

UNIVERZA V LJUBLJANI
MEDICINSKA FAKULTETA
PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOMEDICINE

Ana KOREN

**POMEN TUMORSKIH MATIČNIH CELIC IN
EPITELNO-MEZENHIMSKEGA PREHODA PRI
NAPREDOVANJU NEDROBNOCELIČNEGA RAKA
PLJUČ**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
MEDICINSKA FAKULTETA
PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOMEDICINE

Ana KOREN

**POMEN TUMORSKIH MATIČNIH CELIC IN EPITELNO-
MEZENHIMSKEGA PREHODA PRI NAPREDOVANJU
NEDROBNOCELIČNEGA RAKA PLJUČ**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE IMPORTANCE OF CANCER STEM CELLS AND EPITHELIAL-
MESENCHYMAL TRANSITION IN THE PROGRESSION OF NON-
SMALL CELL LUNG CANCER**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Kdor išče cilj, bo ostal prazen, ko ga bo dosegel; kdor pa najde pot, bo cilj vedno nosil v sebi.

(Nejc Zaplotnik)

Univerza
v Ljubljani *Medicinska*
fakulteta



Avtor KOREN, Ana, univ. dipl. biotehnol.

Naslov POMEN TUMORSKIH MATIČNIH CELIC IN EPITELNO-MEZENHIMSKEGA PREHODA PRI NAPREDOVANJU NEDROBNOCELIČNEGA RAKA PLJUČ

Imenovanje mentorja na seji senata dne: 23. 9. 2013

Imenovanje somentorja na seji senata dne: 23. 9. 2013

Komisija za oceno in zagovor imenovana na seji senata dne: 14. 12. 2015

Datum zagovora: 24. 3. 2016

Mentor: prof. dr. Tanja Čufer, dr. med.

Somentor: izr. prof. dr. Peter Korošec, univ. dipl. biol.

Predsednik komisije: prof. dr. Nina Zidar, dr. med.

Član: prof. dr. Nikola Bešić, dr. med.

Član: doc. dr. Veronika Kloboves Prevodnik, dr. med.

Doktorska disertacija je zaključek interdisciplinarnega podiplomskega študija Biomedicina, področje Temeljna medicina, na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Del naloge je bil opravljen v Laboratoriju za citologijo in patologijo Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Klinični del naloge je bil opravljen v Enoti za internistično onkologijo Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Doktorska naloga je bila financirana iz strani Agencije za raziskovalno dejavnost – ARRS iz projekta Mladi raziskovalec, dodeljenega Ani Koren, ter iz projekta “Molekularni in drugi označevalci raka pljuč in mezotelioma (šifra projekta: J3-4076)”, dodeljenega prof. dr. Tanji Čufer.

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat mojega raziskovalnega dela.

V Ljubljani, 24. 3. 2016

Ana Koren

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO PRILOG	IX
SEZNAM UPORABLJENIH KRATIC	X
POVZETEK	XIII
SUMMARY	XV
1 UVOD	1
1.1 ZNAČILNOSTI RAKA PLJUČ	1
1.2 IDENTIFIKACIJA MATIČNIH CELIC PLJUČ	3
1.3 TUMORSKE MATIČNE CELICE (TMC)	3
1.3.1 Hipoteza o nastanku TMC	3
1.3.2 Označevalci TMC raka pljuč	5
1.3.3 Napovedni pomen označevalcev TMC v tumorskem tkivu NDRP	7
1.4 EPITELNO-MEZENHIMSKI PREHOD (EMP)	11
1.4.1 Molekularne značilnosti EMP	12
1.4.2 Signalne poti EMP	13
1.4.3 Povezava med EMP in TMC	15
1.4.3.1 BMI1	16
1.4.4 Napovedni pomen označevalcev EMP v tumorskem tkivu NDRP	17
1.5 CIRKULIRAJOČE TUMORSKE CELICE (CTC)	21
1.5.1 Metode za izolacijo in detekcijo CTC	21
1.5.2 Napovedni pomen CTC	22
1.5.3 Vloga EMP in TMC pri zasevanju CTC	23
2 NAMEN DELA, DELOVNE HIPOTEZE IN SPECIFIČNI CILJI	26
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 ZASNOVA RAZISKAVE	27

3.2	BOLNIKI IN ZBIRANJE VZORCEV	28
3.3	CELICE	29
3.4	PODROBNEJŠI OPIS UPORABLJENIH METOD	29
3.4.1	Zbiranje vzorcev tumorskega tkiva in periferne krvi.....	29
3.4.2	Priprava primarne celične suspenzije iz tumorskega tkiva.....	30
3.4.3	Gojenje pljučnih celičnih kultur <i>in vitro</i>	30
3.4.3.1	Gojenje trajnih celičnih linij A549 in SKMES1	30
3.4.3.2	Gojenje primarnih celičnih kultur raka pljuč	31
3.4.4	Pretočna citometrija.....	31
3.4.5	Izolacija RNA in eliminacija genomske DNA	33
3.4.6	Sinteza komplementarne DNA.....	34
3.4.7	Predhodno pomnoževanje genov z nizkim izražanjem (preamplifikacija).....	34
3.4.8	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času	34
3.4.9	Izdelava tkivnih mikromrež in imunohistokemija	36
3.4.10	Priprava in izpostavitve celic TGF-β1	37
3.4.11	Izdelava sferoidov in test invazije v kolagenu	37
3.4.12	Izolacija CTC z magnetno separacijo.....	38
3.4.12.1	Preverjanje učinkovitosti izolacije CTC.....	39
3.4.13	Statistika.....	39
4	REZULTATI	41
4.1	KLINIČNE ZNAČILNOSTI BOLNIKOV	41
4.1.1	Značilnosti bolnikov z operabilnim NDRP	41
4.1.2	Značilnosti bolnikov z razsejanim NDRP	42
4.2	DELEŽ TMC IN GENSKO IZRAŽANJE OZNAČEVALCEV EMP IN TMC V PRIMARNEM TUMORJU NDRP IN NORMALNEM PLJUČNEM TKIVU.....	44
4.2.1	Delež TMC v primarnem tumorju.....	44
4.2.2	Gensko izražanje označevalcev EMP in TMC v primarnem tumorju in normalnem pljučnem tkivu	45

4.3	POVEZAVE MED IZRAŽANJEM OZNAČEVALCEV EMP IN TMC V PRIMARNEM TUMORJU IN POLNI KRVI	46
4.3.1	Gensko izražanje molekularnih označevalcev EMP in TMC v primarnem tumorju in periferni polni krvi.....	46
4.3.2	Povezave med genskim izražanjem molekularnih označevalcev EMP in TMC v primarnem tumorju in periferni polni krvi	47
4.3.3	Povezave med proteinskim izražanjem BMI1, CD133 in ALDH1A1 v primarnem tumorju	52
4.4	GENSKO IZRAŽANJE OZNAČEVALCEV EMP IN TMC V CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELICAH	54
4.4.1	Učinkovitost izolacije CTC	54
4.4.2	Gensko izražanje označevalcev EMP in TMC v CTC bolnikov	55
4.5	IN VITRO INDUKCIJA EMP V CELIČNIH KULTURAH	56
4.6	GENSKO IZRAŽANJE <i>BMI1</i> V KRVI IN IZID BOLEZNI.....	60
4.6.1	Povezave med izražanjem <i>BMI1</i> in značilnostmi bolnikov	60
4.6.2	Povezave med izražanjem <i>BMI1</i> in izidi bolezni	62
4.6.3	Razlika v izražanju <i>BMI1</i> med bolniki in kontrolno skupino.....	65
5	RAZPRAVA.....	66
5.1	Primarni tumorji NDRP vsebujejo različne deleže TMC	66
5.2	Izražanje označevalcev EMP in TMC v primarnem tumorju in krvi bolnikov z NDRP je povezano	67
5.3	<i>In vitro</i> aktivacija EMP vpliva na TMC in invazijo celic.....	70
5.4	Izražanje <i>BMI1</i> v krvi napove izid bolezni bolnikov z razsejanim NDRP	71
6	ZAKLJUČKI	75
7	LITERATURA	76
8	PRILOGE.....	91
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Klonalni in hierarhični model nastanka raka.....	5
Slika 2: Pomen EMP pri širjenju raka	12
Slika 3: TGF- β signalna pot	14
Slika 4: Predlagana vloga EMP in TMC pri zasevanju	25
Slika 5: Merjenje invazijske razdalje pri testu invazije v kolagenu	38
Slika 6: Delež TMC v primarnem tumorju.....	44
Slika 7: Gensko izražanje označevalcev v primarnem tumorju in normalnem pljučnem tkivu.	45
Slika 8: Izražanje označevalcev v primarnem tumorju in polni krvi.....	46
Slika 9: Povezave med izražanjem BMI1, ALDH1A1 in CD133 v primarnem tumorju.....	53
Slika 10: Preverjanje uspešnosti izolacije CTC.....	54
Slika 11: Izražanje označevalcev TMC in EMP v izoliranih CTC.....	55
Slika 12: Vpliv TGF- β 1 na morfologijo celic	57
Slika 13: Vpliv TGF- β 1 na izražanje označevalcev EMP in TMC pri A549 in SKMES1 celicah.....	58
Slika 14: Tridimenzionalni invazijski test sferoidov.....	59
Slika 15: Preživetje brez napredovanja bolezni in celokupno preživetje glede na gensko izražanje <i>BMI1</i>	63
Slika 16: Izražanje <i>BMI1</i> v krvi pri 96 bolnikih z razsejanim NDRP in 64 kontrolah.....	65

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Označevalci tumorskih matičnih celic pri raku pljuč	6
Preglednica 2: Napovedni pomen označevalcev TMC v primarnem tumorju	9
Preglednica 3: Označevalci EMP	13
Preglednica 4: Napovedni pomen označevalcev EMP v primarnem tumorju.....	19
Preglednica 5: Klinične značilnosti 57 bolnikov z operabilnim NDRP	41
Preglednica 6: Osnovne značilnosti 96 bolnikov z razsejanim NDRP	43
Preglednica 7: Povezave med izražanjem označevalcev v primarnem tumorju in polni krvi pri NDRP	48
Preglednica 8: Povezave med izražanjem označevalcev v primarnem tumorju in polni krvi pri podskupini 32 bolnikov z žlezni rakom pljuč	50
Preglednica 9: Povezave med izražanjem označevalcev v primarnem tumorju in polni krvi pri podskupini 19 bolnikov s ploščatoceličnim rakom pljuč	51
Preglednica 10: Povezave med izražanjem <i>BMI1</i> in kliničnimi značilnostmi	61
Preglednica 11: Coxov regresijski model sorazmernega tveganja za preživetje brez napredovanja bolezni in celokupno preživetje	64

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Po abecedi razvrščene aparature, uporabljene v doktorski nalogi	91
Priloga 2: Po abecedi razvrščene kemikalije, uporabljene v doktorski nalogi	91
Priloga 3: Po abecedi razvrščeni kompleti reagentov, uporabljeni v doktorski nalogi	92
Priloga 4: Po abecedi razvrščeni pripravljene testi TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, ZDA)	93
Priloga 5: Po abecedi razvrščena primarna protitelesa, uporabljena v doktorski nalogi	93
Priloga 6: Znanstveni članek	93

SEZNAM UPORABLJENIH KRATIC

ALDH1A1	aldehidna dehidrogenaza 1A1
bFGF	bazični fibroblastni rastni dejavnik (iz angl. “ <i>basic fibroblast growth factor</i> ”)
BAAA	BODIPY-aminoacetaldehid
BASC	bronchioalveolarna matična celica (iz angl. “ <i>bronchioalveolar stem cell</i> ”)
BMI1	iz angl. “ <i>B-lymphoma Moloney murine leukemia virus insertion region-1</i> ”
BSA	goveji serumski albumin (iz angl. “ <i>bovine serum albumin</i> ”)
cDNA	komplementarna (iz angl. “ <i>complementary</i> ”) DNA
CI	interval zaupanja (iz angl. “ <i>confidence interval</i> ”)
CSS	za raka specifično preživetje (iz angl. “ <i>cancer-specific survival</i> ”)
Ct-pražni cikel	(iz angl. “ <i>cycle threshold</i> ”)
DEAB	dietilamino-benzaldehid
DFS	preživetje brez bolezni (iz angl. “ <i>disease-free survival</i> ”)
DK-SFM	iz angl. “ <i>defined keratinocyte serum free medium</i> ”
DNA	deoksiribonukleinska kislina (iz angl. “ <i>acid</i> ”)
DSS	za bolezni specifično preživetje (iz angl. “ <i>disease-specific survival</i> ”)
ECACC	Evropska zbirka avtentificiranih celičnih kultur (iz angl. “ <i>european collection of authenticated cell cultures</i> ”)
ECOG	iz angl. “ <i>Eastern cooperative oncology group</i> ”
EGF	epidermalni rastni dejavnik (iz angl. “ <i>epidermal growth factor</i> ”)
EMP	epitelno-mezenhimski prehod
EpCAM	epitelna celična adhezijska molekula (iz angl. “ <i>epithelial cell adhesion molecule</i> ”)
FACS	s fluorescenco aktivirano celično sortiranje
FBS	serum govejih zarodkov (angl. “ <i>fetal bovine serum</i> ”)
FFPE	v formalinu fiksirano in vpeto v parafin (iz angl. “ <i>formalin-fixed paraffin-embedded</i> ”)
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (angl. “ <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> ”)
HBSS	iz angl. “ <i>Hanks` balanced salt solution</i> ”

HR	razmerje tveganja (iz angl. “ <i>hazard ratio</i> ”)
H&E	hematoksilin in eozin
hTERT	humana telomerazna reverzna transkriptaza
IHK	imunohistokemija
KOPB	kronična obstruktivna pljučna bolezen
KRG	kirurgija
KRT7	citokeratin 7
KT	kemoterapija
mRNA	sporočevalna (iz angl. “ <i>messenger</i> ”) RNA
MV	multivariatna analiza
NS	statistično neznačilno (iz angl. “ <i>non-significant</i> ”)
NDRP	nedrobnocelični rak pljuč
NOS	neopredeljen nedrobnocelični rak (iz angl. “ <i>NSCLC not otherwise specified</i> ”)
OS	celokupno preživetje (iz angl. “ <i>overall survival</i> ”)
PBS	fosfatni pufer z NaCl (iz angl. “ <i>phosphate buffered saline</i> ”)
PcG	polikomb skupina (iz angl. “ <i>polycomb group</i> ”)
PE	fikoeritrin (iz angl. “ <i>phycoerythrin</i> ”)
PFS	preživetje brez napredovanja bolezni (iz angl. “ <i>progression-free survival</i> ”)
PS	stanje telesne zmogljivosti (iz angl. “ <i>performance status</i> ”)
PMNC	mononuklearne celice periferne krvi (iz angl. “ <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ”)
PRK	polikomb represorski kompleks
RECIST	iz angl. “ <i>Response evaluation criteria in solid tumors</i> ”
RFS	preživetje brez ponovitve bolezni (iz angl. “ <i>recurrence-free survival</i> ”)
RNA	ribonukleinska kislina (iz angl. “ <i>acid</i> ”)
RT	radioterapija
RT-qPCR	kvantitativna verižna reakcija DNA polimeraze v realnem času (iz angl. “ <i>real time quantitative DNA-polymerase chain reaction</i> ”)
SD	standardni odklon (deviacija)
TGF- β 1	transformirajoči rastni dejavnik β 1 (iz angl. “ <i>transforming growth factor β1</i> ”)
TMC	tumorska matična celica

UV	univariatna analiza
ZEB	iz angl. “ <i>zinc-finger E-box binding</i> ”
ZCM	zunajcelični matriks

POVZETEK

Namen dela: Proučiti povezavo med tumorskimi matičnimi celicami (TMC) in epitelno-mezenhimskim prehodom (EMP) pri nedrobnoceličnem raku pljuč (NDRP) in ovrednotiti njun vpliv na izid bolezni.

Utemeljitev: TMC predstavljajo redko populacijo celic, za katero predvidevamo, da je odgovorna za nastanek, napredovanje in razsoj bolezni. EMP je temeljni transdiferencijski celični program, pri raku pa aktivacijo EMP povezujejo z visoko zmožnostjo zasevanja tumorskih celic. Obstajajo dokazi, da lahko aktivacija EMP v tumorskih celicah vpliva na lastnosti TMC. Predvidevajo, da se zasevki razvijejo iz podskupine cirkulirajočih tumorskih celic (CTC), ki je prešla skozi aktivacijo EMP in tako pridobila sposobnosti samoobnavljanja, diferenciacije in iniciacije novih tumorjev, ki so značilne za TMC.

Hipoteze: Zastavili smo si naslednji hipotezi: 1. Obstaja povezava med EMP in TMC, kar smo preverili z določanjem povezav med izražanjem izbranih označevalcev EMP/TMC v primarnem tumorju in krvi, določanjem izražanja označevalcev v CTC in z modelom *in vitro* aktivacije EMP. 2. Izražanje označevalca za EMP/TMC v krvi napove izid bolezni, kar smo preverili z določanjem napovednega pomena izražanja izbranega označevalca za preživetje bolnikov.

Metode: V prvi del raziskave smo vključili 57 bolnikov z operabilnim NDRP, od katerih smo po kirurškem posegu odvzeli in analizirali primarno tumorsko tkivo in kri. V drugi del raziskave smo vključili 96 bolnikov z razsejanim NDRP, ki so prejeli kemoterapijo na osnovi platine. Od njih smo pred pričetkom zdravljenja odvzeli vzorec krvi in ga analizirali. Določanje izražanja označevalcev v tumorskem tkivu je potekalo s kvantitativno verižno reakcijo DNA polimeraze v realnem času (RT-qPCR) (izražanje mRNA), pretočno citometrijo in imunohistokemijo (izražanje proteinov). Določanje izražanja označevalcev v polni krvi in izoliranih CTC je potekalo z RT-qPCR (izražanje mRNA). Proučevali smo izbrane označevalce EMP (*BMI1*, *TWIST1*), TMC (*CD133*, *ALDH1A1*) in epitelnih celic (*EpCAM*, *KRT7*). CTC smo izolirali z imunomagnetno selekcijo na podlagi izražanja *EpCAM*. V *in vitro*

poskusih smo celice raka pljuč izpostavili TGF- β 1 in opazovali, kako aktivacija EMP vpliva na morfologijo, izražanje označevalcev EMP/TMC in invazijsko zmožnost celic.

Rezultati: Naši rezultati so pokazali, da so v primarnem tumorju in krvi bolnikov z operabilnim NDRP na nivoju mRNA izraženi proučevani označevalci EMP, TMC in epitelnih celic ter da obstajajo povezave med njihovim izražanjem v tkivu, v krvi ter med tkivom in krvjo. V tumorju in krvi smo ugotovili pozitivno povezavo med mRNA izražanjem transkripcijskega dejavnika aktivacije EMP *BMI1* in označevalcev TMC *CD133* in *ALDH1A1*, iz česar sklepamo, da je *BMI1* povezan s transformacijo v TMC raka pljuč, ki so prisotne tako v tumorju kot v krvi bolnikov z NDRP. Povezavo med izražanjem *BMI1* in *ALDH1A1* smo potrdili tudi na proteinskem nivoju. Povezav med izražanjem drugega EMP označevalca *TWIST1* in proučevanima označevalcema TMC nismo našli. Izražanje *BMI1* v polni krvi je bilo povezano z izražanjem *BMI1* v tkivu primarnega tumorja, iz česar predvidevamo, da je udeležen pri zasevanju NDRP. V izoliranih CTC bolnikov z razsejanim NDRP smo prav tako potrdili povečano izražanje *BMI1* in *ALDH1A1*, manjši delež bolnikov pa je izražal *CD133* in *TWIST1* v CTC. Z *in vitro* poskusi smo potrdili, da izpostavitve celic TGF- β 1 vpliva na izražanje *BMI1* in sovпада s povečanjem deleža ALDH1-pozitivnih celic ter povečano invazivno zmožnostjo celic. V drugem delu naloge smo dokazali, da ima izražanje *BMI1* v krvi neodvisen napovedni pomen za preživetje brez napredovanja bolezni po zdravljenju s kemoterapijo na osnovi platine in celokupno preživetje bolnikov z razsejanim NDRP.

Zaključki: Označevalci TMC in EMP so prisotni tako v tumorskem tkivu kot v krvi bolnikov z NDRP, kar kaže na njihovo udeležbo pri širjenju bolezni po krvnem obtoku. Izražanje *BMI1* v tumorskem tkivu in krvi je povezano z izražanjem označevalcev TMC, iz česar sklepamo, da sta EMP in TMC pri NDRP povezana. Z *in vitro* poskusom smo potrdili, da aktivacija EMP vpliva na izražanje *BMI1*, sočasno povišanje ALDH1-pozitivne populacije ter zvišane invazijske lastnosti celic. Ugotovili smo tudi, da je izražanje *BMI1* v krvi neodvisen napovedni dejavnik preživetja bolnikov z razsejanim NDRP, ki so zdravljeni s kemoterapijo na osnovi platine. Rezultati dela kažejo na pomembno in povezano vlogo EMP in TMC pri napredovanju raka pljuč.

SUMMARY

Aim: To study the relationship between cancer stem cells (CSCs) and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and to evaluate their impact on patients' treatment outcomes.

Background: CSCs represent a rare population of tumorigenic cells, which is believed to be responsible for tumor initiation, progression and metastasis. EMT, normally activated in the early stages of embryonic development, has been found to play a key role in the process of metastasis of cancer cells in solid tumors and is associated with high invasive potential of tumor cells. Recently it has also been shown that activation of the EMT program can induce stem cell-like properties in tumor cells. It is speculated that the re-seeding of malignant cells and consequent metastases can only develop from a restricted population of circulating tumor cells (CTCs), which has undergone EMT and acquired self-renewing capacities coupled with high migratory potential.

Hypotheses: Two hypotheses were tested: 1. We assumed there is an association between CSCs and EMT in NSCLC, which was tested by determining associations between expression profiles of selected EMT/CSC markers in primary tumors and blood, determining expression of markers in CTCs and by *in vitro* model of EMT. 2. We assumed that the expression of EMT/CSC markers can predict prognosis of NSCLC patients, which was tested by determining the impact of selected marker expression on patients' prognosis.

Methods: In the first part of the study, 57 patients with operable NSCLC were enrolled from which primary tumor tissue and peripheral whole blood was collected and analyzed. In the second part of the study, 96 patients with advanced NSCLC, who were treated with platinum-based chemotherapy, were enrolled and peripheral whole blood was obtained and analyzed. Markers in primary tumor were determined with quantitative real-time polymerase chain reaction. (RT-qPCR) (mRNA expression), flow cytometry and immunohistochemistry (protein expression). Markers in CTCs and whole blood were determined with RT-qPCR. We investigated the expression of selected EMT (*BMI1*, *TWIST1*), CSC (CD133, ALDH1A1) and epithelial (*EpCAM*, *KRT7*) markers. CTCs were isolated with immunomagnetic separation

against epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). In *in vitro* experiments, NSCLC cell lines were first treated with EMT inducer TGF- β 1. After that, changes in cell morphology, expression of CSC markers and invasion capacities were analyzed.

Results: Our results showed mRNA expression of selected EMT, CSC and epithelial markers in primary tumor and also in whole blood of operable NSCLC patients. Associations between expression levels of markers were identified within tumor, within blood and between tumor and blood. A significant association between EMT-inducing transcription factor *BMI1* and CSC markers *CD133* and *ALDH1A1* was identified in primary tumor and also in the blood. With the protein expression analysis we were able to confirm *BMI1* and *ALDH1A1* coexpression in primary tumor. On the other hand, no significant association between EMT marker *TWIST1* and CSC marker expression was found. *BMI1* expression in primary tumor correlated with *BMI1* expression in whole blood. Elevated expression of *BMI1* and *ALDH1A1* was also confirmed in isolated CTCs with advanced NSCLC, whereas few patients expressed *CD133* and *TWIST1*. *In vitro* testing confirmed TGF- β 1 treatment influences *BMI1* expression which coincides with increase in ALDH1-positive cell population and invasion capacities of tumor cells. In the second part of the study we found decreased *BMI1* expression in peripheral whole blood has independent prognostic value for shorter progression-free survival after first-line platinum-based chemotherapy and overall survival of patients with advanced NSCLC.

Conclusions: CSC and EMT markers are expressed in primary tumor and blood of NSCLC patients, suggesting their involvement in the blood-borne dissemination of NSCLC. *BMI1* expression in tumor and blood is associated with the expression of CSC markers, indicating EMT and CSCs in NSCLC are linked. *BMI1* expression in primary tumor is associated with *BMI1* expression in whole blood, potentially indicating its role in NSCLC metastasis. CTCs express EMT and CSC markers, proposing their co-involvement in tumor spread. *In vitro* experiment confirmed that activation of EMT induces CSC marker expression and promotes cell invasion. *BMI1* expression in whole blood is an independent prognostic factor of survival in patients with advanced NSCLC treated with platinum-based chemotherapy and could be used for non-invasive disease monitoring. Our results suggest that EMT and CSCs play an important and associated role in the progression of NSCLC.

1 UVOD

1.1 ZNAČILNOSTI RAKA PLJUČ

Rak pljuč je poglavitni vzrok smrti zaradi raka, od leta 2012 pa tudi najpogosteje diagnosticirana oblika raka v svetovnem merilu; na letni ravni predstavlja več kot 1,8 milijona na novo ugotovljenih primerov (13 % vseh) in 1,6 milijona vseh smrti zaradi raka (Ferlay in sod. 2013). Celokupno 5-letno preživetje bolnikov, ki so oboleli za rakom pljuč v Evropi je po podatkih EURO CARE-5 le okoli 13 % (De Angelis in sod. 2013). V Sloveniji je pljučni rak četrti najpogostejši rak (takoj za kožnim rakom, rakom debelega črevesja ter danke in rakom prostate). Kot kažejo podatki registra raka Republike Slovenije, je leta 2010 za rakom pljuč v Sloveniji zbolelo 1236 ljudi, 853 moških in 383 žensk. V Sloveniji pljučni rak predstavlja poglavitni vzrok smrtnosti zaradi raka, celokupno 5-letno preživetje bolnikov, ki so oboleli za rakom pljuč v Sloveniji, je v letih 2000–2007 znašalo 10,7 %, kar je nižje od povprečja v Evropi (Primc Žakelj in sod. 2013; De Angelis in sod. 2013). Glavni razlog za visoko smrtnost bolnikov z rakom pljuč predstavlja zgodnji razsoj tumorskih celic in primarna ter pridobljena odpornost le-teh na različne oblike sistemskega zdravljenja. Posledice tega so, da sta več kot dve tretjini bolnikov diagnosticirani v lokalno napredovani ali razsejani obliki bolezni, medtem ko se pri skoraj polovici bolnikov, ki jim je bil tumor kirurško odstranjen, bolezen v roku 5 let ponovi, sistemsko zdravljenje pa je v obeh primerih zaradi razvoja odpornosti na terapijo omejeno in zgolj kratkoročno učinkovito (Parkin in sod. 1999).

Rak pljuč se histološko deli na drobnocelični rak pljuč (DRP) in nedrobnocelični rak pljuč (NDRP). DERP je tumor neuroendokrinega izvora, ki predstavlja približno 20 % vseh rakov pljuč. NDRP vključuje 80–85 % vseh primerov raka pljuč in se deli na žlezni rak, ploščatocelični rak in neopredeljeni nedrobnocelični rak (angl. *NSCLC not otherwise specified*; NOS). V slednji skupini so vrste raka, ki ga sestavljajo žlezne, ploščate ali velike celice (Collins in sod. 2007). S 40 % prevalenco je žlezni rak najpogostejša oblika NDRP pri kadilcih in nekadilcih. Razvije se na stiku med alveolom in terminalnim bronhiolom

(Giangreco in sod. 2007). Ploščatocelični rak ima 25 % prevalenco in je povezan s kajenjem. Tipično se pojavlja v bližini velikih dihalnih poti (Giangreco in sod. 2007; Siegel in sod. 2014).

Na odločitev o najprimernejšem zdravljenju NDRP vplivata obseg bolezni in histologija, vse bolj pa postajajo pomembne tudi genetske in molekularne značilnosti tumorskih celic. Za omejeno obliko NDRP (stadiji I do IIIA) je v prvi vrsti priporočeno kirurško zdravljenje, bolnike z razširjeno boleznijo (stadija IIIB in IV) pa se zdravi s kombinacijo sistemske terapije (kemoterapija in/ali tarčno zdravljenje) in obsevanja (Zwitter in sod. 2006). V zadnjem desetletju so pomembna odkritja v razumevanju molekularne biologije raka pljuč privedla k razpoznavi nekaterih pomembnih onkogenov in razvoju različnih načinov tarčnega zdravljenja. Danes je znanih več kot 10 molekularnih označevalcev, s katerimi opredelimo molekularne podvrste NDRP (EGFR, ALK, KRAS, BRAF, HER2, RET, MET, PIK3CA, FGFR1, ROS1, MAP2K1 itd.); večina je značilna za žlezni podtip raka pljuč. Zdravljenje z inhibitorji EGFR in inhibitorji ALK je postalo standardni pristop zdravljenja pri bolnikih z aktivirajočimi mutacijami v *EGFR* in genetskimi prerazporeditvami v *ALK*, številna nova zdravila pa še preizkušajo. Številne randomizirane prospektivne študije so tako že pokazale, da na zdravljenje s tirozin kinaznimi inhibitorji odgovori kar 70 % bolnikov, ki imajo prisotno aktivirajočo mutacijo *EGFR* gena, kar je mediano preživetja povečalo na približno 30 mesecev (Čufer in Knez 2014). Kljub napredkom v tarčnem zdravljenju napredujelega NDRP pa prognoza bolnikov brez prepoznanih onkogenih tarč ostaja slaba, le-ti pa še vedno predstavljajo okoli 60 % vseh primerov NDRP (Li in sod. 2013). Terapija na osnovi platine je trenutno edino standardno zdravljenje napredujelega nemutiranega NDRP; na zdravljenje odgovori 30 % bolnikov, mediana preživetja pa je 10–14 mesecev (Čufer in sod. 2013). Za izboljšanje izidov zdravljenja bolnikov z NDRP je tako nujno nadaljnje boljše razumevanje biologije raka pljuč in odkritje novih molekularnih označevalcev za učinkovitejšo detekcijo in zdravljenje te bolezni z veliko smrtnostjo.

1.2 IDENTIFIKACIJA MATIČNIH CELIC PLJUČ

Normalno pljučno tkivo je sestavljeno iz različnih tipov celic, kot so bazalne sekretorne celice sapnika in sapnic, Clara celice bronhiolov, tip 1 in tip 2 pneumociti alveolov. Vse to so t. i. zreli celični tipi, ki izvirajo iz linijsko usmerjenih pljučnih predniških celic, ki izvirajo iz nediferenciranih multipotentnih matičnih celic pljuč (Otto 2002). Za matične celice je značilna sposobnost samoobnavljanja, sposobnost generacije diferenciranih hčerinskih celic in neomejena podvojevalna sposobnost (Smith 2006). Podobno kot v drugih organih imajo tudi v pljučih matične celice vlogo pri vzdrževanju tkiva in regeneraciji poškodb (Giangreco in sod. 2007). Matične celice pljuč so najprej odkrili na stikih bronhioalveolarnih vodov in jih poimenovali bronhioalveolarne matične celice (angl. *bronchioalveolar stem cells*; BASCs). V celični kulturi so izolirane BASC imele lastnosti matičnih celic, njihova transformirana oblika pa je vodila v nastanek žleznega raka, kar je bil prvi dokaz za to, da bi lahko matične celice predstavljale tarčo pri zdravljenju raka pljuč (Dovey in sod. 2008).

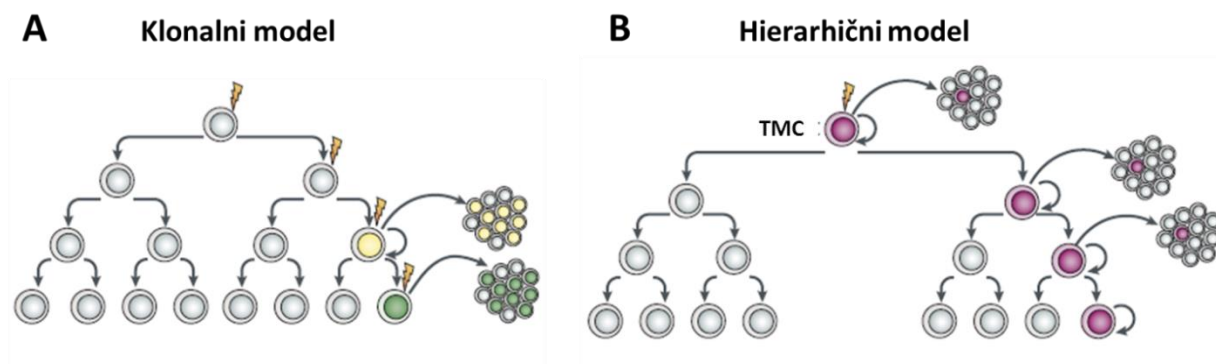
1.3 TUMORSKE MATIČNE CELICE (TMC)

1.3.1 Hipoteza o nastanku TMC

Tumorske matične celice (TMC) so majhna populacija tumorigenih celic s sposobnostjo samoobnavljanja in diferenciacije v različne celične tipe, ki se nahajajo znotraj tumorja (Reya in sod. 2001). Natančen izvor TMC še ni pojasnjen; predvidevajo pa, da se razvijejo iz onkogeno transformiranih tkivnih matičnih celic (Pardal in sod. 2003). Ta teorija je podprta z dejstvom, da je potrebno večje število mutacij, da celica spremeni svoj značaj v malignega in s tem povezano omejeno verjetnostjo, da se nakopiči dovolj veliko število onkogenih mutacij v že diferenciranih celicah. Normalne tkivne matične celice in TMC so podobne tudi v nekaterih drugih lastnostih, kot so izražanje embrionalnih markerjev in aktivnost reverzne transkriptaze (Sullivan in sod. 2010a). Prav tako je za oba tipa celic značilna odpornost na različna zdravila; predvidevajo, da je ta lastnost povezana z izražanjem transmembranskih proteinov za multiplo

odpornost na zdravila (angl. *multiple drug resistance*; MDR) (Gottesman in sod. 2002; Knez in sod. 2012), učinkovitostjo DNA popravljajlih mehanizmov (Zhou in sod. 2001; Gottesman in sod. 2002) in počasnim napredovanjem celičnega cikla v celicah (Bao in sod. 2006; Dembinski in Krauss 2009). Druga teorija nastanka TMC predvideva, da TMC nastanejo iz diferenciranih celic, ki so z mutacijami ponovno pridobile sposobnost samoobnavljanja in dediferenciacije v predniškimi podobne celice (Visvader in Lindeman 2008).

Podobnosti med normalnimi tkivnimi matičnimi celicami in TMC so vodile v razvoj hierarhičnega modela nastanka raka, ki je v zadnjih 10 letih nadomestil prej uveljavljeni klonalni (stohastični) model. Klonalni model je predvideval, da se rak lahko razvije iz katere koli celice, ki se tumorsko spremeni, pri čemer ima vsaka tako nastala tumorska celica sposobnost, da sproži rast novega tumorja. Hierarhičen model pa predvideva, da tumorji izvirajo iz tako imenovanih TMC, majhne subpopulacije celic, ki je odgovorna za iniciacijo, napredovanje in ponovitev tumorjev (Reya in sod. 2001; Visvader in Lindeman 2008) (Slika 1). Teorijo o TMC so najprej potrdili na primeru akutne mieloidne levkemije (Lapidot in sod. 1994; Bonnet in Dick 1997), kasneje pa tudi na raku dojke, možganov in drugih solidnih tumorjih, vključno z rakom pljuč (Ponti in sod. 2005; Eramo in sod. 2008; Singh in sod. 2003; Collins in sod. 2005; Ricci-Vitiani in sod. 2007). Ker so tumorji povečini klonalnega izvora, morajo imeti TMC sposobnost nastanka fenotipsko raznolikih predniških celic z različnimi podvojevalnimi sposobnostmi (Reya in sod. 2001). Posledica te zmožnosti je tako imenovana tumorska heterogenost, ki se odraža v tumorskih regijah z različnimi stopnjami proliferacije, diferenciacije, invazivnosti in ožiljenosti (Hanahan in Weinberg 2011; Visvader in Lindeman 2008). V skladu s to hipotezo so zasevki in odpornost na terapijo direktna posledica TMC. Ta razlaga pojasni, zakaj se odgovor na zdravljenje prvenstveno odraža v delnem ali popolnem zmanjšanju tumorja, vendar se zaradi neprizadetosti redkih TMC bolezni ponovi in vpliva na dolgoročni izid bolezni (Rasheed in sod. 2011). V skladu s tem je dolgoročni terapevtski cilj popolna odstranitev TMC iz telesa, za kar je nujna identifikacija novih, za TMC značilnih molekularnih onačevalcev, ki bodo omogočili razvoj terapevtskih strategij za učinkovitejše zdravljenje raka.



Slika 1: Klonalni in hierarhični model nastanka raka

A) Klonalni model predvideva, da ima vsaka tumorska celica enako zmožnost razvoja novih tumorjev B) Hierarhični model predvideva, da tumorji nastanejo iz tumorskih matičnih celic, ki predstavljajo manjšino v tumorju, in so edine celice, ki imajo tumorigene zmožnosti (prirejeno po: Visvader in Lindeman 2008).

1.3.2 Označevalci TMC raka pljuč

TMC raka pljuč so bile eksperimentalno definirane na različne načine: kot celice, ki izločijo barvilo Hoechst 33342, so odporne na toksične substance, izražajo površinski označevalec CD133, imajo encimsko aktivnost aldehidne dehidrogenaze (ALDH) ali izražajo površinski označevalec CD44 (Preglednica 1).

Ho in sod. (2007) so iz šestih celičnih linij raka pljuč prvi izolirali subpopulacijo celic (t. i. stranska populacija, SP) glede na njihovo zmožnost, da izločijo barvilo Hoechst 33342. SP-celice so imele sposobnost iniciacije tumorjev, visok invazivni potencial in so bile odporne na kemoterapevtike. V primerjavi z nestransko populacijo celic je bilo za SP-celice značilno povišano izražanje membranskega transportnega proteina ABCG2 in povišana telomerazna aktivnost. Kasneje je bilo pokazano, da SP-subpopulacija iz celičnih linij DRP predstavlja manj kot 1 % vseh tumorskih celic, izraža označevalce matičnih celic, je odporna na zdravila in sproži nastanek tumorskih ksenograftov (Salcido in sod. 2010).

Preglednica 1: Označevalci tumorskih matičnih celic pri raku pljuč

Označevalec	Opis	Referenca
Hoechst SP	Celice, ki izločijo barvilo Hoechst, imenovane stranska populacija (SP) Po tej metodi izolirane celice imajo lastnosti matičnih celic v različnih tumorskih oblikah. Aktivnost v celicah pogojena z izražanjem membranskega transportnega proteina ABCG2, ki pogojuje rezistenco na zdravila (Zhou in sod. 2001)	(Wu in Alman 2008)
CD133/PROM1	Membranski površinski glikoprotein Značilen za matične celice različnih tkiv in njihovih neoplazem Vloga v organizaciji topologije plazemske membrane	(Mizrak in sod. 2008)
ALDH1	Spada v družino ubikvitinskih aldehydnih dehidrogenaz Citosolni encim, ki je vpleten v celično detoksifikacijo, diferenciacijo in rezistenco na zdravila Oksidira celične aldehyde (retinol v retinojsko kislino) in prispeva k zgodnji diferenciaciji matičnih celic.	(Jackson in sod. 2011)
CD44	Membranski glikoprotein s številnimi izoformami Uravnava remodeliranje tkiva, celično migracijo in adhezijo celic na zunajcelični matriks. Glavni receptor za hialuronan, ogljikohidratni polimer ekstracelularnega matriksa	(Stern 2009)

TMC je mogoče izolirati tudi kot celice, ki so odporne na različne toksične učinkovine (Reya in sod. 2001). S tem pristopom so pri celični liniji H460 uspešno izolirali TMC s povečano odpornostjo na kemoterapevtike doksorubicin, cisplatin ali etopozid. Odporne celice so imele sposobnosti samoobnavljanja, diferenciacije in visok tumorigen potencial. Večina celic je bila SP, izražale so CD133 in označevalce embrionalnih matičnih celic (Levina in sod. 2008). Ugotovili so tudi, da izpostavitve celic cisplatinu selekcioniira na več učinkovin odporne CD133-pozitivne celice iz celičnih linij raka pljuč H460 in H661 (Liu in sod. 2013). Podobno je bilo pokazano, da izpostavitve celične linije HCC827 tirozin kinaznemu inhibitorju gefitinibu vpliva na lastnosti, ki so povezane s TMC: sposobnost tvorbe tumorskih sfer, povečevanje deleža SP-celic in povišano izražanje ALDH1A1 (Shien in sod. 2013).

Najbolj razširjen pristop za izolacijo TMC pa predstavlja uporaba molekularnih označevalcev TMC. Eramo in sod. (2008) so najprej uspešno izolirali CD133-pozitivne TMC iz 19

primarnih humanih vzorcev NDRP in DRP. Izolirane CD133-pozitivne celice so imele sposobnost neomejenega podvojevanja v obliki tumorskih sfer, so bile odporne na kemoterapevtike in so po presaditvi v testno žival tvorile nove tumorje. Sočasno je Bertolini in sod. (2009) dokazal podobno za CD133-pozitivne/EpCAM-pozitivne celice izolirane iz 60 primarnih humanih vzorcev NDRP. Druga študija je pokazala, da imajo CD133-pozitivne predniške celice ključno vlogo pri angiogenezi tumorjev NDRP (Hilbe in sod. 2004). Ugotovili so tudi, da ima embrionalni transkripcijski dejavnik Oct4 ključno vlogo za vzdrževanje matičnih lastnosti CD133-pozitivnih celic (Chen in sod. 2008). Moreb in sod. (2007) so na celičnih linijah pljučnega raka z uporabo komercialno dostopnega testa Aldefluor prvi uspešno izmerili encimsko aktivnost ALDH (Moreb in sod. 2007). Kasneje je bil test Aldefluor v kombinaciji s fluorescenco aktiviranim celičnim sortiranjem (FACS) uporabljen za izolacijo ALDH-pozitivnih celic iz humanih celičnih linij raka pljuč. Izolirane celice so imele sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije, izražale so CD133 in bile odporne na različne toksične učinkovine. Po transplantaciji v testne živali so se iz njih razvili tumorji, ki so ohranili heterogenost izvirnega tumorskega tkiva (Jiang in sod. 2009). Neodvisno sta dve drugi raziskovalni skupini z uporabo celičnih linij in vzorcev primarnih tumorjev prišli do podobnih spoznanj (Ucar in sod. 2009; Sullivan in sod. 2010b). Tudi za CD44 so pokazali, da je označevalec TMC raka pljuč. CD44-pozitivne celice so imele visoko tumorigeno sposobnost tako *in vitro* kot *in vivo*, izražale so označevalce embrionalnih matičnih celic in bile odporne na citostatik cisplatin (Leung in sod. 2010). Nedavna študija je pokazala, da CD133-pozitivne, ALDH-pozitivne in SP-celice predstavljajo fenotipsko različne subpopulacije celic ter da izolacija TMC glede na določen označevalec ne korelira vedno s TMC, ki so bile izolirane z drugim označevalcem (Akunuru in sod. 2012).

1.3.3 Napovedni pomen označevalcev TMC v tumorskem tkivu NDRP

Izražanje CD133 v tumorskem tkivu ima neodvisen napovedni pomen za krajše preživetje bolnikov z gliomom in rakom jeter (Zeppernick in sod. 2008; Song in sod. 2008), medtem ko je pri raku pljuč le ena (Woo in sod. 2010) izmed več raziskav (Hilbe in sod. 2004; Bertolini in

sod. 2009; Salnikov in sod. 2010; Woo in sod. 2010; Sullivan in sod. 2010b; Li in sod. 2011; Herpel in sod. 2011; Shien in sod. 2012) uspela dokazati (neodvisno) povezavo med povečanim proteinskim izražanjem CD133 in krajšim preživetjem brez bolezni (angl. *disease-free survival*; DFS). Podobno so pokazali, da je povišano izražanje CD133 mRNA povezano s krajšim preživetjem brez bolezni bolnikov z žleznim rakom pljuč (Cortes-Dericks in sod. 2012). Znano je tudi, da je izražanje CD133 povezano z izražanjem proteinov za multiplo odpornost (Salnikov in sod. 2010), medtem ko sočasno izražanje CD133 in ABCG2 proteinov napoveduje krajše preživetje brez ponovitve bolezni (angl. *recurrence-free survival*; RFS) bolnikov z začetnim stadijem NDRP (Li in sod. 2011).

Povišano izražanje ALDH1 je povezano s krajšim preživetjem bolnikov z rakom dojke in prostate (Li in sod. 2010; Ginestier in sod. 2007) ter z daljšim preživetjem bolnic z rakom jajčnikov (Chang in sod. 2009). Pri raku pljuč povišano proteinsko izražanje ALDH1A1 je povezano s krajšim celokupnim preživetjem (angl. *overall survival*; OS) (Jiang in sod. 2009; Sullivan in sod. 2010b; Alamgeer in sod. 2013) in je neodvisni napovedni dejavnik krajšega preživetja brez bolezni (angl. *disease-free survival*, DFS), za rak specifičnega preživetja (angl. *cancer-specific survival*; CSS) (Jiang in sod. 2009) ter celokupnega preživetja (Alamgeer in sod. 2013) bolnikov z operabilnim NDRP. Po drugi strani rezultati nekaterih študij kažejo na to, da je povišano izražanje ALDH1A1 v tumorju povezano z ugodno prognozo bolnikov z NDRP (Dimou in sod. 2012; Sung in sod. 2015).

Znižano izražanje CD44 v tumorskem tkivu je povezano s krajšim preživetjem bolnikov z glioblastomom multiforme in rakom dojke (Tempfer in sod. 1996; Wei in sod. 2010). Pri raku pljuč nizko izražanje CD44 korelira s krajšim celokupnim preživetjem bolnikov z žleznim rakom (Sung in sod. 2015), povezava pa ni statistično značilna za bolnike s ploščatoceličnim rakom (Leung in sod. 2010) (Preglednica 2).

Preglednica 2: Napovedni pomen označevalcev TMC v primarnem tumorju

Biomarker	Tip	Razširjenost bolezni	Tip vzorca (n)	Metoda določanja (mejna vrednost)	Terapija (% bolnikov)	DFS/PFS ^a /RFS ^b		OS/CSS ^c		Referenca
						UV	MV	UV	MV	
CD133	NDRP	operabilni	zamrznjen (79)	IHK (0,7 %)	KRG (100 %)			NS		Hilbe in sod. (2004)
CD133	NDRP	razsejani	FFPE (42)	IHK (n.p.)	KT (100 %)	NS ^a				Bertolini in sod. (2009)
CD133	NDRP	operabilni	FFPE (88)	IHK (> 10 %)	KRG (69 %) KRG+KT (14 %) KRG+RT (17 %)			NS		Salnikov in sod. (2010)
CD133	žlezni	operabilni	FFPE (177)	IHK (>17.5 %)	KRG (100 %)	P=0,004	P=0,01			Woo in sod. (2010)
ALDH1	NDRP	operabilni	FFPE (300)	IHK (>10 %)	n.p.		P=0,016	P=0,009 P=0,006 ^c	P=0,016 ^c	Jiang in sod. (2009)
CD133 ALDH1A1 ALDH3A1	NDRP	n.p.	FFPE (> 200)	IHK (n.p.) IHK (n.p.) IHK (n.p.)	n.p.			NS P=0,025 NS		Sullivan in sod. (2010b)
CD133 ALDH1A1	NDRP	operabilni	FFPE (205)	IHK (>10 %) IHK (>5 %)	KRG (100 %)	NS ^b P=0,005 ^b	P=0,025 ^b	NS P=0,027	P=0,039 P=0,017	Alamgeer in sod. (2013)
CD44	žlezni plošča- tocelični	operabilni	FFPE (96) FFPE (27)	IHK (n.p.) IHK (n.p.)	n.p.	NS ^a NS ^a		P=0,015 NS		Leung in sod. (2010)

Biomarker	Tip	Razširjenost bolezni	Tip vzorca (n)	Metoda določanja (mejna vrednost)	Terapija (% bolnikov)	DFS/PFS ^a /RFS ^b		OS/CSS ^c		Referenca
						UV	MV	UV	MV	
CD133 ABCG2 CD133+ABCG2	NDRP	operabilni	FFPE (145)	IHK (> 1 %) IHK (> 10 %)	KRG (100 %)	NS ^b NS ^b				Li in sod. (2011)
							<i>P</i> =0,015 ^b			
CD133 ABCG2	NDRP	operabilni	FFPE (133)	IHK (> 0 %) IHK (> 0 %)	n.p.	NS NS	NS NS	NS NS	NS NS	Herpel in sod. (2011)
CD133 ALDH1 ABCG2 CD133/ALDH1	NDRP	lokalno napredovali	FFPE (30)	IHK (> 1 %) IHK (> 10 %) IHK (> 10 %)	indukcijska KRT+ KRG (100 %)	NS NS NS <i>P</i> =0,05	NS NS NS	NS NS NS <i>P</i> =0,042	NS NS NS <i>P</i> =0,047	Shien in sod. (2012)
CD133 ALDH	žlezni	operabilni	RNA later (64)	RT-qPCR (n.p.)	KRG (100 %)	<i>P</i> =0,033 NS				Cortes-Dericks in sod. (2012)
ALDH1A1 CD44	NDRP	operabilni	FFPE (97)	IHK (ocena 1- 4, ≥3)	KRG (100 %)	NS <i>P</i> =0,000			<i>P</i> =0,021 <i>P</i> =0,024	Sung in sod. (2015)

DFS: preživetje brez bolezni; PFS: preživetje brez napredovanja bolezni; RFS: preživetje brez ponovitve bolezni; OS: celokupno preživetje; CSS: za rak specifično preživetje; UV: univariatna analiza; MV: multivariatna analiza; NDRP: nedrobnocelični rak pljuč; IHK: imunohistokemija; NS: statistično neznačilno; n.p.: ni podatka; FFPE: v formalinu fiksirano in v parafin vklopljeno tkivo; KRG: kirurgija; KT: kemoterapija; RT: radioterapija; KRT: kemoradioterapija; RT-qPCR: kvantitativna verižna reakcija DNA polimeraze v realnem času

^a Nanaša se na PFS.

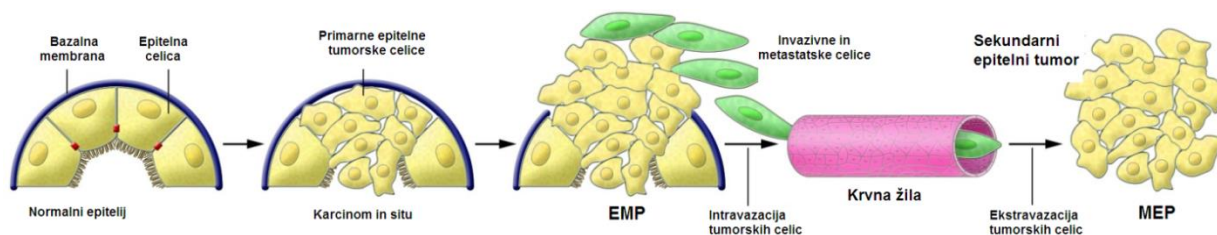
^b Nanaša se na RFS.

^c Nanaša se na CSS.

1.4 EPITELNO-MEZENHIMSKI PREHOD (EMP)

Epitelno-mezenhimski prehod (EMP) in obratni mezenhimsko-epitelni prehod (MEP) sta evolucijsko visoko ohranjena temeljna razvojna programa. Za EMP je značilna izguba apiko-bazolateralne polarnosti epitelnih celic, razkroj medceličnih stikov in pridobitev mezenhimske značilnosti, ki vključujejo povečano migracijsko sposobnost, invazivne lastnosti, povišano odpornost na apoptozo in povečano nastajanje komponent ekstracelularnega matriksa. MEP je obraten proces, ki vključuje prehod iz mobilnih mezenhimske celice z vretenasto morfologijo v planarno celično polarnost, ki je značilna za epitelna tkiva (Thiery in sod. 2009).

EMP glede na funkcionalne posledice delimo na tri tipe: EMP tipa I je povezan z implantacijo, nastankom somatskih plasti (embriogenezo) in razvojem organov. Njegova aktivacija omogoča celicam migracijo na oddaljena mesta v razvijajočem se zarodku, kjer z MEP sodelujejo pri razvoju epitelnih organov. EMP tipa II je povezan z regeneracijo tkiva in fibrozo organov. Ta oblika EMP je povezana z vnetjem, kar vpliva na nastanek fibroblastov, ki sodelujejo pri regeneraciji poškodovanih organov. Če je zaradi kroničnega vnetja aktivacija EMP podaljšana, lahko to vodi v nastanek fibroz, ki sčasoma uničijo organ. EMP tipa III je povezan z napredovanjem raka in zasevanjem. Tumorske celice pod vplivom EMP invadirajo bližnjo okolico, od koder se širijo naprej po telesu in povzročijo nastanek zasevkov (Kalluri in Weinberg 2009). Napredovanje od normalnega epitelija do invazivnega raka poteka v več stopnjah: v prvi stopnji epitelne tumorske celice izgubijo polarnost in se ločijo od bazalne membrane. Sestava bazalne membrane se spremeni, kar vpliva na oslabitev povezav med celico in zunajceličnim matriksom (ZCM) in aktivira različne signalne poti. V naslednji stopnji pride do aktivacije EMP in angiogenega preklopa, kar omogoča maligno tumorsko rast. Od tu naprej EMP omogoča fizično diseminacijo celic iz primarnega tumorja, njihovo širjenje po krvnem obtoku in ponovno pritrditev na oddaljenih mestih, kjer se po aktivaciji MEP povrnejo nazaj v epitelni fenotip in tvorijo mikro in makro zasevke (Slika 2).



Slika 2: Pomen EMP pri širjenju raka

Transformacija iz normalnega epitelnega tkiva do invazivnega raka poteka v več stopnjah. Stopnja karcinoma *in situ* vključuje izgubo polarnosti in pritrjenosti celic na bazalno membrano. Spremeni se tudi sestava bazalne membrane, kar vpliva na celične interakcije z zunajceličnim matriksom in medcelično signalizacijo. V naslednjem koraku sledi EMP in angiogeni preklap, kar omogoči maligno fazo rasti tumorja. Napredovanje do razsejane bolezni še naprej vključuje EMP, kar omogoči rakavim celicam vstop v krvni obtok in izstop iz njega na oddaljenem mestu, kjer se iz njih razvijejo mikro in makro zasevki, pri čemer sodeluje MEP s celično reverzijo v epitelni značaj (prirejeno po: Kalluri in sod. 2009).

1.4.1 Molekularne značilnosti EMP

Pri aktivaciji EMP so soudeleženi številni molekularni procesi, ki vključujejo aktivacijo transkripcijskih dejavnikov, spremembe v izražanju površinskih molekul na celicah, reorganizacijo in spremembe v izražanju proteinov citoskeleta, povečano aktivnost encimov za razgradnjo ZCM in spremembe v izražanju specifičnih mikroRNA (Preglednica 3). Na molekularnem nivoju je glavna značilnost EMP izguba izražanja E-kadherina na površini celic, kar povzroči destabilizacijo adherentnih medceličnih stikov. Ta sprememba sovpada z znižanim izražanjem drugih epitelnih označevalcev, kot so EpCAM (CD326) in citokeratinov, in s povišanim izražanjem mezenhimskega označevalcev, kot so N-kadherin, vimentin in fibronektin. Za EMP je značilna tudi povišana aktivnost metaloproteinaz matriksa, kar se povezuje z invazivnim značajem celic. Spremembe v genski ekspresiji, ki vodijo v spremembo iz epitelnega v mezenhimskega fenotip, uravnavajo transkripcijski dejavniki, med katerimi so najpomembnejši TWIST, Snail in ZEB (angl. *zinc-finger E-box binding*), vsi delujejo kot represorji *CDH1* gena, ki kodira E-kadherin. Njihovo izražanje je aktivirano zelo zgodaj v EMP, kar kaže na njihovo ključno vlogo pri indukciji in napredovanju EMP. Znano je, da

transkripcijska dejavnika Snail in ZEB zavirata izražanje *CDH1* direktno, TWIST pa nanj deluje indirektno (Thiery in sod. 2009; Lamouille in sod. 2014).

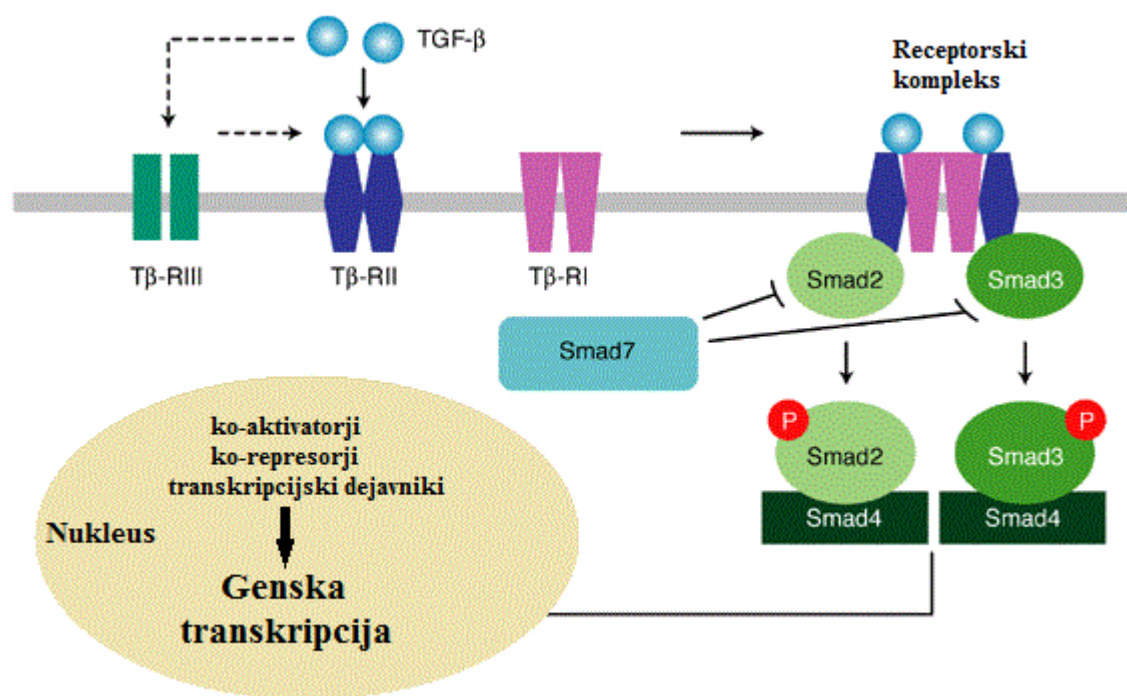
Preglednica 3: Označevalci EMP

Oslabljeni označevalci	Pridobljeni označevalci
<i>Površinske molekule</i>	
E-kadherin	N-kadherin
ZO-1	$\alpha 5 \beta 1$ -integrin
EpCAM	Sindekan-1
Dezmoplakin	
MUC1	
<i>Označevalci citoskeleta</i>	
Citokeratini	FSP-1
	Vimentin
	β -katenin
	α -SMA
<i>Proteini zunajceličnega matriksa</i>	
$\alpha 1$ (IV)-kolagen	Fibronektin
Laminin	Laminin 5
<i>Transkripcijski dejavniki</i>	
	Snail 1, Snail 2
	ZEB1
	TWIST1
	BMI1
<i>mikroRNA</i>	
Družina miR-200	miR-21

1.4.2 Signalne poti EMP

EMP uravnavajo številne signalne poti, kot so transformirajoči rastni dejavnik- β (TGF- β), Wnt- β -katenin, Notch, Hedgehog in receptorske tirozinske kinaze (Gonzalez in Medici 2014). Med njimi je najboljše proučevana signalna pot TGF- β (Slika 3). Vezava TGF- β na receptor sproži aktivacijo Smad2 in Smad3 proteinov skozi fosforilacijo TGF- β receptorja. Fosforilirana Smad2 in Smad3 se povežeta s Smad4, trimerni kompleks pa se nato translocira v jedro, kjer sodeluje z DNA transkripcijskimi dejavniki pri uravnavanju izražanja TGF- β

tarčnih genov Smad (Fuxe in sod. 2010). Ker imajo Smad transkripcijski dejavniki majhno afiniteto za vezavo na DNA, je za večjo afiniteto in specifičnost uravnavanja tarčnih genov potrebna interakcija s transkripcijskimi kodejavniki, kot sta Snail in ZEB. TGF- β receptor, Smad3 in Smad4 so enako pomembni za TGF- β -induciran EMP, saj inhibicija izražanja katerega koli izmed omenjenih genov inhibira EMP (Valcourt 2005). TGF- β pri aktivaciji EMP sodeluje tudi z drugimi signalnimi potmi, kot so Wnt (Shin in sod. 2010; Eger in sod. 2004), Hedgehog (Karhadkar in sod. 2004), Notch (Timmerman in sod. 2004) in Ras-MAPK (Xie in sod. 2004).



Slika 3: TGF- β signalna pot

TGF- β se veže na receptor T β -RII, vezava je ojačana ob prisotnosti T β -RI. T β -RII se poveže z T β -RI, kar sproži aktivacijo Smad2 in Smad3 skozi fosforilizacijo. Ta proces inhibira Smad7. Fosforilirana Smad2 in Smad3 se povežeta s Smad4, trimerni kompleks pa se nato translocira v jedro, kjer sodeluje z DNA transkripcijskimi dejavniki pri uravnavanju izražanja TGF- β tarčnih genov (prirejeno po: Hui in Friedman, 2003).

1.4.3 Povezava med EMP in TMC

Razultati študij pri različnih rakih kažejo na to, da je aktivacija EMP v celicah povezana s pridobitvijo lastnosti, ki spominjajo na TMC. Mani in sod. (2008) so na celičnih linijah raka dojke prvi pokazali, da indukcija EMP s čezmernim izražanjem induktorjev EMP Snail, TWIST ali izpostavitve celic TGF- β vpliva na povečevanje deleža CD44-pozitivnih/CD24-negativnih TMC. Na ta način inducirane celice so imele sposobnost tvorjenja mamosfer in so imele značilnosti mezenhimske matične celice. Kasnejše študije so pojasnile tudi molekularno povezavo med EMP in TMC pri različnih rakih. Na celicah kolorektalnega raka in raka pankreasa so ugotovili, da transkripcijski represor EMP ZEB1 zavira izražanje miR-200 in miR-203, mikroRNA, ki delujeta kot zaviralca dejavnikov matičnih celic Sox2 in Klf4, ter tako povezuje EMP in uravnavanje lastnosti matičnih celic (Wellner in sod. 2009). Kasnejši rezultati so pokazali, da v matičnih celicah izražen polikomb represorski gen BMI1 (angl. *B-lymphoma Moloney murine leukemia virus insertion region*) predstavlja direktno tarčo transkripcijskega dejavnika TWIST1. Le-ta po vezavi na E-box mesto prvega introna gena *BMI1* regulira njegovo izražanje, zaradi česar sta tako BMI1 kot TWIST1 vzajemnega pomena za aktivacijo EMP in iniciacijo matičnih lastnosti v tumorskih celicah raka glave in vratu (Yang in sod. 2010).

Rezultati raziskav pri raku pljuč kažejo na to, da *in vitro* aktivacija EMP vpliva na povečano izražanje označevalcev TMC v celični kulturi, pri čemer je bilo uporabljenih več različnih pristopov. Najpogostje se za indukcijo EMP uporablja izpostavitve celic TGF- β (Tirino in sod. 2013; Pirozzi in sod. 2011; Akunuru in sod. 2012). Znano je, da je aktivacija EMP povezana s povečano odpornostjo na toksične učinkovine, zato se za aktivacijo EMP v celičnih kulturah uporablja tudi izpostavitve celic citostatikom (Wang in sod. 2014) ali tirozin kinaznim inhibitorjem (Shien in sod. 2013) in obsevanje (Gomez-Casal in sod. 2013). Vsi omenjeni pristopi so pokazali podobno: aktivacija EMP vpliva na spremembo morfologije v mezenhimsko fibroblastno, povišano izražanje mezenhimske označevalcev in znižano izražanje epitelne označevalcev, sočasno pa pride do povišanega izražanja označevalcev

TMC in embrionalnih transkripcijskih dejavnikov, kot so Oct4, Nanog in Sox2 (Pirozzi in sod. 2011; Akunuru in sod. 2012; Tirino in sod. 2009; Wang in sod. 2013; Shien in sod. 2013; Gomez-Casal in sod. 2013). Funkcionalni testi so pokazali, da EMP vpliva na povečano nastajanje tumorskih sfer in inducira tumor inciatijske sposobnosti po transplantaciji celic v testne živali (Pirozzi in sod. 2011). Zanimivo je, da se različne populacije TMC različno odzivajo na indukcijo EMP; EMP spodbuja nastajanje CD133-pozitivnih in ALDH-pozitivnih TMC, medtem ko zavira nastajanje SP-celic (Akunuru in sod. 2012). Povezava med EMP in TMC na kliničnih vzorcih raka pljuč še ni bila neposredno dokazana, molekularna povezava med procesoma pa je slabo raziskana.

1.4.3.1 BMI1

BMI1 spada v skupino polikomb (angl. *polycomb group*; PcG) proteinov, ki kot transkripcijski represorji uravnavajo linijske usmeritve celic med razvojem in diferenciacijo. Mehanistično delujejo v okviru multimernih polikomb represorskih kompleksov (PRK) skozi kombinacijo postranslacijskih modifikacij in strukturnih sprememb v strukturi kromatina, kar se odraža v epigenetskem utišanju genov. Vloga PRK1 je vzdrževanje represije, medtem ko PRK2 direktno zavira izražanje genov. Spremenjeno izražanje PcG proteinov je povezano s spremembami v celičnih delitvah in onkogenezo (Di Croce in Helin 2013). BMI1 je bil odkrit kot v sodelovanju s c-myc delujoči onkogen za nastanek limfomov pri miših in se uvršča v skupino PRK1 (Haupt in sod. 1991; van Lohuizen in sod. 1991). BMI1 sam po sebi nima encimske aktivnosti, ampak deluje kot zaviralec transkripcije po deregulaciji p16Ink4a in p14Arf tumor supresorskih proteinov, ki imajo vlogo pri kontrolnih poteh pRb in p53, kar povezuje transkripcijsko represijo s celičnim ciklom in senescenco (Jacobs in sod. 1999). Onkogeni potencial BMI1 se kaže tudi v zmožnosti aktivacije izražanja humane telomerazne reverzne transkriptaze (hTERT) in indukciji aktivnosti telomeraze, kar vpliva na podaljšano podvojevalno sposobnost celic (Dimri in sod. 2002). Znano je, da je BMI1 soudeležen pri regulaciji samoobnavljanja matičnih celic v različnih virih normalnih (Dovey in sod. 2008;

Zencak in sod. 2005; Lukacs in sod. 2010; Abdouh in sod. 2009; Liu in sod. 2006) in rakavih celic (Abdouh in sod. 2009; Lukacs in sod. 2010; Liu in sod. 2006).

1.4.4 Napovedni pomen označevalcev EMP v tumorskem tkivu NDRP

Nizko izražanje E-kadherina je povezano s krajšim preživetjem bolnikov s kolorektalnim rakom in rakom dojke (Mohri 1997; Rakha in sod. 2005). Preklop v izražanju iz E-kadherina v N-kadherin ima neodvisen napovedni pomen za krajše preživetje bolnikov z rakom prostate (Gravdal in sod. 2007). Rezultati treh študij pri NDRP so pokazali, da je nizko izražanje E-kadherina v tumorju povezano s krajšim preživetjem bolnikov (Zhang in sod. 2013; Al-Saad in sod. 2008; Sulzer in sod. 1998), medtem ko rezultat ene študije te povezave ni potrdil (Kase in sod. 2000). Visoko izražanje N-kadherina je povezano s krajšim preživetjem bolnikov z melanomom (Kreizenbeck in sod. 2008) in ploščatoceličnim rakom ustne votline (Di Domenico in sod. 2011). Podobno je tudi pri raku pljuč visoko izražanje N-kadherina povezano s krajšim celokupnim preživetjem bolnikov z NDRP (Hui in sod. 2013).

Visoko izražanje Vimentina je povezano s krajšim preživetjem bolnikov z rakom želodca in rakom dojke (Otsuki in sod. 2011; Yamashita in sod. 2007). Podobno tudi pri raku pljuč visoko izražanje Vimentina napoveduje slabšo prognozo bolnikov z NDRP (Al-Saad in sod. 2008; Zhang in sod. 2013). Visoko izražanje β -katenina v tumorju je napovedni dejavnik krajšega preživetja bolnikov z rakom dojke (Lin in sod. 2000), jeter (Endo in sod. 2000) in daljše preživetje bolnikov z rakom požiralnika (Krishnadath in sod. 1997). Podatki pri raku pljuč kažejo, da je visoko izražanje β -katenina povezano z ugodno prognozo bolnikov z NDRP (Hommura in sod. 2002; Kase in sod. 2000).

Visoko izražanje transkripcijskega dejavnika TWIST1 v tumorskem tkivu različnih rakov je povezano z neugodno prognozo (Wushou in sod. 2014). Podobno je tudi pri NDRP visoko izražanje TWIST1 povezano s krajšim celokupnim preživetjem bolnikov (Hui in sod. 2013; Hung in sod. 2009; Jiang in sod. 2012). Tudi izražanje dejavnikov Snail in Slug je v povezano

z neugodno prognozo (Jiang in sod. 2012; Hung in sod. 2009), sočasno povišano izražanje HIF-1 α /TWIST1/Snail ali TWIST1/Slug/Foxc2 pa je neodvisen napovedni dejavnik krajšega preživetja bolnikov z rakom pljuč (Hung in sod. 2009; Jiang in sod. 2012). Visoko izražanje BMI1 je povezano s slabšo prognozo bolnikov z levkemijo (Mohty in sod. 2007), rakom želodca (Liu in sod. 2008) in jeter (Wang in sod. 2008) ter z ugodno prognozo bolnikov z rakom dojke (Choi in sod. 2009; Nalwoga in sod. 2010; Pietersen in sod. 2008) in glioblastomom (Cenci in sod. 2012). Podatki o kliničnemu pomenu BMI1 pri raku pljuč so omejeni; povezava med izražanjem BMI1 in celokupnim preživetjem bolnikov z NDRP pa še ni bila ugotovljena (Vrzalikova in sod. 2008; Kikuchi in sod. 2010; Vonlanthen in sod. 2001). Vrzalikova in sod. (2008) so sicer uspeli dokazati povezavo med izražanjem BMI1 v tumorju in krajšim preživetjem brez bolezni, vendar je bila ta povezava statistično značilna samo pri majhni podskupini bolnikov s stadijem bolezni I/II, ki so prejeli adjuvantno kemoterapijo (Preglednica 4).

Preglednica 4: Napovedni pomen označevalcev EMP v primarnem tumorju

Biomarker	Tip	Razširjenost bolezni	Vrsta vzorca (n)	Metoda določanja (mejna vrednost)	Terapija (% bolnikov)	DFS/RFS ^a		OS/CSS ^b		Referenca
						UV	MV	UV	MV	
E-kadherin	NDRP	operabilni	FFPE (111)	IHK (>10 %)	KRG (100 %)			P=0,006		Sulzer in sod. (1998)
E-kadherin β-katenin	NDRP	operabilni	FFPE (331)	IHK (≥70 %) IHK (≥70 %)	KRG (100 %)			NS P=0,0001	P=0,0001	Kase in sod. (2000)
E-kadherin Vimentin	Plošča- tocelični	operabilni	FFPE (204)	IHK (ocena 0, 1- 4, >4)	KRG (100 %)	P<0,001 P=0,006	P=0,003 NS	P<0,001 P=0,01	P=0,013 NS	Zhang in sod. (2013)
β-katenin	NDRP	operabilni	FFPE (217)	IHK (ocena 9)	KRG (100 %)			P=0,04	P=0,007	Hommura in sod. (2002)
E-kadherin Vimentin	NDRP	operabilni	FFPE (335)	IHK (ocena≥2)	KRG (100 %)			P=0,03 ^b P=0,001 ^b	NS P=0,005 ^b	Al-Saad in sod. (2008)
TWIST N-kadherin	NDRP	operabilni	FFPE (120)	IHK (ocena≥++) IHK (ocena≥++)	KRG (100 %)			P<0,01 P<0,01		Hui in sod. (2013)
TWIST1 Snail	NDRP	operabilni	FFPE (87)	IHK (>50 %) IHK (>50 %)	KRG (100 %)			P=0,026 P=0,009		Hung in sod. (2009)
TWIST Slug	NDRP	operabilni	FFPE (137)	IHK	n.p.	P<0,001 ^a P=0,001 ^a		P=0,001 P=0,002		Jiang in sod. (2012)
BMI1	NDRP	operabilni	FFPE (179)	IHK (> 10 %)	KRG (62 %) KRG+adj.KT (12 %) KRG+neoadj.KT (26%)	NS P=0,05 (stadij I/II); NS (stadij III) NS		NS NS NS		Vrzalikova in sod. (2008)

Biomarker	Tip	Razširjenost bolezni	Vrsta vzorca (n)	Metoda določanja (mejna vrednost)	Terapija (% bolnikov)	DFS/RFS ^a		OS/CSS ^b		Referenca
						UV	MV	UV	MV	
BMI1	NDRP	operabilni in razsejani	FFPE (157)	IHK (>10 %)	KRG (100 %)			NS		Kikuchi in sod. (2010)
BMI1	NDRP	operabilni	FFPE (48)	IHK (brez/šibko proti močno obarvanje)	KRG (100 %)			NS		Vanlanthen in sod. (2011)

DFS: preživetje brez bolezni; RFS: preživetje brez ponovitve bolezni; OS: celokupno preživetje; CSS: za rak specifično preživetje; UV: univariatna analiza; MV: multivariatna analiza; NDRP: nedrobnocelični rak pljuč; IHK: imunohistokemija; NS: statistično neznačilno; n.p.: ni podatka; FFPE: v formalinu fiksirano in v parafin vklopljeno tkivo; KRG: kirurgija; KT: kemoterapija

^a Nanaša se na RFS.

^b Nanaša se na CSS.

1.5 CIRKULIRAJOČE TUMORSKE CELICE (CTC)

Prvi opis cirkulirajočih tumorskih celic (CTC) sega v leto 1869, ko je Thomas Ashworth v krvi bolnika z razsejanim rakom prvič opazil celice, ki so spominjale na celice tumorja (Ashworth 1869). Kasneje so CTC definirali kot rakave celice, ki izvirajo iz primarnega tumorja ali iz zasevkov in prosto krožijo v periferni krvi bolnikov z rakom (Allard in sod. 2004). Prisotnost CTC je bila potrjena pri številnih epitelih rakih, kot so rak dojke (Cristofanilli in sod. 2004), rak prostate (de Bono in sod. 2008), rak debelega črevesa (Cohen in sod. 2008), rak mehurja (Gallagher in sod. 2009), drobnocelični rak pljuč (Hou in sod. 2009) in nedrobnocelični rak pljuč (Maheswaran in sod. 2008). Predvideva se, da se CTC sprostijo v krvni obtok po odcepitvi od primarnega tumorja, po katerem nato migrirajo do oddaljenih organov, ki jih kolonizirajo in sprožijo rast zasevkov (Alunni-Fabbroni in Sandri 2010).

1.5.1 Metode za izolacijo in detekcijo CTC

Število CTC v krvni cirkulaciji je izjemno majhno in je ocenjeno na 1 CTC na 10^6 – 10^7 mononuklearnih celic periferne krvi. Zaradi izjemne redkosti je raziskovanje CTC omogočil šele razvoj visoko občutljivih tehnologij, ki so potrebne za njihovo izolacijo in detekcijo. V splošnem so metode za detekcijo CTC sestavljene iz dveh korakov: faza izolacije oziroma obogatitve (morfološke in imunske tehnike) in faza detekcije (nukleinskih kislin in proteinov), koraka pa lahko potekata hkrati ali ločeno (Sun in sod. 2011). CTC najpogosteje izolirajo s pomočjo protiteles proti celično specifični epitelijski celični adhezijski molekuli (EpCAM), ki ima na eni strani konjugiran nanodelec, kar omogoča izolacijo označenih celic v magnetnem polju. Najbolj znana komercialno dostopna naprava, ki izkorišča to metodologijo, je pri ameriški Agenciji za hrano in zdravila (angl. *Food and Drug Administration*; FDA) odobren sistem CellSearch (Veridex, ZDA), dobro uveljavljen je tudi sistem MACS (Miltenyi Biotec, Nemčija) (Cohen in sod. 2008). Ostale tehnologije med drugim vključujejo mikročipe (Nagrath in sod. 2007) in AdnaTest (Lankiewicz in sod. 2008). V veljavi so tudi drugi

pristopi, ki so neodvisni do izražanja EpCAM, in vključujejo izolacijo na gradientu fikola (Kallergi in sod. 2011), negativno deplecijo levkocitov (Balasubramanian in sod. 2012), od velikosti odvisno filtracijo celic (ISET) (Vona in sod. 2000; Lecharpentier in sod. 2011) in mikrotekočine (Karabacak in sod. 2014).

Z metodami za detekcijo potrjujemo izvor in molekularni profil izoliranih celic. Trenutne metode za detekcijo se delijo na analizo izražanja proteinov in analizo izražanja nukleinskih kislin (mRNA, DNA). CellSearch po imunomagnetni izolaciji proti EpCAM z imunofluorescentnim barvanjem določi izražanje citokeratinov (KRT 8, 18, 19) in levkocitnega označevalca CD45 in celično jedro obarva s fluorescenčnim barvilom DAPI. Za CTC nato določi celice, ki ustrezajo kombiniranemu kriteriju: pozitivna reakcija na citokeratine, negativna reakcija na CD45 in prisotnost celičnega jedra (Allard in sod. 2004). Znane so tudi druge metode za avtomatizirano detekcijo CTC, kot sta citometrija FAST (Krivacic in sod. 2004) in tehnologija EPISPOT (Alix-Panabières in sod. 2007). Kvantitativna verižna reakcija DNA polimeraze v realnem času (iz angl. "*real time quantitative DNA-polymerase chain reaction*", RT-qPCR) je visoko občutljiva metoda, ki omogoča kvantitativno analizo tarčne mRNA v vzorcu (Nolan in sod. 2006). Molekularna detekcija CTC običajno poteka z določanjem epitelnih ali drugih z rakom povezanih transkriptov (Stathopoulou 2002; Zhu in sod. 2013; Shen in sod. 2009; Koren in sod. 2015). Oba pristopa, imunocitokemija in RT-qPCR, imata določene prednosti in slabosti: RT-qPCR je v primerjavi z imunocitokemijo bolj občutljiv (Ring in sod. 2005) in omogoča detekcijo ene tumorske celice v mešanici 1-10 milijonov normalnih krvnih celic (Ghossein in sod. 1999), po drugi strani pa pristopi z uporabo protiteles omogočajo morfološko analizo in potrditev malignega značaja v skladu s citomorfološkimi kriteriji (Borgen in sod. 1999; Krebs in sod. 2011).

1.5.2 Napovedni pomen CTC

Povezava med številom CTC in razširjenostjo bolezni in prognozo je bila dokazana v številnih študijah pri bolnikih z raki prostate, dojke, debelega črevesa, mehurja, jeter, ledvic in pljuč

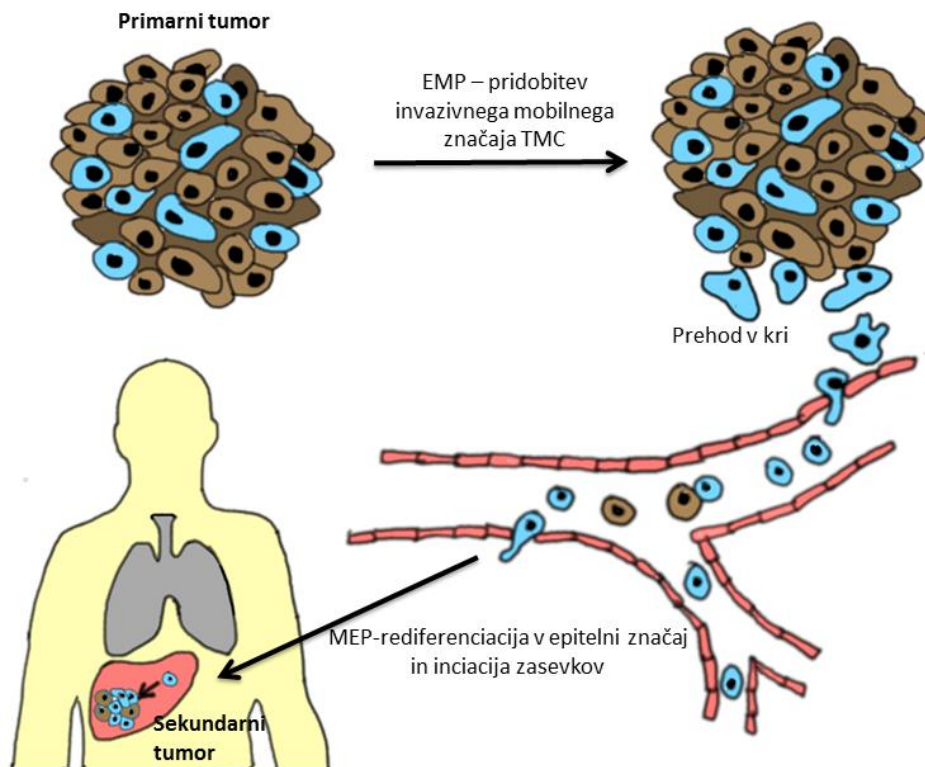
(povzeto v: Sun in sod. 2011). CellSearch je validirana metoda FDA za opazovanje bolnikov z razsejanim rakom dojke (Cristofanilli in sod. 2004), prostate (de Bono in sod. 2008) in debelega črevesa (Cohen in sod. 2008). Prisotnost CTC v krvi bolnikov s pljučnim rakom je povezana s krajšim preživetjem (Kubuschok in sod. 1999; Hiltermann in sod. 2012; Hofman, Ilie, in sod. 2011; Hofman, Bonnetaud, in sod. 2011; Krebs in sod. 2011), povečanje števila CTC napoveduje ponovitev bolezni (Rolle in sod. 2005) in odgovor na kemoterapijo (Hiltermann in sod. 2012). Še vedno zaznavno število CTC po specifičnem sistemskem zdravljenju je pokazatelj odpornosti na specifično sistemsko zdravljenje (Hoffmann in sod. 2009). Prisotnost ≥ 5 CTC v 7,5 ml krvi, določena z metodo CellSearch, je neodvisni napovedni dejavnik krajšega preživetja brez napredovanja bolezni in celokupnega preživetja bolnikov v III. in IV. stadiju NDRP (Krebs in sod. 2011). Dokazali so tudi, da je z molekularno analizo CTC bolnikov z razsejanim rakom pljuč mogoče uspešno določiti mutacije *EGFR* gena (Maheswaran in sod. 2008) in prerazporeditve v *EML4-ALK* genski regiji (Ilie in sod. 2012), kar daje neposreden vpogled v molekularne značilnosti primarnega tumorja in/ali njegovih zasevkov ter omogoča izbiro specifičnega tarčnega zdravljenja.

1.5.3 Vloga EMP in TMC pri zasevanju CTC

Zasevanje je zapleten proces, ki vključuje tudi gibanje celic iz primarnega tumorja do oddaljenega organa (Pantel in Brakenhoff 2004). Predvidevajo, da nekatere CTC pri prehodu v krvni obtok pridobijo mezenhimske značilnosti, kar je posledica aktivacije EMP. EMP tako vpliva na povečevanje mobilnega in invazivnega potenciala tumorskih celic v primarnem tumorju, kar jim omogoči vstop v kri, omogoča preživetje CTC v krvnem obtoku in spodbuja zmožnost celic, da zapustijo kri in invadirajo okoliško tkivo (Liu in sod. 2015). Posledica tega je, da lahko izolacija CTC na podlagi epitelnih antigenov zgreši pomembno subpopulacijo celic, ki imajo mezenhimske in značilnosti TMC (Sun in sod. 2011). Pri raku dojke je tako prisotnost mezenhimskih označevalcev na CTC natančneje napovedala slabšo prognozo kot izražanje citokeratinov (Gradilone in sod. 2011). Pri raku dojke in raku pljuč so ugotovili, da lahko CTC dinamično prehajajo med epitelnim in mezenhimskim stanjem (Yu in sod. 2013)

ali celo sočasno izražajo epitelne in mezenhimske označevalce (Lecharpentier in sod. 2011; Armstrong in sod. 2011). Rezultati raziskav pri raku jeter in dojke so dokazali, da del CTC-bolnikov z rakom jeter in dojke izraža označevalce TMC (Yang in sod. 2008; Theodoropoulos in sod. 2010), izražanje označevalca TMC CD44 v CTC bolnikov z rakom debelega črevesa pa je povezano s slabšo prognozo bolnikov. Predvidevajo, da se cirkulirajoče TMC razvijejo iz stacionarnih TMC s kombiniranjem dveh ključnih lastnosti: matičnosti in sposobnosti aktivacije EMP (Brabletz in sod. 2005). Nedavna raziskava pri NDRP je pokazala, da ima delež CTC zmožnost iniciacije novih tumorjev, kar je predstavljalo prvi funkcionalni dokaz za to, da imajo CTC lastnosti TMC (Hodgkinson in sod. 2014).

V luči zgoraj omenjenih rezultatov se postavlja vprašanje, ali je mogoče, da so začetnice zasevkov izključno celice, ki so z EMP pridobile mobilne in lastnosti TMC in prešle po krvnem obtoku do drugih organov, kjer so se nanje uspešno pritrdile in inicirale nastanek zasevkov (Koren in sod. 2013) (Slika 4). V smislu klinične uporabe bi tako število cirkulirajočih TMC bolj odražalo napredovanje razsejane bolezni, njihovo zmanjšanje pa bi napovedovalo ugoden odgovor na sistemsko zdravljenje. Fenotipizacija CTC za označevalce TMC bi tako lahko podala dodatne informacije o agresivnosti bolezni.



Slika 4: Predlagana vloga EMP in TMC pri zasevanju

Tumorsko tkivo je heterogeno, saj ga sestavlja glavnina tumorskih celic (rjava barva) in majhna populacija TMC (modra barva). Tumorske celice pridobijo invaziven mobilni značaj z EMP, ki v njih aktivira zmožnost, da vstopijo v krvni obtok, po katerem nato dosežejo oddaljene organe, se nanje pritrdijo in sprožijo rast zasevkov. (prirejeno po: Koren in sod. 2013)

2 NAMEN DELA, DELOVNE HIPOTEZE IN SPECIFIČNI CILJI

Glavni razlog za umrljivost bolnikov s pljučnim rakom so oddaljeni zasevki. Proces zasevanja vključuje sprostitvev tumorskih celic iz primarnega tumorja v bližnjo okolico, od koder se po krvi prenesejo do drugih organov, kjer se pritrdijo in delujejo kot začetnice zasevkov. Vloga EMP in TMC za napredovanje bolezni je pri raku pljuč slabo raziskana. Namen dela je bil raziskati povezavo med EMP in TMC pri NDRP in ovrednotiti njun vpliv za izid bolezni bolnikov z NDRP. Zastavili smo si naslednji hipotezi:

Hipoteza 1: Obstaja povezava med tumorskimi matičnimi celicami in epitelno-mezenhimskim prehodom.

Specifični cilj 1.1: Določiti mRNA izražanje izbranih molekularnih označevalcev EMP (*BMI1*, *TWIST1*), TMC (*CD133*, *ALDH1A1*) in epitelnih celic (*EpCAM*, *KRT7*) v primarnem tumorju in periferni polni krvi bolnikov z operabilnim NDRP.

Specifični cilj 1.2: Določiti povezave v izražanju označevalcev v tumorju, v krvi in med tumorjem in krvjo.

Specifični cilj 1.3: Določiti izražanje označevalcev za EMP in TMC v izoliranih CTC bolnikov z razsejanim NDRP.

Specifični cilj 1.4: Določiti vpliv indukcije EMP v celični kulturi na izražanje označevalcev EMP in TMC.

Hipoteza 2: Izražanje označevalca EMP/TMC v krvi napove končni izid bolezni.

Specifični cilj 2.1: Določiti napovedni pomen mRNA izražanja izbranega označevalca v krvi na preživetje bolnikov z razsejanim NDRP.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ZASNOVA RAZISKAVE

V prvi del raziskave smo vključili bolnike z operabilnim NDRP, zdravljene z operativno odstranitvijo tumorja in pripadajočih bezgavk. Pri bolnikih smo odvzeli tkivo primarnega tumorja in periferno polno kri. Tkivo smo uporabili za določitev izražanja mRNA izbranih molekularnih označevalcev EMP (*BMI1*, *TWIST1*), TMC (*CD133*, *ALDH1A1*) in epitelnih celic (*EpCAM*, *KRT7*), določanje deleža tumorskih matičnih celic (CD133-pozitivne in ALDH-pozitivne celice) ter za vzpostavitev primarne celične kulture. V krvi smo prav tako določili gensko izražanje omenjenih molekularnih označevalcev, nato pa proučili možne povezave med izražanjem označevalcev v tumorju, v krvi ter med tumorjem in krvjo. Za označevalce, katerih izražanje v tumorju je najbolje koreliralo na genskem nivoju (*BMI1*, *CD133*, *ALDH1A1*), smo z IHK preverili, ali obstaja povezava z njihovim proteinskim izražanjem. Nazadnje smo povezanost EMP in TMC proučili z *in vitro* celičnimi modeli, kjer smo uporabili komercialno dostopni celični liniji (A549, SKMES1) in primarno celično kulturo NDRP, ki smo jih stimulirali z molekulo TGF- β 1, ki deluje kot aktivator EMP.

V drugi del raziskave smo vključili bolnike z razsejanim NDRP, v prvi liniji zdravljene s kemoterapijo na osnovi platine. Bolnikom smo pred pričetkom kemoterapije odvzeli periferno polno kri in jo uporabili za določitev mRNA izražanja *BMI1*, za katerega smo preučili povezavo med nivojem izražanja in izidoma bolezni, preživetjem brez napredovanja bolezni po zdravljenju s kemoterapijo na osnovi platine in celokupnim preživetjem. Za *BMI1* smo se odločili na podlagi rezultatov prvega dela raziskave, kjer smo ugotovili pozitivno povezavo med izražanjem *BMI1* v tumorju in krvi. Podskupini bolnikov smo odvzeli dodatno periferno kri, ki smo jo uporabili za izolacijo CTC in določitev mRNA izražanja označevalcev EMP/TMC v CTC. V raziskavo smo dodatno vključili tudi kontrolno skupino bolnikov brez rakavega obolenja, ki smo jim prav tako odvzeli periferno polno kri ter določili mRNA izražanje *BMI1*.

3.2 BOLNIKI IN ZBIRANJE VZORCEV

V prvi del raziskave smo vključili 57 zaporednih bolnikov z operabilnim NDRP. Tkivo primarnega tumorja je bilo odvzeto ob operativni odstranitvi bolezni, periferna polna kri istega bolnika pa dan po operativnem posegu. Pri 22 bolnikih smo hkrati odvzeli tudi normalno tkivo odstranjenega režnja pljuč, ki smo ga patološko verificirali. V drugi del raziskave smo vključili 96 bolnikov z razsejanim NDRP, ki so v prvi liniji bili sistemsko zdravljeni s kemoterapijo na osnovi platine. Med temi bolniki smo trinajstim iz krvi izolirali CTC. Bolnikom je bila periferna kri odvzeta pred pričetkom kemoterapije. Vsi vključeni bolniki so bili zdravljeni s standardno kemoterapijo na osnovi platine v Univerzitetni kliniki Golnik v obdobju 2009–2014. Podatke o klinično-patoloških značilnostih bolnikov in izidih zdravljenja smo pridobili iz bolnišničnega registra raka pljuč, v okviru katerega prospektivno zbiramo podatke o bolnikih. Stanje bolnikove zmogljivosti smo ocenili skladno z navodili *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) (Oken in sod. 1982). Odgovor na zdravljenje smo ocenili po kriterijih RECIST 1.1 (angl. *Response evaluation criteria in solid tumors*) (Eisenhauer in sod. 2009). Dodatno smo v študijo vključili tudi 64 kontrolnih oseb brez predhodnih ali trenutnih rakavih obolenj, ki so se po starosti ujemali z bolniki in smo jim prav tako odvzeli kri. 36 izmed 64 (56,3 %) je bilo zdravih darovalcev krvi, 28 od 64 pa je bilo oseb, ki so se v naši bolnišnici zdravili zaradi različnih pljučnih bolezni. Slednji so imeli napredovalo obliko kronične obstruktivne pljučne bolezni (KOPB) (7/64; 10,9 %), astmo (10/64; 15,6 %) in sarkoidozo (11/64; 17,2 %).

Izvedbo študije je odobrila Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko, protokol št. 40/04/12 in protokol št. 37/07/09. Vsi vključeni bolniki so bili predhodno seznanjeni s potekom in namenom raziskave ter so podpisali poseben ozaveščen pristanek za sodelovanje.

3.3 CELICE

Humani celični liniji NDRP A549 (žlezni rak pljuč) in SKMES1 (ploščatocelični rak pljuč) sta bili kupljeni pri Evropski zbirki za celične kulture (angl. *European collection of authenticated cell cultures*; ECACC) leta 2011. Identiteta celic je bila potrjena s profiliranjem STR. Testiranje je izvedla ECACC. Primarne celične kulture so bile vzpostavljene iz vzorcev tumorskega tkiva, ki smo ga zbrali ob operativni odstranitvi bolezni. Njihova identiteta je bila potrjena z morfološkim pregledom s fazno kontrastnim mikroskopom v različnih fazah rasti in dokazovanjem epitelnega značaja celic (z določanjem izražanja citokeratinov z imunocitokemijo ali pretočno citometrijo).

3.4 PODROBNEJŠI OPIS UPORABLJENIH METOD

3.4.1 Zbiranje vzorcev tumorskega tkiva in periferne krvi

Tumorsko in normalno tkivo odstranjenega režnja pljuč za analizo izražanja mRNA je bilo odvzeto takoj po operativnem posegu, da smo ohranili integriteto RNA. Košček tkiva (1x1x2,5 mm) smo potopili v raztopino RNeasy lysis buffer (Qiagen, Nemčija) in shranili pri -40°C do RNA izolacije. Sočasno smo manjši košček tkiva potopili v medij RPMI-1640 brez fenol rdečega (Sigma-Aldrich, Nemčija) z dodanim 1 % penicilin-streptomycinom (Sigma-Aldrich, Nemčija) in pripravili celično suspenzijo tumorskih celic po spodaj opisanem postopku. Celično suspenzijo smo porabili za analizo določanja deleža TMC s pretočno citometrijo in za celično kultivacijo. Meritve s pretočno citometrijo smo opravili na prvih 20 tumorskih vzorcih, kjer je bilo na voljo dovolj velika količina tumorskega tkiva za analizo. Vzorci tkiva za IHC so bili fiksirani v formalinu in vgrajeni v parafinske bloke kot del rutinskega diagnostičnega postopka. Zbiranje tkiva je izvajal izkušen patolog, histološka diagnoza pa je bila določena glede na mikroskopske karakteristike tumorja v skladu s klasifikacijo Svetovne zdravstvene organizacije. Vzorci krvi (2,5 ml) za analizo genskega izražanja so bili odvzeti dan po operaciji ali pred pričetkom kemoterapije prvega reda v PAXgene epruveto (PreAnalytix,

Švica) in shranjeni pri -40°C do izolacije RNA. Vzorci krvi za izolacijo CTC (30 ml) so bili odvzeti pred pričetkom kemoterapije v heparinizirane epruvete in takoj uporabljeni za izolacijo celic. Vsi krvni vzorci so bili odvzeti po tem, ko je bilo prvih 5 ml odvzete krvi zavržene, s čimer smo preprečili kontaminacijo vzorca s kožnimi epitelnimi celicami.

3.4.2 Priprava primarne celične suspenzije iz tumorskega tkiva

Košček tumorskega tkiva smo sterilno prenesli v ledeno hladno gojišče, pripravljeno iz gojišča RPMI-1640 brez fenol rdečega (Sigma-Aldrich, Nemčija), 1 % govejega serumskega albumina (angl. *bovine serum albumin*, BSA, Miltenyi Biotec, Nemčija) in 1 % penicillin-streptomicina (Sigma-Aldrich, Nemčija). V roku ene ure po operaciji smo odrezan košček v gojišču prenesli v celični laboratorij, kjer smo s skalpelom pazljivo odstranili krvne žile in nekrotično tkivo in s pomočjo dveh skalpelov drobno nasekljali tkivo na približno $0,5\text{ mm}^3$ velike koščke, ki smo jih sprali s svežim gojiščem in centrifugirali 5 min. pri 300 g. Nato smo koščke tumorskega tkiva encimsko razgradili v raztopini HBSS (angl. *Hanks' balanced salt solution*) brez Ca/Mg (Gibco, ZDA) z dodano $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ kolagenazo II (Gibco, ZDA). Inkubacija je trajala 2 uri pri 37°C z mešanjem vsakih 15 min. Celično suspenzijo smo nato prefiltrirali skozi $70\text{-}\mu\text{m}$ najlonsko cedilo (BD Falcon, ZDA), dvakrat sprali z 10 ml raztopine fosfatnega pufra (angl. *phosphate buffered saline*, PBS; Sigma-Aldrich, Nemčija) in centrifugirali 5 min. pri 300 g. Celice smo raztopili v ustrezni količini gojišča ali pufra PBS in uporabili za kultivacijo ali analizo na pretočnem citometru.

3.4.3 Gojenje pljučnih celičnih kultur *in vitro*

3.4.3.1 Gojenje trajnih celičnih linij A549 in SKMES1

Celice smo gojili na ploščah za gojenje celičnih kultur v gojišču, ki je vsebovalo medij RPMI-1640 brez fenol rdeče, ki je imel dodan 10 % goveji serum zarodkov (angl. *fetal bovine serum*, FBS), 1 % penicilin-streptomycin in 2mM L-glutamin (vse Sigma-Aldrich, Nemčija). Celice

smo gojili v celičnem inkubatorju s 5 % CO₂ v zraku in 100 % relativno vlažnostjo pri 37°C, pri čemer smo gojišče zamenjali 2- do 3-krat tedensko. Celične kulture smo presajali ob 80–90 % preraščenosti rastne površine; pri presajanju smo celice najprej sprali s PBS in jih nato odlepili od podlage z 0,25 % tripsin/2 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Nemčija), prešteli in ponovno nasadili z gostoto 8000 celic/cm². Celice smo zamrznili v 10 % DMSO (Sigma-Aldrich, Nemčija) in trajno shranili v tekočem dušiku. Za poskuse smo celice nasajali v gostoti 22000 celic/cm².

3.4.3.2 Gojenje primarnih celičnih kultur raka pljuč

Iz koščka tumorskega tkiva smo pripravili primarno celično suspenzijo, kot je opisano v točki 3.4.2. Celice smo nasadili na plošče za gojenje celičnih kultur, ki smo jih predhodno prekrili z raztopino 0,01 % kolagena tipa I (Sigma-Aldrich, Nemčija). Celice smo gojili v gojišču, ki je vsebovalo medij DK-SFM (angl. *defined keratinocyte serum free medium*; Gibco, ZDA), 2mM L-glutamin (Sigma-Aldrich, Nemčija), 1 % penicilin streptomycin (Sigma-Aldrich, Nemčija), 1 % amfotericin B (PAA, Avstrija), serumski nadomestek B-27 (1-kratna koncentracija; Gibco, ZDA) in rastna dejavnika epidermalni rastni dejavnik (EGF; 20 ng/ml) (Invitrogen, ZDA) in bazični fibroblastni rastni dejavnik (bFGF; 20 ng/ml) (Invitrogen, ZDA). Celice smo nasadili v gostoti 20000–25000 celic/cm². Gojenje je potekalo v celičnem inkubatorju s 5 % CO₂ v zraku in 100 % relativno vlažnostjo pri 37°C. Gojišče smo menjali na 2–3 dni, celične kulture pa presajali ob 70–80 % preraščenosti plošče. Pri presajanju smo celice sprali PBS, jih odlepili od podlage z 0,25 % tripsinom/2 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Nemčija), prešteli, sprali z 10 ml PBS in ponovno nasadili v gostoti 20000–25000 celic/cm². Po treh tednih smo celice, ki so predstavljale morfološko uniformno populacijo, uporabili za poskus.

3.4.4 Pretočna citometrija

Delež TMC v primarnem tumorju in celičnih linijah A549 in SKMES1 smo določili s pretočno citometrijo na podlagi izražanja CD133 in določanja ALDH1 aktivnosti. Pri tej metodi celično

suspenzijo označimo s protitelesom, konjugiranim s fluorokromom, ki sveti pri določeni valovni dolžini. Celice v suspenziji s pomočjo hidrodinamskega fokusiranja v nizu ena za drugo potujejo mimo izvora svetlobe, kjer jih ozek snop laserske svetlobe presvetli. Presvetlitev označenih celic s svetlobo določene valovne dolžine sproži fluorescenco, ki jo zaznajo fotodetektorji, ki nato pretvorijo svetlobne signale v električne. Električni signali se računalniško obdelajo. Rezultat meritve je histogram ali citogram, ki prikazuje delež TMC, ki izražajo CD133 ali imajo aktivnost ALDH1.

Celično suspenzijo smo najprej sprali s PBS, nato pa smo jo 10 min. pri 4°C v temi inkubirali v pufru za imunofenotipizacijo, ki je vseboval PBS z dodanim 2mM EDTA in 1 % BSA (Miltenyi Biotec, Nemčija) in dodanimi protitelesi CD133/2-fikoeritrin (*angl. phycoerythrin*, PE) (1:10; klon 293C3; Miltenyi Biotec, Nemčija) ali izotipsko kontrolo (1:10; IgG2b-PE; Miltenyi Biotec, Nemčija). Celice smo sprali s pufrom in jih resuspendirali v končnem volumnu 300 µl imunofenotipizacijskega pufra. Pred meritvijo smo dodali 1 µl propidijevega jodida (Sigma-Aldrich, Nemčija).

ALDH1 aktivnost smo detektirali s testom ALDEFLUOR™ (Stem Cell Technologies, ZDA) po navodilih proizvajalca: celične suspenzije iz primarnih celic in celičnih linij raka pljuč smo resuspendirali v pufru ALDEFLUOR, ki vsebuje ALDH1 substrat, BODIPY-aminoacetaldehid (BAAA) (1.5 mM) in inkubirali 1 uro pri 37°C. Kot negativno kontrolo smo uporabili specifični inhibitor ALDH1, dietilamino-benzaldehid (DEAB). Celice, ki so izražale ALDH1 (ALDH1-pozitivne celice) smo detektirali v zelenem fluorescentnem kanalu pretočnega citometra. Mrtve celice smo identificirali z dodatkom propidijevega jodida (Sigma-Aldrich). Zajemanje rezultatov je potekalo na pretočnem citometru FACS Canto in BD FACS Diva programsko opremo V6.1.3 (BD Biosciences, ZDA).

3.4.5 Izolacija RNA in eliminacija genomske DNA

Celokupno RNA iz tumorskega tkiva, celičnih kultur in CTC smo izolirali z miRNeasy Mini Kitom (Qiagen, Nemčija) v skladu z navodili proizvajalca. Tumorsko tkivo smo s sterilno pinceto prestavili iz RNAlater v tubico, v katero smo dodali reagent Qiazol (Qiagen, Nemčija) in ga homogenizirali s pomočjo tkivnega homogenizatorja. Celice v kulturi in CTC smo sprali s pufrom PBS in jim enako dodali reagent Qiazol. Qiazol je monofazna raztopina fenola in gvanidin izotiocianata, ki razbije celice in razgradi celične komponente, RNA pa pri tem ostane nepoškodovana, saj gvanidin izotiocianat inaktivira RNAze. Po dodatku kloroforma smo ločili organsko in vodno fazo, v kateri se je nahajala RNA. RNA smo precipitirali z dodatkom etanola. Nazadnje smo RNA nanесли na kolono, kjer smo jo očistili nečistoč in odstranili genomsko DNA z uporabo kompleta DNAze (Qiagen, Nemčija). Izolirano in očiščeno RNA smo raztopili v vodi brez RNAz in shranili pri -40°C .

Vzorci polne krvi, zbrane v epruveto PAXgene (PreAnalytix), smo en dan pred izolacijo postavili na sobno temperaturo. Epruveta PAXgene vsebuje posebno raztopino, ki vpliva na zmanjšano razgradnjo RNA in gensko indukcijo (Rainen in sod. 2002). Izolacija RNA je potekala s kompletom reagentov Paxgene Blood miRNA Kit (PreAnalytix, Švica) in s pomočjo aparature za izolacijo nukleinskih kislin Qiacube (Qiagen, Nemčija). Postopek za izolacijo RNA je vključeval razgradnjo vzorca s proteinazo K, precipitacijo RNA z izopropanolom (Sigma-Aldrich, Nemčija), spiranje na koloni s pufri, inkubacijo z DNAzo in raztapljanje v vodi brez RNAz. Izolirano RNA smo 5 min. denaturirali pri 65°C , jo prenesli na led in shranili pri -40°C .

Koncentracijo izolirane RNA v vzrocu smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop 2000c (Thermo Fischer Scientific, ZDA), ki iz absorbance pri 260 nm izračuna koncentracijo RNA, iz razmerja absorbanc pri 260/280 nm in 260/230 nm pa določi tudi čistost RNA.

3.4.6 Sinteza komplementarne DNA

RNA iz posameznega vzorca smo reverzno prepisali v cDNA z uporabo seta reagentov High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ZDA) po navodilih proizvajalca v 50 µl reakciji. Komplet vsebuje naključne začetne oligonukleotide, ki se povežejo z RNA, nato pa ob matrični RNA poteka prepis v cDNA z encimom reverzna transkriptaza. Za prepis smo uporabili 2,5 µg izolirane RNA posameznega vzorca. Reverzna transkripcija je potekala 10 minut pri 25°C in 120 minut pri 37°C v aparatu Primus 96 Plus (MWG-Biotech, Nemčija). Vzorce prepisane cDNA smo do nadaljnje uporabe shranili pri -20°C.

3.4.7 Predhodno pomnoževanje genov z nizkim izražanjem (preamplifikacija)

Pred izvedbo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času smo cDNA iz CTC in pripadajočih EpCAM-negativnih vzorcev PMNC predhodno pomnožili proučevane gene (Priloga 4). Uporabili smo TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, ZDA), ki smo mu dodali vodo brez RNaz, 500 ng cDNA posameznega vzorca in mešanico Taqman sond za izbrane gene (Applied Biosystems, ZDA) v 0,2x raztopini. Reakcija je potekala v aparatu Veriti® 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, ZDA) po naslednjem programu: 1 cikel: 10 min. pri 95°C in 10 ciklov 15 s pri 95°C, 4 min. pri 60°C. Na prvi stopnji reakcije se s segrevanjem aktivira Taq polimeraza, ki nato v naslednji stopnji pomnoži izbrani gen.

3.4.8 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času

cDNA smo kvantificirali s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-qPCR), s katero lahko izmerimo izražanje genov z določanjem relativne količine tarčne mRNA v vzorcu. Metoda je osnovana na PCR, od katerega se glavno razlikuje v tem, da poleg pomnoževanja poteka hkrati tudi merjenje količine tarčnega produkta v vzorcu. RT-qPCR smo izvedli na aparaturi ABI PRISM®7500 Real-Time PCR System (opremljen s programsko

opremo Sequence detection system verzija 1.3.0.) z uporabo gensko specifičnih setov začetnih nukleotidov in sond (TaqMan tehnologija, Applied Biosystems, ZDA). Sekvenčno specifična oligonukleotidna DNA sonda s fluorescenčnim označevalcem omogoča detekcijo samo, kadar poteče hibridizacija sonde s komplementarno tarčno DNA. Instrument zazna naraščanje fluorescence pri vsakem ciklu potekajoče reakcije. Cikel, pri katerem fluorescenca preseže vnaprej določeno mejno vrednost fluorescence, se imenuje prazni cikel (angl. *cycle threshold*, Ct) in odraža količino tarčne cDNA v vzorcu.

Reakcija PCR je potekala pri standardnih temperaturnih pogojih (45 ciklov), uporabili smo TaqMan Universal PCR Master Mix II ali Taqman Gene Expression Master Mix (oboje Applied Biosystems) za preamplificirane vzorce cDNA. Uporabili smo naslednje predpripravljene teste TaqMan za gensko ekspresijo: EpCAM (CD326) (Hs00901885_m1), BMI1 (Hs00180411_m1), TWIST1 (Hs00361186_m1), CD133 (PROM1) (Hs1009245_m1), ALDH1A1 (Hs00167445_m1), KRT7 (Hs00559840_m1) (Applied Biosystems). Vzorci s Ct ≥ 38.00 so bili šteti kot negativni za izražanje posameznega gena. Vse meritve so potekale v triplikatu, relativno ekspresijo pa smo določili z uporabo metode $\Delta\Delta Ct$ (Livak in Schmittgen 2001). V skladu z metodo smo mRNA vrednosti tarčnega gena normalizirali na endogeno kontrolno in relativno proti kalibratorju, pri čemer smo uporabili formulo:

$$\text{Relativni nivo izražanja} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{vzorec}} - \Delta Ct_{\text{kalibrator}})}, \text{ pri čemer je } \Delta Ct_{\text{vzorec}} = Ct_{\text{tarčni gen}} - Ct_{\text{notranja kontrola}}$$
$$\text{in } \Delta Ct_{\text{kalibrator}} = Ct_{\text{tarčni gen}} - Ct_{\text{notranja kontrola}}.$$

Za notranjo kontrolo smo uporabili glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenazo (GAPDH; 4333764F; Applied Biosystems, ZDA). Za kalibrator smo uporabili patološko verificirano normalno tkivo pljuč istega bolnika (določitev izražanja v tumorskem tkivu), celično linijo A549 (določitev izražanja v tumorskem tkivu in parnih krvnih vzorcih istega bolnika), neizpostavljene celice v isti časovni točki (določitev izražanja pri poskusu s TGF- $\beta 1$), EpCAM-negativne PMNC (določitev izražanja v CTC) in združen vzorec cDNA 10 zdravih kontrol (določitev izražanja *BMI1* v krvi). Rezultat za izbrani referenčni vzorec (kalibrator) je približno 1, za ostale pa sorazmerno več ali manj.

3.4.9 Izdelava tkivnih mikromrež in imunohistokemija

Tkivne mikromreže smo izdelali iz vseh 57 vzorcev tumorjev. Tkivno področje za vzorčenje je bilo izbrano glede na vidno poravnavo z ustrezno rezino obarvano z barviloma hematoksilin in eozin (H & E). Iz parafinskih blokov v formalinu fiksiranega tumorskega tkiva vsakega bolnika smo v trojniku izrezali 6 mm široke tkivne dele in jih narezali v 5 µm debele tkivne rezine. Za morfološko kontrolo kakovosti smo uporabili tkivne rezine obarvane s H & E. IHC določanje CD133, ALDH1A1 in BMI1 je potekalo v skladu z navodili proizvajalca na avtomatizirani platformi Benchmark XT (Ventana Medical Systems, ZDA). Uporabili smo naslednja primarna protitelesa: mišje monoklonsko anti-CD133 protitelo (klon AC133, Miltenyi Biotec, redčitev 1:50), zajčje monoklonsko anti-ALDH1A1 protitelo (klon EP1933Y, Abcam, redčitev 1:200) in zajčje monoklonsko anti-BMI1 protitelo (klon EPR3745(2), Abcam, redčitev 1:100), ki smo jih nanесли v standardni dvostopenjski imunohistokemijski metodi, kjer smo uporabili 3,3'-diaminobenzidin kot kromogeni substrat. Uporabili smo komercialno dostopni komplet za detekcijo OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, ZDA). Za kontrastiranje preparatov smo uporabili barvanje s hematoksilinom. Dva raziskovalca (AK in IK) sta neodvisno ovrednotila obarvanje s svetlobnim mikroskopom, kjer sta ocenila odstotek pozitivno obarvanih celic glede na celotno število tumorskih celic v vzorcu in določila numerično vrednost za intenziteto obarvanja (0-negativno; 1-zmerno; 2-močno; 3-zelo močno). Skupno oceno obarvanja smo dobili s pomnoževanjem povprečnih vrednosti ocenjenih površin obarvanih celic s povprečnimi vrednostmi ocenjenih intenzitet obarvanja (ekspresijski pomnožek = površina × intenziteta). Za vsakega bolnika smo iz trojnikov izračunali povprečen ekspresijski pomnožek. Vzorce smo nato dihitomizirali v visoki ali nizki ekspresijski razred na podlagi mediane ekspresijskega pomnožka pri ALDH1A1 in BMI1 (20,0 in 76,7), medtem ko smo tumorje, kjer smo lahko detektirali CD133-pozitivne tumorske celice, uvrstili v visoki ekspresijski razred. Za pozitivne kontrole obarvanja pri ALDH1A1 in BMI1 smo uporabili normalno tkivo ledvice, za kontrolo pri CD133 pa smo uporabili močno pozitivno obarvan vzorec tumorja pljuč. Kontrole smo dodali v vsako serijo barvanja.

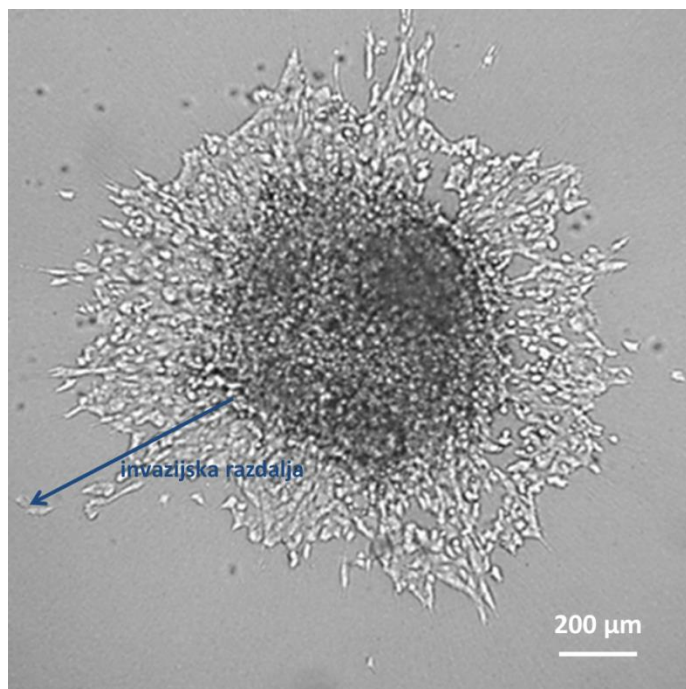
3.4.10 Priprava in izpostavitev celic TGF- β 1

Raztopino humanega transformirajočega rastnega faktorja- β 1 (TGF- β 1) smo pripravili tako, da smo 5 μ g liofiliziranega TGF- β 1 rekonstituirali v 100 μ l 10 mM citronske kisline (Sigma-Aldrich) in uravnali pH na 3,0. Nato smo dodali 1900 μ l PBS z dodanim 0,1 % BSA in tako pridobili založno koncentracijo 2,5 μ g/ml, ki smo jo dodali v gojišče v končni koncentraciji 5 ng/ml.

Celice smo izpostavili 5 ng/ml TGF- β 1 48 ur za ovrednotenje morfoloških sprememb. Celice smo izpostavili 5 ng/ml TGF- β 1 3, 5, 7, 10 in 14 dni za ugotavljanje razlik v izražanju označevalcev EMP in TMC. Za poskuse smo celice nasadili v 70 % konfluenci. Za opazovanje razlik v morfologiji smo uporabili faznokontrastni mikroskop Olympus IX51, opremljen z barvno kamero UC30 (Olympus, VB).

3.4.11 Izdelava sferoidov in test invazije v kolagenu

Sferoide smo pripravili na plošči s 96 žepki z dnem, zaobljenim v obliki črke U. Za izdelavo sferoidov enotne velikosti in oblike smo nasadili 5000 A549 ali SKMES1 celic na žepek v 100 μ l gojišča, ki je vsebovalo 4 % metilceluloze (Sigma-Aldrich, Nemčija), ki je preprečevala pritrditev celic na dno žepka. Ploščo s celicami smo nato centrifugirali 1,5 ure pri 850 g. Po 24 urah inkubacije v celičnem inkubatorju pri 37°C in 5 % CO₂ v zraku, smo sferoide vklopili v 45 μ l kapljico kolagena I (BD Biosciences, ZDA) in inkubirali v celičnem mediju z dodanim TGF- β 1 v končni koncentraciji 5 ng/ml 72 ur pri 37°C in 5 % CO₂ ali brez njega. Invazijsko razdaljo smo izmerili kot najdaljšo razdaljo, ki so jo celice prepotovale od roba sferoida po 24, 48 in 72 urah inkubacije (Slika 5).



Slika 5: Merjenje invazijske razdalje pri testu invazije v kolagenu

3.4.12 Izolacija CTC z magnetno separacijo

Sveže odvzeto periferno polno kri (30 ml), ki smo jo zbrali v heparinizirane epruvete, smo 2-krat razredčili s pufrom PBS. Razredčeno kri smo naplastili na Fikol (Ficoll-Paque™ PLUS, Stem Cell Technologies, ZDA) in centrifugirali 30 min. pri 400 g na sobni temperaturi brez zavore. Previdno smo odpipetirali PMNC, dvakrat sprali s PBS in resuspendirali v 300 μl separacijskega pufra, ki je vseboval PBS z dodanim 0,5% BSA (Miltenyi Biotec, Nemčija). CTC smo izolirali z uporabo kompleta CD326 (EpCAM) tumor Cell Enrichment and Detection Kit (Miltenyi Biotec, Nemčija). Metoda temelji na imunomagnetni izolaciji celic, ki izražajo epitelni označevalec EpCAM. Najprej smo PMNC inkubirali z 100 μl magnetnih nanodelcev konjugiranih z anti-EpCAM (CD326) protitelesi in 100 μl reagenta za blokado FcR 30 min. pri 4°C. Po spiranju s pufrom smo celično suspenzijo označenih celic nanесли na MS separacijsko kolono (Miltenyi Biotec, Nemčija), ki smo jo postavili v MiniMACS separator (Miltenyi Biotec, Nemčija). Zbrali smo neoznačene celice, ki so prešle skozi kolono in jo sprali s separacijskim pufrom. Nato smo odstranili kolono iz magnetnega polja, dodali

500 µl separacijskega pufra in z nežnim pritiskom na bat izbrizgali magnetno označene celice, ki so predstavljale z EpCAM-pozitivnimi CTC obogateno celično frakcijo. Obe frakciji (pozitivna in negativna) smo centrifugirali, odpipetirali supernatant, resuspendirali v 700 µl Qiazola in ju shranili pri -40°C do izolacije RNA.

3.4.12.1 Preverjanje učinkovitosti izolacije CTC

Za določitev učinkovitosti izolacije CTC smo v 30 ml heparinizirane krvi, ki smo jo pridobili od zdravih prostovoljcev, dodali 10^4 A549 celic. Iz krvi smo nato po enakem postopku kot pri bolnikih izolirali EpCAM-pozitivne celice (poimenovane A549 podobne CTC), pri katerih smo izolirali RNA in z RT-qPCR določili gensko izražanje *EpCAM*. Gensko izražanje *EpCAM* smo določili tudi v vzorcu 10^4 A549 celic, učinkovitost izolacije pa smo določili kot razmerje med izražanjem *EpCAM* v izoliranih A549 podobnih CTC in 10^4 A549. Končni rezultat smo izrazili kot povprečje treh neodvisnih poskusov s standardnim odklonom (SD).

3.4.13 Statistika

Porazdelitev podatkov smo določili z D'Agostino-Pearsonovim testom. Razlike v izražanju označevalcev med tumorskim in normalnim pljučnim tkivom smo ovrednotili z Wilcoxonovim testom. Povezave med izražanjem molekularnih označevalcev v krvi in v tkivu smo določili s Spearmanovim korelacijskim koeficientom. Povezave med visokim in nizkim izražanjem CD133, ALDH1A1 in BMI1 v tkivni mikromreži smo ovrednotili s Fischerjevim natančnim testom. Razlike pri poskusu na celičnih kulturah smo določili z enosmernim testom ANOVA in Dunnetovim posttestom. Razlike v izražanju *BMI1* med bolniki in kontrolami smo ovrednotili z Mann-Whitneyjevim U-testom. Povezave med izražanjem *BMI1* in kliničnimi značilnostmi bolnikov smo ovrednotili s Fischerjevim natančnim testom. Analizo preživetja smo izvedli po metodi Kaplan-Meier, pri čemer smo razlike v preživetju bolnikov glede na izražanje *BMI1* ovrednotili z uporabo testa Log rank. Preživetje brez napredovanja bolezni smo definirali kot čas v mesecih od datuma pričetka kemoterapije do datuma progressa ali

smrti. Celokupno preživetje smo definirali kot čas v mesecih od datuma diagnoze do datuma smrti, ne glede na njen vzrok. Za določitev optimalne mejne vrednosti med izražanjem *BMI1* smo testirali različne mejne vrednosti. Ker optimizirana vrednost ni bistveno vplivala na preživetveno analizo, smo mejno vrednost za razlikovanje med nizkim in visokim izražanjem *BMI1* postavili na mediano izražanja *BMI1* (0,663). Za testiranje vpliva dejavnikov na preživetje v univariatni in multivariatni analizi smo uporabili Coxov regresijski model sorazmernih tveganj, uporabili smo zvezne vrednosti *BMI1* izražanja.

Statistično obdelavo podatkov smo izvedli s programoma GraphPad Prism (verzija 5, San Diego, CA, ZDA) in SPSS 21 (verzija 21, Chicago, IL, ZDA). Vse podane *P* vrednosti so dvostranske. Za statistično značilne razlike smo označili izračunane razlike z vrednostjo $P < 0,05$. V primeru določanja povezav med izražanjem molekularnih označevalcev v tumorskem tkivu smo upoštevali Bonferroni korekcijo za večkratno primerjanje ($0,05/6 = 0,0083$), zato smo raven statistične značilnosti postavili pri $P < 0,0083$. Vse ovrednotene razlike in povezave so rezultat uporabe zgoraj opisanih statističnih orodij.

4 REZULTATI

4.1 KLINIČNE ZNAČILNOSTI BOLNIKOV

4.1.1 Značilnosti bolnikov z operabilnim NDRP

Značilnosti 57 bolnikov z operabilnim NDRP so povzete v Preglednica 5. Ob diagnozi je bila mediana starosti bolnikov 62 (razpon 42–79 let), več kot polovica je bilo moških (33/57; 57,9 %). Dvaintrideset izmed 57 bolnikov (56,1 %) je imelo žlezni rak in 19 izmed 57 (33,3 %) je imelo ploščatocelični rak. Večina bolnikov je bila nekdanjih ali aktualnih kadilcev (46/57; 80,1 %). Vsi bolniki so imeli ob času postavitve diagnoze omejeno obliko bolezni (29/57, 50,9 % stadij I; 14/57, 24,6 % stadij II; 14/57, 24,6 % stadij III) in so bili zdravljeni z radikalno kirurgijo. Štirje izmed 57 bolnikov so pred operacijo prejeli neoadjuvantno kemoterapijo na osnovi platine.

Preglednica 5: Klinične značilnosti 57 bolnikov z operabilnim NDRP

Značilnost	N (%)
Starost v letih: mediana (razpon)	62 (42–79)
Spol	
Moški	33 (57,9)
Ženski	24 (42,1)
Histologija	
Žlezni rak	32 (56,2)
Ploščatocelični rak	19 (33,3)
Neopredeljen nedrobnocelični rak	6 (10,5)
Stadij raka po UICC*	
I	29 (50,8)
II	14 (24,6)
III	14 (24,6)
Zgodovina kajenja	
Da	46 (80,7)
Ne	9 (15,8)
Neznano	2 (3,5)

*Union Internationale Contre le Cancer klasifikacija za razdelitev raka v stadije

4.1.2 Značilnosti bolnikov z razsejanim NDRP

Značilnosti 96 bolnikov z razsejanim NDRP so povzete v Preglednica 6. Petinšestdeset od 96 (67,7 %) je imelo žlezni rak in 25 od 96 (26,0 %) je imelo ploščatocelični rak. Ob diagnozi je bila mediana starosti bolnikov 62 let (razpon 39–79), več kot pol (57/96; 59,3 %) je bilo moških. Glavnina bolnikov je bila v dobrem stanju zmogljivosti – primerni za zdravljenje s kemoterapijo ($PS \leq 1$ pri 85/96; 88,6 %). Vsi bolniki so bili diagnosticirani v razsejani obliki bolezni (stadij IV), glavnina je ob diagnozi imela manj kot tri oddaljene zasevke (79/96; 82,3 %). Bolniki so v prvi liniji sistemskega zdravljenja prejeli kemoterapijo na osnovi platine. Glavnina bolnikov (55/96; 57,3 %) je prejela platino in pemetreksed, ostali so prejeli platino in gemcitabin, platino in taksane ali platino in etopozid. Mediana števila prejetih kemoterapevtskih ciklov je bila 4 (razpon 1–6). Tretjina bolnikov (32/96; 33,3 %) je prejela več linij sistemskega zdravljenja. Večina bolnikov (93/96; 96,8 %) je imela merljiv odgovor na prvo linijo kemoterapije; popolni ali delni odgovor je bil dosežen pri 42 izmed 96 (43,7 %) bolnikov. Mediana sledenja bolnikov je bila 9,9 meseca (razpon 1–31,5 meseca).

Preglednica 6: Osnovne značilnosti 96 bolnikov z razsejanim NDRP

Značilnost	N (%)
Starost v letih: mediana (razpon)	62 (39–79)
Spol	
Moški	57 (59,4)
Ženski	39 (40,6)
Histologija	
Žlezni rak	65 (67,7)
Ploščatocelični rak	25 (26,0)
Neopredeljen nedrobnocelični rak	6 (6,3)
Stanje zmogljivosti^a	
0	14 (14,6)
1	71 (73,9)
≥2	11 (11,5)
Zgodovina kajenja	
Da	82 (85,4)
Ne	14 (14,6)
Število oddaljenih zasevkov	
<3	79 (82,3)
≥3	17 (17,7)
Odgovor na kemoterapijo^b	
Popolni odgovor + delni odgovor	42 (43,7)
Stabilna bolezen	22 (22,9)
Napredujoča bolezen	29 (30,2)

N: število bolnikov

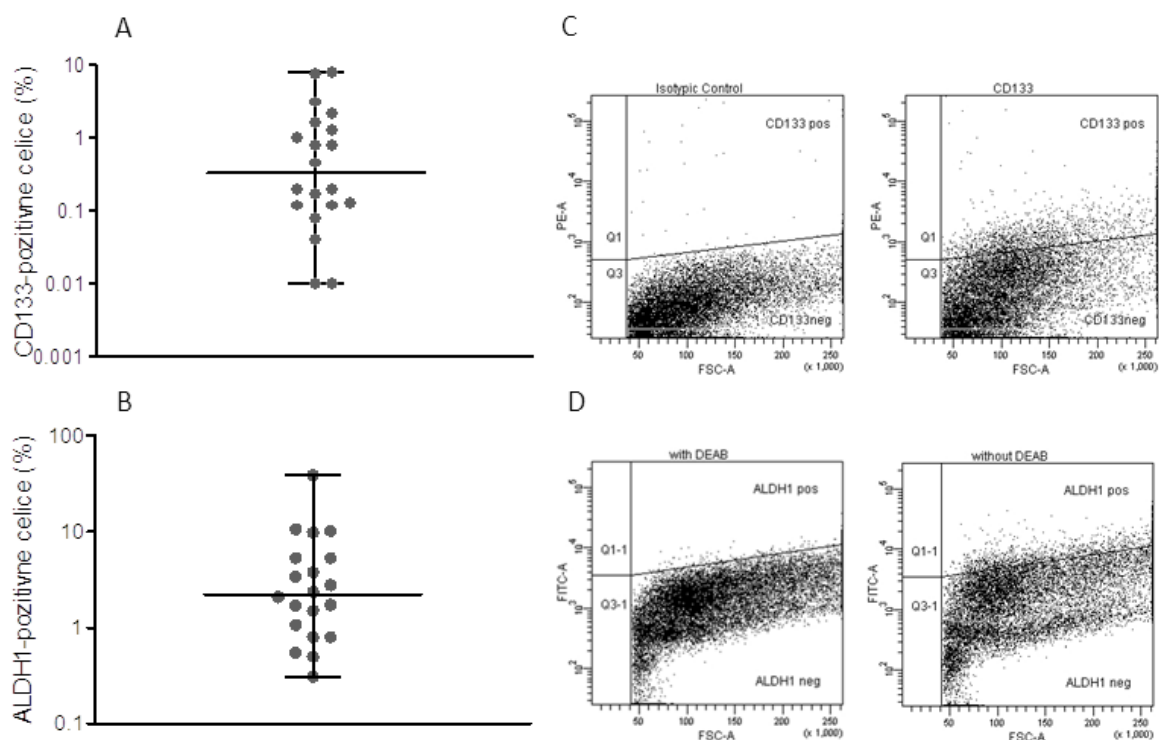
^a lestvica za ocenjevanje bolnikov zmogljivosti East Cooperative Oncology Group

^b Objektivni odgovor na zdravljenje je bil merljiv pri 93/96 (96,8 %) bolnikih.

4.2 DELEŽ TMC IN GENSKO IZRAŽANJE OZNAČEVALCEV EMP IN TMC V PRIMARNEM TUMORJU NDRP IN NORMALNEM PLJUČNEM TKIVU

4.2.1 Delež TMC v primarnem tumorju

S pretočno citometrijo smo določili delež CD133-pozitivnih in ALDH1-pozitivnih celic v primarnem tumorju 20 bolnikov z operabilnim NDRP. Delež CD133-pozitivnih celic je bil med 0,01 do 7,59 % (mediana 0,33 %), aktivnost ALDH1 pa je bila med 0,31 do 38,8 % (mediana 2,23 %) pozitivnih celic (Slika 6).

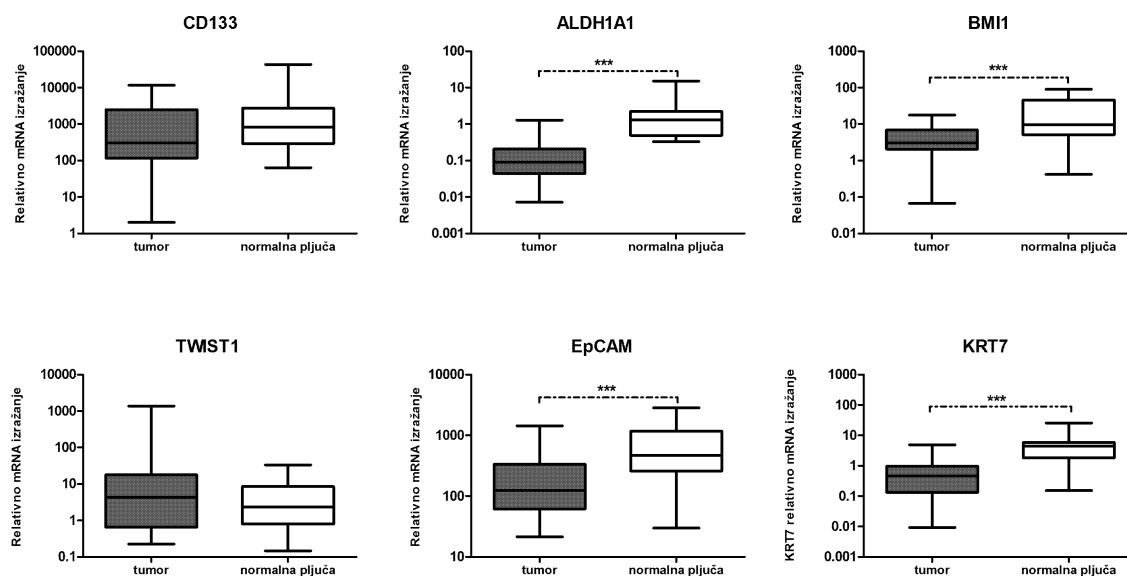


Slika 6: Delež TMC v primarnem tumorju

Delež A) CD133-pozitivnih in B) ALDH1-pozitivnih celic v 20 vzorcih primarnega tumorja. Reprezentativne slike analiz s pretočnim citometrom za C) imunofenotipizacijo CD133 in D) encimsko aktivnost ALDH1. Rezultati so prikazani v obliki raztresenega grafikona za vse merjene vrednosti. Črta na sredini predstavlja mediano.

4.2.2 Gensko izražanje označevalcev EMP in TMC v primarnem tumorju in normalnem pljučnem tkivu

Gensko izražanje označevalca TMC *ALDH1A1*, označevalca EMP *BMI1* in označevalcev epitelnih celic *EpCAM* in *KRT7* je bilo v primarnem tumorju 22 bolnikov z operabilnim NDRP glede na normalno pljučno tkivo istih bolnikov statistično značilno znižano ($P < 0,0001$). Za označevalec TMC *CD133* in označevalec EMP *TWIST1* nismo ugotovili razlik med izražanjem v tumorju in normalnih pljučih ($P > 0,05$) (Slika 7).



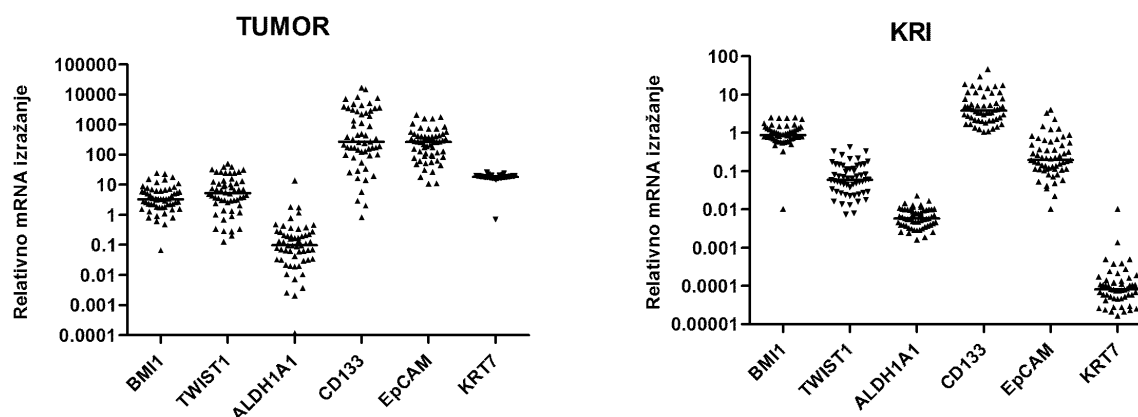
Slika 7: Gensko izražanje označevalcev v primarnem tumorju in normalnem pljučnem tkivu.

Relativno mRNA izražanje označevalcev TMC (*CD133*, *ALDH1A1*), EMP (*BMI1*, *TWIST1*) in epitelnih celic (*EpCAM* in *KRT7*) v 22 vzorcih primarnega tumorja in pripadajočega normalnega pljučnega tkiva. Rezultati so prikazani v obliki okvirja z ročaji. Črta na sredini predstavlja mediano (***) $P < 0,001$.

4.3 POVEZAVE MED IZRAŽANJEM OZNAČEVALCEV EMP IN TMC V PRIMARNEM TUMORJU IN POLNI KRVI

4.3.1 Gensko izražanje molekularnih označevalcev EMP in TMC v primarnem tumorju in periferni polni krvi

Gensko izražanje molekularnih označevalcev EMP (*BMI1*, *TWIST1*), TMC (*CD133*, *ALDH1A1*) in epitelnih celic (*EpCAM* in *KRT7*) smo lahko določili v primarnem tumorju 56 od 57 (98 %) bolnikov in v periferni polni krvi 53 od 57 (93 %) bolnikov z operabilnim NDRP. Razpon mRNA izražanja označevalcev v tumorju je bil 0,0001–16797 in v krvi 0,00001–46 (Slika 8).



Slika 8: Izražanje označevalcev v primarnem tumorju in polni krvi

mRNA izražanje označevalcev EMP (*BMI1*, *TWIST1*), TMC (*CD133*, *ALDH1A1*) in epitelnih celic (*EpCAM* in *KRT7*) v tumorskem tkivu in polni krvi 57 bolnikov z operabilnim NDRP. Rezultati so prikazani v obliki raztresenih grafikonov za vse merjene vrednosti. Črta na sredini predstavlja mediano.

4.3.2 Povezave med genskim izražanjem molekularnih označevalcev EMP in TMC v primarnem tumorju in periferni polni krvi

V primarnem tumorju smo ugotovili statistično značilno povezavo med mRNA izražanjem označevalcev EMP in TMC: med *BMI1* in *ALDH1A1* ($r_s=0,622$; $P=2\times 10^{-7}$) in med *BMI1* in *CD133* ($r_s=0,452$; $P=2\times 10^{-4}$). Med izražanjem *TWIST1* in *CD133* ali *ALDH1A1* nismo ugotovili nobenih povezav. Dodatno smo potrdili povezavo med označevalcema TMC *CD133* in *ALDH1A1* ($r_s=0,544$; $P=1\times 10^{-5}$). Povezave med označevalcema EMP *BMI1* in *TWIST1* nismo potrdili. Ugotovili smo tudi statistično značilno povezave med označevalci EMP/TMC in označevalci epitelnih celic: *BMI1* in *EpCAM* ($r_s=0,681$; $P=6\times 10^{-9}$), *BMI1* in *KRT7* ($r_s=0,656$; $P=3\times 10^{-8}$), *ALDH1A1* in *EpCAM* ($r_s=0,475$; $P=2\times 10^{-4}$) ter *ALDH1A1* in *KRT7* ($r_s=0,54$; $P=5\times 10^{-5}$). Povezave med *TWIST1* in *EpCAM* ali *KRT7* nismo ugotovili (oba $P>0,0083$), potrdili pa smo statistično značilno povezavo med epitelnima označevalcema *EpCAM* in *KRT7* ($r_s=0,545$; $P=1\times 10^{-5}$).

V polni krvi smo enako kot v primarnem tumorju ugotovili statistično značilno povezavo med *BMI1* in *CD133* ($r_s=0,353$; $P=0,008$) in med *BMI1* in *ALDH1A1* ($r_s=0,407$; $P=0,002$), ne pa povezave med *TWIST1* ter *CD133* ali *ALDH1A1* mRNA izražanjem. Za razliko od primarnega tumorja v krvi nismo potrdili povezave med označevalcema TMC *CD133* in *ALDH1A1*. Ugotovili pa smo statistično značilno povezavo med *BMI1* in *TWIST1* ($r_s=0,283$; $P=0,002$) mRNA izražanjem. V krvi nismo ugotovili povezave med molekularnimi označevalci EMP/TMC in epitelnimi označevalci, opazili pa smo trend za povezavo mRNA izražanja med *EpCAM* in *ALDH1A1* ($P=0,04$).

Analiza povezav med tumorjem in krvjo je pokazala, da je izražanje *BMI1* v primarnem tumorju pozitivno statistično značilno povezano z izražanjem *BMI1* v polni krvi ($r_s=0,35$; $P=0,008$). Drugih povezav med izražanjem označevalcev EMP/TMC nismo našli (Preglednica 7).

Preglednica 7: Povezave med izražanjem označevalcev v primarnem tumorju in polni krvi pri NDRP

Spearmanov koeficient korelacij med mRNA izražanjem označevalcev za EMP (*BMI1*, *TWIST1*), TMC (*CD133*, *ALDH1A1*) in epitelne celice (*EpCAM*, *KRT7*) v tumorskem tkivu in periferni polni krvi 57 bolnikov z operabilnim NDRP.

	PRIMARNI TUMOR						KRI					
	CD133	ALDH1A1	BMI1	TWIST1	EpCAM	KRT7	CD133	ALDH1A1	BMI1	TWIST1	EpCAM	KRT7
PRIMARNI TUMOR	CD133	$r_s=0,544$ ($P=1 \times 10^{-5}$)	$r_s=0,452$ ($P=4 \times 10^{-4}$)	$r_s=-0,039$	$r_s=0,32$ ($P=0,02$)	$r_s=0,33$ ($P=0,01$)	$r_s=0,052$	$r_s=0,079$	$r_s=0,097$	$r_s=0,067$	$r_s=0,159$	$r_s=0,209$
	ALDH1A1		$r_s=0,622$ ($P=2 \times 10^{-7}$)	$r_s=-0,032$	$r_s=0,475$ ($P=2 \times 10^{-4}$)	$r_s=0,54$ ($P=5 \times 10^{-5}$)	$r_s=0,055$	$r_s=0,116$	$r_s=0,232$	$r_s=0,095$	$r_s=0,044$	$r_s=0,179$
	BMI1			$r_s=0,014$	$r_s=0,681$ ($P=6 \times 10^{-9}$)	$r_s=0,656$ ($P=3 \times 10^{-8}$)	$r_s=0,220$	$r_s=0,186$	$r_s=0,347$ ($P=0,008$)	$r_s=0,119$	$r_s=0,119$	$r_s=0,271$
	TWIST1				$r_s=-0,262$	$r_s=0,075$	$r_s=0,102$	$r_s=-0,050$	$r_s=0,180$	$r_s=0,109$	$r_s=-0,085$	$r_s=0,008$
	EpCAM					$r_s=0,545$ ($P=1 \times 10^{-5}$)	$r_s=0,092$	$r_s=0,293$ ($P=0,03$)	$r_s=0,289$ ($P=0,03$)	$r_s=-0,062$	$r_s=0,222$	$r_s=0,156$
	KRT7						$r_s=0,023$	$r_s=0,255$	$r_s=0,260$	$r_s=-0,050$	$\rho=0,095$	$r_s=0,259$
KRI	CD133							$r_s=0,225$	$r_s=0,353$ ($P=0,008$)	$r_s=0,283$ ($P=0,04$)	$r_s=0,181$	$r_s=-0,235$
	ALDH1A1								$r_s=0,407$ ($P=0,002$)	$r_s=-0,034$	$r_s=0,283$ ($P=0,04$)	$r_s=0,096$
	BMI1									$r_s=0,406$ ($P=0,002$)	$r_s=-0,135$	$r_s=0,277$
	TWIST1										$r_s=-0,313$ ($P=0,02$)	$r_s=0,209$
	EpCAM											$r_s=-0,314$ ($P=0,02$)
	KRT7											

Preglednica 8 in Preglednica 9 prikazujeta povezave med izražanjem proučevanih molekularnih označevalcev pri podskupinah bolnikov z žleznim ($N=32$) in ploščatoceličnim ($N=19$) rakom. Ugotovili smo, da je bila v primarnem tumorju povezava med označevalcem EMP *BMI1* in označevalcema TMC *CD133* in *ALDH1A1* statistično značilna pri bolnikih s ploščatoceličnim rakom (*CD133-BMI1* ($r_s=0,731$; $P=3 \times 10^{-4}$), *ALDH1A1-BMI1* ($r_s=0,767$; $P=8 \times 10^{-5}$), *CD133-ALDH1A1* ($r_s=0,738$; $P=2 \times 10^{-4}$)), medtem ko je bila pri bolnikih z žleznim rakom statistično značilna le povezava med *BMI1* in *ALDH1A1* ($r_s=0,638$; $P=9 \times 10^{-5}$). V krvi je bila pri bolnikih s ploščatoceličnim rakom statistično značilna povezava med *BMI1* in *ALDH1A1* ($r_s=0,514$; $P=0,003$), pri bolnikih z žleznim rakom pa povezav med označevalci EMP in TMC v periferni polni krvi nismo ugotovili. Pri nobenem histološkem podtipu nismo ugotovili povezave med izražanjem *BMI1* v primarnem tumorju in izražanjem *BMI1* v krvi.

Preglednica 8: Povezave med izražanjem označevalcev v primarnem tumorju in polni krvi pri podskupini 32 bolnikov z žleznim rakom pljuč

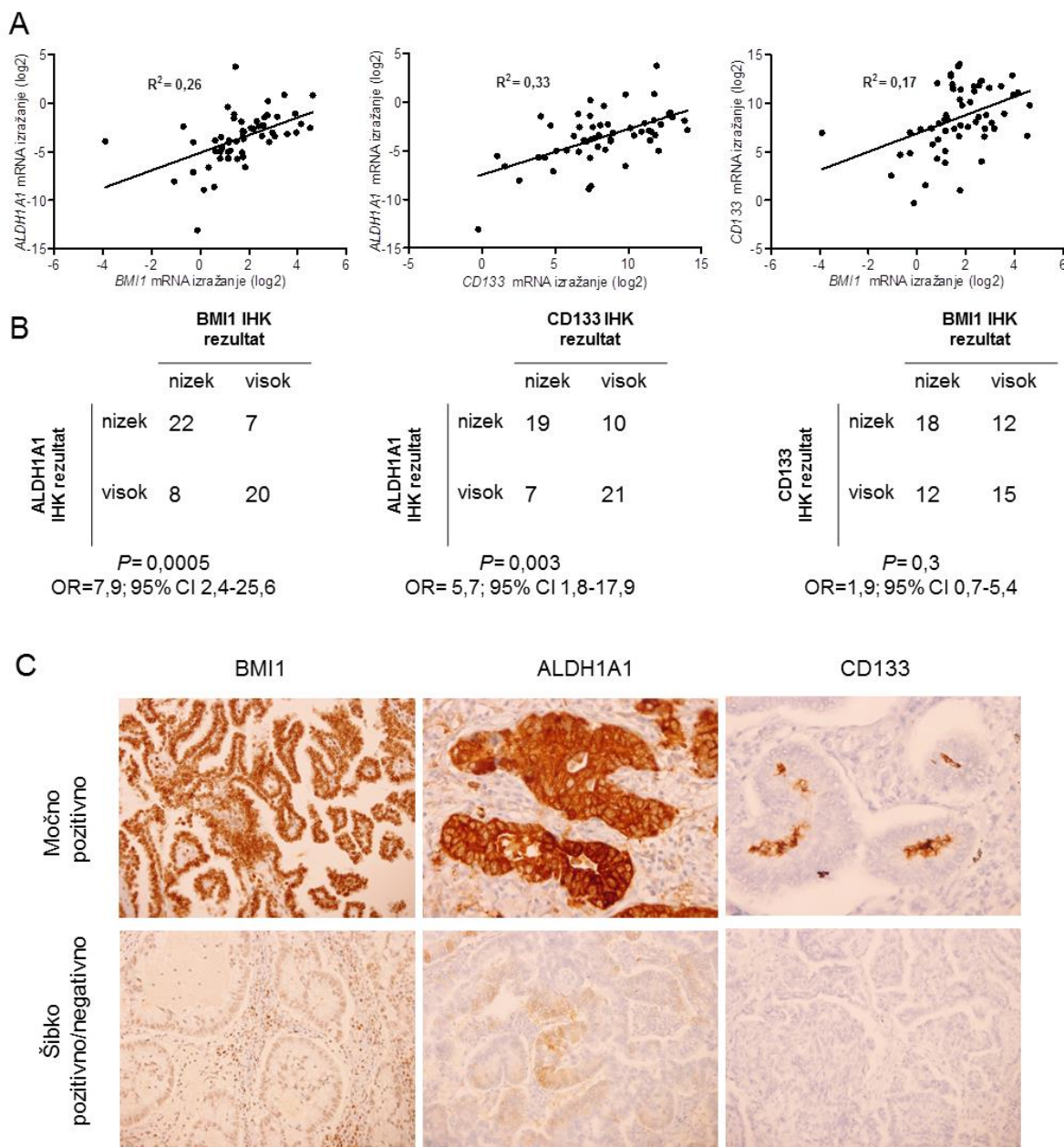
	PRIMARNI TUMOR						KRI					
	CD133	ALDH1A1	BMI1	TWIST1	EpCAM	KRT7	CD133	ALDH1A1	BMI1	TWIST1	EpCAM	KRT7
PRIMARNI TUMOR	CD133	$r_s=0,378$ ($P=0,03$)	$r_s=0,287$	$r_s=-0,205$	$r_s=0,250$	$r_s=0,148$	$r_s=-0,129$	$r_s=0,117$	$r_s=0,369$ ($P=0,04$)	$r_s=0,300$	$r_s=0,308$	$r_s=0,224$
	ALDH1A1		$r_s=0,638$ ($P=9 \times 10^{-5}$)	$r_s=-0,275$	$r_s=0,607$ ($P=2 \times 10^{-4}$)	$r_s=0,296$	$r_s=0,023$	$r_s=0,132$	$r_s=0,286$	$r_s=0,199$	$r_s=0,105$	$r_s=0,441$ ($P=0,01$)
	BMI1			$r_s=-0,125$	$r_s=0,676$ ($P=2 \times 10^{-5}$)	$r_s=0,538$ ($P=0,002$)	$r_s=-0,162$	$r_s=0,216$	$r_s=0,248$	$r_s=0,163$	$r_s=0,228$	$r_s=0,267$
	TWIST1				$r_s=-0,287$	$r_s=-0,004$	$r_s=0,078$	$r_s=0,039$	$r_s=0,070$	$r_s=0,150$	$r_s=-0,114$	$r_s=0,042$
	EpCAM					$r_s=0,51$ ($P=0,003$)	$r_s=0,063$	$r_s=-0,073$	$r_s=0,198$	$r_s=-0,021$	$r_s=0,159$	$r_s=0,168$
	KRT7						$r_s=0,176$	$r_s=0,174$	$r_s=0,261$	$r_s=-0,274$	$r_s=0,265$	$r_s=0,341$
KRI	CD133						$r_s=0,176$	$r_s=0,281$	$r_s=0,195$	$r_s=-0,002$	$r_s=-0,137$	
	ALDH1A1							$r_s=0,514$ ($P=0,003$)	$r_s=-0,059$	$r_s=0,146$	$r_s=0,098$	
	BMI1								$r_s=0,426$ ($P=0,02$)	$r_s=-0,357$ ($P=0,04$)	$r_s=0,277$	
	TWIST1									$r_s=-0,378$ ($P=0,03$)	$r_s=0,067$	
	EpCAM										$r_s=-0,096$	
	KRT7											

Preglednica 9: Povezave med izražanjem označevalcev v primarnem tumorju in polni krvi pri podskupini 19 bolnikov s ploščatoceličnim rakom pljuč

		PRIMARNI TUMOR						KRI					
		CD133	ALDH1A1	BMI1	TWIST1	EpCAM	KRT7	CD133	ALDH1A1	BMI1	TWIST1	EpCAM	KRT7
PRIMARNI TUMOR	CD133		$r_s=0,738$ ($P=2 \times 10^{-4}$)	$r_s=0,731$ ($P=3 \times 10^{-4}$)	$r_s=0,16$	$r_s=0,498$	$r_s=0,614$ ($P=0,004$)	$r_s=0,313$	$r_s=-0,002$	$r_s=0,272$	$r_s=0,023$	$r_s=0,395$	$r_s=0,037$
	ALDH1A1			$r_s=0,767$ ($P=8 \times 10^{-5}$)	$r_s=0,07$	$r_s=0,684$ ($P=0,001$)	$r_s=0,678$ ($P=0,001$)	$r_s=0,134$	$r_s=0,068$	$r_s=0,171$	$r_s=0,135$	$r_s=0,365$	$r_s=0,186$
	BMI1				$r_s=0,2$	$r_s=0,707$ ($P=5 \times 10^{-4}$)	$r_s=0,771$ ($P=7 \times 10^{-5}$)	$r_s=0,062$	$r_s=-0,060$	$r_s=0,427$ ($P=0,06$)	$r_s=0,181$	$r_s=0,144$	$r_s=0,253$
	TWIST1					$r_s=-0,091$	$r_s=0,114$	$r_s=-0,091$	$r_s=-0,105$	$r_s=0,244$	$r_s=-0,024$	$r_s=0,153$	$r_s=0,141$
	EpCAM						$r_s=0,708$ ($P=5 \times 10^{-5}$)	$r_s=0,045$	$r_s=-0,113$	$r_s=0,329$	$r_s=0,070$	$r_s=0,161$	$r_s=0,107$
	KRT7							$r_s=-0,050$	$r_s=0,189$	$r_s=0,080$	$r_s=-0,125$	$r_s=0,146$	$r_s=0,186$
KRI	CD133								$r_s=0,247$	$r_s=0,477$ ($P=0,03$)	$r_s=0,472$ ($P=0,04$)	$r_s=0,220$	$r_s=-0,242$
	ALDH1A1									$r_s=0,093$	$r_s=0,074$	$r_s=0,320$	$r_s=-0,021$
	BMI1										$r_s=0,460$ ($P=0,05$)	$r_s=0,035$	$r_s=0,133$
	TWIST1											$r_s=-0,281$	$r_s=0,300$
	EpCAM												$r_s=-0,477$ ($P=0,04$)
	KRT7												

4.3.3 Povezave med proteinskim izražanjem BMI1, CD133 in ALDH1A1 v primarnem tumorju

Za potrditev ugotovljenih statistično značilnih povezav med mRNA izražanjem označevalcev EMP in TMC v tumorju, določenih z RT-qPCR (Slika 9A), smo preverili povezave med proteinskim izražanjem BMI1, ALDH1A1 in CD133 z IHK barvanjem rezin tumorskega tkiva. V IHK evaluacijo je bilo vključenih vseh 57 vzorcev tumorjev. V skladu s postavljenimi mejami med visokim in nizkim izražanjem je bilo 28/57 (49,1 %) bolnikov pozitivnih za BMI1 izražanje, 27/57 (47,4 %) pozitivnih za CD133 izražanje in 28/57 (49,1 %) pozitivnih za ALDH1A1 izražanje. Izražanje BMI1 je bilo statistično značilno povezano z izražanjem ALDH1A1 ($P=5\times 10^{-4}$); 20/27 (74,1 %) vzorcev tumorjev, ki so močno izražali BMI1, je tudi močno izražalo ALDH1A1, medtem ko je 22/30 (73,3 %) vzorcev, ki so šibko/negativno izražali BMI1, tudi nizko izražalo ALDH1A1. Potrdili smo tudi statistično značilno povezavo med ALDH1A1 in CD133 ($P=0,003$); 21/31 (67,7 %) tumorjev, ki je močno izražalo ALDH1A1, je sočasno izražalo tudi CD133. Povezave med izražanjem BMI1 in CD133 na proteinskem nivoju nismo potrdili ($P=0,3$), kljub temu pa je 15/27 (55,6 %) vzorcev z visokim izražanjem BMI1 izražalo tudi CD133. (Slika 9B). Reprezentativne fotografije BMI1, ALDH1A1 in CD133 IHK barvanj so prikazane na Slika 9C.



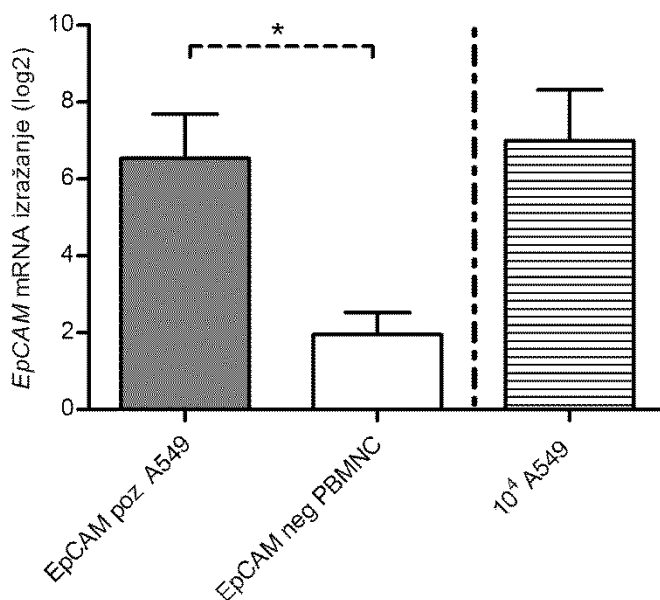
Slika 9: Povezave med izražanjem BMI1, ALDH1A1 in CD133 v primarnem tumorju

(A) Regresijske premice med mRNA izražanjem *BMI1*, *ALDH1A1* in *CD133*. (B) Povezave med proteinskim izražanjem BMI1, ALDH1A1 in CD133 (C) Reprezentativni rezultat imunohistokemijskega barvanja BMI1, ALDH1A1 in CD133 pri različnih intenzitetah reakcije (zgoraj: močno pozitivno; spodaj: šibko pozitivno/negativno).

4.4 GENSKO IZRAŽANJE OZNAČEVALCEV EMP IN TMC V CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELICAH

4.4.1 Učinkovitost izolacije CTC

Za oceno učinkovitosti metode izolacije CTC iz periferne krvi smo najprej naredili poskus, kjer smo znano število (10^4) A549 celic dodali v odvzeto kri zdravih darovalcev, iz katere smo nato izolirali EpCAM-pozitivne A549-podobne CTC. Povprečen izkoristek izolacije A549 iz krvi je bil 70 % (Slika 10).

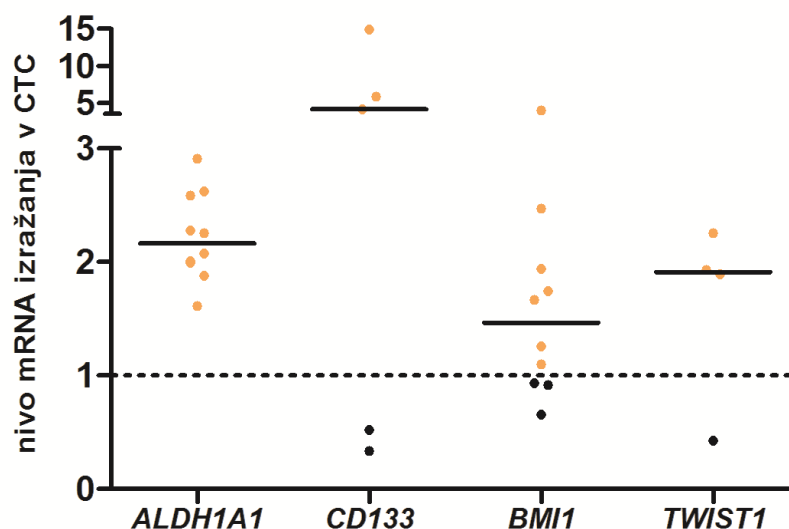


Slika 10: Preverjanje uspešnosti izolacije CTC

Učinkovitost smo določili z dodajanjem 10^4 A549 celic v kri zdravih darovalcev, iz katere smo nato izolirali A549-podobne cirkulirajoče tumorske celice (CTC). Učinkovitost izolacije je podana kot razmerje med genskim izražanjem *EpCAM* v izoliranih A549-podobnih CTC in 10^4 A549 celicah. Stolpčni grafikon je prikaz povprečja treh neodvisnih poskusov $\pm$ SD (* $P < 0,05$).

4.4.2 Gensko izražanje označevalcev EMP in TMC v CTC bolnikov

Povišano izražanje *EpCAM* mRNA v CTC smo ugotovili pri 10/13 (76,9 %) bolnikov z razsejanim NDRP (mediana 23,83; razpon 1,66–63,12); pri tej podskupini smo nato določili izražanje označevalcev TMC in EMP. Označevalca *ALDH1A1* in *BMI1* sta bila izražana v CTC vseh 10/10 (100 %) bolnikov, medtem ko sta bila označevalca *CD133* in *TWIST1* izražena v CTC 5/10 (50 %) in 4/10 (40 %) bolnikov. Izražanje *ALDH1A1* v CTC je bilo povišano pri 10/10 (100 %) bolnikov, *CD133* samo pri 3/10 (30 %) bolnikov, *BMI1* pri 7/10 (70 %) bolnikov in *TWIST1* pri 3/10 (30 %) bolnikov (Slika 11).



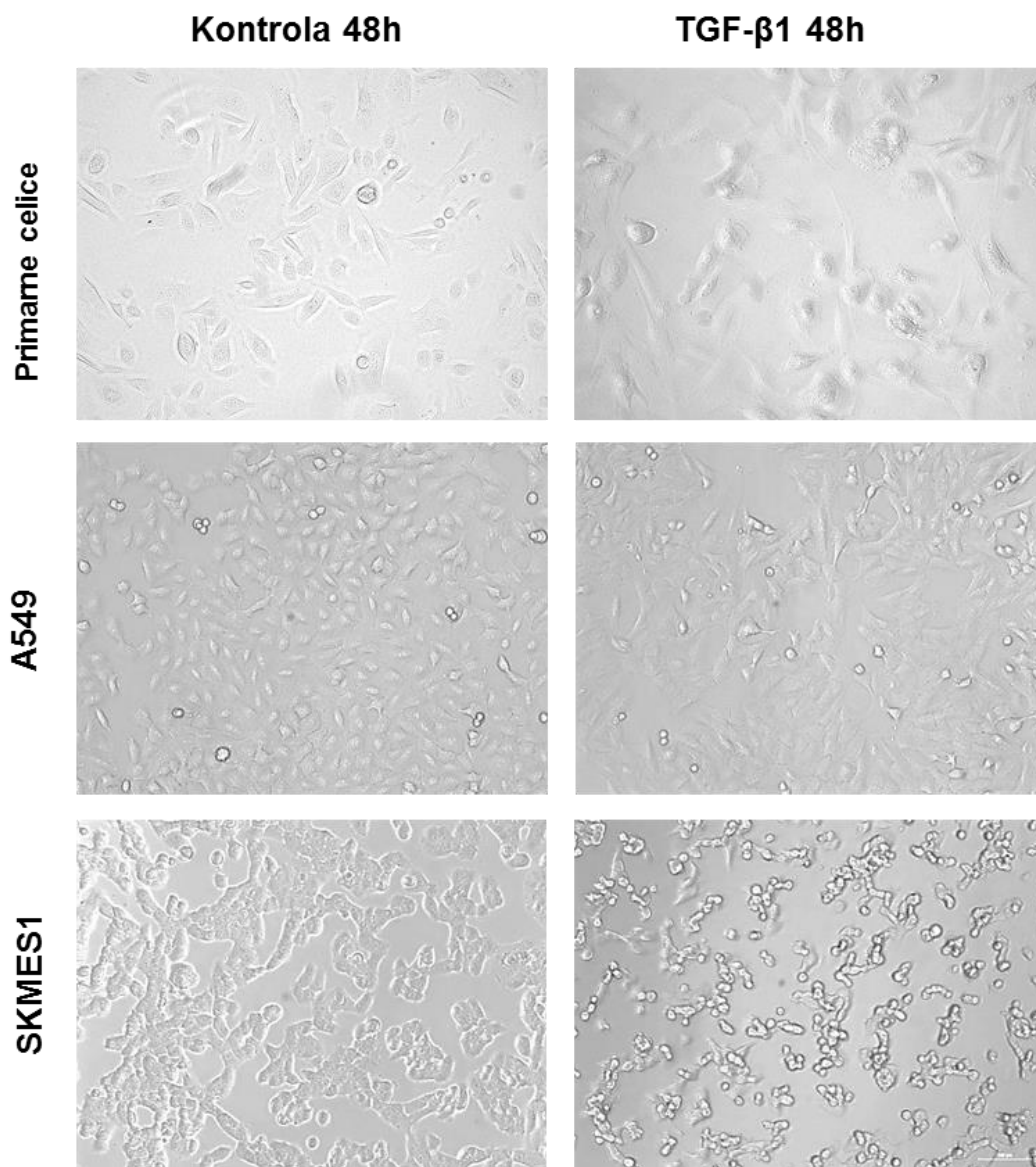
Slika 11: Izražanje označevalcev TMC in EMP v izoliranih CTC

mRNA izražanje označevalcev TMC (*ALDH1A1*, *CD133*) in EMP (*BMI1*, *TWIST1*) v EpCAM-pozitivnih CTC 10 bolnikov z razsejanim NDRP. Prekinjena črta prikazuje mRNA izražanje v perifernih mononuklearnih celicah. Z oranžno barvo so označeni bolniki, pri katerih je bilo izražanje posameznega transkripta v CTC povišano (>1).

Podatki so prikazani v obliki raztresenega grafikona, črta na sredini predstavlja mediano.

4.5 *IN VITRO* INDUKCIJA EMP V CELIČNIH KULTURAH

Z namenom proučiti odnos med EMP in TMC *in vitro* smo opazovali vpliv aktivacije EMP s TGF- β 1 na morfologijo, izražanje označevalcev EMP/TMC in invazivne lastnosti celic. Celični liniji A549 in SKMES1 ter primarna celična kultura NDRP so po 48 urah izpostavitve TGF- β 1 izgubile epitelne značilnosti in pridobile podolgovato fibroblastom podobno obliko, ki je značilna za mezenhimske celice (Slika 12).

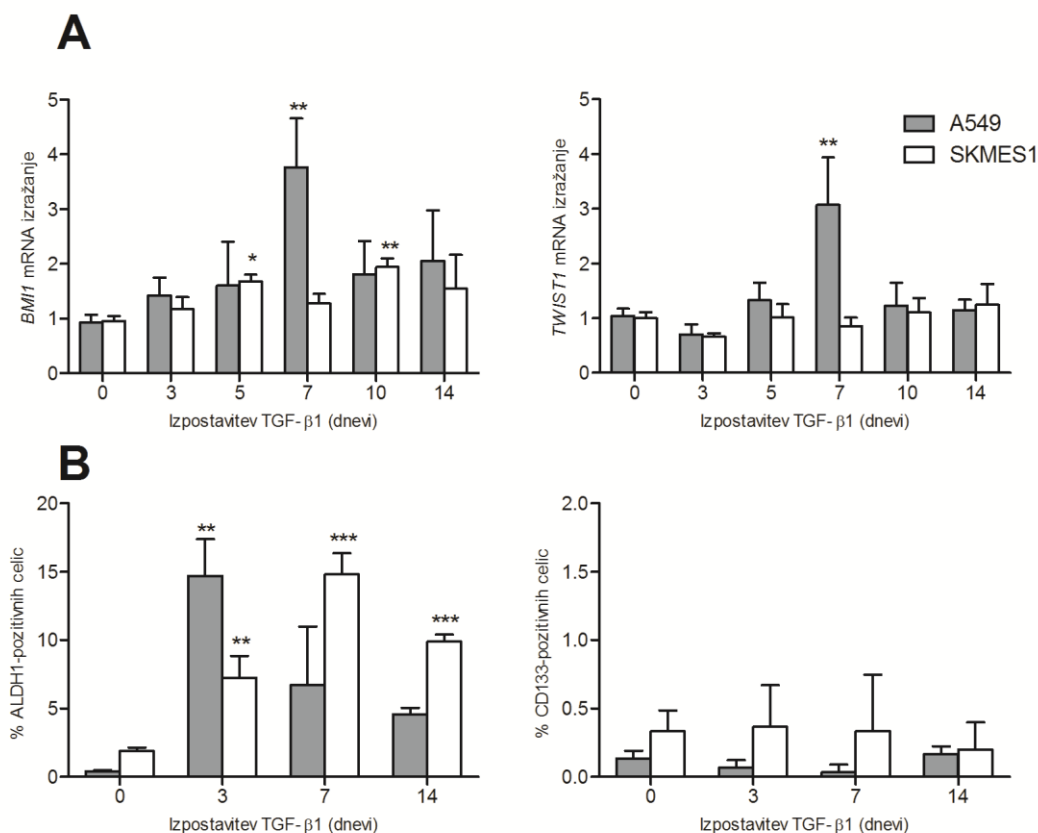


Slika 12: Vpliv TGF- β 1 na morfologijo celic

Vpliv indukcije EMP s TGF- β 1 na morfološke značilnosti primarnih celic NDRP in celičnih linij NDRP A549 ter SKMES1. Slike so posnete pri 100-kratni povečavi.

Celični liniji NDRP A549 in SKMES1 smo nato izpostavili TGF- β 1 3, 5, 7, 10 in 14 dni in opazovali spremembe v mRNA izražanju označevalcev EMP *BMI1* in *TWIST1* (RT-qPCR; po 3, 5, 7, 10 in 14 dneh) ter deležu celic, ki izražajo označevalce TMC CD133 in ALDH1A1 (pretočna citometrija; po 3, 7 in 14 dneh). Ugotovili smo, da aktivacija EMP s TGF- β 1 vpliva

na povišano izražanje *BMI1* v A549 (~3,8-krat po 7 dneh) in SKMES1 (~1,7-krat po 5 dneh in ~1,9-krat po 10 dneh) celicah. Podobno TGF- β 1 vpliva na povišano izražanje *TWIST1* v A549 (~3,1-krat po 7 dneh), ne pa tudi v SKMES1 celicah (Slika 13A). Sočasno je prišlo do statistično značilnega povečanja deleža ALDH1-pozitivnih celic v TGF- β 1 izpostavljenih celicah A549 (z 0,4 % na 14,7 % po 3 dneh) in SKMES1 (z 1,9 % na 14,8 % po 5 dneh), medtem ko pri nobeni izmed proučevanih celic nismo ugotovili razlik v deležu v CD133-pozitivnih celic (Slika 13B).

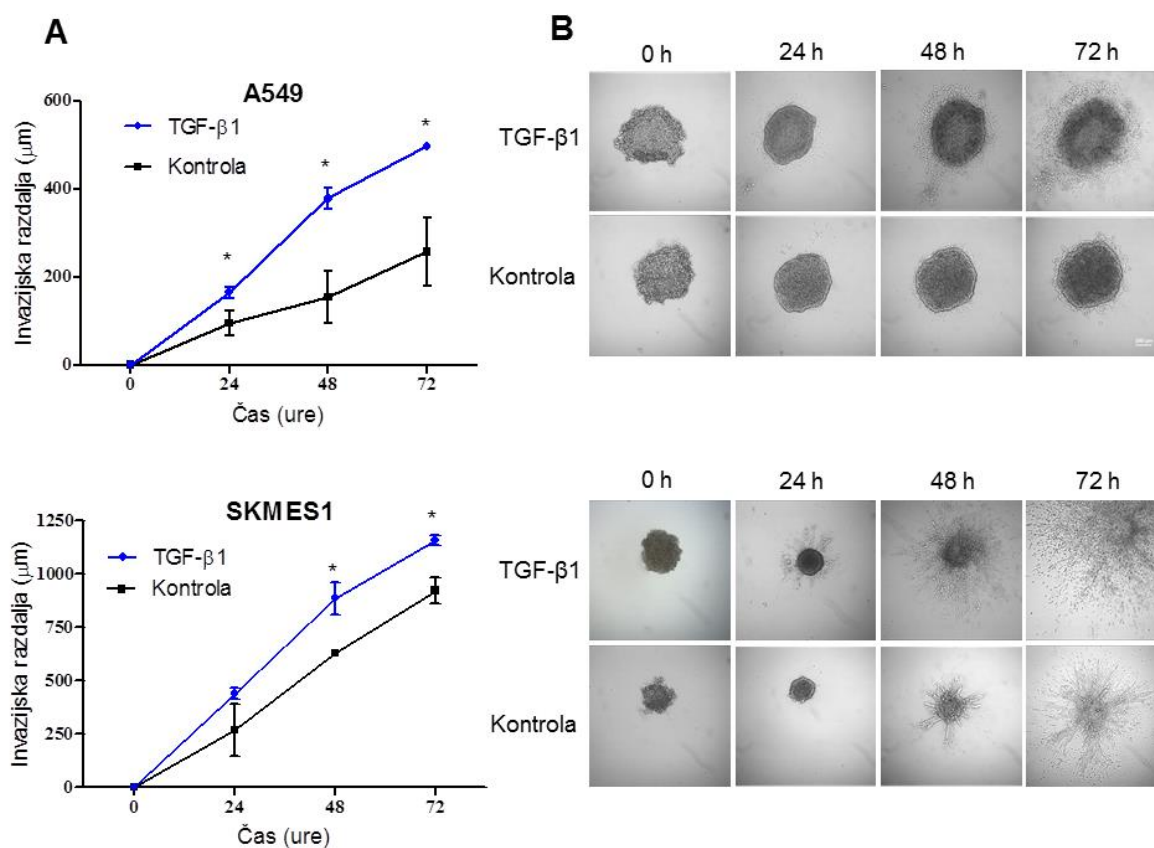


Slika 13: Vpliv TGF- β 1 na izražanje označevalcev EMP in TMC pri A549 in SKMES1 celicah

A) Spremembe v mRNA izražanju *BMI1* in *TWIST1* po 3, 5, 7, 10 in 14 dnevih izpostavitve celic TGF- β 1. B) Spremembe v deležu celic, ki izražajo ALDH1 in CD133 po 3, 7 in 14 dnevih izpostavitve TGF- β 1. Stolpčni grafikoni so prikaz povprečja treh neodvisnih poskusov $\pm$ standardni odklon (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$).

Povečane invazivne in migracijske sposobnosti tumorskih celic so ključnega pomena za zasevanje in posledično napredovanje bolezni. Vpliv aktivacije EMP s TGF- β 1 na migracijske

spodobnosti celic smo proučili s tridimenzionalnim (3D) sferoidnim testom, kjer smo sferoide iz A549 in SKMES1 celic vklopili v kolagenski matriks v prisotnosti/odsotnosti 5 ng/ml TGF- β 1 in opazovali migracijo celic iz sferoidov po 24, 48 in 72 urah kultivacije (Slika 14A). Ugotovili smo, da je TGF- β 1 statistično značilno vplival na povečano migracijsko sposobnost proučevanih celic. Povprečna invazijska razdalja v kolagenu po 72 urah izpostavitve TGF- β 1 se je povečala približno 3,5-krat v sferoidih iz A549 celic ($921 \pm 60 \mu\text{m}$; $256 \pm 7 \mu\text{m}$ v neizpostavljenih sferoidih) in 2-krat v izpostavljenih sferoidih iz SKMES1 celic ($1157 \pm 26 \mu\text{m}$; $496 \pm 5 \mu\text{m}$ v neizpostavljenih sferoidih) (Slika 14B).



Slika 14: Tridimenzionalni invazijski test sferoidov

(A) TGF- β 1 vpliva na povečano invazijo A549 in SKMES1 celic iz sferoidov. Točke na grafih predstavljajo povprečje treh neodvisnih poskusov $\pm$ standardni odklon (*, $P < 0.05$). (B) Faznokontrastne reprezentativne slike sferoidov ob različnih časih merjenja invazijske razdalje. Merilo na sliki predstavlja $200 \mu\text{m}$.

4.6 GENSKO IZRAŽANJE *BMI1* V KRVU IN IZID BOLEZNI

Ker smo v prvem delu raziskave ugotovili pozitivno statistično značilno povezavo med mRNA izražanjem *BMI1* v primarnem tumorju in izražanjem *BMI1* v periferni polni krvi bolnikov z operabilnim NDRP, smo v drugem delu raziskave preverili napovedni pomen mRNA izražanja označevalca EMP *BMI1* v krvi za odgovor na zdravljenje in prognozo bolnikov z razsejanim NDRP, ki so bili zdravljeni s KT prvega reda na osnovi platine.

4.6.1 Povezave med izražanjem *BMI1* in značilnostmi bolnikov

Izražanje *BMI1* mRNA v periferni polni krvi smo lahko določili pri vseh 96 v študijo vključenih bolnikih z razsejanim NDRP. Najprej smo analizirali možne povezave med izražanjem *BMI1* in kliničnimi značilnostmi bolnikov (Preglednica 10). Statistično značilnih povezav med izražanjem *BMI1* mRNA v krvi in proučevanimi klinično-patološkimi značilnostmi bolnikov oziroma tumorja (patološki tip, starost, spol, stanje zmogljivosti, kadilski status in število oddaljenih zasevkov) bolnikov z razsejanim NDRP nismo ugotovili (vsi $P \geq 0,05$).

Preglednica 10: Povezave med izražanjem *BMI1* in kliničnimi značilnostmi

Povezave med izražanjem *BMI1* mRNA v krvi in kliničnimi značilnostmi 96 bolnikov z razsejanim NDRP

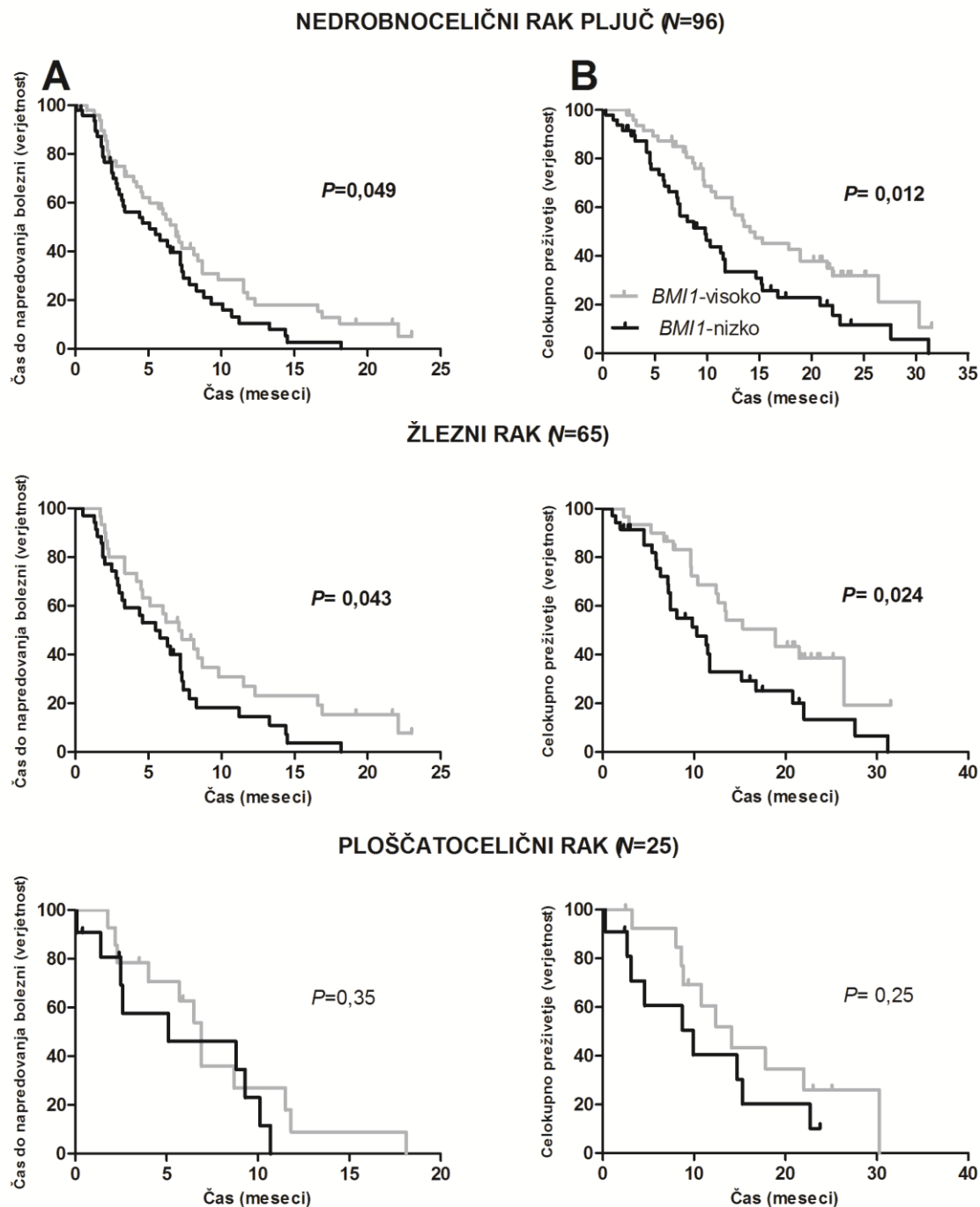
	<i>BMI1</i> -visoko N (%)	<i>BMI1</i> -nizko N (%)	<i>P</i> -vrednost
Starost			
≥60	28	28	<i>P</i> =0,839 ⁺
<60	19	21	
Spol			
Ženski	18	21	<i>P</i> =0,682 ⁺
Moški	29	28	
PS^a			
< 2	44	41	<i>P</i> =0,200 ⁺
≥ 2	3	8	
Histologija			
Žlezni rak	36	29	<i>P</i> =0,356 ⁺
Ploščatocelični rak	11	14	
Število oddaljenih zasevkov			
< 3	36	43	<i>P</i> =0,187 ⁺
≥ 3	11	6	
Zgodovina kajenja			
Da	43	39	<i>P</i> =0,572 ⁺
Ne	6	8	

^a lestvica za ocenjevanje bolnikove zmogljivosti East Cooperative Oncology Group

N: število bolnikov; ⁺Fischerjev natančni test

4.6.2 Povezave med izražanjem *BMI1* in izidi bolezni

Mediana sledenja bolnikov je bila 9,9 meseca (razpon: 1–31,5 meseca) Povezave med izražanjem *BMI1* in odgovorom na prvo linijo kemoterapije na osnovi platine nismo potrdili ($P=0,21$; Fischerjev natančni test). Ugotovili pa smo statistično značilne razlike v preživetju glede na mRNA izražanje *BMI1*. Analiza razlik med skupinama Log rank je pokazala, da so imeli bolniki z nizkim izražanjem *BMI1* statistično značilno krajšo mediano preživetja brez napredovanja bolezni po kemoterapiji na osnovi platine (5,1 proti 6,9 meseca; $P=0,049$) in statistično značilno krajšo mediano celokupnega preživetja (9,8 proti 14,1 meseca; $P=0,012$) od bolnikov z visokim izražanjem *BMI1* v krvi. Glede na izražanje *BMI1* (nizko izražanje proti visokemu izražanju) je bila pri žleznem raku mediana preživetja brez napredovanja bolezni 5,5 proti 7,1 meseca ($P=0,043$) in mediana celokupnega preživetja 10,3 proti 18,9 meseca ($P=0,02$) Pri ploščatoceličnem raku statistično značilne povezave med izražanjem *BMI1* in preživetjem nismo ugotovili; mediana preživetja brez napredovanja bolezni je bila 5,1 proti 6,9 meseca ($P=0,35$) in mediana celokupnega preživetja 9,9 proti 14,1 meseca ($P=0,25$) (Slika 15).



Slika 15: Preživetje brez napredovanja bolezni in celokupno preživetje glede na gensko izražanje *BMI1*
Kaplan-Meierjeve krivulje za (A) preživetje brez napredovanja bolezni po prvi liniji kemoterapije na osnovi platine (B) celokupno preživetje glede na izražanje *BMI1* mRNA v krvi pri žlezem in ploščatoceličnem raku pljuč.

Multivariatna Coxova regresijska analiza, prilagojena za starost, PS in število oddaljenih zasevkov, pa je pokazala, da je izražanje *BMI1* neodvisni napovedni dejavnik tako preživetja brez napredovanja bolezni (HR=2,959; 95 % CI:1,274-6,849; $P=0,012$) kot celokupnega preživetja (HR=7,937; 95 % CI: 2,604-24,39; $P<0,001$) (Preglednica 11).

Preglednica 11: Coxov regresijski model sorazmernega tveganja za preživetje brez napredovanja bolezni in celokupno preživetje

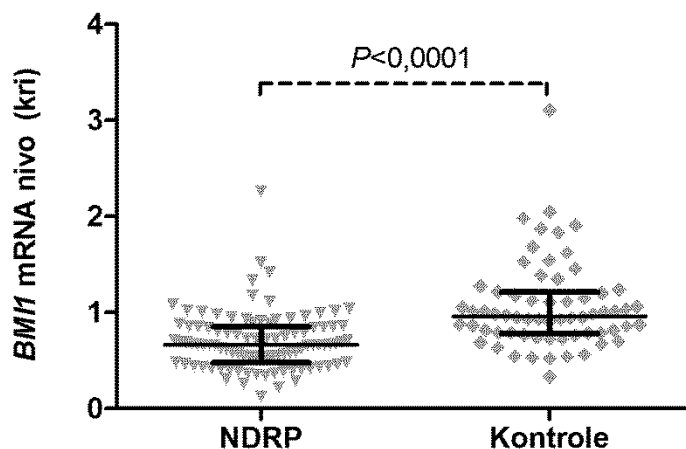
Spremenljivka	Preživetje brez napredovanja bolezni		Celokupno preživetje	
	UV <i>P</i> -vrednost HR (95% CI)	MV <i>P</i> -vrednost HR (95% CI)	UV <i>P</i> -vrednost HR (95% CI)	MV <i>P</i> -vrednost HR (95% CI)
<i>BMI1</i> mRNA izražanje	$P=0,006$ 3,484 (1,44-8,403)	$P=0,012$ 2,959 (1,274-6,849)	$P<0,001$ 9,433 (3,125-28,570)	$P<0,001$ 7,937 (2,604-24,390)
Starost (>60 proti ≤60)	$P=0,120$ 1,43 (0,909-2,252)	$P=0,268$ 1,293 (0,820-2,040)	$P=0,501$ 1,179 (0,729-1,908)	
Spol (M proti Ž)	$P=0,667$ 1,098 (0,707-1,706)		$P=0,428$ 0,822 (0,507-1,334)	
Histologija (žlezni proti ploščatocelični)	$P=0,591$ 1,149 (0,691-1,912)		$P=0,596$ 1,159 (0,675-1,992)	
PS^a (≥2 proti <2)	$P=0,001$ 3,332 (1,676-6,621)	$P=0,007$ 2,623 (1,306-5,269)	$P=0,001$ 3,043 (1,571-5,896)	$P=0,021$ 2,221 (1,126-4,380)
Št. oddaljenih zasevkov (≥3 proti <3)	$P=0,003$ 2,375 (1,348-4,184)	$P=0,007$ 2,198 (1,235-3,906)	$P=0,122$ 1,644 (0,875-3,095)	$P=0,038$ 1,969 (1,038-3,745)
Zgodovina kajenja (da proti ne)	$P=0,296$ 1,429 (0,732-2,786)		$P=0,531$ 1,257 (0,615-2,571)	

UV: univariatna analiza; MV: multivariatna analiza; HR: razmerje tveganja; CI: interval zaupanja

^a lestvica za ocenjevanje bolnikove zmogljivosti East Cooperative Oncology Group

4.6.3 Razlika v izražanju *BMI1* med bolniki in kontrolno skupino

Zaradi ugotovljenega značilno negativnega vpliva nizkih vrednosti *BMI1* v periferni krvi na preživetje smo izražanje *BMI1* v krvi bolnikov z razsejanim NDRP nato še primerjali s kontrolno skupino, ki jo je sestavljajo 64 oseb brez rakavega obolenja. Mediana izražanja *BMI1* pri bolnikih z NDRP je bila 0,633 (razpon 0,129–2,260) in pri kontrolah 0,958 (razpon 0,327–3,103). Nivo izražanja *BMI1* v krvi bolnikov z razsejanim NDRP je bil v primerjavi s kontrolami statistično značilno nižji ($P<0,0001$) (Slika 16).



Slika 16: Izražanje *BMI1* v krvi pri 96 bolnikih z razsejanim NDRP in 64 kontrolah

Podatki so prikazani kot razpršeni točkovni grafikon, črta na sredini predstavlja mediano, razpon pa interkvartilni razpon.

5 RAZPRAVA

Za tumorsko tkivo raka pljuč je značilna velika tkivna heterogenost (Tan in sod. 2014), kar je posledica specifičnih celičnih populacij rakavih celic, ki različno prispevajo k vzdrževanju tumorske mase, malignosti in zmožnosti celic, da kolonizirajo okolno normalno tkivo (Pardal in sod. 2003). Predvidevajo, da so za fenotipsko in funkcionalno različnost tumorjev odgovorne TMC (Reya in sod. 2001). Aktivacija EMP se pri raku povezuje s pridobitvijo visoke zmožnosti zasevanja tumorskih celic (Thiery in sod. 2009) in pridobitvijo lastnosti TMC (Mani in sod. 2008). V naši raziskavi smo na nivoju tumorskega tkiva, krvi in celičnih kultur proučili povezanost med TMC in EMP pri NDRP in preverili napovedni pomen izražanja izbranega označevalca EMP/TMC v krvi za izid bolezni bolnikov.

5.1 Primarni tumorji NDRP vsebujejo različne deleže TMC

Z določanjem deleža CD133-pozitivnih in ALDH1-pozitivnih TMC v celičnih suspenzijah primarnih tumorjev smo ugotovili, da je za tumorsko tkivo NDRP značilna medtumorska heterogenost, saj so se tumorska tkiva bolnikov razlikovala v deležu CD133-pozitivnih in ALDH1-pozitivnih TMC. Celično izražanje membranskega proteina CD133 in znotrajcelična encimska aktivnost aldehidne dehidrogenaze (ALDH) sta uveljavljena molekularna označevalca TMC raka pljuč (Kitamura in sod. 2009). Glede na njuno izražanje je v eksperimentalnih pogojih mogoča izolacija celic, ki rastejo v obliki tumorskih sfer, izražajo gene, ki so povezani z vzdrževanjem nediferenciranega stanja, so odporne na različna kemoterapevtska zdravila in sprožijo rast novih tumorjev po transplantaciji v testne živali (Eramo in sod. 2008; Bertolini in sod. 2009; Jiang in sod. 2009). Ugotovili smo, da primarni tumorji NDRP vsebujejo 0,01–7,59 % (mediana 2,23 %) CD133-pozitivnih celic, kar je primerljivo z rezultati Bertolinija in sod. (2009), ki so opisali, da CD133-pozitivne celice predstavljajo 0,02 % do 3,5 % vseh celic v tumorju, medtem ko 60 % vzorcev tumorjev vsebuje manj kot 2 % CD133-pozitivnih celic. Ugotovili smo tudi, da primarni tumorji NDRP vsebujejo 0,31–38,8 % (mediana 2,23 %) ALDH1-pozitivnih celic, kar je primerljivo z

rezultatom Sullivana in sod. (2010b), ki so poročali o deležu 2–30 % ALDH1-pozitivnih celic v tumorskem tkivu NDRP.

5.2 Izražanje označevalcev EMP in TMC v primarnem tumorju in krvi bolnikov z NDRP je povezano

Rezultati različnih *in vitro* študij pri raku pljuč so pokazali, da EMP vpliva na nastanek lastnosti TMC (Pirozzi in sod. 2011; Akunuru in sod. 2012; Shien in sod. 2013; Gomez-Casal in sod. 2013), podatki o povezanosti EMP in TMC na vzorcih bolnikov z rakom pljuč pa so zelo omejeni. V raziskavi smo ugotavljali povezave med genskim izražanjem izbranih molekularnih označevalcev EMP in TMC v primarnem tumorju in periferni polni krvi bolnikov z operabilnim NDRP. V tumorju in krvi smo ugotovili statistično značilno povezavo med mRNA izražanjem transkripcijskega dejavnika aktivacije EMP *BMI1* in označevalcev TMC *CD133* in *ALDH1A1*, iz česar sklepamo, da je BMI1 povezan s TMC raka pljuč, ki so prisotne tako v tumorskem tkivu kot v krvi bolnikov z NDRP. Povečano izražanje BMI1 v CD133-pozitivnih TMC je bilo predhodno že pokazano v primarnih celicah in tumorskih vzorcih bolnikov z glioblastoma multiforme (Abdouh in sod. 2009). Rezultati študij pri drugih rakih so potrdili izražanje BMI1 v CD44-pozitivnih celicah ploščatoceličnega raka glave in vratu (Prince in sod. 2007) in v CD49f Sca-1-dvojno pozitivnih TMC raka prostate (Lukacs in sod. 2010). Raziskave na celičnih in živalskih modelih (raka) pljuč so pokazale, da BMI1 deluje kot regulator samoobnavljanja domnevnih pljučnih epiteljskih matičnih celic in ima ključno vlogo pri razvoju pljučnih tumorjev (Dovey in sod. 2008). Rezultati več študij so že pokazali, da je izražanje BMI1 proteina v primarnem tumorskem tkivu raka pljuč spremenjeno (Vonlanthen in sod. 2001; Vrzalikova in sod. 2008; Kikuchi in sod. 2010), po našem vedenju pa rezultati naše raziskave predstavljajo prvi dokaz, da je BMI1 povezan s TMC bolnikov z rakom pljuč. V tumorju smo ugotovili tudi statistično značilno povezavo med izražanjem *BMI1* in označevalcev *EpCAM* in *KRT7*, kar kaže na to, da imajo celice, ki izražajo *BMI1*, epitelne značilnosti. Predvidevamo, da se v začetnih stopnjah EMP izražanje mezenhimskih in epitelnih označevalcev ne izključujeta; to razlago potrjujejo tudi rezultati Pirozzi in sod.

(2013), ki so pokazali sočasno izražanje EpCAM in mezenhimskega označevalca CD90 v približno 10 % primarnih tumorskih celic bolnikov z NDRP.

Nasprotno z ugotovljeno povezavo med izražanjem *BMI1* in označevalci TMC pa nismo ugotovili povezave med izražanjem EMP označevalca *TWIST1* in označevalcema TMC *CD133* in *ALDH1A1*. Ta rezultat je nasproten rezultatom Padin-Iruegas in sod. (2013), ki so dokazali pozitivno povezavo med izražanjem *TWIST1* in *CD133* v krvi pri majhni skupini 28 bolnikov z rakom debelega črevesa. V objavljeni literaturi nismo zasledili nobenih podatkov o povezanosti izražanja *TWIST1* z označevalci TMC pri bolnikih z rakom pljuč, zasledili pa smo podatek o ugotovljeni povezavi med izražanjem *TWIST1* in označevalcem EMP N-kadherin v primarnem tumorju NDRP (Hui in sod. 2013). Naši rezultati prav tako niso pokazali povezave med izražanjem EMT regulatorjev *BMI1* in *TWIST1* v primarnem tumorju. Ta rezultat nas je presenetil, saj so na celičnih kulturah raka glave in vratu že pokazali, da sta *BMI1* in *TWIST1* vzajemno pomembna za aktivacijo EMP na način, da *TWIST1* neposredno uravnava izražanje *BMI1* (Yang in sod. 2010). Po drugi strani smo v krvi potrdili statistično značilno povezavo med izražanjem *BMI1* in *TWIST1*, kar kaže na prisotnost celic z mezenhimijskimi značilnostmi v periferni polni krvi bolnikov z NDRP. Slednji rezultat je tako v skladu z že objavljeno literaturo o medsebojni povezanosti med *BMI1* in *TWIST1*.

Analiza povezav med izražanjem označevalcev v tumorju in krvi pri žlezem in ploščatoceličnem raku je pokazala določene razlike v statistični značilnosti ugotovljenih povezav. Vzrok za to bi lahko bile različne molekularne značilnosti histoloških podtipov NDRP, ki bi se lahko odražale tudi v tem, da je povezava med EMP in TMC bolj močno izražena pri ploščatoceličnem raku. Možen razlog za ugotovljene razlike bi lahko bil tudi manjše število bolnikov v posamezni podskupini, kar bi lahko vodilo v izgubo statistične značilnosti ugotovljenih povezav (širši interval zaupanja zaradi manjšega števila opazovanih primerov v posamezni skupini). Za potrditev potencialnih razlik med histološkimi podtipi bi bilo tako potrebno v analizo vključiti dovolj velika vzorca posameznih histologij.

Z analizo proteinskega izražanja smo uspeli potrditi soizražanje BMI1 in ALDH1A1 ter CD133 in ALDH1A1 v primarnem tumorju, nismo pa potrdili soizražanja BMI1 in CD133 v tumorju. Možen razlog za to neskladje bi lahko bil v majhnem deležu CD133-pozitivnih celic, ki so prisotne v tumorju, kar je pokazal tudi naš ugotovljen rezultat deleža CD133-pozitivnih celic v primarnem tumorju, določen s pretočno citometrijo. Najverjetnejši razlog za dobljene razlike med genskim in proteinskim nivojem v naši raziskavi bi lahko bil v dejstvu, da je RT-qPCR občutljivejša metoda za detekcijo majhnega števila pozitivnih celic kot IHK.

CTC smo izolirali pri bolnikih z razsejano obliko bolezni, kjer je tumorsko breme največje in število prisotnih CTC v primerjavi z operabilno obliko večje. Za ta pristop smo se odločili, ker smo domnevali, da bomo pri njih lahko izolirali zadostno število CTC za molekularno analizo. CTC smo izolirali glede na izraženost epitelne molekule EpCAM na površini celic, ki je najpogosteje uporabljen pristop za izolacijo CTC (Allard in sod. 2004). V izoliranih CTC smo pri večini bolnikov določili mRNA izražanje označevalcev *BMI1* in *ALDH1A1*, le manjše število bolnikov je v izoliranih CTC izražalo označevalca *CD133* in *TWIST1*. Rezultat pridobljen na CTC je skladen z rezultatom analize pridobljene na polne krvi operabilnih bolnikov, kjer smo ugotovili statistično značilno povezavo med izražanjem *CD133* in *TWIST1*, medtem ko smo opazili trenda proti pozitivni povezavi med izražanjem *EpCAM* in *ALDH1A1* ($P=0,04$) in negativni povezavi med *TWIST1* in *EpCAM* ($P=0,02$). Zavedamo se, da smo z našo metodo izolacije CTC, ki je temeljila na izraženosti EpCAM, zgrešili podpopulacijo CTC z mezenhimijskimi značilnostmi (Aktas in sod. 2009), vendar bi se njihova prisotnost lahko zrcalila v povezavah, ki smo jih ugotovili z analizo polne krvi. Izražanje *ALDH1A1* v CTC je mogoče razložiti z znano dvojno vlogo EpCAM kot celična adhezijska molekula in tudi receptor, ki je vpleten v vzdrževanje fenotipa TMC skozi Wnt signalno pot (Yamashita in sod. 2007; Munz in sod. 2009). Izražanje EMT označevalcev *BMI1* in *TWIST1* v EpCAM-pozitivnih CTC bi lahko bila posledica tega, da so CTC zmožne dinamično prehajati med epitelnim in mezenhimijskim stanjem (Yu in sod. 2013) ali celo istočasno izražati epitelne in mezenhimijske označevalce (Lecharpentier in sod. 2011; Armstrong in sod. 2011).

5.3 *In vitro* aktivacija EMP vpliva na TMC in invazijo celic

Povezanost EMP in TMC smo proučili tudi z *in vitro* poskusom, kjer smo primarno celično kulturo NDRP in celični liniji NDRP A549 in SKMES1 izpostavili TGF- β 1, ki je poznan induktor EMP (Xu in sod. 2009). Ugotovili smo, da je TGF- β 1 vplival na morfologijo proučevanih celic, saj so le-te izgubile epitelne značilnosti ter pridobile podolgovato fibroblastom podobno obliko, kar je v soglasju s predhodno objavljenimi študijami pri raku pljuč (Pirozzi in sod. 2011; Chen in sod. 2012). Naprej smo ugotovili, da izpostavitve A549 in SKMES1 celic TGF- β 1 vpliva na povečano mRNA izražanje *BMI1* in povečevanje deleža celic, ki imajo encimsko aktivnost ALDH1. Analiza izražanja CD133 s pretočno citometrijo ni pokazala razlik med celicami izpostavljenimi TGF- β 1 in neizpostavljeno kontrolo. Povečevanje v deležu ALDH1-pozitivnih celic, merjeno s testom Aldefluor, je v skladu s predhodno objavljenimi rezultati Akunuru in sod. (2012), v nasprotju z njimi pa v naši raziskavi nismo ugotovili statistično značilnega povečanja CD133-pozitivnih celic po izpostavitvi TGF- β 1. Ta rezultat je skladen s Pirozzi in sod (2011), ki podobno niso ugotovili razlik v izražanju CD133 proteina, določenega s pretočno citometrijo.

Povečanje invazijskih in migracijskih sposobnosti tumorskih celic je ključnega pomena za razsoj bolezni. Rezultati tridimenzionalnega invazijskega testa sferoidov so pokazali, da so bile invazijske sposobnosti A549 in SKMES1 celic, ki so bile izpostavljene TGF- β 1, v primerjavi z neizpostavljeno kontrolo povišane, kar potencialno kaže na to, da imajo z EMP aktivirane celice večjo sposobnost zasevanja. Ta rezultat se ujema z rezultatom druge raziskave, kjer je podobno že bilo pokazano, da aktivacija EMP s TGF- β 1 vpliva na povečane migracijske lastnosti A549 celic (Tirino in sod. 2013).

5.4 Izražanje *BMI1* v krvi napove izid bolezni bolnikov z razsejanim NDRP

V okviru prvega dela raziskave smo opazili tudi pozitivno statistično značilno povezavo med izražanjem *BMI1* v primarnem tumorju in izražanjem *BMI1* v krvi bolnikov z operabilnim NDRP, kar nakazuje na možen pomen izražanja *BMI1* pri razvoju in napredovanju NDRP. V objavljeni literaturi nismo našli raziskave, ki bi primerjala ravni izražanja med periferno krvjo in primarnim tumorskim tkivom pri pljučnem raku. S kliničnega vidika bi spremljanje genskega izražanja *BMI1* v periferni krvi lahko predstavljalo neinvaziven način za sprotno spremljanje poteka bolezni, kar smo preverili v drugem delu raziskave.

V nasprotju s pričakovanji nismo ugotovili povezave med izražanjem *BMI1* v krvi in številom oddaljenih zasevkov; razlog za to bi lahko bil v majhnem številu bolnikov v podskupini z več kot tremi oddaljenimi zasevki. Vendar tudi Silva in sod. (2007) niso ugotovili povezave med izražanjem *BMI1* mRNA v plazmi 111 bolnic z rakom dojke in stopnjo bolezni oziroma prisotnostjo zasevkov (Silva in sod. 2007). Nasprotno so Zhang in sod. (2012) uspeli potrditi povezavo med izražanjem *BMI1* mRNA v plazmi 109 bolnic z rakom materničnega vratu in stadijem bolezni oziroma njeno razširjenostjo. Pričakovano nismo ugotovili povezav med izražanjem *BMI1* in starostjo, spolom ali kadilskim statusom. Ugotovili smo tudi, da ni razlik v izražanju *BMI1* med bolniki z žleznim ali ploščatoceličnim rakom pljuč. Raziskave, ki bi primerjala nivo izražanja *BMI1* v krvi med posameznimi histološkimi podtipi raka pljuč, v objavljeni literaturi še nismo zasledili, rezultat analize izražanja *BMI1* proteina v tumorskem tkivu pa je pokazal, da se izražanje *BMI1* pri žleznem in ploščatoceličnem raku ne razlikuje (Vrzalikova in sod. 2008).

Ugotovili pa smo statistično značilno povezavo med znižanimi vrednostmi *BMI1* v krvi in krajšim preživetjem bolnikov z NDRP, ki so zdravljeni s kemoterapijo prvega reda na osnovi platine. To je bilo v nasprotju z našimi pričakovanji in splošnim prepričanjem, da je visok nivo izražanja *BMI1* v tumorskem tkivu povezan s slabšo prognozo in povečano agresivnostjo tumorjev (Glinsky in sod. 2005). Natančnejši pregled literature je pokazal, da je izražanje

BMI1 pri posameznih tipih raka specifično deregulirano. Povečano proteinsko izražanje BMI1 v tumorskem tkivu je povezano s krajšim preživetjem bolnikov z rakom jeter in želodca (Liu in sod. 2008; Wang in sod. 2008). Podobno je bilo pokazano, da ima povišano izražanje proste *BMI1* mRNA v plazmi neugoden napovedni pomen za bolnice z rakom materničnega vratu ali dojke (Zhang in sod. 2012; Silva in sod. 2007). Nasprotno sta dve veliki raziskavi pri raku dojke pokazali, da je povišano proteinsko izražanje BMI1 v tumorju povezano z ugodno prognozo bolnic (Choi in sod. 2009; Pietersen in sod. 2008), podobno pa so pokazali tudi pri bolnikih z glioblastomom (Cenci in sod. 2012). Ta rezultat podpira tudi podatek, da je izražanje BMI1 pri raku dojke povezano z manjšo pojavnostjo p53 mutacij (Pietersen in sod. 2008) nediferenciranim stanjem in nizko proliferativno aktivnostjo (Arnes in sod. 2008). Rezultati raziskav pri raku pljuč do zdaj še niso ugotovili povezave med izražanjem BMI1 proteina v tumorju in celokupnim preživetjem (Kikuchi in sod. 2010; Vonlanthen in sod. 2001; Vrzalikova in sod. 2008), znano pa je, da je znižano izražanje PcG genov, kamor se uvršča BMI1, povezano s slabšo diferenciacijo tumorjev in neugodno prognozo bolnikov (Hassan in sod. 2009), kar se ujema z našimi rezultatom analize preživetja in kaže na specifično biološko vlogo BMI1 pri raku pljuč. Skladno z rezultati preživetja pri naših bolnikih smo opazili tudi znižano izražanje *BMI1* v krvi bolnikov z NDRP v primerjavi s kontrolno skupino, kar kaže na to, da je znižan *BMI1* v krvi povezan z onkogenezo.

Če povežemo glavni spoznanji raziskave, ugotovimo, da je izražanje regulatorja EMP *BMI1* v tumorju in krvi povezano z izražanjem označevalcev TMC *CD133* in *ALDH1A1*. Po drugi strani so znižane vrednosti *BMI1* mRNA v krvi povezane z značilno slabšim preživetjem bolnikov z NDRP. Vse ugotovljeno potrjuje našo tezo, da so označevalci EMP povezani s TMC in agresivnostjo raka pljuč. V okviru raziskave smo izražanje *BMI1*, *CD133* in *ALDH1A1* določili tudi v vzorcih tumorjev in normalnih pljuč in presenetljivo ugotovili, da je izražanje označevalcev *BMI1* in *ALDH1A1* v primarnem tumorju statistično značilno nižje kot v normalnem pljučnem tkivu ($P < 0,001$), medtem ko smo opazili trend proti nižjemu izražanju *CD133* v tumorju. Glede na dobljene rezultate predvidevamo, da obstaja povezava med izražanjem označevalcev BMI1, CD133 in ALDH1A1, vendar so znižane in ne povišane

vrednosti omenjenih označevalcev povezane z onkogenezo ter z napredovanjem NDRP. Ob pregledu novejših literature smo našli nekaj raziskav, ki podpirajo naše izsledke. Nizko proteinsko izražanje ALDH1 v tumorskem tkivu NDRP je povezano z večjim številom oddaljenih zasevkov (Kirita in sod. 2013), slabšo diferenciacijo in visoko proliferacijsko aktivnostjo tumorja (Okudela in sod. 2013) in krajšim preživetjem bolnikov (Dimou in sod. 2012; Sung in sod. 2015). Zanimivo so Kirita in sod. (2013) opazili, da je nižje izražanje ALDH1A1 povezano z nižjim izražanjem E-kadherina, na podlagi česar so predlagali, da znižane vrednosti ALDH1A1 v tumorju sprožijo EMP (Kirita in sod. 2013). Podobno so tudi ugotovili, da je nizko izražanje ALDH1A1 v tumorju povezano z visokim izražanjem mezenhimskega označevalca Vimentina (Sung in sod. 2015).

Naša raziskava ima določene omejitve, na katere moramo biti pozorni pri interpretaciji rezultatov. Tumorsko tkivo je pogosto heterogeno, zato lahko samo mesto vzorčenja vpliva na rezultat. Vzorci tkiva, ki smo ga uporabili z izolacijo RNA, so bili majhni in izrezani iz samo enega predela tumorja. Ker je za TMC značilna plastičnost in ker se EMP pojavlja v različnih delih tumorja, bi bilo mogoče, da bi z vzorčenjem na več mestih pridobili bolj celosten rezultat o izraženosti proučevanih molekularnih označevalcev v tumorskem tkivu in o tem, kako sta EMP in TMC povezana. To omejitev smo delno premostili z večkratnim vzorčenjem pri izdelavi tkivnih mikromrež za IHK analizo. CTC smo izolirali pri podskupini bolnikov z razsejanim NDRP, kjer je bilo tumorsko breme v primerjavi z operabilnimi bolniki večje. Zanimivo bi bilo opazovati izražanje proučevanih označevalcev tudi v CTC bolnikov z operabilnim NDRP in primerjati njihovo izražanje v polni krvi z izražanjem v CTC. Znano je namreč, da naši proučevani označevalci niso tumorsko specifični, ampak so izraženi tudi v normalnih krvnih (matičnih) celicah. CD133 je izražen v endotelijskih predniških celicah (Peichev in sod. 2000), ALDH izražajo tudi hematopoetske predniške celice (Kastan in sod. 1990), mezenhimske matične celice pa izražajo TWIST1 (Isenmann in sod. 2009). Znano je tudi, da je BMI1 močno izražen v limfocitnih populacijah (Vrzalikova in sod. 2008). Epitelna označevalca EpCAM in KRT7 sta lahko izražena tudi v cirkulirajočih netumorskih celicah, ki izvirajo iz organov epitelnega izvora. Dodatno bi bilo potrebno razpoznati in validirati tudi

mejno vrednost za razlikovanje med visokim in nizkim izražanjem *BMI1*. Navsezadnje smo se v okviru naše raziskave omejili na proučevanje povezav med šestimi izbranimi molekularnimi označevalci, zavedamo se, da bi bilo za boljšo opredelitev odnosa med EMP in TMC uporabiti večji nabor označevalcev TMC in EMP.

V prihodnjih raziskavah je potrebno pridobiti dodaten vpogled v molekularne mehanizme, ki bodo pojasnili, kako *BMI1* regulira TMC ter opredeliti natančnejšo vlogo *BMI1* pri poteku bolezni. Boljše razumevanje odnosa med EMP in TMC bi v zaključni fazi lahko privedlo do razvoja novih pristopov za zdravljenje, ki bi temeljili na odstranjevanju TMC skozi selektivno blokado EMP, kar bi se odražalo v daljšem preživetju bolnikov.

6 ZAKLJUČKI

Na podlagi proučevanja povezav med označevalci EMP in TMC lahko zaključimo naslednje:

- V primarnem tumorju in periferni polni krvi bolnikov z NDRP so na nivoju mRNA izraženi in z RT-qPCR določljivi označevalci EMP (*BMI1*, *TWIST1*), TMC (*CD133*, *ALDH1A1*) in epitelnih celic (*EpCAM*, *KRT7*).
- Izražanje označevalca EMP *BMI1* v tumorju in krvi je povezano z izražanjem označevalcev TMC *CD133* in *ALDH1A1*. Povezava med izražanjem *BMI1* in TMC v tumorju je potrjena na mRNA in proteinskem nivoju. Nasprotno izražanje drugega označevalca EMP *TWIST1* ni povezano z izražanjem označevalcev TMC. Izražanje *BMI1* v tkivu primarnega tumorja je povezano z izražanjem *BMI1* v krvi. Zaključujemo, da ima *BMI1* pomembno vlogo pri uravnavanju matičnih lastnosti tumorskih celic in je potencialno vpleten v širjenje bolezni po krvnem obtoku.
- Izolirane CTC bolnikov z razsejanim NDRP izražajo označevalce EMP in TMC, kar kaže na vpletenost obeh procesov pri zasevanju raka pljuč.
- *In vitro* aktivacija EMP s TGF- β 1 v celičnih kulturah raka NDRP vpliva na izgubo epitelne morfologije in pridobitev mezenhimske značilnosti celic, povišano izražanje *BMI1* in povečanje deleža ALDH-pozitivnih TMC. Aktivacija EMP je povezana s povečanimi invazijskimi sposobnostmi tumorskih celic.

Navedeni zaključki tako vodijo v potrditev prve postavljene hipoteze, da sta TMC in EMP pri NDRP povezana.

Na podlagi proučevanja pomena izražanja *BMI1* v polni krvi za napovedovanje izidov bolezni bolnikov z razsejanim NDRP lahko zaključimo naslednje:

- Nizko izražanje *BMI1* ima neodvisen napovedni pomen za krajši čas do napredovanja bolezni po zdravljenju s kemoterapijo na osnovi platine in krajše celokupno preživetje bolnikov.
- Izražanje *BMI1* v krvi bolnikov z NDRP je v primerjavi s kontrolno skupino znižano.

Ti zaključki tako vodijo v potrditev druge postavljene hipoteze, da izražanje EMT označevalca v periferni krvi lahko napove izid bolezni pri razsejanem NDRP.

7 LITERATURA

Abdouh M, Facchino S, Chatoo W, Balasingam V, Ferreira J, Bernier G. BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. *J Neurosci*. 2009;29(28):8884–96.

Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4):R46.

Akunuru S, James Zhai Q, Zheng Y. Non-small cell lung cancer stem/progenitor cells are enriched in multiple distinct phenotypic subpopulations and exhibit plasticity. *Cell Death Dis*. 2012;3(7):e352.

Alamgeer M, Ganju V, Szczepny A, Russell PA, Prodanovic Z, Kumar B, in sod. The prognostic significance of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) and CD133 expression in early stage non-small cell lung cancer. *Thorax*. 2013;68(12):1095–104.

Alix-Panabières C, Vendrell J-P, Pellé O, Rebillard X, Riethdorf S, Müller V, in sod. Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients. *Clin Chem*. 2007;53(3):537–9.

Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, in sod. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6897–904.

Al-Saad S, Al-Shibli K, Donnem T, Persson M, Bremnes RM, Busund LT. The prognostic impact of NF-kappaB p105, vimentin, E-cadherin and Par6 expression in epithelial and stromal compartment in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2008;99:1476–83.

Alunni-Fabbroni M, Sandri MT. Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. *Methods*. 2010;50(4):289–97.

De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, in sod. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2013;2045(13):1–12.

Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, Kemeny G, Bitting RL, Turnbull JD, in sod. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol Cancer Res*. 2011;9(8):997–1007.

Arnes JB, Collett K, Akslen LA. Independent prognostic value of the basal-like phenotype of breast cancer and associations with EGFR and candidate stem cell marker BMI-1. *Histopathology*. 2008;52(3):370–80.

Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Med J Aust*. 1869;14:146–7.

Balasubramanian P, Lang JC, Jatana KR, Miller B, Ozer E, Old M, in sod. Multiparameter analysis, including EMT markers, on negatively enriched blood samples from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *PLoS One*. 2012;7(7).

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, in sod. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756–60.

Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, in sod. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(38):16281–6.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730–7.

de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, in sod. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(19):6302–9.

Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O, in sod. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy*. 1999;1(5):377–88.

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):744–9.

Cenci T, Martini M, Montano N, D'Alessandris QG, Falchetti ML, Annibali D, in sod. Prognostic relevance of c-Myc and BMI1 expression in patients with glioblastoma. *Am J Clin Pathol*. 2012;138(3):390–6.

Chang B, Liu G, Xue F, Rosen DG, Xiao L, Wang X, in sod. ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Mod Pathol*. 2009;22(6):817–23.

Chen XF, Zhang HJ, Wang HB, Zhu J, Zhou WY, Zhang H, in sod. Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways. *Mol Biol Rep*. 2012;39(4):3549–56.

Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, in sod. Oct-4 Expression Maintained Cancer Stem-Like Properties in Lung Cancer-Derived CD133-Positive Cells. *PLoS One* 2008;3(7):14.

Choi YJ, Choi Y La, Cho EY, Shin YK, Sung KW, Hwang YK, in sod. Expression of Bmi-1 protein in tumor tissues is associated with favorable prognosis in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113(1):83–93.

Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, in sod. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3213–21.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005;65(23):10946–51.

Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2007;75(1):56–63.

Cortes-Dericks L, Galetta D, Spaggiari L, Schmid RA, Karoubi G. High expression of octamer-binding transcription factor 4A, prominin-1 and aldehyde dehydrogenase strongly indicates involvement in the initiation of lung adenocarcinoma resulting in shorter disease-free intervals. *Eur J Cardio-Thoracic Surg*. 2012;41(6):e173–81.

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, in sod. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(8):781–91.

Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(10):1147–55.

Cufer T, Knez L. Update on systemic therapy of advanced non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2014;14(10):1189–203.

Cufer T, Ovcaricek T, O'Brien MER. Systemic therapy of advanced non-small cell lung cancer: major-developments of the last 5-years. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1216–25.

Dembinski JL, Krauss S. Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26(7):611–23.

Dimou A, Neumeister V, Agarwal S, Anagnostou V, Syrigos K, Rimm DL. Measurement of aldehyde dehydrogenase 1 expression defines a group with better prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Am J Pathol*. 2012;181(4):1436–42.

Dimri GP, Martinez J, Jacobs JLL, Cells ME, Lohuizen M Van, Campisi J, in sod. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2002;62(16):4736–45.

Di Domenico M, Pierantoni GM, Feola A, Esposito F, Laino L, De Rosa A, in sod. Prognostic significance of N-Cadherin expression in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2011;31:4211–8.

Dovey JS, Zacharek SJ, Kim CF, Lees J A. Bmi1 is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(33):11857–62.

Eger A, Stockinger A, Park J, Langkopf E, Mikula M, Gotzmann J, in sod. beta-Catenin and TGFbeta signalling cooperate to maintain a mesenchymal phenotype after FosER-induced epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene*. 2004;23(15):2672–80.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, in sod. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228–47.

Endo K, Ueda T, Ueyama J, Ohta T, Terada T. Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, and patients' survival. *Hum Pathol*. 2000;31(5):558–65.

Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, in sod. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 2008;15(3):504–14.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, in sod. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Dosegljivo 16.10.2014 s spletne strani: <http://globocan.iarc.fr>.

Fuxe J, Vincent T, De Herreros AG. Transcriptional crosstalk between TGFβ and stem cell pathways in tumor cell invasion: Role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle*. 2010;9:2363–74.

Gallagher DJ, Milowsky MI, Ishill N, Trout A, Boyle MG, Riches J, in sod. Detection of circulating tumor cells in patients with urothelial cancer. *Ann Oncol*. 2009;20(2):305–8.

Ghossein RA, Bhattacharya S, Rosai J. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res*. 1999;5(8):1950–60.

Giangreco A, Groot KR, Janes SM. Lung cancer and lung stem cells - Strange bedfellows? *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(6):547–53.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, in sod. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1(5):555–67.

Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest*. 2005;115(6):1503–21.

Gomez-Casal R, Bhattacharya C, Ganesh N, Bailey L, Basse P, Gibson M, in sod. Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes. *Mol Cancer*. 2013;12(1):94.

Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*. 2014;344(7):re8.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):48–58.

Gradilone A, Raimondi C, Nicolazzo C, Petracca A, Gandini O, Vincenzi B, in sod. Circulating tumour cells lacking cytokeratin in breast cancer: the importance of being mesenchymal. *J Cell Mol Med*. 2011;15(5):1066–70.

Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13:7003–11.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.

Hassan KA, Chen G, Kalemkerian GP, Wicha MS, Beer DG. An embryonic stem cell-like signature identifies poorly differentiated lung adenocarcinoma but not squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(20):6386–90.

Haupt Y, Alexander WS, Barri G, Klinken SP, Adams JM. Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell*. 1991;65(5):753–63.

Herpel E, Jensen K, Muley T, Warth A, Schnabel PA, Meister M, in sod. The cancer stem cell antigens CD133, BCRP1/ABCG2 and CD117/c-KIT are not associated with prognosis in resected early-stage non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2011;31(12):4491–500.

Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Gunsilius E, Hilbe G, in sod. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2004;57(9):965–9.

Hiltermann TJN, Pore MM, Van Den Berg A, Timens W, Boezen HM, Liesker JJW, in sod. Circulating tumor cells in small-cell lung cancer: a predictive and prognostic factor. *Ann Oncol*. 2012;23(11):2937–42.

Ho MM, Ng A V, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res*. 2007;67(10):4827–33.

Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, Metcalf RL, Rothwell DG, Trapani F, in sod. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med*. 2014; 20(8):897-903.

Hoffmann O, Solomayer E, Kuemmel S, Hahn M, Kasimir-Bauer S, Kimmig R, in sod. Does primary systemic therapy eradicate disseminated and circulating tumor cells? *Cancer Res*. 2009;69(24):3001–3001.

Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Fléjou JF, in sod. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res*.;17(4):827–35.

Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E, Bonnetaud C, Molina T, in sod. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: Comparison of the efficacy of the CellSearch AssayTM and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer*. 2011; 129(7):1651–60.

Hommura F, Furuuchi K, Yamazaki K, Ogura S, Kinoshita I, Shimizu M, in sod. Increased expression of β -catenin predicts better prognosis in nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer*. 2002;94(3):752–8.

Hou JM, Greystoke A, Lancashire L, Cummings J, Ward T, Board R, in sod. Evaluation of circulating tumor cells and serological cell death biomarkers in small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *Am J Pathol*. 2009;175(2):808–16.

Hui YH, Friedman SL. Molecular basis of hepatic fibrosis. *Expert Rev Mol Med*. 2003;5(5):1-23.

Hui L, Zhang S, Dong X, Tian D, Cui Z, Qiu X. Prognostic significance of twist and N-cadherin expression in NSCLC. *PLoS One*. 2013;8(4):e62171.

Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS, Wu KJ. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 α , TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax*. 2009;64(12):1082–9.

Ilie M, Long E, Butori C, Hofman V, Coelle C, Mauro V, in sod. ALK-gene rearrangement: A comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol*. 2012;23(11):2907–13.

Isenmann S, Arthur A, Zannettino ACW, Turner JL, Songtao S, Glackin CA, in sod. TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment. *Stem Cells*. 2009;27(10):2457–68.

Jackson B, Brocker C, Thompson DC, Black W, Vasiliou K, Nebert DW, in sod. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics*. 2011;5(4):283–303.

Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*. 1999;397(6715):164–8.

Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, in sod. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2009;7(3):330–8.

Jiang W, Pang XG, Wang Q, Shen YX, Chen XK, Xi JJ. Prognostic role of Twist, Slug, and Foxc2 expression in stage I non-small-cell lung cancer after curative resection. *Clin Lung Cancer*. 2012;13:280–7.

Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2011;13(3):R59.

Kalluri R, Weinberg R a. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420–8.

Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, Lim EJ, Pai V, Ozkumur E, in sod. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nat Protoc.* 2014;9(3):694–710.

Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, in sod. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature.* 2004;431(7009):707–12.

Kase S, Sugio K, Yamazaki K, Okamoto T, Yano T, Sugimachi K. Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4789–96.

Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, Colvin OM, Civin CI, Hilton J. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1990;75(10):1947–50.

Kikuchi J, Kinoshita I, Shimizu Y, Kikuchi E, Konishi J, Oizumi S, in sod. Distinctive expression of the polycomb group proteins Bmi1 polycomb ring finger oncogene and enhancer of zeste homolog 2 in nonsmall cell lung cancers and their clinical and clinicopathologic significance. *Cancer.* 2010;116(12):3015–24.

Kirita K, Ishii G, Matsuwaki R, Matsumura Y, Umemura S, Matsumoto S, in sod. Identification of biological properties of intralymphatic tumor related to the development of lymph node metastasis in lung adenocarcinoma. *PLoS One.* 2013;8(12):e83537.

Kitamura H, Okudela K, Yazawa T, Sato H, Shimoyamada H. Cancer stem cell: implications in cancer biology and therapy with special reference to lung cancer. *Lung Cancer.* 2009;66(3):275–81.

Knez L, Košnik M, Ovčariček T, Sadikov A, Sodja E, Kern I, in sod. Predictive value of ABCB1 polymorphisms G2677T/A, C3435T, and their haplotype in small cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138(9):1551–60.

Koren A, Motaln H, Cufer T. Lung cancer stem cells: a biological and clinical perspective. *Cell Oncol.* 2013;36(4):265–75.

Koren A, Sodja E, Rijavec M, Jez M, Kovac V, Korosec P, in sod. Prognostic value of cytokeratin-7 mRNA expression in peripheral whole blood of advanced lung adenocarcinoma patients. *Cell Oncol.* 2015;38(5):387-95.

Krebs MG, Hou J-M, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, in sod. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol.* 2012;7(2):306–15.

Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou J, Greystoke A, in sod. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(12):1556–63.

Kreizenbeck GM, Berger AJ, Subtil A, Rimm DL, Gould Rothberg BE. Prognostic significance of cadherin-based adhesion molecules in cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:949–58.

Krishnadath KK, Tilanus HW, Van Blankenstein M, Hop WCJ, Kremers ED, Dinjens WNM, in sod. Reduced expression of the cadherin-catenin complex in oesophageal adenocarcinoma correlates with poor prognosis. *J Pathol.* 1997;182(3):331–8.

Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN, Hsieh HB, Kuhn P, Bergsruud DE, in sod. A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(29):10501–4.

Kubuschok B, Passlick B, Izbicki JR, Thetter O, Pantel K. Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(1):19–24.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178–96.

Lankiewicz S, Zimmermann S, Hollmann C, Hillemann T, Greten TF. Circulating tumour cells as a predictive factor for response to systemic chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2008;2(4):349–55.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, in sod. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367:645–8.

Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D, Soria JC, Farace F. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2011;105(9):1338–41.

Leung EL-H, Fiskus RR, Tung JW, Tin VP-C, Cheng LC, Sihoe ADL, in sod. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One.* 2010;5(11):e14062.

Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E, Lokshin AE. Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PLoS One.* 2008;3(8):e3077.

Li F, Zeng H, Ying K. The combination of stem cell markers CD133 and ABCG2 predicts relapse in stage I non-small cell lung carcinomas. *Med Oncol.* 2011;28(4):1458–62.

Li T, Kung H-J, Mack PC, Gandara DR. Genotyping and Genomic Profiling of Non-Small-Cell Lung Cancer: Implications for Current and Future Therapies. *J Clin Oncol.* 2013;31(8):1039–49.

Li T, Su Y, Mei Y, Leng Q, Leng B, Liu Z, in sod. ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome. *Lab Invest.* 2010;90(2):234–44.

Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, in sod. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(8):4262–6.

Liu H, Zhang X, Li J, Sun B, Qian H, Yin Z. The biological and clinical importance of epithelial-mesenchymal transition in circulating tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141(2):189–201.

Liu JH, Song LB, Zhang X, Guo BH, Feng Y, Li XX, in sod. Bmi-1 expression predicts prognosis for patients with gastric carcinoma. *J Surg Oncol*. 2008;97(3):267–72.

Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn N, Jackson KW, in sod. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res*. 2006;66(12):6063–71.

Liu YP, Yang CJ, Huang MS, Yeh CT, Wu ATH, Lee Y-C, in sod. Cisplatin selects for multidrug-resistant CD133+ cells in lung adenocarcinoma by activating Notch signaling. *Cancer Res*. 2013;73(1):406–16.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.

Van Lohuizen M, Verbeek S, Scheijen B, Wientjens E, Van Der Gulden H, Berns A. Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell*. 1991;65(5):737–52.

Lukacs RU, Memarzadeh S, Wu H, Witte ON. Bmi-1 is a crucial regulator of prostate stem cell self-renewal and malignant transformation. *Cell Stem Cell*. 2010;7(6):682–93.

Maheswaran S, Sequist L, Nagrath S. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med*. 2008;359(4):366–77.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, in sod. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704–15.

Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. *J Pathol*. 2008;214(1):3–9.

Mohri Y. Prognostic significance of E-cadherin expression in human colorectal cancer tissue. *Surg Today*. 1997;27:606–12.

Mohty M, Yong ASM, Szydlo RM, Apperley JF, Melo JV. The polycomb group BMI1 gene is a molecular marker for predicting prognosis of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110(1):380–3.

Moreb JS, Zucali JR, Ostmark B, Benson NA. Heterogeneity of aldehyde dehydrogenase expression in lung cancer cell lines is revealed by Aldefluor flow cytometry-based assay. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2007;289:281–9.

Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res.* 2009;69(14):5627–9.

Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, in sod. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 2007;450(7173):1235–9.

Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Akslen LA. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is associated with basal-like markers and features of aggressive tumours in African breast cancer. *Br J Cancer.* 2010;102(2):369–75.

Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1559–82.

Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, in sod. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5(6):649–55.

Okudela K, Woo T, Mitsui H, Suzuki T, Tajiri M, Sakuma Y, in sod. Downregulation of ALDH1A1 expression in non-small cell lung carcinomas--its clinicopathologic and biological significance. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(1):1–12.

Otsuki S, Inokuchi M, Enjoji M, Ishikawa T, Takagi Y, Kato K, in sod. Vimentin expression is associated with decreased survival in gastric cancer. *Oncol Rep.* 2011;25:1235–42.

Otto WR. Lung epithelial stem cells. *J Pathol.* 2002;197(4):527–35.

Padín-Iruegas ME, Herranz-Carnero M, Aguin-Losada S, Brozos-Vazquez E, Anido-Herranz U, Antunez-Lopez JR, in sod. Prognostic value of changes in the expression of stem cell markers in the peripheral blood of patients with colon cancer. *Oncol Rep.* 2013;29(6):2467–72.

Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(6):448–56.

Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(12):895–902.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 1999;49(2):1,33–64.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, in sod. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95(3):952–8.

Pietersen AM, Horlings HM, Hauptmann M, Langerød A, Ajouaou A, Cornelissen-Steijger P, in sod. EZH2 and BMI1 inversely correlate with prognosis and TP53 mutation in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008;10(6):R109.

Pirozzi G, Tirino V, Camerlingo R, Franco R, La Rocca A, Liguori E, in sod. Epithelial to mesenchymal transition by TGF β -1 induction increases stemness characteristics in primary non small cell lung cancer cell line. *PLoS One*. 2011;6(6):e21548.

Pirozzi G, Tirino V, Camerlingo R, La Rocca A, Martucci N, Scognamiglio G, in sod. Prognostic value of cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition and circulating tumor cells in lung cancer. *Oncol Rep*. 2013;29:1763–8.

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, in sod. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*. 2005;65(13):5506–11.

Primc Žakelj M, Bračko M, Hočevlar M, Jarm K, Pompe-Kirn V, Storjan P, in sod. Rak v Sloveniji 2010. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2013.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, in sod. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(3):973–8.

Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, in sod. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem*. 2002;48(11):1883–90.

Rakha EA, Abd El Rehim D, Pinder SE, Lewis SA, Ellis IO. E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathology*. 2005;46:685–93.

Rasheed ZA, Kowalski J, Smith BD, Matsui W. Concise review: Emerging concepts in clinical targeting of cancer stem cells. *Stem Cells*. 2011;29(6):883–7.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105–11.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, in sod. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445(7123):111–5.

Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer*. 2005;92(5):906–12.

Rolle A, Günzel R, Pachmann U, Willen B, Höffken K, Pachmann K. Increase in number of circulating disseminated epithelial cells after surgery for non-small cell lung cancer monitored by MAINTRAC® is a predictor for relapse: A preliminary report. *World J Surg Oncol*. 2005;3(1):18.

Salcido CD, Larochelle A, Taylor BJ, Dunbar CE, Varticovski L. Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(11):1636–44.

Salnikov AV, Gladkich J, Moldenhauer G, Volm M, Mattern J, Herr I. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*. 2010;126(4):950–8.

Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR. *Clin Biochem*. 2009;42(3):194–200.

Sher Y, Shih J, Yang P, Roffler SR, Chu Y, Wu C, in sod. Prognosis of non – small cell lung cancer patients by detecting circulating cancer cells in the peripheral blood with multiple marker genes prognosis of non – small cell lung cancer patients by detecting circulating cancer cells in the peripheral blood with multiple marker genes. *Clin Cancer Res*. 2005;11:173–9.

Shien K, Toyooka S, Ichimura K, Soh J, Furukawa M, Maki Y, in sod. Prognostic impact of cancer stem cell-related markers in non-small cell lung cancer patients treated with induction chemoradiotherapy. *Lung Cancer*. 2012;77(1):162-7.

Shien K, Toyooka S, Yamamoto H, Soh J, Jida M, Thu KL, in sod. Acquired resistance to EGFR inhibitors is associated with a manifestation of stem cell-like properties in cancer cells. *Cancer Res*. 2013;73(10):3051–61.

Shin SY, Rath O, Zebisch A, Choo SM, Kolch W, Cho KH. Functional roles of multiple feedback loops in extracellular signal-regulated kinase and Wnt signaling pathways that regulate epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2010;70(17):6715–24.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9–29.

Silva J, García V, García JM, Peña C, Domínguez G, Díaz R, in sod. Circulating Bmi-1 mRNA as a possible prognostic factor for advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2007;9(4):R55.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, in sod. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821–8.

Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 2006;441(7097):1060–1060.

Song W, Li H, Tao K, Li R, Song Z, Zhao Q, in sod. Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Pract*. 2008;62(8):1212–8.

Stathopoulou A. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol*. 2002;20(16):3404–12.

Stern R. Association between cancer and “acid mucopolysaccharides”: An old concept comes of age, finally. *Hyaluronan Cancer Biol*. 2009;18(4):3–16.

Sullivan JP, Minna JD, Shay JW. Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2010a;29(1):61–72.

Sullivan JP, Spinola M, Dodge M, Raso MG, Behrens C, Gao B, in sod. Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on notch signaling. *Cancer Res.* 2010b;70(23):9937–48.

Sulzer MA, Leers MP, Van Noord JA, Bollen EC, Theunissen PH. Reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(4):1319–23.

Sun YF, Yang XR, Zhou J, Qiu SJ, Fan J, Xu Y. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137(8):1151–73.

Sung WJ, Park K, Kwak SG, Hyun D, Jang JS, Park K. Epithelial-mesenchymal transition in patients of pulmonary adenocarcinoma : correlation with cancer stem cell markers and prognosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(8):8997–9009.

Tan DSW, Camilleri-Broët S, Tan EH, Alifano M, Lim WT, Bobbio A, in sod. Intertumor heterogeneity of non-small-cell lung carcinomas revealed by multiplexed mutation profiling and integrative genomics. *Int J Cancer.* 2014;135(5):1092–100.

Tempfer C, Lösch A, Heinzl H, Häusler G, Hanzal E, Kölbl H, in sod. Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 isoforms CD44v5, CD44v6 and CD44v7-8 in human breast cancer. *Eur J Cancer.* 1996;32(11):2023–5.

Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Agelaki S, Kallergi G, Saridaki Z, Mavroudis D, in sod. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett.* 2010;288(1):99–106.

Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871–90.

Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertrán E, Pérez-Pomares JM, Díez J, in sod. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* 2004;18(1):99–115.

Tirino V, Camerlingo R, Bifulco K, Irollo E, Montella R, Paino F, in sod. TGF- β 1 exposure induces epithelial to mesenchymal transition both in CSCs and non-CSCs of the A549 cell line, leading to an increase of migration ability in the CD133+ A549 cell fraction. *Cell Death Dis.* 2013;4(5):e620.

Tirino V, Camerlingo R, Franco R, Malanga D, La Rocca A, Viglietto G, in sod. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardio-Thoracic Surg.* 2009;36(3):446–53.

Ucar D, Cogle CR, Zucali JR, Ostmark B, Scott EW, Zori R, in sod. Aldehyde dehydrogenase activity as a functional marker for lung cancer. *Chem Biol Interact.* 2009;178(1-3):48–55.

Valcourt U. TGF- and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell.* 2005;16(4):1987–2002.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(10):755–68.

Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, in sod. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol.* 2000;156(1):57–63.

Vonlanthen S, Heighway J, Altermatt HJ, Gugger M, Kappeler A, Borner MM, in sod. The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. *Br J Cancer.* 2001;84(10):1372–6.

Vrzalikova K, Skarda J, Ehrmann J, Murray PG, Fridman E, Kopolovic J, in sod. Prognostic value of Bmi-1 oncoprotein expression in NSCLC patients: a tissue microarray study. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(9):1037–42.

Wang H, Pan K, Zhang H, Weng D, Zhou J, Li J, in sod. Increased polycomb-group oncogene Bmi-1 expression correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(5):535–41.

Wang H, Zhang G, Zhang H, Zhang F, Zhou B, Ning F, in sod. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/ β -catenin/Snail signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2014;723:156–66.

Wang P, Gao Q, Suo Z, Munthe E, Solberg S, Ma L, in sod. Identification and characterization of cells with cancer stem cell properties in human primary lung cancer cell lines. *PLoS One.* 2013;8(3):e57020.

Wei KC, Huang CY, Chen PY, Feng LY, Wu TWE, Chen SM, in sod. Evaluation of the prognostic value of CD44 in glioblastoma multiforme. *Anticancer Res.* 2010;30(1):253–9.

Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, in sod. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 2009;11:1487–95.

Woo T, Okudela K, Mitsui H, Yazawa T, Ogawa N, Tajiri M, in sod. Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010;4(1):32–42.

Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett.* 2008;268(1):1–9.

Wushou A, Hou J, Zhao YJ, Shao ZM. Twist-1 Up-regulation in carcinoma correlates to poor survival. *Int J Mol Sci.* 2014;15:21621–30.

Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. Activation of the Erk pathway is required for TGF- β 1-induced EMT in vitro. *Neoplasia*. 2004;6(5):603–10.

Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 2009;19(2):156–72.

Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2007;67(22):10831–9.

Yang MH, Hsu DSS, Wang HW, Wang HJ, Lan HY, Yang WH, in sod. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2010;12(10):982–92.

Yang ZF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MNP, Lau CK, in sod. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology*. 2008;47(3):919–28.

Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, in sod. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*. 2013;339(6119):580–4.

Zencak D, Lingbeek M, Kostic C, Tekaya M, Tanger E, Hornfeld D, in sod. Bmi1 loss produces an increase in astroglial cells and a decrease in neural stem cell population and proliferation. *J Neurosci*. 2005;25(24):5774–83.

Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, in sod. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res*. 2008;14(1):123–9.

Zhang H, Liu J, Yue D, Gao L, Wang D, Zhang H, in sod. Clinical significance of E-cadherin, β -catenin, vimentin and S100A4 expression in completely resected squamous cell lung carcinoma. *J Clin Pathol*. 2013;66(11):937–45.

Zhang X, Wang C, Wang L, Du L, Wang S, Zheng G, in sod. Detection of circulating Bmi-1 mRNA in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for uterine cervical cancer. *Int J Cancer*. 2012;131(1):165–72.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, in sod. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*. 2001;7(9):1028–34.

Zhu WF, Li J, Yu LC, Wu Y, Tang XP, Hu YM, in sod. Prognostic value of EpCAM/MUC1 mRNA-positive cells in non-small cell lung cancer patients. *Tumor Biol*. 2013;35(2):1211–9.

Zwitter M, Antonič J, Bavčar-Vodovnik T, Cerar O, Cesar R, Crnjac A. Smernice za diagnostiko in zdravljenje bolnikov z rakom pljuč. Ljubljana: Onkološki Inštitut Ljubljana. 2006.

8 PRILOGE

Priloga 1: Po abecedi razvrščene aparature, uporabljene v doktorski nalogi

Aparatura	Proizvajalec
ABI PRISM 7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, ZDA
Benchmark XT	Ventana Medical Systems, ZDA
Celični inkubator	Heraeus Instruments, Nemčija
FACS Canto	BD Biosciences, ZDA
Mini MACS Separator	Miltenyi Biotec, Nemčija
NanoDrop 2000c	Thermo Fischer Scientific, ZDA
Olympus IX51	Olympus, Japonska
Primus 96 Plus	MWG-Biotech, Nemčija
TissueLyser LT	Qiagen, Nemčija
Veriti 96-well Thermal Cycler	Applied Biosystems, ZDA
Qiacube	Qiagen, Nemčija

Priloga 2: Po abecedi razvrščene kemikalije, uporabljene v doktorski nalogi

Komplet	Proizvajalec
ALDEFUOR™	Stem Cell Technologies, ZDA
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Nemčija
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Nemčija
Paxgene Blood miRNA Kit	PreAnalytix, Švica
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, ZDA
OptiView DAB IHC Detection Kit	Ventana Medical Systems, ZDA
CD326 (EpCAM) tumor Cell Enrichment and Detection Kit	Miltenyi Biotec, Nemčija

Priloga 3: Po abecedi razvrščeni kompleti reagentov, uporabljeni v doktorski nalogi

Kemikalija	Proizvajalec
0,25 % tripsin/2 mM EDTA	Sigma-Aldrich, Nemčija
Aldefluor	Stem Cell Technologies, ZDA
Amfotericin B	PAA, Avstrija
B-27, serumski nadomestek (50 x)	Gibco, ZDA
bFGF, človeški	Invitrogen, ZDA
BSA	Miltenyi-Biotec, Nemčija
Citronska kislina	Sigma-Aldrich, Nemčija
Defined Keratinocyte - SFM	Gibco, ZDA
DMEM/F12 gojišče	Sigma-Aldrich, Nemčija
DMSO	Sigma-Aldrich, Nemčija
EGF, človeški	Invitrogen, ZDA
Etanol, absolutni	Sigma-Aldrich, Nemčija
FBS	Sigma-Aldrich, Nemčija
Fikol	Stem Cell Technologies, ZDA
Hanks` Balanced Salt Solution (HBSS) brez Ca/Mg	Gibco, ZDA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, ZDA
Imunofenotipizacijski pufer	Miltenyi-Biotec, Nemčija
Izopropanol	Sigma-Aldrich, Nemčija
Kolagen I	BD Biosciences, ZDA
Kolagen, telečji (0,1 %)	Sigma-Aldrich, Nemčija
Kolagenaza, tip II	Invitrogen, ZDA
L-glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich, Nemčija
Metilceluloza	Sigma-Aldrich, Nemčija
PAXgene epruveta	PreAnalytix, Švica
PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline 10x)	Sigma-Aldrich, Nemčija
Penicilin/streptomycin	Sigma-Aldrich, Nemčija
Propidijev jodid	Sigma-Aldrich, Nemčija
Qiazol	Qiagen, Nemčija
RNAlater	Qiagen, Nemčija
RPMI gojišče	PAA, Avstrija
Taqman Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, ZDA
TaqMan PreAmp Master Mix	Applied Biosystems, ZDA
TaqMan Universal PCR Master Mix II,	Applied Biosystems, ZDA
TGF-β1	Invitrogen, ZDA

Priloga 4: Po abecedi razvrščeni pripravljeni testi TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, ZDA)

mRNA	TaqMan Gene Expression Assay
ALDH1A1	Hs00167445_m1
BMI1	Hs00180411_m1
CD133 (PROM1)	Hs1009245_m1
EpCAM (CD326)	Hs00901885_m1
KRT7	Hs00559840_m1
NANOG	Hs02387400_g1
OCT4	Hs00999632_g1
TWIST1	Hs00361186_m1
GAPDH	4333764F

Priloga 5: Po abecedi razvrščena primarna protitelesa, uporabljena v doktorski nalogi

Primarno protitelo	Proizvajalec
ALDH1A1 (Ab126783)	AbCAM, Velika Britanija
BMI1 (Ab52492)	AbCAM, Velika Britanija
CD133/1 (AC133)	Miltenyi Biotec, Nemčija
CD133/2 (293C3) - PE	Miltenyi Biotec, Nemčija
IgG2b-PE izotipska kontrola	Miltenyi Biotec, Nemčija

Priloga 6: Znanstveni članek

Koren A, Rijavec M, Kern I, Sodja E, Korosec P, and Cufer T, BMI1, ALDH1A1, and CD133 Transcripts Connect Epithelial-Mesenchymal Transition to Cancer Stem Cells in Lung Carcinoma. Stem Cells International, vol. 2016. doi:10.1155/2016/9714315

<http://www.hindawi.com/journals/sci/2016/9714315/>

ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. Tanji Čufer za predano znanje, vodenje in pomoč pri nastanku naloge. Hvala somentorju izr. prof. dr. Petru Korošču za strokovno pomoč in omogočanje dobrih pogojev za laboratorijsko delo.

Hvala tudi prof. dr. Nini Zidar, doc. dr. Veroniki Kloboves Prevodnik in prof. dr. Nikoli Bešiću za hiter in strokoven pregled naloge ter nasvete za izboljšanje.

Hvala doc. dr. Matiji Rijavcu za neposredno pomoč v laboratoriju, pomoč pri analizi podatkov in pisanju člankov. Hvala prim. Izidorju Kernu za odzemanje vzorcev tkiva, izvedbi imunohistokemijskih barvanj in uporabne nasvete iz sveta patologije. Hvala prof. Tamari Lah Turnšek in dr. Heleni Motaln za pomoč pri celičnih poskusih. Hvala mag. Marku Bitencu in zaposlenim v kirurškem bloku in enoti za intenzivno terapijo za omogočanje neposrednega dostopa do kirurških vzorcev, seznanjanje bolnikov z raziskavo in odzemanje vzorcev krvi. Hvala vsem zaposlenim na enoti za internistično onkologijo za sodelovanje v biobanki in pomoč pri kliničnem opredeljevanju bolnikov.

Hvala vsem zdajšnjim in nekdanjim sodelavcem laboratorija za klinično imunologijo in molekularno genetiko za vsakodnevno pomoč pri delu, spodbudo in prijetno družbo v laboratoriju in zunaj njega.

Hvala Živi za pomoč pri urejanju naloge v končno obliko ter druge uporabne nasvete.

Navsezadnje se zahvaljujem staršem, ki so me podpirali in mi stali ob strani ves čas študija. Hvala tudi prijateljem, še posebno Sedini, Živi, Neži, Moniki, Aleksu in Špeli, za bodrenje, spravljanje v dobro voljo, druženje in pogovore.

Hvala vsem, ki so kakorkoli prispevali k nastanku tega dela.