

Nádorová heterogenita a chemorezistencia

Mgr. Lucia Kučerová, PhD., Mgr. Svetlana Školeková, RNDr. Zuzana Kozovská, PhD.

Laboratórium molekulárnej onkológie, Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava

Nová generácia metodických prístupov k sekvenovaniu odhalila v nádoroch neočakávanú komplexitu a genomické alterácie spojené s jednotlivými podtypmi nádorov. Táto diverzita existuje nielen medzi jednotlivými typmi nádorov, ale aj medzi nádormi rovnakého histologického podtypu, a aj medzi podskupinami buniek v rámci jedného nádoru. Súhrnne sa tento fenomén označuje ako nádorová heterogenita. Bez ohľadu na jej príčiny a mechanizmy vzniku má veľký dosah v klinickej praxi. Genetická, fenotypová a expresná diverzita nádorov je kľúčová pre účinnú liečbu nádorov, a má aj dôležitý význam v ich prognóze. Intratumorálna heterogenita má kľúčovú úlohu aj vo vnútornej aj získanej rezistencii na cytotoxickú aj cielenú liečbu. V prehľadnom článku sa venujeme mechanizmom vzniku intratumorálnej a intertumoralnej heterogenity a ich vzťahu k liekovej rezistencii. Porozumenie mechanizmom a časopriestorovej dynamike heterogenity pred terapiou a počas nej je dôležité na dosiahnutie možnosti nadizajnovať individualizované liečebné protokoly vhodné v danom molekulárnom kontexte.

Kľúčové slová: nádorové podtypy, nádorová heterogenita, klonálna evolúcia, nádorové kmeňové bunky, lieková rezistencia.

Tumor Heterogeneity and Drug Resistance

New generation of sequencing methodologies revealed unexpected complexity and genomic alterations linked with the tumor subtypes. This diversity exists across the tumor types, histologic tumor subtypes and subsets of the tumor cells within the same tumor. This phenomenon is termed tumor heterogeneity. Regardless of its origin and mechanisms of development it has a major impact in the clinical setting. Genetic, phenotypic and expression pattern diversity of tumors plays critical role in the selection of suitable treatment and also in the prognosis prediction. Intratumoral heterogeneity plays a key role in the intrinsic and acquired chemoresistance to cytotoxic and targeted therapies. In this review we focus on the mechanisms of intratumoral and intertumoral heterogeneity and their relationship to the drug resistance. Understanding of the mechanisms and spatiotemporal dynamics of tumor heterogeneity development before and during the therapy is important for the ability to design individual treatment protocols suitable in the given molecular context.

Key words: tumor subtypes, tumor heterogeneity, clonal evolution, cancer stem cells, drug resistance.

Onkológia (Bratisl.), 2015; roč. 10(6): 371–374

Úvod

Nádorová heterogenita

Nádory jednotlivých orgánov boli podľa neustále zložitejšej taxonómie klasifikované na mnohé konkrétne histologické podtypy. V rámci týchto zdanlivo homogénnych skupín však konkrétne nádory obsahujú rôzne populácie nádorových buniek, ktoré sa odlišujú mnohými dôležitými špecifickými znakmi, napríklad klonogenicitou a invazívnym potenciálom. Odlišnosti existujú aj medzi nádormi rovnakého podtypu, a tiež v rámci jedného nádoru v jednotlivých jeho častiach. Sú spôsobené vnútornými faktormi a mechanizmami vývoja nádorových buniek (intratumorálna heterogenita), ale aj faktormi, ktoré prispievajú k heterogenite medzi nádormi rovnakého podtypu (intertumorálna heterogenita) (1). Priamymi dôsledkami nádorovej heterogenity je veľmi individuálna odpoveď na zvolenú protinádorovú liečbu. Zároveň tak dostávame odpoveď na otázku, prečo po počiatočnej odpovedi na cielenú liečivú dochádza takmer nevyhnutne k rekurencii nádoru. Mechanizmus zahŕňa kombinovanie viacerých biologických fenoménov a vyvíja sa polyklonálna lieková rezistencia (2, 3). Je veľmi dôležité porozumieť biologickým príčinám odlišnosti nádorov a jednotlivých populácií

nádorových buniek v rámci jednej malignity, pretože to povedie k odhaleniu nových spôsobov kombinovania liečebných stratégií (4).

Vnútro bunkové mechanizmy vzniku heterogenity

Ak by za vznik nádoru bola zodpovedná jediná bunka, v nádore by neexistovala intratumorálna heterogenita, všetky nádorové bunky by boli identické. Existuje mnoho faktorov, ktoré ovplyvňujú intratumorálnu heterogenitu, čiže ako sa vzájomne líšia jednotlivé populácie buniek v rámci jedného nádoru. Jedným z nich je klonálna evolúcia nádoru, keď v nádore, ktorý vzniká zo spoločnej prekursorovej bunky, delením dochádza k objaveniu sa klonov s odlišnými mutáciami. Genetické faktory zodpovedajú nielen za klonálnu evolúciu nádoru, ale aj za selektívne vyradenie (selective sweep) určitých klonov nádorových buniek po použití terapie. V nádore sa tak výrazne zmení zloženie a zostávajú preferenčne klony, ktoré boli na liečbu rezistentné od začiatku, alebo klony nádorových buniek, v ktorých došlo ku genetickým zmenám vedúcim k rezistencii (5). K intratumorálnej heterogenite prispieva aj odlišná metylácia v promótorových oblastiach génov, ktorá vedie k epigeneticky podmienenej odlišnosti medzi nádorovými bunkami v rámci

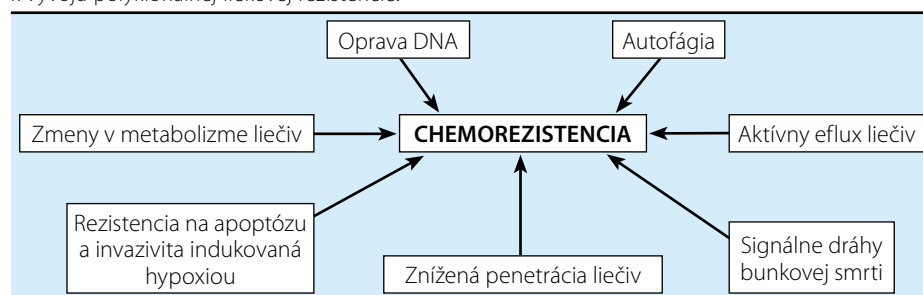
jedného nádoru. V modeli, ktorý predpokladá existenciu nádorových kmeňových buniek, tak tiež môže dochádzať ku klonálnej evolúcii, ktorá však zasahuje len nádorové kmeňové bunky. Nádorové kmeňové bunky majú schopnosť sebaobnovy a dávajú vznik mnohým typom diferencovaných buniek v nádore. Obe teórie vzniku nádorov a nádorovej heterogenity sa vzájomne dopĺňajú a v súčasnosti sa už nepovažujú za vzájomne sa vylučujúce. Zdrojom heterogenity je potom práve určitá hierarchická organizácia buniek v rámci nádoru, keď často minoritné nádorové kmeňové bunky dávajú vznik diferencovaným majoritným populáciám nádorových buniek (väčšine nádorovej masy – tumor bulk) (6). Intratumorálnu heterogenitu ďalej ovplyvňuje nádorové mikroprostredie. Nádorová stróma je v rámci nádoru a v jeho bezprostrednom okolí distribuovaná nerovnomerne. Invazívne okraje nádoru sú v priamom a najužšom kontakte s faktormi z nádorovej strómy. Bezprostredne susediace okolie nádoru, nádorové mikroprostredie, a to konkrétne typy buniek, napríklad myofibroblasty a bunky imunitného systému, ale aj solubilné faktory týmito bunkami produkované, dokážu indukovať mnohé biologické zmeny v diferencovaných bunkách vrátane posunu smerom k nádorovým kmeňovým bunkám (7).

Vonkajšie faktory prispievajúce k heterogenite nádorov

Ďalším typom nádorovej heterogenity je vzájomná rozdielnosť nádorov jedného orgánu a označuje sa ako intertumorálna heterogenita. Napríklad pri meduloblastóme, jednom z najčastejších pediatrických mozgových nádorov, sa podarilo na základe odlišenia molekulárnych podtypov nájsť dva rôzne typy buniek, z ktorých meduloblastómy môžu vzniknúť. V prípade, že je aberantne aktivovaná signálna dráha SHH (sonic hedgehog), vznikajú tieto nádory z prekursorových buniek cereberálnych granulárnych neurónov a majú horšiu prognózu ako tie, v ktorých je aktivovaná signálna dráha Wnt. Tieto nádory vznikajú z neurálnych prekursorov buniek mozgového kmeňa a ich prognóza je lepšia. Príkladom intertumorálnej odlišnosti danej genetickými faktormi sú rôzne podtypy nádorov hrubého čreva. Nádory s mikrosatelitovou instabilitou (MSI – microsatellite instability) sú asociované s mutáciami v BRAF onkogéne. Nádory hrubého čreva s chromozómalnou instabilitou (CIN – chromosomal instability) sú asociované s mutáciami v onkogénoch KRAS a APC. Nielen tieto genetické odlišnosti, ale aj epigenetické zmeny vytvárajú metylačné fenotypy týchto nádorov. Ďalším príkladom heterogenity spôsobenej genetickými faktormi je rozlišovanie karcinómov mliečnej žľazy podľa expresie konkrétneho markerového aj terapeutického cieľa, akými sú receptory pre estrogén (ER-pozitívne podtypy) a hladina receptora epidermálneho rastového faktora typu 2 (Her2). Iným zdrojom heterogenity v nádoroch je ovplyvnenie fenotypu nádorových kmeňových buniek signálnou dráhou TGF- β v karcinómoch mliečnej žľazy. Aktivácia tejto dráhy v bazálnom podtype nádorov vedie k zvýšeniu markerov nádorových kmeňových buniek. Konkrétne charakteristiky nádorových kmeňových buniek a ich „podpisy“ (cancer stem cell signatures) sú asociované s omnoho horšou prognózou vývoja ochorenia. Aktivácia TGF- β signalizácie v odlišnom podtype, v luminálnych nádoroch markery a fenotyp nádorových kmeňových buniek znižuje. Jednotlivé podtypy nádorov sa dajú odlíšiť aj na základe markerov exprimovaných v nádorovej stróme, takzvaného stromálneho podpisu (stromal signature). Súhrn a hladina expresie určitých znakov v stróme potom súvisí s prognózou vývoja ochorenia (SDPP – stroma-derived prognostic profile) (1).

Samotná existencia heterogenity, bez ohľadu na príčiny jej vzniku, má závažné dôsledky na klinickú prax. V prípade intratumorálnej heterogenity je detekcia onkogénnej mutácie priamo určujúca na rozhodnutie o liečbe. Prítomnosť mutácie môže síce na jednej strane predpovedať

Obrázok 1. Mechanizmy chemorezistencie nádorových buniek. Účinnosť terapie pri konkrétnych nádorových bunkách ovplyvňuje viacero mechanizmov, ktoré v rôznych kombináciách prispievajú k vývoju polyklonálnej liekovej rezistencie.



neúčinnosť konkrétnej terapie (mutácie KRAS pri inhibítoroch EGFR signalizácie). Na druhej strane však identifikácia onkogénnej aberácie, ktorá je rozhodujúcim driverom konkrétneho typu nádoru (mutácia BRAF pri melanóme), umožňuje cieľným nasmerovaním liečby účinne zasiahnuť. Pri uvažovaní o diagnostike je rozhodnutie o terapeutickom ovplyvnení veľmi obmedzované heterogenitou, pretože preskúmaná vzorka nádoru nedáva úplný reprezentatívny obraz nádoru. Prelomová práca pri genetickej analýze mnohých oblastí renálneho karcinómu, ktorú umožnil technologický pokrok a metódy sekvenovania druhej generácie, ukázala neočakávaný rozsah nádorovej heterogenity. Až 60 % identifikovaných somatických mutácií nebolo zastúpených vo všetkých vzorkách jedného nádoru z rôznych jeho častí (8). Terapeutická odpoveď je výrazne ovplyvnená heterogenitou nádoru, cieľná liečba vďaka svojej vysokej selektivitě často zlyháva pri špecifických genetických zmenách cieľových molekúl. Pri vytvorení selektívneho tlaku, napríklad pri aplikácii terapie, sa nevyhnutne selektujú najživotaschopnejšie – najrezistentnejšie klon, ktoré prežívajú a začnú expandovať, čo sa potom klinicky manifestuje ako relaps nádoru. V kontexte biológie nádorových kmeňových buniek sa zdá, že terapia selektuje vysoko rezistentné klon, ktoré boli v nádore zastúpené už pred nasadením terapie. Všeobecne sa predpokladá, že nádorové kmeňové bunky sú rezistentnejšie na mnohé typy liečiv, ako sme potvrdili aj my na modeli medulárneho tyroidného karcinómu (9). Toto má závažný vplyv v klinickej praxi, kde by prioritou pri dizajnovaní nových liečiv malo byť monitorovanie efektu, a tiež redukcia populácie nádorových kmeňových buniek.

Mechanizmy chemorezistencie nádorových buniek a nádorových kmeňových buniek

Cieľom každej protinádorovej liečby je selektívne zabiť nádorové bunky zasiahnutím ich kľúčových biologických vlastností, ktoré im umožňujú udržanie tumorigenicity a progresiu malígneho

ochorenia. Nádorové bunky však neutralizujú efekt cytotoxických látok celou škálou mnohokrát sa prekrývajúcich mechanizmov (obrázok 1).

V základnom rozdelení poznáme primárnu a sekundárnu rezistenciu. Primárna rezistencia je vrodenná, je daná pre konkrétny typ buniek, ktoré majú celý rad mechanizmov, ktoré ich robia rezistentnými. Primárna rezistencia je zodpovedná za zlyhanie terapie v prvej fáze, keď dané liečivo na takéto bunky nie je schopné účinkovať. Naopak, sekundárna rezistencia sa vyvíja počas terapie v prvej fáze, bunky na terapiu reagujú a rezistencia sa vyvíja časom.

Medzi najdôležitejšie mechanizmy rezistencie, ktorá sa vyvinula počas liečby pacientov, patrí:

1. aberantná oprava DNA,
2. aberantné signálne dráhy bunkovej smrti,
3. drug eflux – vylučovanie liekov z bunky,
4. znížená penetrácia liečiva do bunky,
5. rezistencia na apoptózu a invazivita indukovaná hypoxiou,
6. zmeny v metabolizme liečiv,
7. autofágia a iné.

Aberantná oprava poškodennej DNA má významnú úlohu pri sekundárnej rezistencii buniek voči chemoterapii. Pri chemoterapii obsahujúcej platinové deriváty sa tvoria väzby s bázami v DNA a vytvárajú kovalentné mostíky, ktoré zastavujú replikáciu DNA. To následne vedie k apoptóze buniek. Pri oprave tohto typu poškodení DNA zohráva významnú úlohu nukleotidová excízná oprava a homologická rekombinácia, ktoré sú primárnym mechanizmom DNA opravy po pôsobení platínových zlúčenín. Bunka sa takýmto spôsobom stáva rezistentnou proti pôsobeniu cisplatiny, keďže sa vie s poškodenou DNA vyrovnáť.

Bunková smrť – apoptóza je veľmi komplexný proces a je kontrolovaná viacerými signálnymi dráhami. V prípade nádorových buniek dochádza k úniku pred apoptózou, čo má za následok rast nádoru a aj rezistenciu na protinádorovú liečbu. To je zabezpečené pomocou aberantnej expresie IAPs (z angl. Inhibitor of Apoptosis Proteins). Hladina týchto proteínov v bunkách je silne kon-

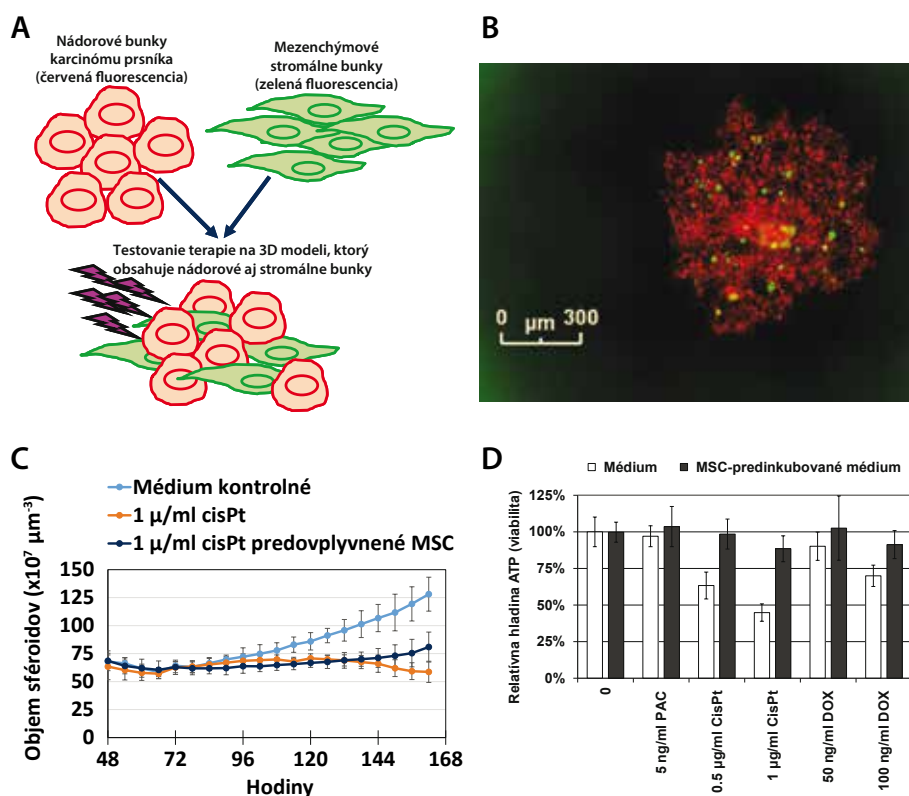
Obrázok 2. Mezenchýmové stromálne bunky (MSB) ovplyvňujú citlivosť na chemoterapiu cisplatinou. MSB v reakcii na pôsobenie cisplatiny produkujú parakrinné faktory, ktoré sú už v malých množstvách schopné sprostredkovať rezistenciu nádorových buniek na cytotoxické účinky chemoterapie. Výsledkom je rezistencia nádorových buniek vyvolaná parakrinným okolím a stromálnou zložkou nádoru (nádorovým mikroprostredím).

A) Modelovanie heterogenity nádorov kombinovaním malígnych a nemalígnych buniek.

B) Fluorescenčný obraz heterogénnej sféroidnej kultúry. NuclighRed-MDA231 (červené) bunky boli zmiešané s EGFP-MSB (zelené) a kultivované 5 dní v neadherentných podmienkach – 3D sféroidy.

C) Vyhodnotenie účinku chemoterapeutika porovnaním objemu sféroidov. MSB sme opracovali zvoleným liečivom 20 hodín pred začatím experimentu. Fluorescenčne značené nádorové bunky odvodené z karcinómu prsníka MDA231 sme potom ovplyvnili chemoterapeutikom bez prítomnosti a v prítomnosti MSB-sekretovaných látok v neadherentnej 3D kultúre *in vitro*. V prítomnosti MSB-produkovaných faktorov je inhibovanie sféroidov menšie.

D) Stanovenie hladiny ATP luminiscenčnou metódou (Luminescent Viability Assay, Promega Corporation, Madison, WI) ukázalo, že v prítomnosti MSB je toxicita cisplatiny a doxorubicínu výrazne nižšia. PAC – paklitaxel, CisPt – cisplatina, DOX – doxorubicín. Naše výsledky zdôrazňujú potrebu využívania komplexných heterogénnych modelov a ukazujú možnosti využitia pokročilých metód kultivácie buniek pri testovaní účinnosti chemoterapeutík.



trolovaná na transkripčnej a aj posttranskripčnej úrovni. Ďalším dôležitým proteínom v kontrole apoptózy je proteín p53, ktorý je považovaný za kľúčový nádorový supresor, jeho inaktivácia je často spojená s nádorovým ochorením (10).

Vylučovanie liekov z buniek je proces evolučne konzervovaný od baktérií až po bunky ľudske. Zástupcovia rodiny ATP-viažucich kaziet (ABC) sú lokalizovaní v plazmatickej membráne buniek. Zúčastňujú sa na transporte rôznych štruktúrne a funkčne odlišných substrátov cez bunkovú membránu. Rovnakým mechanizmom prispievajú aj k efluxu protinádorových liečiv z nádorových buniek. Najlepšie charakterizovaným transmembránovým proteínom je P-glykoproteín, ktorý je produktom génu *MDR1*, ktorý je súčasťou rodiny génov *MDR* (11). Významnú úlohu v rezistencii nádorových buniek majú aj MRP1 a BCRP prote-

íny. Tkanivá, ktoré za fyziologických podmienok neexprimujú MRP1, ako sú bunky pľúc, tkanivo prsníka a prostaty, sú rezistentné proti chemoterapeutikám v dôsledku expresie príbuzných transportérov MRP1 a BCRP. BCRP chráni normálne bunky pred účinkom toxínov a je exprimovaný v kmeňových bunkách. Množstvo klinických štúdií ukázalo, že zvýšená expresia niektorých z týchto transportérov v nádorových bunkách je zodpovedná za zlú klinickú prognózu (12).

Znížená penetrácia liečiva do bunky je ďalším kľúčovým mechanizmom, ktorým sa bunka bráni cytotoxickým účinkom chemoterapie. Tento mechanizmus je dôležitý hlavne pri chemoterapeutikách, ktoré priamo zasahujú DNA (mitomycín C, cisplatina). Rezistencia na tieto liečivá vzniká buď redukováním množstva liečiva v bunke, alebo už spomínanou zvýšenou opravou DNA.

Rezistencia na apoptózu a invazivita indukovaná hypoxiou sú ďalšou vlastnosťou nádorových buniek, ktoré sú týmto spôsobom schopné uniknúť apoptóze – programovanej bunkovej smrti. Ide o mnohopočetné defekty na rozličných úrovniach signálnych dráh kontrolujúcich apoptózu buniek. Epitelové nádorové bunky vďaka epitelálno-mezenchýmálnemu prechodu (EMT) nadobúdajú mezenchýmálny fenotyp a menia sa na bunky s vlastnosťami kmeňových buniek, čo umožňuje ich disemináciu z primárneho tumoru a tvorbu metastáz. Hypoxia potláča expresiu E-kadherínu, a zároveň podporuje tvorbu MMP-2 proteínázy, čím výrazne pomáha migrácii nádorových buniek (13).

Zmeny v metabolizme liečiv majú za následok, že liečivo je modifikované, čiastočne degradované, alebo vytvára komplex s inými molekulami alebo proteínmi, ktoré zabezpečujú nevyhnutnú aktiváciu liečiva na účinnú látku. Liečivo sa tak stáva neúčinné.

Autofágia hrá úlohu pri prežívaní organizmu v čase hladovania alebo pri obnove poškodených organel, ako aj v procese programovanej smrti buniek. Autofágia začína vznikom autofagických vakuol (autofagozómov), ktoré pohlcujú cieľovú organelu, spájajú sa s lyzozómom, čím vzniká autolyzozóm. Dôležitým regulátorom autofagickej smrti sú Bcl-2 proteíny. Autofágia môže byť alternatívnou programovanou smrťou v bunkách, ktoré majú zvýšené antiapoptotické Bcl-2 a znížené proapoptotické Bax/Bak. Takisto sa autofágia potvrdila v bunkách v prítomnosti kaspázových inhibítorov.

Naše porozumenie molekulárnym udalostiam, ktoré vedú k zlyhaniu liečby, sa v súčasnosti výrazne prehĺbilo vďaka novým technikám genomickej analýzy a predklinickému modelovaniu (14). Intratumorálna nádorová heterogenita je jedným z prominentných faktorov, ktoré vedú k zlyhaniu terapie. Ukazuje sa čoraz zreteľnejšie, že individuálne nádory získavajú rezistenciu cez viacero mechanizmov simultánne, čo sa označuje ako polyklonálna rezistencia. Preto aj liečba, ktorá sa zameriava na prekonanie jedného mechanizmu rezistencie, môže priniesť len limitovaný úspech. V súčasnosti pri liečbe nádorových ochorení je odporúčaná kombinovaná terapia, ktorá do určitej miery zabráni vzniku sekundárnej rezistencie nádorových buniek. Taktiež kombinovaná terapia zasahujúca viaceré funkčne odlišné ciele v bunke je účinnejšia ako monoterapia samotná. Na kombinovanie terapie je potrebné navrhnuť klinické štúdie so sekvenčnou analýzou nádorového materiálu, aby sme získali lepší obraz o funkčných vzťahoch medzi klonmi a subpopuláciami v nádore a ich vývojom počas liečby (15).

Vplyv strómy na chemorezistenciu nádorových buniek

Nádorové mikroprostredie výrazne prispieva k ovplyvneniu odpovede nádorových buniek na liečbu (16). V našej experimentálnej práci sa zameriavame na objasnenie biologických mechanizmov vzájomného pôsobenia mezenchýmových stromálnych buniek, ktoré reprezentujú nemalígnu zložku nádorového mikroprostredia, a nádorových buniek (17). Experimenty potvrdili ovplyvnenie na mnohých úrovniach nádorovej biológie vrátane chemorezistencie (18). Našou snahou je analyzovať mechanizmy ovplyvnenia na pokročilých komplexných modeloch pri kultivácii sféroidov v 3D podmienkach, ktoré umožňujú prostredníctvom dvoch fluorescenčne odlíšených populácií buniek kinetického sledovania ich odpovede (obrázok 2). V experimentálnych modeloch pracujeme s bunkovou líniou odvodenou z karcinómu prsníka MDA231 expri-mujúcou červený fluorescenčný proteín v jadre v kombinácii s mezenchýmovými stromálnymi bunkami značenými zeleným fluorescenčným proteínom v cytoplazme. Kinetické sledovanie umožňuje prístroj Incucyte ZOOM FLR, vďaka ktorému vieme vyhodnocovať vzájomné pôsobenie a ovplyvnenie nádorových a stromálnych buniek, a po pridaní chemoterapeutík aj modelovať cytotoxické pôsobenie na 3D kultúrach na obe zložky, malígnu aj nemalígnu.

Záver

Poznanie komplexných vzťahov medzi nádorovými bunkami a ich mikroprostredím, a mechanizmov, ktoré sa po ovplyvnení liečivom spúšťajú v oboch zložkách nádoru, je dôležité pre odhalenie dosiaľ neznámych mechanizmov liekovej rezistencie. Zároveň tým získavame možnosť ovplyvniť tieto procesy v prospech

účinnnejšej kombinovanej terapie, ktorá zasahuje rýchlo sa deliace populácie nádorových buniek, dormantné nádorové kmeňové bunky, a tiež bunky nádorového mikroprostredia a jeho stromálnu zložku.

Podakovanie

Autori vyjadrujú vďaka všetkým kolegom za cenné rady, pripomienky a konštruktívnu spoluprácu pri príprave rukopisu a experimentálnej práce citovanej v rukopise. Práca a experimenty boli podporené grantmi Agentúry pre podporu výskumu a vývoja APVV-0230-11, APVV-0052-12, grantmi vedeckej grantovej agentúry VEGA 2/0088/11, VEGA 2/0130/13 a finančným príspevkom Nadácie Výskum rakoviny RFL2011 (Incucyte ZOOM FLR, Essen Bioscience UK).

Literatúra

1. De Sousa EMF, Vermeulen L, Fessler E, Medema JP. Cancer heterogeneity – a multifaceted view. *EMBO reports*. 2013;14(8):686–695. doi:10.1038/embor.2013.92.
2. Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer*. 2013;108(3):479–485. doi:10.1038/bjc.2012.581.
3. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*. 2013;501(7467):355–364. doi:10.1038/nature12627.
4. Longo DL. Tumor heterogeneity and personalized medicine. *N Engl J Med*. 2012;366(10):956–957. doi:10.1056/NEJMe1200656.
5. Minarik G. Molekulárna genomika nádorových ochorení a jej perspektívy. *Onkológia (Bratisl.)*. 2014;9(5):292–295.
6. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell stem cell*. 2014;14(3):275–291. doi:10.1016/j.stem.2014.02.006.
7. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309–322. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022.
8. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M,

Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883–892. doi:10.1056/NEJMoa1113205.

9. Kucerova L, Feketeova L, Kozovska Z, Poturnajova M, Matuskova M, Nencka R, Babal P. In vivo 5FU-exposed human medullary thyroid carcinoma cells contain a chemoresistant CD133+ tumor-initiating cell subset. *Thyroid*. 2014;24(3):520–532. doi:10.1089/thy.2013.0277.
10. Insinga A, Cicalese A, Pelicci PG. DNA damage response in adult stem cells. *Blood cells, molecules & diseases*. 2014;52(4):147–151. doi:10.1016/j.bcmd.2013.12.005.
11. Weismanová E, Horváth L, Markus J, Rauová K, Lehotská V, Špáňik S, Sopko L, Konečný M, Weismann P. ABC transportéry: vývoj liekovej rezistencie a iných patologických stavov. *Onkológia (Bratisl.)*. 2012;7(1):39–44.
12. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*. 2014;6(3):1769–1792. doi:10.3390/cancers6031769.
13. Mallini P, Lennard T, Kirby J, Meeson A. Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(3):341–348. doi:10.1016/j.ctrv.2013.09.008.
14. Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L. Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2014. doi: 10.1016/j.biopha.2014.10.019 (článok prijatý do tlače).
15. Burrell RA, Swanton C. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Molecular oncology*. 2014;8(6):1095–1111. doi:10.1016/j.molonc.2014.06.005.
16. Kučerová L, Baranovičová L, Školeková S, Boháč M, Polák Š. Lieková rezistencia sprostredkovaná multipotentnými bunkami. *Onkológia (Bratisl.)*. 2013;8(4):234–237.
17. Kucerova L, Skolekova S. Tumor microenvironment and the role of mesenchymal stromal cells. *Neoplasma*. 2013;60(1):1–10. doi:10.4149/neo_2013_001.
18. Kucerova L, Skolekova S, Matuskova M, Bohac M, Kozovska Z. Altered features and increased chemosensitivity of human breast cancer cells mediated by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Cancer*. 2013;13:535. doi:10.1186/1471-2407-13-535.

Mgr. Lucia Kučerová, PhD.

Laboratórium molekulárnej onkológie
Ústav experimentálnej onkológie SAV
Vlárska 7, 833 91 Bratislava
lucia.kuceroval@savba.sk