,965	25,315	27,205	27,775	24,305	30,72	30,34	30,675	30,1	30,255	
4	21,26	28,175	30,455	27,395	25,6	26,9	27,465	24,53	31,28	30,4	30,795	30,365	31,67	
5	21,145	28,07	28,87	26,865	25,55	27,035	28,44	24,635	31,17	29,345	30,135	29	29,74	
6	25,08	32,995	30,765	30,3	29,225	29,35	31,695	29,265	32,76	32,465	32,675	31,665	28,945	
7	21,66	28,865	30,5	28,19	25,685	28,03	28,295	26,105	31,305	30,81	31,235	30,665	31,075	
8	22,03	29,395	30,505	28,55	26,145	28,005	28,795	26,75	31,875	30,455	31	30,825	30,625	
9	21,49	28,76	29,51	27,28	25,795	27,15	28,53	24,815	31,01	30,24	29,455	29,525	29,255	
K	37,225	no CT	29,625	29,665	35,265	29,22	34,66	31,995	35,895	33,18	32,785	32,885	33,18	

Tab. 5 Ct jednotlivých vzorků pro jednotlivé geny před analýzou. Zobrazené hodnoty byly vypočteny jako průměr technických duplikátů.

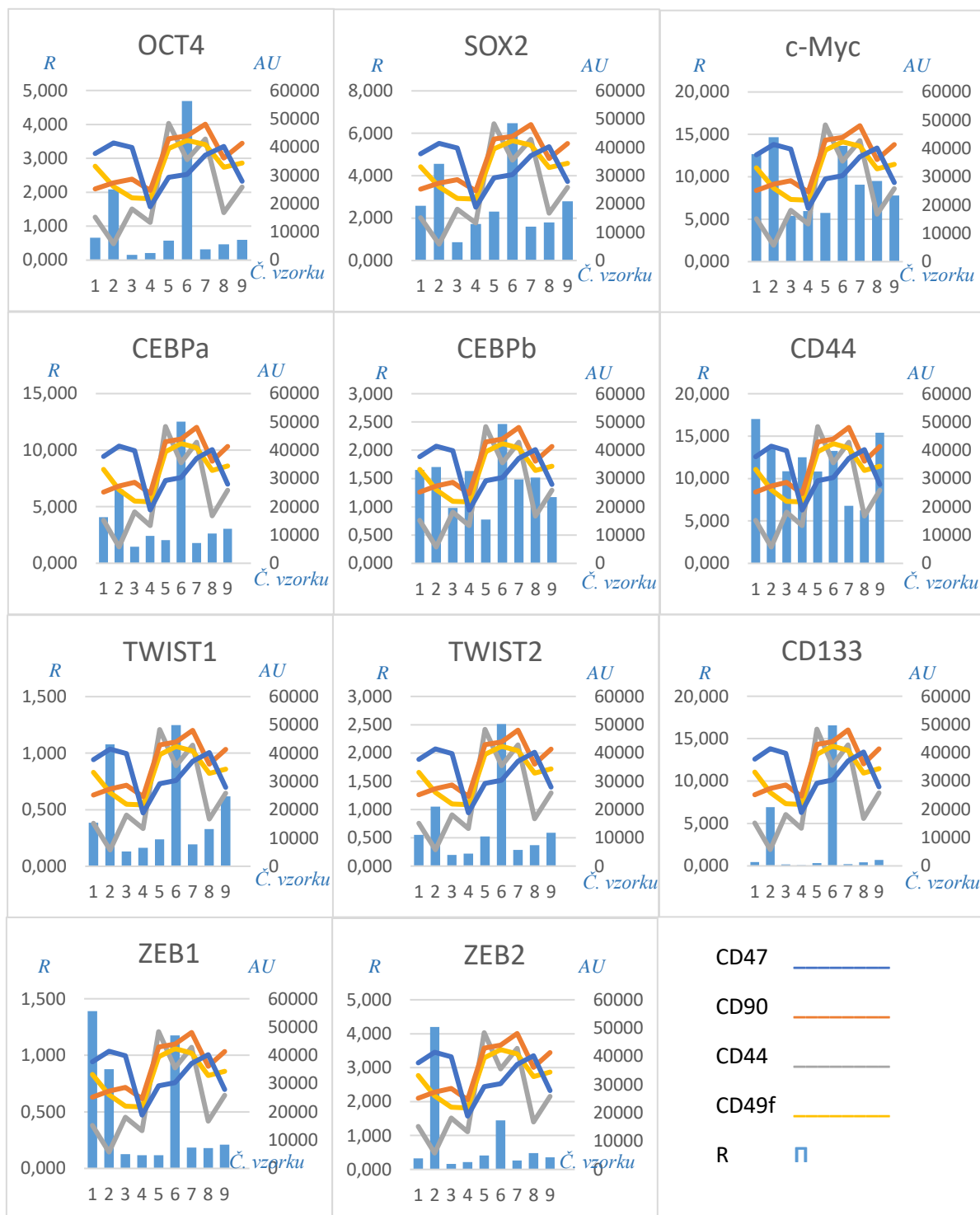
vzorek	OCT4	SOX2	c-MYC	CEBPa	CEBPb	CD44	ZEB1	ZEB2	TWIST1	TWIST2	CD133
1	0,657	2,576	12,685	4,070	1,653	17,030	1,390	0,325	0,386	0,553	0,467
2	2,085	4,563	14,672	6,521	1,705	13,642	0,877	4,199	1,079	1,050	6,916
3	0,153	0,859	5,389	1,454	0,979	10,853	0,127	0,166	0,131	0,195	0,176
4	0,206	1,717	5,959	2,420	1,636	12,510	0,116	0,214	0,163	0,219	0,089
5	0,574	2,305	5,736	2,049	0,774	10,815	0,117	0,413	0,239	0,525	0,314
6	4,691	6,476	13,642	12,510	2,462	13,269	1,177	1,444	1,248	2,514	16,564
7	0,322	1,597	9,063	1,784	1,485	6,774	0,184	0,260	0,193	0,287	0,216
8	0,463	1,796	9,514	2,621	1,516	6,255	0,179	0,480	0,329	0,371	0,426
9	0,595	2,789	7,808	3,053	1,173	15,402	0,210	0,358	0,618	0,588	0,710

Tab. 6 Relativní exprese jednotlivých genů vypočtená jako $R=2^{-dCt}$. Tyto hodnoty jsou vyneseny v grafech na obr. 11.

Z duplikátů Ct hodnot byl nejprve vypočten průměr (kde průměrná odchylka Ct pro jednotlivé duplikáty byla 0,409). Vzorky, pro něž nebyla naměřena žádná hodnota Ct, byly pro výpočet nahrazeny hodnotou 40. Získané hodnoty pro každý vzorek byly normalizovány hodnotami housekeeping genu HPRT. Tento gen byl vybrán oproti GAPDH proto, že jeho Ct hodnoty jsou bližší hodnotám měřených vzorků. Z těchto mezivýsledků byly následně vypočteny relativní hodnoty $R=2^{-dCt}$ (viz tab. 6). Tyto hodnoty jsou v grafech na Obr. 18 porovnány s expresí CD47, CD44 a CD49f tak, jak byla změřena pomocí FCM. Celá analýza byla provedena v programu GenEx v6.

Z výsledků je patrné, že zkoumané geny lze rozdělit do několika skupin s podobnými trendy exprese. Téměř identický profil vykazují SOX-2, OCT-4 a CEBPA, celkově vyšší, ale podobnou expresi má i c-MYC a CEBPB. Další skupinu tvoří TWIST1 a TWIST2, ZEB1 a

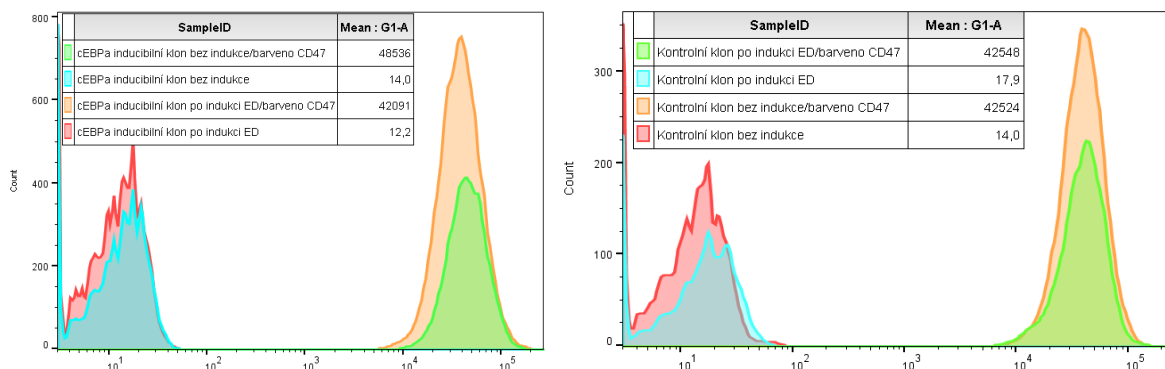
ZEB2. CD44 a CD133 mají unikátní profil, kde exprese CD133 je velmi nízká, její vrcholy se podobají expresi TWIST1. CD44 je exprimován ve všech vzorcích, ale jeho profil neodpovídá expresi CD47 (tak, jak byla změřena FCM). Negativní kontroly pro geny OCT-4, SOX-2, TWIST-1 a TWIST-2 vykazují hodnoty blízké hodnotám vzorků. Proto je interpretace těchto dat obtížná. Toto může být zaviněno dimery primerů, nebo jejich kontaminací, která vede k amplifikaci těchto nežádoucích molekul nukleových kyselin, čímž vzniká falešný signál.



Obr. 18 A Porovnání exprese CD47, CD90, CD44 a CD49f (měřeno FCM, vedlejší osa) a mRNA pro vybrané geny (qPCR, hlavní osa). AU = „arbitrary unit“, arbitrární jednotka, která byla vypočtena pro větší přehlednost grafu. Tyto hodnoty byly vypočteny pro CD47: $1 AU = MFI$, pro CD90: $1 AU = MFI * 80$, pro CD44: $1 AU = MFI * 6$ a pro CD49f: $1 AU = MFI * 3$.

6.5. Indukce exprese CD47 pomocí ektopické indukce CEBPa

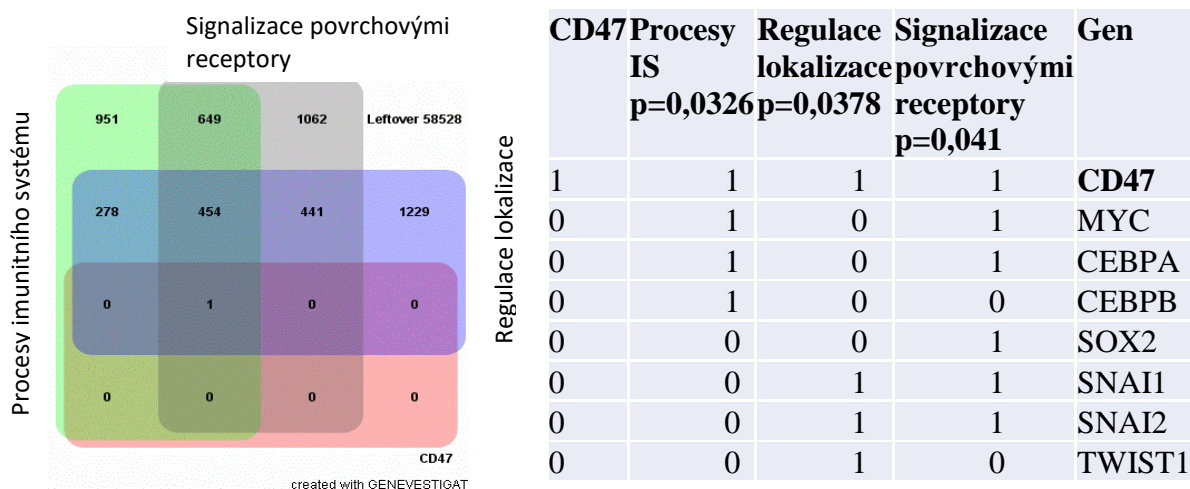
Pro studium transkripčních faktorů ovlivňujících expresi CD47 jsem použila erytrocytární buněčnou linii K562 s indukovatelnou expresí CEBPA. Po 9 dnech indukce tohoto transkripčního faktoru estradiolem došlo pouze k nepatrnému navýšení exprimovaného CD47 (viz Obr. 19). V kratším časovém úseku nebyl zaznamenán žádný rozdíl (data neukázána).



Obr. 19 Expresa CD47 po indukci exprese C/EBPa estradiolem (9 dní indukce vlevo, 3 dny indukce vpravo).

Vzhledem k tomu, že studium TF na liniích s inducibilními TF nebylo hlavním předmětem mé práce, dále jsem v experimentech tohoto typu nepokračovala.

6.6. Bioinformatická analýza koregulace exprese genů



Tab. 7 Expresa CD47 a TF ve vybraných sítích genů.

Dále jsem pokračovala ve studiu regulace exprese bioinformatickou analýzou v programu Genevestigator. Z výsledků „gene set enrichment“ analýzy, která umožňuje porovnat expresi vybraných setů genů, vyplývá, že CD47 je exprimován v buňkách spolu s TF uvedenými v tab. 7 (z daných setů genů jsou vybrány pouze ty TF, které jsou relevantní pro porovnání s výsledky qPCR experimentu).

7. Diskuze

Ve své práci jsem se věnovala kompetičním testům anti-CD47 mAbs a vztahu mezi epitopy, které pokrývají. Dále jsem se zabývala fenotypizací patientských vzorků a vztahu mezi expresí CD47 a kmenovým fenotypem. Zároveň jsem měřila schopnost buněčných linií MM6 a THP1 fagocytovat erytrocyty při inkubaci s anti-CD47 mAbs. Dále jsem pomocí qPCR zkoumala vztah mezi expresí CD47, CD90, CD44 a CD49f a expresí vybraných TF, které regulují kmenový fenotyp a EMT.

7.1. Titrace protilátek a kompetiční test

Expese CD47 jako povrchového znaku vlastních tkání je vysoká na normální i nádorové tkáni (viz obr. 4). Během diferenciaci a stárnutí však dochází k jejím změnám (viz 2.3 CD47 a 3 klíčové charakteristiky exprese).

Cílem bylo popsat rozdíly ve vazebných epitopech co nejširšího spektra dostupných anti-CD47 mAbs, pro které nebyly publikována souhrnná data z kompetičních testů

Data na obr. 8C dokazují, že vazebná afinita je (podle očekávání) závislá na teplotě, přičemž vyšší kompetice se odehrává při 37 °C.

Z mých dat vyplývá, že klon B6H12 má vysokou afinitu ke svému epitopu, protože při 37 °C ji nedokáže blokovat žádná jiná z testovaných protilátek (inhibice od 0 % do 59 %). Vzhledem k těmto vlastnostem je tento klon hojně využíván pro fenotypizaci a funkční testy [48, 62, 106, 107].

2D3 je jediný klon, o kterém je z literatury známo, že neblokuje vazbu CD47-SIRPA [65], ani vazbu CD47-TSP-1 [108]. Navíc při propojení molekul CD47 na povrchu buňky tímto klonem nedochází k přenosu kostimulačních signálů vedoucích k T buněčné proliferaci a k motilitě B buněk, tak jako u klonů BRIC126 a B6H12 [106, 109]. Moje data ukazují, že při blokování tímto klonem dokonce dochází v porovnání s pozitivní kontrolou k nárůstu signálu při značení klonem MEM-122. Mírný nárůst oproti pozitivní kontrole je zaznamenán i u klonu CC2C6. Tento efekt je zřejmě způsoben schopností klonu 2D3 indukovat tvorbu shluků CD47,

kteřá byla pozorována na membránách erytrocytů [65]. MEM-122 je protilátka typu IgM s pentamerní strukturou, má tedy 10 vazebných míst na jedinou molekulu. Tento klon je navíc nízkoafinní. To vysvětluje, proč lépe váže shluky CD47 způsobené přítomností 2D3. Naopak ještě nižší afinitu mají klony MEM-120 a MEM-133 [41], u kterých však tento efekt není pozorovatelný.

Rozdílný profil v mých datech vykazují i protilátky klonu B6H12 a BRIC126, ač jsou obě blokující [58]. To opět odpovídá výsledkům Subramanian a kol. [65], kde autoři prokázali, že B6H12 reaguje pouze s lidskými erytrocyty, zatímco BRIC126 slabě váže i CD47 na prasečích erytrocytech. Profil, který vyazuje klon B6H12 se podobá tomu, který připadá klonu CC2C6. Dále BRIC126 a CIKm1 mají taktéž podobné výsledky, ale díky reaktivitě CIKm1 s kravími erytrocyty [65], kterou BRIC126 postrádá, víme, že jejich epitopy se liší. Oba tyto klony však reagují s prasečími erytrocyty.

7.2. Fenotypizace patientských vzorků

Pomocí tSNE analýzy jsem schopná identifikovat buňky nádorové populace. Identifikace nediferencované populace tak, jak je definována v článku Volkmer a kol. z roku 2012 [18], tedy buněk pozitivních pro CD90, CD44 a CD49f, je komplikovaná záležitost. Podle očekávání je populací vymezených nejpřísnějším z těchto znaků, CD90^{high}, ve srovnání s populacemi pozitivními pro jiné znaky poměrně málo. Dokonce jsou tyto buňky také CD44^{high}, ale exprese CD49f je u nich spíše nízká. Proto se zdá, že jsem v daných vzorcích pouze schopná nalézt populaci, která již během své diferenciaci ztratila CD49f. Výsledky však mohou být zkresleny tím, že použitá CD49f mAb je značena slabým fluorochromem FITC. Zároveň tyto málo diferencované populace vykazují vysokou expresi CD47, což odpovídá hypotéze, že exprese CD47 je zvýšena právě na nádorových kmenových buňkách a tak zajišťuje jejich přežití v organismu. Nabohacení CD47 na nádorové populaci CD44⁺ buněk popsal již v roce 2009 Chan a kol. [37]. CD44⁺ buňky jsou hojné v agresivní skupině BCa 3. třídy tak, jak je klasifikuje práce z roku 2016 [30]. Moje data potvrzují, že tato populace zároveň silně exprimuje CD47 (viz obr. 11), ale jeho exprese není výlučná pouze pro tyto buňky. CD44 je znak, který je asociovaný s agresivitou nádoru také v dalších pracích [30, 33].

Zastoupení vybraných populací se mezi pacienty výrazně liší. Na druhou stranu Volkmer a kol. dělí BCa do 3 základních subtypů: bazální (obsahující populaci CD90⁺ CD44⁺ CD49f⁺), intermediální (neobsahuje CD90⁺ CD44⁺ CD49f⁺) a diferencovaný (neobsahuje CD90⁺ CD44⁺ CD49f⁺, ani CD90⁻ CD44⁺ CD49f⁺) [18]. Dnes je však molekulární klasifikace

jiná, která dělí BCa na luminální a bazální subtyp (viz 2.1.1. Koncept nádorových kmenových buněk a souvislost s CD47). Autoři tvrdí, že právě nejméně diferencovaná populace přítomná v každém subtypu je zodpovědná za rozvoj nádoru, což potvrzuje i Skowron a kol. [28]. Taková populace CSC pak dává vzniknout pouze diferencovanějším populacím než ona sama [18]. CD90 je znak charakteristický pro agresivní formu luminálního subtypu BCa [30]. Jeho exprese se v mých datech omezuje pouze na několik populací, které jsou zároveň CD47⁺ : exprese CD90 je 10-100-krát nižší než exprese CD47 (viz obr. 14). Další práce analyzují především expresi keratinů [18, 29] (viz obr. 3), které jsou u BCa velmi podrobně popsány, ale v tomto experimentu nebyly předmětem mého zájmu. Pokud mají nádorové kmenové buňky zvýšenou expresi CD47 (jako v případě leukémie [110], nádoru prsu [111], melanomu [112], nemalobuněčného karcinomu plic [54], leiomyosarkomu [50] a nehodgkinovského lymfomu [13]) , na který se může vázat terapeutická mAb, budou tyto buňky přednostním cílem této terapie. Fagocytické odstranění těchto buněk může být měřeno *in vivo* i *in vitro*. Potřebné je pouze znát fenotyp CSC, na základě kterého je lze separovat. Jediným způsobem, jak ověřit, že se opravdu jedná o CSC, je xenotransplantace do zvířecích modelů [18, 113].

Z podstaty CSC jde o velmi malou populaci buněk. Vzhledem k tomu, že tSNE plug-in ve FlowJo je sice uživatelsky přívětivý, ale postrádá některé základní vlastnosti analýzy dat (jako například možnost zopakovat analýzu se stejným výsledkem) a dochází k malé separaci jednotlivých populací, je možné, že je tato malá populace CSC nesprávně zařazena jako součást některé z větších populací, nebo rozptýlena ve výsledném tSNE grafu tak, že ji nelze identifikovat (viz malé populace na okrajích tSNE grafů na obr. 11). Pro větší spolehlivost výsledků je potřeba provádět SNE analýzu v programu R, kde je možné nastavit i další parametry SNE analýzy tak, aby výsledky byly reprodučibilní. tSNE plug-in ve FlowJo totiž pro zrychlení analýzy používá k rozdělení buněk a uspořádání do výsledného tSNE grafu pouze část buněk z dat, která do analýzy vstupují. To vede k odchýlkám mezi různými opakováními. V programu R je možné nastavit tzv. „seed option“, která slouží k ukotvení populace buněk, na základě které je SNE graf vypočítán. Proto jsou výsledky reprodučibilní.

7.3. Test fagocytární aktivity

Existuje mnoho způsobů kvantifikace fagocytární aktivity makrofágů. Ještě častější než cytometrické měření, které jsem zvolila pro svou práci vzhledem k metodickému zaměření laboratoře, je stanovení pomocí mikroskopické techniky [37, 114]. Při použití buněčných linií jsou buňky indukovány 50 ng/ml phorbol-12-myristát 13-acetát (PMA) po dobu 2 [115] až 3 [116] dnů, stejně jako v této práci. Moje data však dokazují, že obě buněčné linie (THP-1 i

MM6) jsou schopné fagocytovat i bez indukce PMA. Po indukci dokonce dochází k přilnutí makrofágů k plastiku a ty pak musí být pasážovány trypsinem, což může mít vliv na výsledky funkčních testů. Pro budoucí aplikaci mnou ověřené metodiky pro měření fagocytózy patientských vzorků bude však zapotřebí indukovat patientské makrofágy pomocí GM-CSF (20ng/ml) [114]. Další možností je kvantifikace fagocytózy in situ mikroskopicky ve tkáňových řezech.

Ke značení fagocytovaných částic je nejčastěji použito barvivo CFSE [76, 114], nebo pHrodo, což je pH-senzitivní barvivo, které v nižším pH vydává větší signál [117]. Pro svou práci a vyhodnocení výsledků jsem použila lidské erytrocyty barvené kombinací pHrodo a CFSE a z toho odvozený poměrný parametr pHrodo/CFSE, jehož hodnota se snižujícím se pH roste. Vzhledem k propadlé expiraci mnou použitých barviv jsem musela zvýšit jejich koncentraci při barvení až na 10 uM oproti běžně používaným 2,5 uM [56, 70, 114].

Standartní doba kokultivace makrofágů a fagocytovaných částic je 2 hodiny a jejich poměr je 1 : 5 [70, 76]. Na rozdíl od doby inkubace nebyl tento podíl buněk v mém experimentu dodržen. Vlivem špatného pipetování se pohybuje poměr fagocytů vůči erytrocytům v rozmezí 1:1 až 1:5. Očekávám, že při upravení tohoto poměru na standartní hodnotu, lze získat vyšší podíl fagocytujících buněk, protože buňky s fagocytickým potenciálem budou mít dostatek erytrocytů v okolí, a proto jej doporučuji do dalších experimentů. Stejně tak je pro lepší výsledky vhodné před kokultivací nechat makrofágy 2 hodiny v médiu bez séra [107], což nebylo v mém experimentu dodrženo. Pro příští provedení tohoto testu je také nezbytné zařadit izotypové kontroly pro analýzu vlivu Fc části mAb na fagocytózu.

Fagocytární index (počet fagocytovaných částic na 100 makrofágů) blokující B6H12 dosahuje v závislosti na typu testu od 50 % [5, 118] až po více než 100 % [56]. BRIC126 dosahuje fagocytického indexu kolem 60 % [5]. Ač není tolik používaný jako B6H12, je to silně blokující klon [58]. MEM-120, MEM-122 a MEM-133 jsou nízkoafinní klony, o kterých není známo, zda blokují CD47-SIRPA, či nikoliv. Vzhledem k poměru signálu klonů MEM a BRIC126 však lze usuzovat, že klony rodiny MEM tuto vazbu neblokují. Fagocytární index není možné z mých dat vypočítat kvůli širokému rozpětí pHrodo/CFSE signálu erytrocytů (viz obr. 17). To je zřejmě způsobeno přítomností zbytků membrán ve vzorku. Proto jsem data vynesla jako procenta fagocytujících buněk, jako v práci z roku 2016 [59], kde však hodnoty negativních kontrol dosahují nejvýše 15 % a hodnoty při blokování CD47 jsou o jednotky, až desítky procent vyšší.

Vzhledem k metodické specializaci naší laboratoře a s tím souvisejícím materiálním zajištěním projektu jsem se věnovala pouze průtokové cytometrii (FCM), nikoliv mikroskopii.

7.4. Fenotypizace buněčných linií rodiny RT112 a měření intracelulární exprese pomocí qPCR

qPCR je obecně nejpoužívanější a nejdostupnější metodou pro korelaci exprese transkripčních faktorů a proteinu našeho zájmu [87, 90]. Chromatinová imunoprecipitace a následná DNA sekvenace (ChIP-seq) dále umožňuje studium interakcí protein-DNA a identifikaci vazebných míst na DNA [60, 87, 91].

Expese CD47 má za následek snížení exprese kmenových TF (MYC, KLF-4, SOX-2 a OCT-4) [88]. Naproti tomu jiná studie dokazuje, že pomocí CEBPA spolu s OCT-4, SOX-2, KLF-4 a MYC lze vytvořit iPSC [93]. Pozitivní korelace mezi expresí SOX-2 a CD47 byla nalezena i v práci Lehnen a kol. [90]. Výsledky analýzy z programu Genevestigator v tab. 7 podporují spíše hypotézu, že vysoká exprese CD47 je asociována s kmenovým charakterem buňky. Moje qPCR data neukazují žádnou výraznou korelaci mezi CD47 a analyzovanými TF. Všechny vzorky však vykazují vysokou expresi MYC, který je zodpovědný za nespecifickou aktivaci mnoha lokusů [89]. Tento TF tak je zřejmě zodpovědný i za vysokou expresi CD47 v mých vzorcích, a současnou expresi OCT-4 a SOX-2, které by měly být signalizací skrze CD47 utlumeny [88]. Expese OCT-4 a SOX-2 je však (oproti negativní kontrole) poměrně nízká. I další TF vykazují zvýšenou expresi právě ve vzorcích, kde je MYC silně exprimován (vzorky č. 1, 2 a 6 a TF ZEB-1, ZEB-2, TWIST-1, TWIST-2, CD133, OCT-4, SOX-2, CEBPA)

Kvůli nízkému nárůstu signálu a dlouhé době odezvy (9 dní) ve FCM experimentu nelze usuzovat na souvislost mezi CD47 a CEBPA, ačkoliv z literatury je známo, že CEBPA iniciuje expresi CD47 [92]. Tento výsledek však může být způsoben tím, že na buňkách krevní řady je exprese CD47 sama o sobě vysoká, a proto se po indukci rozdíl již téměř neprojeví a oproti nestimulované kontrole nedojde k výraznějšímu nárůstu exprese.

ZEB-1, ZEB-2, TWIST-1 a TWIST-2 jsou pozitivní regulátory EMT a s tím souvisejících metastáz [100]. Obecně lze říci, že moje qPCR data dokazují vyšší expresi CD47 u vzorků s vyšší expresí těchto TF. Tento vztah však neplatí pro všechny vzorky.

FCM měření odhalilo stejný expresní profil CD44 a CD49f. Expese CD44 naměřená pomocí FCM a qPCR se však neshodují. To může být způsobeno nepřesností laboratorní práce, nebo nepřímou úměrností mezi transkripcí a expresí povrchového CD44.

8. Závěr

Ve své práci jsem pomocí kompetičního testu prokázala, že různé klony CD47 mAbs se váží k různým epitopům CD47, na základě čehož mohou být rozděleny do skupin s různou reaktivitou: 1. BRIC-126 a CIKm1, 2. MEM120, MEM-122 a MEM-133, 3. 2D3, 4. B6H12 a CC2C6.

Dále jsem ověřila metodiku pro test fagocytární aktivity, který bude po úpravě (viz diskuze) užíván pro stanovení probíhající fagocytózy v patientských vzorcích. Tímto testem jsem potvrdila schopnost klonu BRIC126 blokovat CD47-SIRPA interakci, další testované klony MEM-120, MEM-122 a MEM-133 tuto vlastnost zřejmě nemají.

Pomocí stochastické analýzy jsem identifikovala nejméně diferencované populace buněk ve vzorcích pacientů BCa. CD47 je vysoce exprimován ve všech těchto populacích. Nenalezla jsem však žádnou souvislost mezi zastoupením jednotlivých kmenových populací a stádiem nádoru.

Metodou qPCR jsem zjistila, že buněčná linie RT112 Heidelberg exprimuje velké množství TF MYC, který je zodpovědný za nescifickou transkripční aktivaci mnoha dalších genů. Moje data ukazují, že exprese CD47 pozitivně koreluje s expresí TF zodpovědných za EMT ZEB-1, ZEB-2, TWIST-1 a TWIST-2. Tyto výsledky je však nutné potvrdit opakováním experimentu.

Práce podobného zaměření přispějí k molekulární charakterizaci CD47 exprimovaného na nádorových buňkách. To pomůže zvýšit účinnost terapie blokující signalizaci skrze tuto molekulu. Znalost dnes používaných imunoterapií BCa (BCG, PD-1/PD-L1 inhibitory, CTLA-4 inhibitory) zatím tohoto bodu nedosáhla.

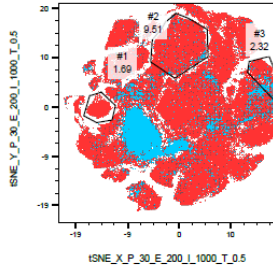
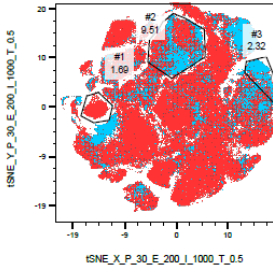
9. Doplnující informace

Obr. S1 Zastoupení jednotlivých nediferencovaných populací u jednotlivých pacientů pro exofytický (A) a invazivní (B) část nádoru.

(Konkrétní pacient: -----, soubor všech pacientů: -----)

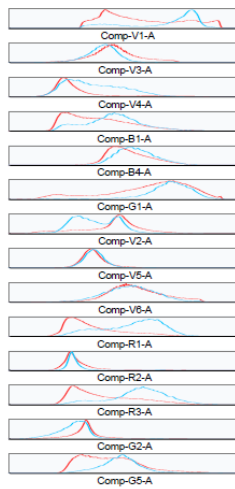
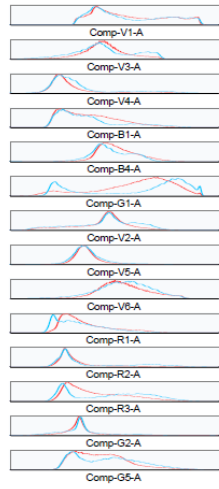
A. Exofytický nádor

T1

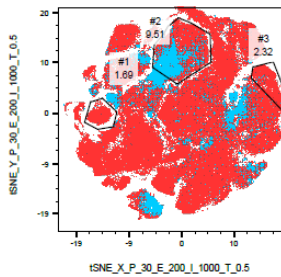


Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
EXO_20000_180123 fcs	T021	20000	n/a	n/a
EXO_20000_180123 fcs	Ungated	212886	n/a	n/a

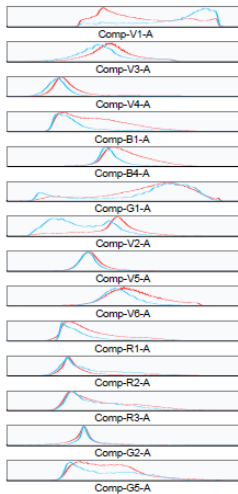
Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
EXO_20000_180123 fcs	T043	20000	n/a	n/a
EXO_20000_180123 fcs	Ungated	212886	n/a	n/a



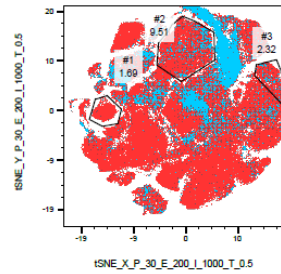
T2



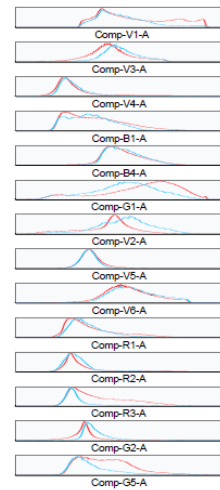
Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
EXO_20000_180123 fcs	T012	17161	n/a	n/a
EXO_20000_180123 fcs	Ungated	212886	n/a	n/a



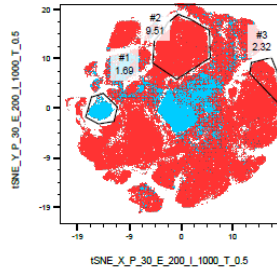
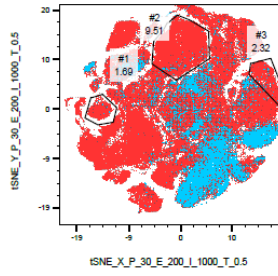
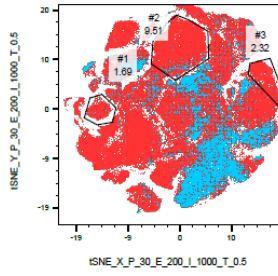
T2a



Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
EXO_20000_180123 fcs	T026	20000	n/a	n/a
EXO_20000_180123 fcs	Ungated	212886	n/a	n/a



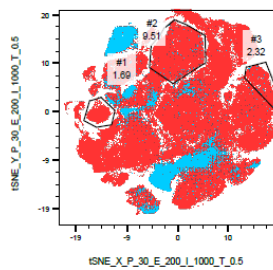
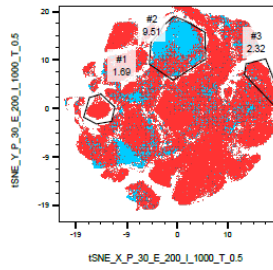
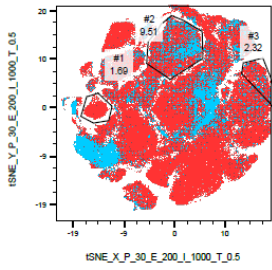
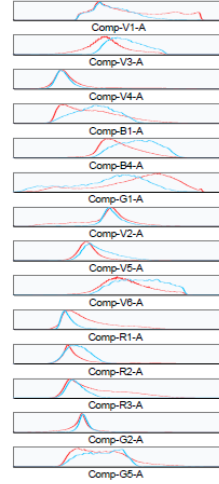
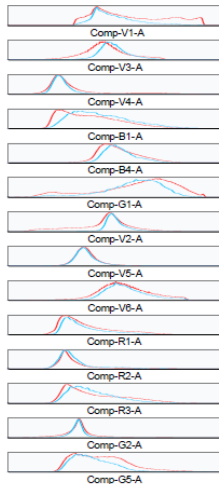
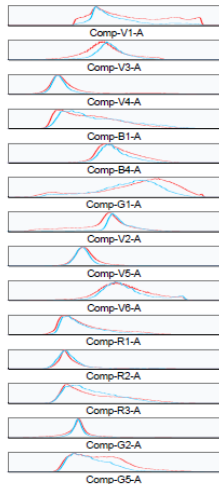
T3a



Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
EXO_20000_180123_fc3	T00961	20000	n/a	n/a
EXO_20000_180123_fc3	Ungated	212986	n/a	n/a

Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
EXO_20000_180123_fc3	T00962	20000	n/a	n/a
EXO_20000_180123_fc3	Ungated	212986	n/a	n/a

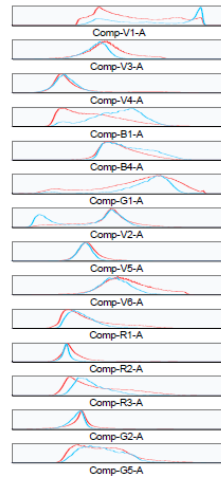
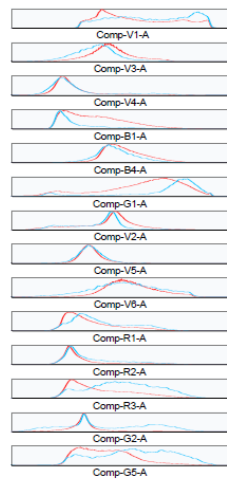
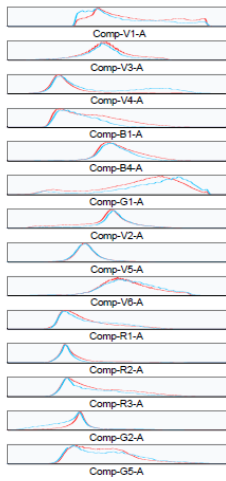
Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
EXO_20000_180123_fc3	T010	20000	n/a	n/a
EXO_20000_180123_fc3	Ungated	212986	n/a	n/a



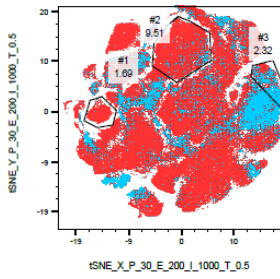
Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
EXO_20000_180123_fc3	T037	20000	n/a	n/a
EXO_20000_180123_fc3	Ungated	212986	n/a	n/a

Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
EXO_20000_180123_fc3	T041	19825	n/a	n/a
EXO_20000_180123_fc3	Ungated	212986	n/a	n/a

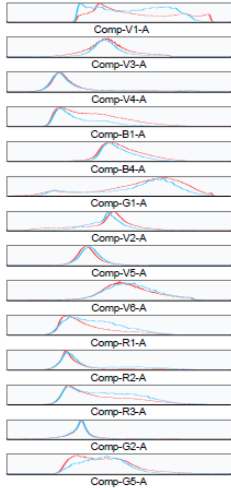
Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
EXO_20000_180123_fc3	T047	20000	n/a	n/a
EXO_20000_180123_fc3	Ungated	212986	n/a	n/a



T4a

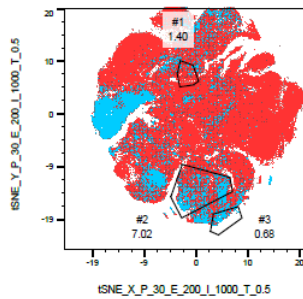


Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
EXO_20000_180123.fcs	T033	20000	n/a	n/a
EXO_20000_180123.fcs	Ungated	212898	n/a	n/a

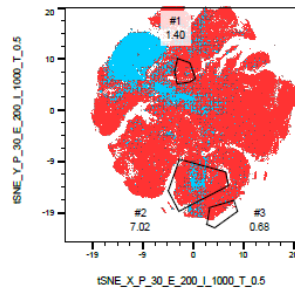
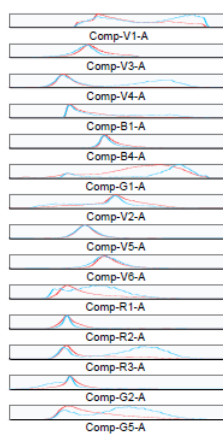


B. Invazivní nádor

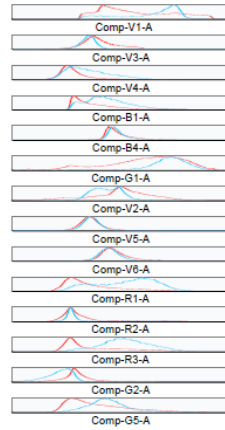
T1



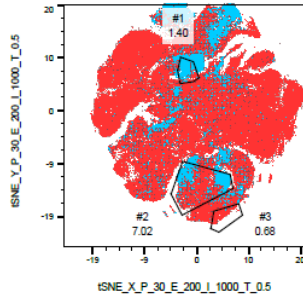
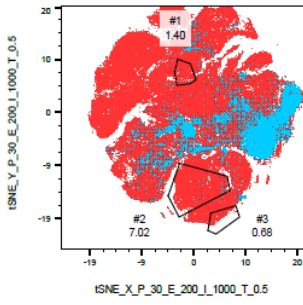
Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
INV_20000_180117.fcs	T021	20000	n/a	n/a
INV_20000_180117.fcs	Ungated	220000	n/a	n/a



Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
INV_20000_180117.fcs	T043	20000	n/a	n/a
INV_20000_180117.fcs	Ungated	220000	n/a	n/a

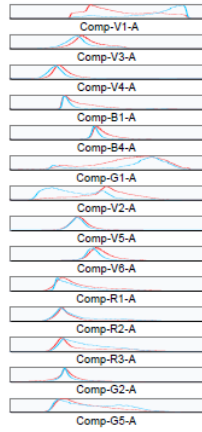
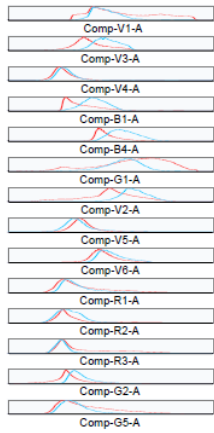


T2b

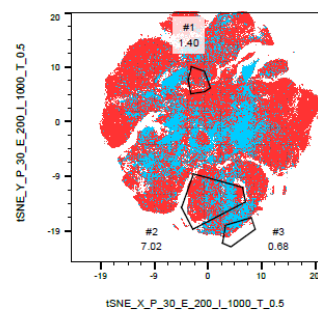
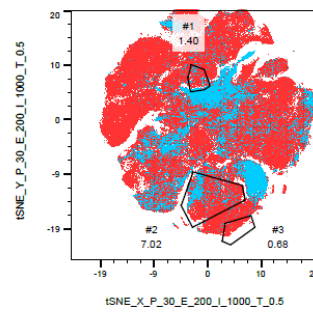
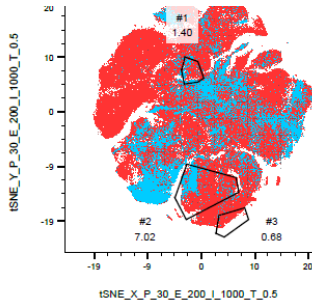


Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
INV_20000_180117.fcs	T001	20000	n/a	n/a
INV_20000_180117.fcs	Ungated	220000	n/a	n/a

Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
INV_20000_180117.fcs	T012	20000	n/a	n/a
INV_20000_180117.fcs	Ungated	220000	n/a	n/a



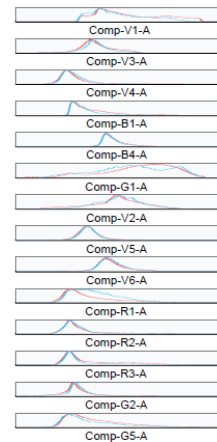
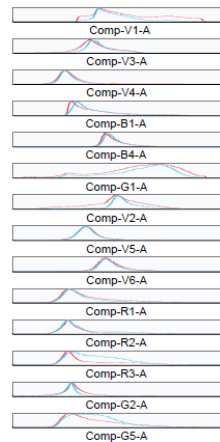
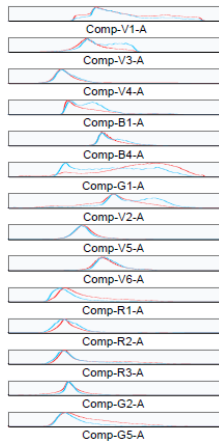
T3

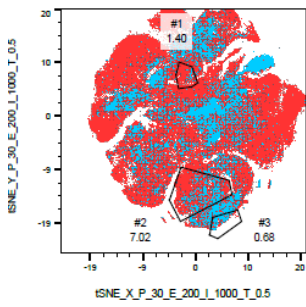


Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
INV_20000_180117.fcs	T09H1	20000	n/a	n/a
INV_20000_180117.fcs	Ungated	220000	n/a	n/a

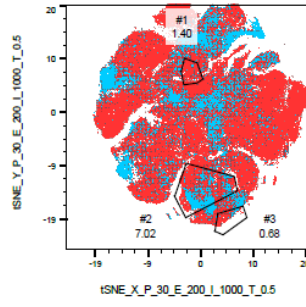
Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
INV_20000_180117.fcs	T09H2	20000	n/a	n/a
INV_20000_180117.fcs	Ungated	220000	n/a	n/a

Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
INV_20000_180117.fcs	T030	20000	n/a	n/a
INV_20000_180117.fcs	Ungated	220000	n/a	n/a

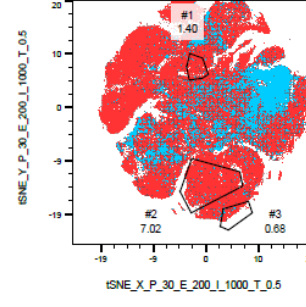




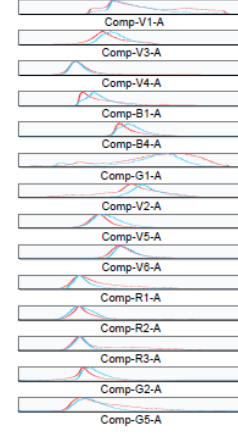
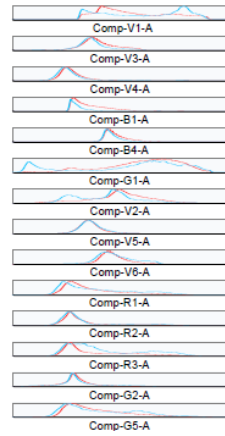
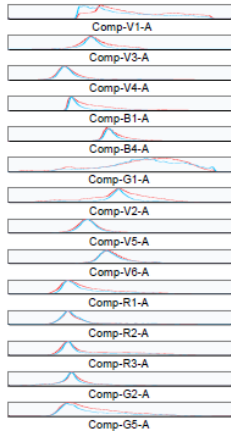
Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
INV_20000_180117.fcs	T037	220000	n/a	n/a
INV_20000_180117.fcs	Ungated	220000	n/a	n/a



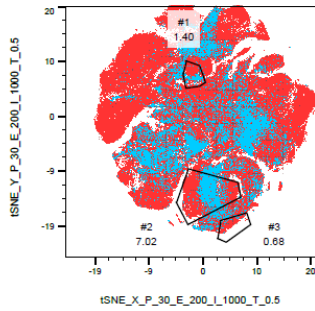
Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
INV_20000_180117.fcs	T041	20000	n/a	n/a
INV_20000_180117.fcs	Ungated	220000	n/a	n/a



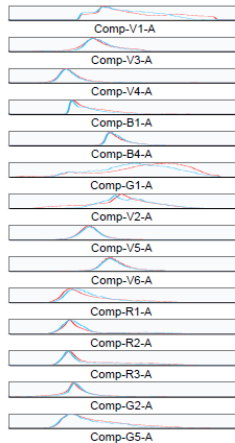
Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
INV_20000_180117.fcs	T047	20000	n/a	n/a
INV_20000_180117.fcs	Ungated	220000	n/a	n/a



T4a



Sample Name	Subset Name	Count	WELL ID	PLATE NAME
INV_20000_180117.fcs	T033	20000	n/a	n/a
INV_20000_180117.fcs	Ungated	220000	n/a	n/a



10. Seznam použité literatury

- [1] REINHOLD, M. I., F. P. LINDBERG, D. PLAS, S. REYNOLDS, M. G. PETERS a E. J. BROWN. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *Journal of Cell Science*. 1995, **108**(11), 3419–3425. ISSN 0021-9533, 1477-9137.
- [2] BIAN, Zhen, Lei SHI, Ya-Lan GUO, Zhiyuan LV, Cong TANG, Shuo NIU, Alexandra TREMBLAY, Mahathi VENKATARAMANI, Courtney CULPEPPER, Limin LI, Zhen ZHOU, Ahmed MANSOUR, Yongliang ZHANG, Andrew GEWIRTZ, Koby KIDDER, Ke ZEN a Yuan LIU. Cd47-Sirp α interaction and IL-10 constrain inflammation-induced macrophage phagocytosis of healthy self-cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2016, **113**(37), E5434–E5443. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1521069113
- [3] GALLI, Serena, Inti ZLOBEC, Christian SCHÜRCH, Aurel PERREN, Adrian F. OCHSENBEIN a Yara BANZ. CD47 protein expression in acute myeloid leukemia: A tissue microarray-based analysis. *Leukemia Research* [online]. 2015, **39**(7), 749–756. ISSN 1873-5835. Dostupné z: doi:10.1016/j.leukres.2015.04.007
- [4] BACCELLI, Irène, Andreas SCHNEEWEISS, Sabine RIETHDORF, Albrecht STENZINGER, Anja SCHILLERT, Vanessa VOGEL, Corinna KLEIN, Massimo SAINI, Tobias BÄUERLE, Markus WALLWIENER, Tim HOLLAND-LETZ, Thomas HÖFNER, Martin SPRICK, Martina SCHARPFF, Frederik MARMÉ, Hans Peter SINN, Klaus PANTEL, Wilko WEICHERT a Andreas TRUMPP. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nature Biotechnology* [online]. 2013, **31**(6), 539–544. ISSN 1546-1696. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.2576
- [5] WILLINGHAM, Stephen B., Jens-Peter VOLKMER, Andrew J. GENTLES, Debashis SAHOO, Piero DALERBA, Siddhartha S. MITRA, Jian WANG, Humberto CONTRERAS-TRUJILLO, Robin MARTIN, Justin D. COHEN, Patricia LOVELACE, Ferenc A. SCHEEREN, Mark P. CHAO, Kipp WEISKOPF, Chad TANG, Anne Kathrin VOLKMER, Tejaswitha J. NAIK, Theresa A. STORM, Adriane R. MOSLEY, Badreddin EDRIS, Seraina M. SCHMID, Chris K. SUN, Mei-Sze CHUA, Oihana MURILLO, Pradeep RAJENDRAN, Adriel C. CHA, Robert K. CHIN, Dongkyoon KIM, Maddalena ADORNO, Tal RAVEH, Diane TSENG, Siddhartha JAISWAL, Per Øyvind ENGER, Gary K. STEINBERG, Gordon LI, Samuel K. SO, Ravindra MAJETI, Griffith R. HARSH, Matt VAN DE RIJN, Nelson N. H. TENG, John B. SUNWOO, Ash A. ALIZADEH, Michael F. CLARKE a Irving L. WEISSMAN. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2012, **109**(17), 6662–6667. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1121623109
- [6] 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, **106**(33), 14016–14021. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0906549106
- [7] WEISKOPF, Kipp. Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRP α axis. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* [online]. 2017, **76**, 100–109. ISSN 1879-0852. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2017.02.013

- [8] PER-ARNE, Oldenborg. Role of CD47 and Signal Regulatory Protein Alpha (SIRP α) in Regulating the Clearance of Viable or Aged Blood Cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [online]. 2012, **39**(5), 315–320. ISSN 1660-3796. Dostupné z: doi:10.1159/000342537
- [9] GARDAI, Shyra J., Kathleen A. MCPHILLIPS, S. Courtney FRASCH, William J. JANSSEN, Anna STAREFELDT, Joanne E. MURPHY-ULLRICH, Donna L. BRATTON, Per-Arne OLDENBORG, Marek MICHALAK a Peter M. HENSON. Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic Cells through trans-Activation of LRP on the Phagocyte. *Cell* [online]. 2005, **123**(2), 321–334. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2005.08.032
- [10] BURGER, Patrick, Petra HILARIUS-STOKMAN, Dirk de KORTE, Timo K. van den BERG a Robin van BRUGGEN. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood* [online]. 2012, **119**(23), 5512–5521. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2011-10-386805
- [11] LV, Zhiyuan, Zhen BIAN, Lei SHI, Shuo NIU, Bin HA, Alexandra TREMBLAY, Liangwei LI, Xiugen ZHANG, John PALUSZYNSKI, Ming LIU, Ke ZEN a Yuan LIU. Loss of cell surface CD47 'clustering' formation and binding avidity to SIRP α facilitate apoptotic cell clearance by macrophage. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [online]. 2015, **195**(2), 661–671. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1401719
- [12] FUJIMURA, Kazuhiko, Tetsuhiro NIIDOME, Yoriko SHINOZUKA, Yasuhiko IZUMI, Takeshi KIHARA, Hachiro SUGIMOTO, Akinori AKAIKE a Toshiaki KUME. Integrin-associated protein promotes neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells. *PLoS One* [online]. 2015, **10**(2), e0116741. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0116741
- [13] CHAO, Mark P., Ash A. ALIZADEH, Chad TANG, June H. MYKLEBUST, Bindu VARGHESE, Saar GILL, Max JAN, Adriel C. CHA, Charles K. CHAN, Brent T. TAN, Christopher Y. PARK, Feifei ZHAO, Holbrook E. KOHRT, Raquel MALUMBRES, Javier BRIONES, Randy D. GASCOYNE, Izidore S. LOSSOS, Ronald LEVY, Irving L. WEISSMAN a Ravindra MAJETI. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* [online]. 2010, **142**(5), 699–713. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2010.07.044
- [14] SHIN, Kunyoo, Agnes LIM, Justin I. ODEGAARD, Jared D. HONEYCUTT, Sally KAWANO, Michael H. HSIEH a Philip A. BEACHY. Cellular origin of bladder neoplasia and tissue dynamics of its progression to invasive carcinoma. *Nature Cell Biology* [online]. 2014, **16**(5), 469–478. ISSN 1476-4679. Dostupné z: doi:10.1038/ncb2956
- [15] JORDAN, Craig T., Monica L. GUZMAN a Mark NOBLE. Cancer stem cells. *New England Journal of Medicine*. 2006, **355**(12), 1253–1261.
- [16] 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, **322**(1), 70–77. ISSN 1872-7980. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2012.02.010
- [17] GHIAUR, Gabriel, Jonathan GERBER a Richard J. JONES. Concise Review: Cancer Stem Cells and Minimal Residual Disease. *Stem cells (Dayton, Ohio)* [online]. 2012, **30**(1), 89–93. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1002/stem.769

- [18] 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, **109**(6), 2078–2083. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1120605109
- [19] WHO | The top 10 causes of death. *WHO* [online]. [vid. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- [20] HANAHAAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, **144**(5), 646–674. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- [21] 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, **65**(2), 87–108. ISSN 1542-4863. Dostupné z: doi:10.3322/caac.21262
- [22] SANLI, Oner, Jakub DOBRUCH, Margaret A. KNOWLES, Maximilian BURGER, Mehrdad ALEMOZAFFAR, Matthew E. NIELSEN a Yair LOTAN. Bladder cancer. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. 2017, **3**, 17022. ISSN 2056-676X. Dostupné z: doi:10.1038/nrdp.2017.22
- [23] LIU, Zhaohui a Shihua ZHANG. Tumor characterization and stratification by integrated molecular profiles reveals essential pan-cancer features. *BMC Genomics* [online]. 2015, **16**, 503. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-015-1687-x
- [24] 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, **158**(4), 929–944. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2014.06.049
- [25] ARAN, Dvir, Zicheng HU a Atul J. BUTTE. xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. *Genome Biology* [online]. 2017, **18** [vid. 2018-04-09]. ISSN 1474-7596. Dostupné z: doi:10.1186/s13059-017-1349-1
- [26] ROBERTSON, A. Gordon, Jaegil KIM, Hikmat AL-AHMADIE, Joaquim BELLMUNT, Guangwu GUO, Andrew D. CHERNIACK, Toshinori HINOUE, Peter W. LAIRD, Katherine A. HOADLEY, Rehan AKBANI, Mauro A. A. CASTRO, Ewan A. GIBB, Rupa S. KANCHI, Dmitry A. GORDENIN, Sachet A. SHUKLA, Francisco SANCHEZ-VEGA, Donna E. HANSEL, Bogdan A. CZERNIAK, Victor E. REUTER, Xiaoping SU, Benilton DE SA CARVALHO, Vinicius S. CHAGAS, Karen L. MUNGALL, Sara SADEGHI, Chandra Sekhar PEDAMALLU, Yiling LU, Leszek J. KLIMCZAK, Jiexin ZHANG, Caleb CHOO, Akinyemi I. OJESINA, Susan BULLMAN, Kristen M. LERAAS, Tara M. LICHTENBERG, Catherine J. WU, Nicholas SCHULTZ, Gad GETZ, Matthew MEYERSON, Gordon B. MILLS, David J. MCCONKEY, TCGA RESEARCH NETWORK, John N. WEINSTEIN, David J. KWIATKOWSKI a Seth P. LERNER. Comprehensive Molecular Characterization of

- Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell* [online]. 2017, **171**(3), 540-556.e25. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2017.09.007
- [27] SKOWRON, Margaretha A., Günter NIEGISH, 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, **34** [vid. 2016-02-24]. ISSN 0392-9078. Dostupné z: doi:10.1186/s13046-015-0259-x
- [28] SKOWRON, K. B., S. P. PITRODA, J. P. NAMM, O. BALOGUN, M. A. BECKETT, M. L. ZENNER, O. FAYANJU, X. HUANG, C. FERNANDEZ, W. ZHENG, G. QIAO, R. CHIN, S. J. KRON, N. N. KHODAREV, M. C. POSNER, G. D. STEINBERG a R. R. WEICHSELBAUM. Basal Tumor Cell Isolation and Patient-Derived Xenograft Engraftment Identify High-Risk Clinical Bladder Cancers. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**, 35854. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep35854
- [29] BATAVIA, Jason Van, Tammer YAMANY, Andrei MOLOTKOV, Hanbin DAN, Mahesh MANSUKHANI, Ekaterina BATOURINA, Kerry SCHNEIDER, Daniel OYON, Mark DUNLOP, Xue-Ru WU, Carlos CORDON-CARDO a Cathy MENDELSON. Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations. *Nature Cell Biology* [online]. 2014, **16**(10), 982–991. ISSN 1476-4679. Dostupné z: doi:10.1038/ncb3038
- [30] HEDEGAARD, Jakob, Philippe LAMY, Iver NORDENTOFT, Ferran ALGABA, Søren HØYER, Benedicte Parm ULHØI, Søren VANG, Thomas REINERT, Gregers G. HERMANN, Karin MOGENSEN, Mathilde Borg Houlberg THOMSEN, Morten Muhlig NIELSEN, Mirari MARQUEZ, Ulrika SEGERSTEN, Mattias AINE, Mattias HÖGLUND, Karin BIRKENKAMP-DEMTRÖDER, Niels FRISTRUP, Michael BORRE, Arndt HARTMANN, Robert STÖHR, Sven WACH, Bastian KECK, Anna Katharina SEITZ, Roman NAWROTH, Tobias MAURER, Cane TULIC, Tatjana SIMIC, Kerstin JUNKER, Marcus HORSTMANN, Niels HARVING, Astrid Christine PETERSEN, M. Luz CALLE, Ewout W. STEYERBERG, Willemien BEUKERS, Kim E. M. VAN KESSEL, Jørgen Bjerggaard JENSEN, Jakob Skou PEDERSEN, Per-Uno MALMSTRÖM, Núria MALATS, Francisco X. REAL, Ellen C. ZWARTHOF, Torben Falck ØRNTOFT a Lars DYRSKJØT. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell* [online]. 2016, **30**(1), 27–42. ISSN 1535-6108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2016.05.004
- [31] KIM, Jaegil, Rehan AKBANI, Chad J. CREIGHTON, Seth P. LERNER, John N. WEINSTEIN, Gad GETZ a David J. KWIATKOWSKI. Invasive Bladder Cancer: Genomic Insights and Therapeutic Promise. *Clinical Cancer Research* [online]. 2015, **21**(20), 4514–4524. ISSN 1078-0432, 1557-3265. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1215
- [32] MO, Qianxing, Fotis NIKOLOS, Fengju CHEN, Zoe TRAMEL, Yu-Cheng LEE, Kazukuni HAYASHI, Jing XIAO, Jianjun SHEN a Keith Syson CHAN. Prognostic Power of a Tumor Differentiation Gene Signature for Bladder Urothelial Carcinomas. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [online]. nedatováno [vid. 2018-04-17]. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/djx243
- [33] 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, **111**(8), 3110–3115. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1318376111

- [34] CHOI, Woonyoung, Sima PORTEN, Seungchan KIM, Daniel WILLIS, Elizabeth R. PLIMACK, Jean HOFFMAN-CENSITS, Beat ROTH, Tiewei CHENG, Mai TRAN, I.-Ling LEE, Jonathan MELQUIST, Jolanta BONDARUK, Tadeusz MAJEWSKI, Shizhen ZHANG, Shanna PRETZSCH, Keith BAGGERLY, Arlene SIEFKER-RADTKE, Bogdan CZERNIAK, Colin P. N. DINNEY a David J. MCCONKEY. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell* [online]. 2014, **25**(2), 152–165. ISSN 1535-6108, 1878-3686. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2014.01.009
- [35] KARDOS, Jordan, Shengjie CHAI, Lisle E. MOSE, Sara R. SELITSKY, Bhavani KRISHNAN, Ryoichi SAITO, Michael D. IGLESIA, Matthew I. MILOWSKY, Joel S. PARKER, William Y. KIM a Benjamin G. VINCENT. Claudin-low bladder tumors are immune infiltrated and actively immune suppressed. *JCI Insight* [online]. nedatováno, **1**(3) [vid. 2018-04-17]. ISSN 2379-3708. Dostupné z: doi:10.1172/jci.insight.85902
- [36] MAJETI, Ravindra, Mark P. CHAO, Ash A. ALIZADEH, Wendy W. PANG, Siddhartha JAISWAL, Kenneth D. GIBBS JR., Nico VAN ROOIJEN a Irving L. WEISSMAN. CD47 Is an Adverse Prognostic Factor and Therapeutic Antibody Target on Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Cell* [online]. 2009, **138**(2), 286–299. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.05.045
- [37] 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, **106**(33), 14016–14021. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0906549106
- [38] PAN, Ying, Jens-Peter VOLKMER, Kathleen E. MACH, Robert V. ROUSE, Jen-Jane LIU, Debashis SAHOO, Timothy C. CHANG, Thomas J. METZNER, Lei KANG, Matt VAN DE RIJN, Eila C. SKINNER, Sanjiv S. GAMBHIR, Irving L. WEISSMAN a Joseph C. LIAO. Endoscopic molecular imaging of human bladder cancer using a CD47 antibody. *Science Translational Medicine* [online]. 2014, **6**(260), 260ra148. ISSN 1946-6242. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.3009457
- [39] KURIYAMA, Takuro, Katsuto TAKENAKA, Kentaro KOHNO, Takuji YAMAUCHI, Shinya DAITOKU, Goichi YOSHIMOTO, Yoshikane KIKUSHIGE, Junji KISHIMOTO, Yasunobu ABE, Naoki HARADA, Toshihiro MIYAMOTO, Hiromi IWASAKI, Takanori TESHIMA a Koichi AKASHI. Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* [online]. 2012, **120**(19), 4058–4067. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2012-02-408864
- [40] OLDENBORG, Per-Arne. CD47: A Cell Surface Glycoprotein Which Regulates Multiple Functions of Hematopoietic Cells in Health and Disease. *ISRN Hematology* [online]. 2013, **2013** [vid. 2017-07-11]. ISSN 2090-441X. Dostupné z: doi:10.1155/2013/614619
- [41] DRBAL, K., J. ČERNÝ, P. ANGELISOVÁ, I. HILGERT, M. CEBECAUER, J. ŠINKORA a V. HOŘEJŠÍ. CDw149 antibodies recognize a clustered subset of CD47 molecules associated with cytoplasmic signaling molecules. *Tissue Antigens* [online]. 2000, **56**(3), 258–267. ISSN 1399-0039. Dostupné z: doi:10.1034/j.1399-0039.2000.560308.x
- [42] KUZMIK, Ján. *Bakalářská práce: Povrchová exprese CD47 na nádorových kmenových buňkách jako cíl protinádorové léčby* [online]. [vid. 2016-11-02]. Dostupné

z: https://owncloud.cesnet.cz/index.php/apps/files/?dir=%2FCD47_Marie%2FGAUK_CD47_Marie_2016%2FBP_Kuzmik#pdfviewer. 00000

- [43] SOTO-PANTOJA, David R., Sukhbir KAUR a David D. ROBERTS. CD47 signaling pathways controlling cellular differentiation and responses to stress. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* [online]. 2015, **50**(3), 212–230. ISSN 1040-9238. Dostupné z: doi:10.3109/10409238.2015.1014024
- [44] ISENBERG, Jeff S., Douglas S. ANNIS, Michael L. PENDRAK, Malgorzata PTASZYNSKA, William A. FRAZIER, Deane F. MOSHER a David D. ROBERTS. Differential Interactions of Thrombospondin-1, -2, and -4 with CD47 and Effects on cGMP Signaling and Ischemic Injury Responses. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2009, **284**(2), 1116–1125. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M804860200
- [45] LUTZ, Hans U. Comment Concerning the Role of CD47 and Signal Regulatory Protein Alpha in Regulating the Clearance of Aged Red Blood Cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [online]. 2013, **40**(2), 140–141. ISSN 1660-3796, 1660-3818. Dostupné z: doi:10.1159/000350507
- [46] KOJIMA, Yoko, Jens-Peter VOLKMER, Kelly MCKENNA, Mete CIVELEK, Aldons Jake LUSIS, Clint L. MILLER, Daniel DIRENZO, Vivek NANDA, Jianqin YE, Andrew J. CONNOLLY, Eric E. SCHADT, Thomas QUERTERMOUS, Paola BETANCUR, Lars MAEGDEFESSEL, Ljubica Perisic MATIC, Ulf HEDIN, Irving L. WEISSMAN a Nicholas J. LEEPER. CD47-blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis. *Nature* [online]. 2016, **536**(7614), 86–90. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature18935
- [47] KAUR, Sukhbir, Abdel G. ELKAHLOUN, Anush ARAKELYAN, Lynn YOUNG, Timothy G. MYERS, Francisco OTAIZO-CARRASQUERO, Weiwei WU, Leonid MARGOLIS a David D. ROBERTS. CD63, MHC class 1, and CD47 identify subsets of extracellular vesicles containing distinct populations of noncoding RNAs. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8** [vid. 2018-04-04]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-20936-7
- [48] KAUR, Sukhbir, Abdel G. ELKAHLOUN, Satya P. SINGH, Anush ARAKELYAN a David D. ROBERTS. A function-blocking CD47 antibody modulates extracellular vesicle-mediated intercellular signaling between breast carcinoma cells and endothelial cells. *Journal of Cell Communication and Signaling* [online]. 2017 [vid. 2018-02-23]. ISSN 1873-9601, 1873-961X. Dostupné z: doi:10.1007/s12079-017-0428-0
- [49] OLDENBORG, Per-Arne, Alex ZHELEZNYAK, Yi-Fu FANG, Carl F. LAGENAUR, Hattie D. GRESHAM a Frederik P. LINDBERG. Role of CD47 as a Marker of Self on Red Blood Cells. *Science* [online]. 2000, **288**(5473), 2051–2054. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.288.5473.2051
- [50] EDRIS, Badreddin, Kipp WEISKOPF, Anne K. VOLKMER, Jens-Peter VOLKMER, Stephen B. WILLINGHAM, Humberto CONTRERAS-TRUJILLO, Jie LIU, Ravindra MAJETI, Robert B. WEST, Jonathan A. FLETCHER, Andrew H. BECK, Irving L. WEISSMAN a Matt VAN DE RIJN. Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2012, **109**(17), 6656–6661. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1121629109
- [51] MURATA, Yoji, Takenori KOTANI, Hiroshi OHNISHI a Takashi MATOZAKI. The CD47–SIRP α signalling system: its physiological roles and therapeutic application. *The Journal of*

- Biochemistry* [online]. 2014, **155**(6), 335–344. ISSN 0021-924X. Dostupné z: doi:10.1093/jb/mvu017
- [52] HATHERLEY, Deborah, Stephen C. GRAHAM, Jessie TURNER, Karl HARLOS, David I. STUART a A. Neil BARCLAY. Paired Receptor Specificity Explained by Structures of Signal Regulatory Proteins Alone and Complexed with CD47. *Molecular Cell* [online]. 2008, **31**(2), 266–277. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2008.05.026
- [53] LEE, Winston Y., Dominique A. WEBER, Oskar LAUR, Sean R. STOWELL, Ingrid MCCALL, Rakeeb ANDARGACHEW, Richard D. CUMMINGS a Charles A. PARKOS. The Role of cis Dimerization of Signal Regulatory Protein α (SIRP α) in Binding to CD47. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2010, **285**(49), 37953–37963. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.180018
- [54] K, Weiskopf, Jahchan NS, Schnorr PJ, Cristea S, Ring AM, Maute RL, Volkmer AK, Volkmer JP, Liu J, Lim JS, Yang D, Seitz G, Nguyen T, Wu D, Jude K, Guerston H, Barkal A, Trapani F, George J, Poirier JT, Gardner EE, Miles LA, de Stanchina E, Lofgren SM, Vogel H, Winslow MM, Dive C, Thomas RK, Rudin CM, van de Rijn M, Majeti R, Garcia KC, Weissman IL a Sage J. CD47-blocking immunotherapies stimulate macrophage-mediated destruction of small-cell lung cancer., CD47-blocking immunotherapies stimulate macrophage-mediated destruction of small-cell lung cancer. *The Journal of clinical investigation, The Journal of Clinical Investigation* [online]. 2016, **126**, **126**(7, 7), 2610, 2610–2620. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI81603, 10.1172/JCI81603
- [55] KIM, D., J. WANG, S. B. WILLINGHAM, R. MARTIN, G. WERNIG a I. L. WEISSMAN. Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. *Leukemia* [online]. 2012, **26**(12), 2538–2545. ISSN 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2012.141
- [56] LIU, Liang, Lin ZHANG, Lin YANG, Hui LI, Runmei LI, Jinpu YU, Lili YANG, Feng WEI, Cihui YAN, Qian SUN, Hua ZHAO, Fan YANG, Hao JIN, Jian WANG, Shizhen Emily WANG a Xiubao REN. Anti-CD47 Antibody As a Targeted Therapeutic Agent for Human Lung Cancer and Cancer Stem Cells. *Frontiers in Immunology* [online]. 2017, **8**, 404. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2017.00404
- [57] JAISWAL, Siddhartha, Mark P. CHAO, Ravindra MAJETI a Irving L. WEISSMAN. Macrophages as mediators of tumor immunosurveillance. *Trends in immunology*. 2010, **31**(6), 212–219.
- [58] CHAO, Mark P, Irving L WEISSMAN a Ravindra MAJETI. The CD47–SIRP α pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Current Opinion in Immunology* [online]. 2012, **24**(2), Lymphocyte development/Tumour immunology, 225–232. ISSN 0952-7915. Dostupné z: doi:10.1016/j.coi.2012.01.010
- [59] ZHANG, Michael, Gregor HUTTER, Suzana A. KAHN, Tej D. AZAD, Sharareh GHOLAMIN, Chelsea Y. XU, Jie LIU, Achal S. ACHROL, Chase RICHARD, Pia SOMMERKAMP, Matthew Kenneth SCHOEN, Melissa N. MCCracken, Ravi MAJETI, Irving WEISSMAN, Siddhartha S. MITRA a Samuel H. CHESHER. Anti-CD47 Treatment Stimulates Phagocytosis of Glioblastoma by M1 and M2 Polarized Macrophages and Promotes M1 Polarized Macrophages In Vivo. *PLoS ONE* [online]. 2016, **11**(4) [vid. 2018-04-09]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0153550
- [60] ZHANG, Huimin, Haiquan LU, Lisha XIANG, John W. BULLEN, Chuanzhao ZHANG, Debangshu SAMANTA, Daniele M. GILKES, Jianjun HE a Gregg L. SEMENZA. HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of

- cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2015, **112**(45), E6215–E6223. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1520032112
- [61] KRAMPITZ, Geoffrey Wayne, Benson M. GEORGE, Stephen B. WILLINGHAM, Jens-Peter VOLKMER, Kipp WEISKOPF, Nadine JAHCHAN, Aaron M. NEWMAN, Debashis SAHOO, Allison J. ZEMEK, Rebecca L. YANOVSKY, Julia K. NGUYEN, Peter J. SCHNORR, Pawel K. MAZUR, Julien SAGE, Teri A. LONGACRE, Brendan C. VISSER, George A. POULTSIDES, Jeffrey A. NORTON a Irving L. WEISSMAN. Identification of tumorigenic cells and therapeutic targets in pancreatic neuroendocrine tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2016, **113**(16), 4464–4469. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1600007113
- [62] LO, Jessica, Eunice Yuen Ting LAU, Francis Tak Yuk SO, Ping LU, Vera Sau Fong CHAN, Vincent Chi Ho CHEUNG, Rachel Hiu Ha CHING, Bowie Yik Ling CHENG, Mark Kin Fai MA, Irene Oi Lin NG a Terence Kin Wah LEE. Anti-CD47 antibody suppresses tumour growth and augments the effect of chemotherapy treatment in hepatocellular carcinoma. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* [online]. 2016, **36**(5), 737–745. ISSN 1478-3231. Dostupné z: doi:10.1111/liv.12963
- [63] CHAO, Mark P., Siddhartha JAISWAL, Rachel WEISSMAN-TSUKAMOTO, Ash A. ALIZADEH, Andrew J. GENTLES, Jens VOLKMER, Kipp WEISKOPF, Stephen B. WILLINGHAM, Tal RAVEH, Christopher Y. PARK, Ravindra MAJETI a Irving L. WEISSMAN. Calreticulin Is the Dominant Pro-Phagocytic Signal on Multiple Human Cancers and Is Counterbalanced by CD47. *Science Translational Medicine* [online]. 2010, **2**(63), 63ra94-63ra94. ISSN 1946-6234, 1946-6242. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.3001375
- [64] LIU, Xiaojuan, Yang PU, Kyle CRON, Liufu DENG, Justin KLINE, William A. FRAZIER, Hairong XU, Hua PENG, Yang-Xin FU a Meng Michelle XU. CD47 Blockade Triggers T cell-mediated Destruction of Immunogenic Tumors. *Nature medicine* [online]. 2015, **21**(10), 1209–1215. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/nm.3931
- [65] SUBRAMANIAN, Shyamsundar, Ranganath PARTHASARATHY, Shamik SEN, Eric T. BODER a Dennis E. DISCHER. Species- and cell type-specific interactions between CD47 and human SIRP α . *Blood* [online]. 2006, **107**(6), 2548–2556. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2005-04-1463
- [66] LIU, Jie, Lijuan WANG, Feifei ZHAO, Serena TSENG, Cyndhavi NARAYANAN, Lei SHURA, Stephen WILLINGHAM, Maureen HOWARD, Susan PROHASKA, Jens VOLKMER, Mark CHAO, Irving L. WEISSMAN a Ravindra MAJETI. Pre-Clinical Development of a Humanized Anti-CD47 Antibody with Anti-Cancer Therapeutic Potential. *PLoS ONE* [online]. 2015, **10**(9) [vid. 2017-05-06]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0137345
- [67] PONCE, Laia Pascual, Nadja C. FENN, Nadine MORITZ, Christina KRUPKA, Jan-Hendrik KOZIK, Kirsten LAUBER, Marion SUBKLEWE a Karl-Peter HOPFNER. SIRP α -antibody fusion proteins stimulate phagocytosis and promote elimination of acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(7), 11284–11301. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.14500
- [68] TSENG, Diane, Jens-Peter VOLKMER, Stephen B. WILLINGHAM, Humberto CONTRERAS-TRUJILLO, John W. FATHMAN, Nathaniel B. FERNHOFF, Jun SEITA, Matthew A. INLAY, Kipp WEISKOPF, Masanori MIYANISHI a Irving L. WEISSMAN. Anti-CD47 antibody-mediated

- phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2013, **110**(27), 11103–11108. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1305569110
- [69] SEIFFERT, Martina, Charles CANT, Zhengjun CHEN, Irene RAPPOLD, Wolfram BRUGGER, Lothar KANZ, Eric J. BROWN, Axel ULLRICH a Hans-Jörg BÜHRING. Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47. *Blood*. 1999, **94**(11), 3633–3643.
- [70] YANG, Yun, Rui GUO, Qi CHEN, Youxun LIU, Pengfei ZHANG, Ziheng ZHANG, Xi CHEN a Tianyun WANG. A novel bispecific antibody fusion protein co-targeting EGFR and CD47 with enhanced therapeutic index. *Biotechnology Letters* [online]. 2018, 1–7. ISSN 0141-5492, 1573-6776. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-018-2535-2
- [71] *A Phase 1, Dose Finding Study of CC-90002 in Subjects With Advanced Solid and Hematologic Cancers - Full Text View - ClinicalTrials.gov* [online]. [vid. 2016-10-27]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02367196>
- [72] *A Study of CC-90002 in Subjects With Acute Myeloid Leukemia (AML) and High-risk Myelodysplastic Syndrome (MDS) - Full Text View - ClinicalTrials.gov* [online]. [vid. 2016-10-27]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02641002>
- [73] *A Trial of TTI-621 for Patients With Hematologic Malignancies - Full Text View - ClinicalTrials.gov* [online]. [vid. 2016-10-27]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02663518>
- [74] *CAMELLIA: Anti-CD47 Antibody Therapy in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukaemia - Full Text View - ClinicalTrials.gov* [online]. [vid. 2016-10-27]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02678338>
- [75] NARLA, Rama Krishna, Hardik MODI, Lilly WONG, Mahan ABASSIAN, Daniel BAUER, Pragnya DESAI, Bonny GAFFNEY, Pilgrim JACKSON, Jim LEISTEN, Jing LIU, Antonia LOPEZ-GIRONA, Maria ROMERO, WenQing YANG, Brendan P. ECKELMAN, Quinn DEVERAUX, Laurie PHILLIPS, Heather K. RAYMON, Laure ESCOUBET, John BOYLAN a Kandasamy HARIHARAN. Abstract 4694: The humanized anti-CD47 monoclonal antibody, CC-90002, has antitumor activity in vitro and in vivo. *Cancer Research* [online]. 2017, **77**(13 Supplement), 4694–4694. ISSN 0008-5472, 1538-7445. Dostupné z: doi:10.1158/1538-7445.AM2017-4694
- [76] PETROVA, Penka S., Natasja Nielsen VILLER, Mark WONG, Xinli PANG, Gloria H. Y. LIN, Karen DODGE, Vien CHAI, Hui CHEN, Vivian LEE, Violetta HOUSE, Noel T. VIGO, Debbie JIN, Tapfuma MUTUKURA, Marilyse CHARBONNEAU, Tran TRUONG, Stephane VIAU, Lisa D. JOHNSON, Emma LINDEROTH, Eric L. SIEVERS, Saman Maleki VAREKI, Rene FIGUEREDO, Macarena PAMPILLO, James KOROPATNICK, Suzanne TRUDEL, Nathan MBONG, Liqing JIN, Jean C. Y. WANG a Robert A. UGER. TTI-621 (SIRP α Fc): A CD47-Blocking Innate Immune Checkpoint Inhibitor with Broad Antitumor Activity and Minimal Erythrocyte Binding. *Clinical Cancer Research* [online]. 2017, **23**(4), 1068–1079. ISSN 1078-0432, 1557-3265. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1700
- [77] WEISKOPF, Kipp, Aaron M. RING, Chia Chi M. HO, Jens-Peter VOLKMER, Aron M. LEVIN, Anne Kathrin VOLKMER, Engin ÖZKAN, Nathaniel B. FERNHOFF, Matt van de RIJN, Irving L. WEISSMAN a K. Christopher GARCIA. Engineered SIRP α Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies. *Science* [online]. 2013, **341**(6141), 88–91. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1238856

- [78] SOCKOLOSKY, Jonathan T., Michael DOUGAN, Jessica R. INGRAM, Chia Chi M. HO, Monique J. KAUKE, Steven C. ALMO, Hidde L. PLOEGH a K. Christopher GARCIA. Durable antitumor responses to CD47 blockade require adaptive immune stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2016, **113**(19), E2646–E2654. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1604268113
- [79] KAUDER, Steven E., Tracy C. KUO, Amy CHEN, Ons HARRABI, Sony S. ROCHA, Laura DOYLE, Sangeetha BOLLINI, Bora HAN, Emma Ruth B. SANGALANG, Janet SIM, Sophia RANDOLPH, Jaume PONS a Hong I. WAN. ALX148 Is a High Affinity Sirp α Fusion Protein That Blocks CD47, Enhances the Activity of Anti-Cancer Antibodies and Checkpoint Inhibitors, and Has a Favorable Safety Profile in Preclinical Models. *Blood*. 2017, **130**(Suppl 1), 112–112. ISSN 0006-4971, 1528-0020.
- [80] *Search of: CD47 - List Results - ClinicalTrials.gov* [online]. [vid. 2017-08-28]. Dostupné z: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=CD47&cntry1=&state1=&recrs=>
- [81] MANNA, Partha P., Julie DIMITRY, Per-Arne OLDENBORG a William A. FRAZIER. CD47 Augments Fas/CD95-mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2005, **280**(33), 29637–29644. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M500922200
- [82] LINDBERG, F. P., H. D. GRESHAM, M. I. REINHOLD a E. J. BROWN. Integrin-associated protein immunoglobulin domain is necessary for efficient vitronectin bead binding. *The Journal of Cell Biology*. 1996, **134**(5), 1313–1322. ISSN 0021-9525.
- [83] ROBERTS, David D., Thomas W. MILLER, Natasha M. ROGERS, Mingyi YAO a Jeffrey S. ISENBERG. The matricellular protein thrombospondin-1 globally regulates cardiovascular function and responses to stress via CD47. *Matrix Biology* [online]. 2012, **31**(3), 162–169. ISSN 0945-053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2012.01.005
- [84] SICK, E, A JEANNE, C SCHNEIDER, S DEDIEU, K TAKEDA a L MARTINY. CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2012, **167**(7), 1415–1430. ISSN 0007-1188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02099.x
- [85] QIN, Qing, Juying QIAN, Lei GE, Li SHEN, Jianguo JIA, Jianhao JIN a Junbo GE. Effect and Mechanism of Thrombospondin-1 on the Angiogenesis Potential in Human Endothelial Progenitor Cells: An In Vitro Study. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(2) [vid. 2018-02-27]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0088213
- [86] CHANG, Wen-Teng a A.-Min HUANG. α -Pal/NRF-1 Regulates the Promoter of the Human Integrin-associated Protein/CD47 Gene. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2004, **279**(15), 14542–14550. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M309825200
- [87] CASEY, Stephanie C., Ling TONG, Yulin LI, Rachel DO, Susanne WALZ, Kelly N. FITZGERALD, Arvin GOUW, Virginie BAYLOT, Ines GUTGEMANN, Martin EILERS a Dean W. FELSHER. MYC Regulates the Anti-Tumor Immune Response through CD47 and PD-L1. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2016, **352**(6282), 227–231. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aac9935
- [88] KAUR, Sukhbir, David R. SOTO-PANTOJA, Erica V. STEIN, Chengyu LIU, Abdel G. ELKAHLOUN, Michael L. PENDRAK, Alina NICOLAE, Satya P. SINGH, Zuqin NIE, David LEVENS, Jeffrey S.

- ISENBERG a David D. ROBERTS. Thrombospondin-1 Signaling through CD47 Inhibits Self-renewal by Regulating c-Myc and Other Stem Cell Transcription Factors. *Scientific Reports* [online]. 2013, **3** [vid. 2016-10-21]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep01673
- [89] LEWIS, L. Michelle, Meredith C. EDWARDS, Zachary R. MEYERS, C. Conover Talbot JR, Haiping HAO, David BLUM a Reproducibility Project: Cancer BIOLOGY. Replication Study: Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *eLife* [online]. 2018, **7**, e30274. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.30274
- [90] LEHNEN, Daniela, Serena BARRAL, Tiago CARDOSO, Shane GREALISH, Andreas HEUER, Andrej SMIYAKIN, Agnete KIRKEBY, Jutta KOLLET, Harold CREMER, Malin PARMAR, Andreas BOSIO a Sebastian KNÖBEL. IAP-Based Cell Sorting Results in Homogeneous Transplantable Dopaminergic Precursor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* [online]. 2017, **9**(4), 1207–1220. ISSN 2213-6711. Dostupné z: doi:10.1016/j.stemcr.2017.08.016
- [91] LO, Jessica, Eunice Yuen Ting LAU, Rachel Hiu Ha CHING, Bowie Yik Ling CHENG, Mark Kin Fai MA, Irene Oi Lin NG a Terence Kin Wah LEE. Nuclear factor kappa B-mediated CD47 up-regulation promotes sorafenib resistance and its blockade synergizes the effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* [online]. 2015, **62**(2), 534–545. ISSN 1527-3350. Dostupné z: doi:10.1002/hep.27859
- [92] GERY, Sigal, Adrian F. GOMBART, William S. YI, Chloe KOEFFLER, Wolf-K. HOFMANN a H. Phillip KOEFFLER. Transcription profiling of C/EBP targets identifies Per2 as a gene implicated in myeloid leukemia. *Blood* [online]. 2005, **106**(8), 2827–2836. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2005-01-0358
- [93] BUENO, C., J. L. SARDINA, B. DI STEFANO, D. ROMERO-MOYA, A. MUÑOZ-LÓPEZ, L. ARIZA, M. C. CHILLÓN, A. BALANZATEGUI, J. CASTAÑO, A. HERREROS, M. F. FRAGA, A. FERNÁNDEZ, I. GRANADA, O. QUINTANA-BUSTAMANTE, J. C. SEGOVIA, K. NISHIMURA, M. OHTAKA, M. NAKANISHI, T. GRAF a P. MENENDEZ. Reprogramming human B cells into induced pluripotent stem cells and its enhancement by C/EBP α . *Leukemia* [online]. 2016, **30**(3), 674–682. ISSN 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2015.294
- [94] TANAKA, Toshiya, Takeshi UCHIUMI, Eiji HINOSHITA, Akihiko INOKUCHI, Satoshi TOH, Morimasa WADA, Hiroshi TAKANO, Kimitoshi KOHNO a Michihiko KUWANO. The human multidrug resistance protein 2 gene: Functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology* [online]. 1999, **30**(6), 1507–1512. ISSN 1527-3350. Dostupné z: doi:10.1002/hep.510300617
- [95] CHEN, G. Kevin, Sanja SALE, Thomas TAN, Ralph P. ERMOIAN a Branimir I. SIKIC. CCAAT/Enhancer-Binding Protein β (Nuclear Factor for Interleukin 6) Transactivates the Human MDR1 Gene by Interaction with an Inverted CCAAT Box in Human Cancer Cells. *Molecular Pharmacology* [online]. 2004, **65**(4), 906–916. ISSN 0026-895X, 1521-0111. Dostupné z: doi:10.1124/mol.65.4.906
- [96] 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, **108**(19), 7950–7955. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1102454108

- [97] 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, **10**(8), 995–1009. ISSN 1541-7786, 1557-3125. Dostupné z: doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0274
- [98] LIU, Wen, Yi-Juan HUANG, Cong LIU, Yan-Yong YANG, Hu LIU, Jian-Guo CUI, Ying CHENG, Fu GAO, Jian-Ming CAI a Bai-Long LI. Inhibition of TBK1 attenuates radiation-induced epithelial-mesenchymal transition of A549 human lung cancer cells via activation of GSK-3 β and repression of ZEB1. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* [online]. 2014, **94**(4), 362–370. ISSN 1530-0307. Dostupné z: doi:10.1038/labinvest.2013.153
- [99] HE, Enhui, Fei PAN, Guangchao LI a Jingjing LI. Fractionated Ionizing Radiation Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Esophageal Cancer Cells through PTEN Deficiency-Mediated Akt Activation. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(5), e0126149. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0126149
- [100] LEE, Su Yeon, Eui Kyong JEONG, Min Kyung JU, Hyun Min JEON, Min Young KIM, Cho Hee KIM, Hye Gyeong PARK, Song ly HAN a Ho Sung KANG. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Molecular Cancer* [online]. 2017, **16**, 10. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/s12943-016-0577-4
- [101] RESCH, Irene, Shahrokh F. SHARIAT a Kilian M. GUST. PD-1 and PD-L1 inhibitors after platinum-based chemotherapy or in first-line therapy in cisplatin-ineligible patients. *Memo* [online]. 2018, **11**(1), 43–46. ISSN 1865-5041. Dostupné z: doi:10.1007/s12254-018-0396-y
- [102] ALSAAB, Hashem O., Samaresh SAU, Rami ALZHRANI, Katyayani TATIPARTI, Ketki BHISE, Sushil K. KASHAW a Arun K. IYER. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2017, **8** [vid. 2018-04-17]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2017.00561
- [103] BARKAL, Amira A., Kipp WEISKOPF, Kevin S. KAO, Sydney R. GORDON, Benyamin ROSENTAL, Ying Y. YIU, Benson M. GEORGE, Maxim MARKOVIC, Nan G. RING, Jonathan M. TSAI, Kelly M. MCKENNA, Po Yi HO, Robin Z. CHENG, James Y. CHEN, Layla J. BARKAL, Aaron M. RING, Irving L. WEISSMAN a Roy L. MAUTE. Engagement of MHC class I by the inhibitory receptor LILRB1 suppresses macrophages and is a target of cancer immunotherapy. *Nature Immunology* [online]. 2018, **19**(1), 76–84. ISSN 1529-2908, 1529-2916. Dostupné z: doi:10.1038/s41590-017-0004-z
- [104] BRANDAU, Sven a Henrik SUTTMANN. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: A success story with room for improvement. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2007, **61**(6), 299–305. ISSN 0753-3322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2007.05.004
- [105] BIOT, Claire, Cyrill A. RENTSCH, Joel R. GSPONER, Frédéric D. BIRKHÄUSER, Hélène JUSFORGUES-SAKLANI, Fabrice LEMAÎTRE, Charlotte AURIAU, Alexander BACHMANN, Philippe BOUSSO, Caroline DEMANGEL, Lucie PEDUTO, George N. THALMANN a Matthew L. ALBERT. Preexisting BCG-Specific T Cells Improve Intravesical Immunotherapy for Bladder Cancer. *Science Translational Medicine* [online]. 2012, **4**(137), 137ra72-137ra72. ISSN 1946-6234, 1946-6242. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.3003586

- [106] TICCHIONI, M., M. DECKERT, F. MARY, G. BERNARD, E. J. BROWN a A. BERNARD. Integrin-associated protein (CD47) is a comitogenic molecule on CD3-activated human T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1997, **158**(2), 677–684. ISSN 0022-1767.
- [107] ZENG, Dadi, Qiang SUN, Ang CHEN, Jiangfeng FAN, Xiaopeng YANG, Lei XU, Peng DU, Weiyi QIU, Weicai ZHANG, Shuang WANG a Zhiwei SUN. A fully human anti-CD47 blocking antibody with therapeutic potential for cancer. *Oncotarget* [online]. 2016, **7**(50), 83040–83050. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.13349
- [108] BRITTAİN, Julia E., Kathryn J. MLINAR, Christopher S. ANDERSON, Eugene P. ORRINGER a Leslie V. PARISE. Integrin-associated protein is an adhesion receptor on sickle red blood cells for immobilized thrombospondin. *Blood* [online]. 2001, **97**(7), 2159–2164. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V97.7.2159
- [109] YOSHIDA, H., Y. TOMIYAMA, J. ISHIKAWA, K. ORITANI, I. MATSUMURA, M. SHIRAGA, T. YOKOTA, Y. OKAJIMA, M. OGAWA, J. i MIYAGAWA, T. NISHIURA a Y. MATSUZAWA. Integrin-associated protein/CD47 regulates motile activity in human B-cell lines through CDC42. *Blood*. 2000, **96**(1), 234–241. ISSN 0006-4971.
- [110] JAISWAL, Siddhartha, Catriona H. M. JAMIESON, Wendy W. PANG, Christopher Y. PARK, Mark P. CHAO, Ravindra MAJETI, David TRAVER, Nico van ROOIJEN a Irving L. WEISSMAN. CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis. *Cell* [online]. 2009, **138**(2), 271–285. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.05.046
- [111] BETANCUR, Paola A., Brian J. ABRAHAM, Ying Y. YIU, Stephen B. WILLINGHAM, Farnaz KHAMENEH, Mark ZARNEGAR, Angera H. KUO, Kelly MCKENNA, Yoko KOJIMA, Nicholas J. LEEPER, Po HO, Phung GIP, Tomek SWIGUT, Richard I. SHERWOOD, Michael F. CLARKE, George SOMLO, Richard A. YOUNG a Irving L. WEISSMAN. A CD47-associated super-enhancer links pro-inflammatory signalling to CD47 upregulation in breast cancer. *Nature Communications* [online]. 2017, **8**. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms14802
- [112] NGO, Michael, Arum HAN, Anita LAKATOS, Debashis SAHOO, Stephanie J. HACHEY, Kipp WEISKOPF, Andrew H. BECK, Irving L. WEISSMAN a Alexander D. BOIKO. Antibody Therapy Targeting CD47 and CD271 Effectively Suppresses Melanoma Metastasis in Patient-Derived Xenografts. *Cell Reports* [online]. 2016, **16**(6), 1701–1716. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2016.07.004
- [113] CHEAH, M. T., J. Y. CHEN, D. SAHOO, H. CONTRERAS-TRUJILLO, A. K. VOLKMER, F. A. SCHEEREN, J. P. VOLKMER a I. 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, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2015, **112**, **112**(15, 15), 4725, 4725–4730. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1424795112, 10.1073/pnas.1424795112
- [114] KIM, D., J. WANG, S. B. WILLINGHAM, R. MARTIN, G. WERNIG a I. L. WEISSMAN. Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. *Leukemia* [online]. 2012, **26**(12), 2538–2545. ISSN 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2012.141
- [115] SHIRATORI, Hiromi, Carmen FEINWEBER, Sonja LUCKHARDT, Bona LINKE, Eduard RESCH, Gerd GEISSLINGER, Andreas WEIGERT a Michael J. PARNHAM. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro.

Molecular Immunology [online]. 2017, **88**, 58–68. ISSN 0161-5890. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2017.05.027

- [116] GATTO, Francesca, Roberta CAGLIANI, Tiziano CATELANI, Daniela GUARNIERI, Mauro MOGLIANETTI, Pier Paolo POMPA a Giuseppe BARDI. PMA-Induced THP-1 Macrophage Differentiation is Not Impaired by Citrate-Coated Platinum Nanoparticles. *Nanomaterials* [online]. 2017, **7**(10) [vid. 2018-04-03]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano7100332
- [117] TAKAHASHI, Daisuke, Mitsuhiro FUJIHARA, Toru MIYAZAKI, Keiji MATSUBAYASHI, Shinichiro SATO, Hiroshi AZUMA, Toshiaki KATO, Shuichi KINO, Hisami IKEDA, Shigeru TAKAMOTO, Noriyuki SATO a Toshihiko TORIGOE. Flow cytometric quantitation of platelet phagocytosis by monocytes using a pH-sensitive dye, pHrodo-SE. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2017, **447**, 57–64. ISSN 0022-1759. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2017.04.009
- [118] PIETSCH, E C, J DONG, R CARDOSO, X ZHANG, D CHIN, R HAWKINS, T DINH, M ZHOU, B STRAKE, P-H FENG, M ROCCA, C Dos SANTOS, X SHAN, G DANET-DESNOYERS, F SHI, E KAISER, H J MILLAR, S FENTON, R SWANSON, J A NEMETH a R M ATTAR. Anti-leukemic activity and tolerability of anti-human CD47 monoclonal antibodies. *Blood Cancer Journal* [online]. 2017, **7**(2), e536. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/bcj.2017.7