

# Uloga interleukina 6 u razvoju zloćudnog tumora mokraćnog mjehura

---

**Degoricija, Marina**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:465141>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-05**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marina Degoricija**

**Uloga interleukina 6 u razvoju zloćudnog tumora  
mokraćnog mjehura**

**Doktorska disertacija**

**Split, 2016.**

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje raka, pri Katedri za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

**Voditelj rada:** prof. dr. sc. Janoš Terzić, dr. med.

# SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	Epidemiologija tumora mokraćnog mjehura .....	1
1.1.1	Zemljopisna rasprostranjenost i incidencija .....	1
1.1.2	Pušenje.....	3
1.1.3	Industrijski kancerogeni.....	4
1.1.4	Dob.....	4
1.1.5	Spol.....	4
1.1.6	Drugi faktori rizika .....	6
1.2	Patohistologija tumora mokraćnog mjehura.....	7
1.2.1	Građa urotela.....	7
1.2.2	TNM klasifikacije tumora mokraćnog mjehura.....	9
1.2.3	Neinvazivne novotvorine urotela.....	10
1.2.4	Invazivni urotelni karcinom.....	13
1.2.5	Drugi histološki tipovi karcinoma mokraćnog mjehura .....	14
1.3	Molekularna patogeneza tumora mokraćnog mjehura .....	15
1.3.1	Ta put .....	16
1.3.2	CIS put .....	17
1.4	Kronična upala vodi ka nastanku zloćudnog tumora.....	19
1.4.1	Utjecaj upale na aspekte maligne transformacije .....	19
1.4.2	Utjecaj tumora na imunološki odgovor .....	22
1.5	Upalni citokin IL6 i razvoj tumora .....	24
1.5.1	Protumorska uloga IL6 .....	25
1.5.2	Antitumorsko djelovanje IL6.....	27
1.6	Upalni procesi u zloćudnim tumorima mokraćnog mjehura .....	27
2	HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	30
2.1	Hipoteza.....	30
2.2	Ciljevi istraživanja.....	31
3	MATERIJALI I METODE.....	32
3.1	Materijali.....	32
3.1.1	Reagensi.....	32
3.1.2	Početnice.....	33

3.1.3	Protutijela.....	34
3.1.4	Biljezi.....	34
3.1.5	Komercijalno dostupni kompleti .....	34
3.1.6	Puferi i otopine.....	36
3.1.7	Gelovi.....	37
3.2	Metode .....	38
3.2.1	Protokol istraživanja .....	38
3.2.2	Uzorci pacijenata .....	38
3.2.3	Izolacija RNA, DNA i proteina iz tkiva .....	40
3.2.4	Priprema ukupnih tkivnih lizata i frakcioniranje tkivnih lizata .....	40
3.2.5	Denaturirajuća SDS poliakrilamidna gel elektroforeza i <i>western blot</i> .....	40
3.2.6	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR).....	41
3.2.7	Transgenični miševi i BBN tretman .....	42
3.2.8	Patohistološka i imunohistokemijska analiza tkiva .....	42
3.2.9	Dokazivanje fragmentacije DNA.....	44
3.2.10	Sekvenciranje RNA .....	44
3.2.11	Statistički postupci.....	45
4	REZULTATI .....	46
4.1	Tretman kemikalijom BBN izaziva izrazit upalni fenotip tumora mokraćnog mjehura kod miševa.....	46
4.2	Porast izražaja upalnih biljega prilikom indukcije tumora BBN-om .....	51
4.3	Patohistološki fenotip tumora mokraćnog mjehura wt i IL6 KO miševa.....	59
4.4	Diferencijalni izražaj gena prilikom tretmana kemikalijom BBN u WT i IL6 KO miševima.....	68
4.5	Izražaj IL6, STAT3, RelA/p65, CCND1, TGFβ1 i VEGFA u tumorima mokraćnog mjehura kod čovjeka .....	72
4.6	Aktivacija STAT3 i RelA/p65 u tumorima mokraćnog mjehura čovjeka.....	74
5	RASPRAVA .....	76
6	ZAKLJUČCI.....	83
7	SAŽETAK .....	84
8	SUMMARY.....	85

9	LITERATURA .....	86
10	ŽIVOTOPIS.....	107

## POPIS OZNAKA I KRATICA

4-ABF	4-aminobifeni
APC	antigen presenting cells
BBN	N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
CAC	<i>colitis associated cancer</i>
CD11+	<i>cluster of differentiation 11+</i>
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2a</i>
CIS	<i>carcinoma in situ</i>
CK20	citokeratin 20
Crp	C reaktivni protein
CTL	citotoksični T limfociti
DBC1	<i>deleted in baldder cancer protein 1</i>
DC	dendritičke stanice
DSS	dekstran natrij sulfat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FC	<i>fold change</i>
FGFR3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GO	<i>gene ontology</i>
GSTM1	glutation-S-transferaza M1
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HGTCC	<i>high grade transitional cell</i>
HPC	stanice hematopoetske loze
IFN $\gamma$	interferon $\gamma$
IL1 $\alpha$	interleukin 1 $\alpha$
IL1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
IL22	interleukin 22
IL6	interleukin 6
IL6 KO	<i>interleukin 6 knock-out</i>
iMC	nezrele mijeloidne stanice
Jak	<i>Janus kinase</i>
LGTCC	<i>low grade transitional cell carcinoma</i>
LOH	<i>loss of heterozigosity</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MDR2	<i>multidrug resistance protein</i>
MDSC	<i>myeloid-derived stem cells</i>
MIBC	<i>muscle invasive bladder cancer</i>
MMPs	<i>matrix metalloproteases</i>
mTor	<i>mammalian Target of rapamycin</i>
MYD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
NAT2	N-acetiltransferaza 2

NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
NMIBC	<i>non muscle invasive bladder cancer</i>
NOS	<i>non-specific glandular growth</i>
pDCs	<i>plazmacitoidne dendritičke stanice</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PI3K	<i>phosphoinositide-3-kinase</i>
PTCH1	<i>protein pathed homolog 1</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PUNLMP	<i>papillary neoplasm of low malignant potential</i>
qPCR	<i>kvantitativna lančana reakcija polimerazom</i>
RB1	<i>retinoblastoma 1</i>
S1PR	<i>sphingosine-1-phosphate receptor</i>
S1P	<i>sphingosine-1-phosphate</i>
SASP	<i>senescence-associated secretory phenotype</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNM	<i>Tumor-Node-Metastasis</i>
TSC1	<i>tuberous sclerosis 1</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>



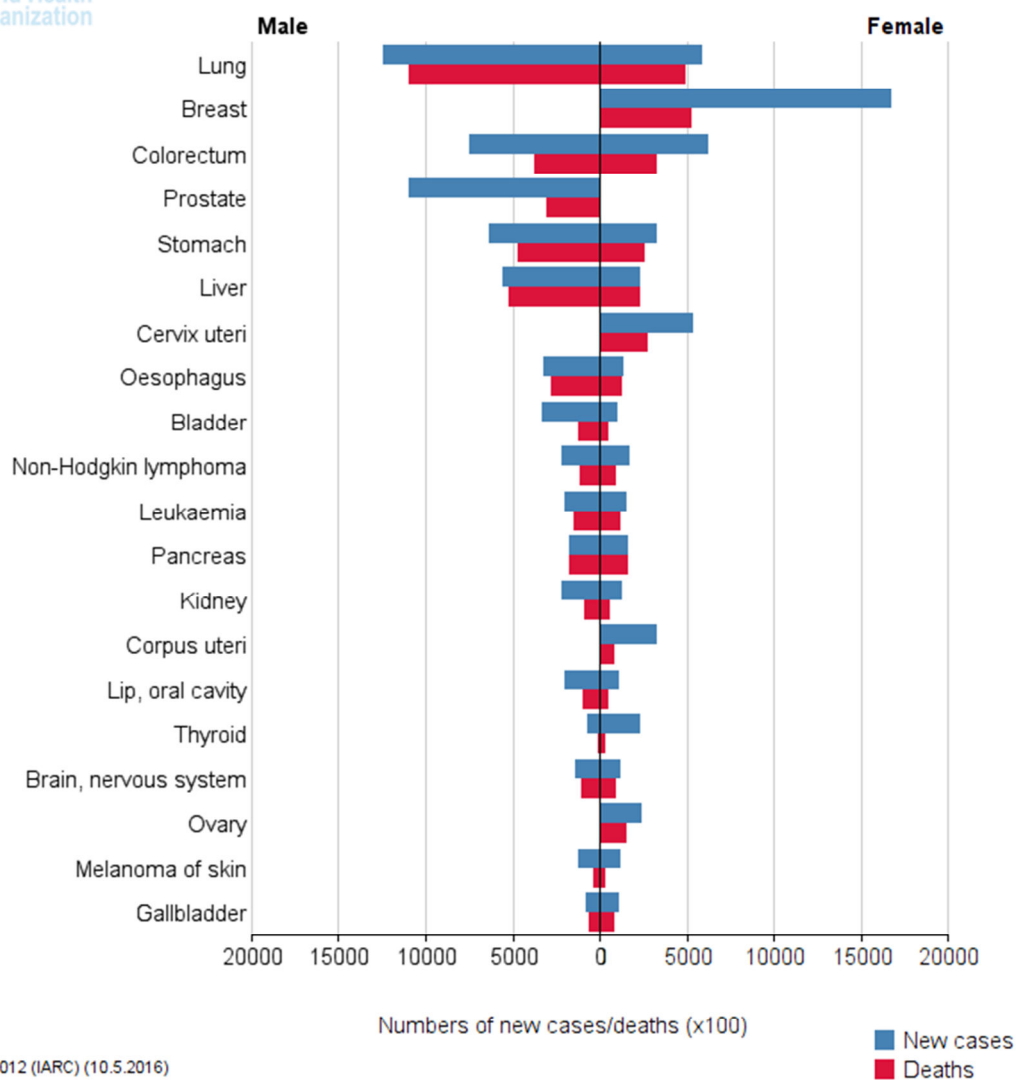
# 1 UVOD

## 1.1 Epidemiologija tumora mokraćnog mjehura

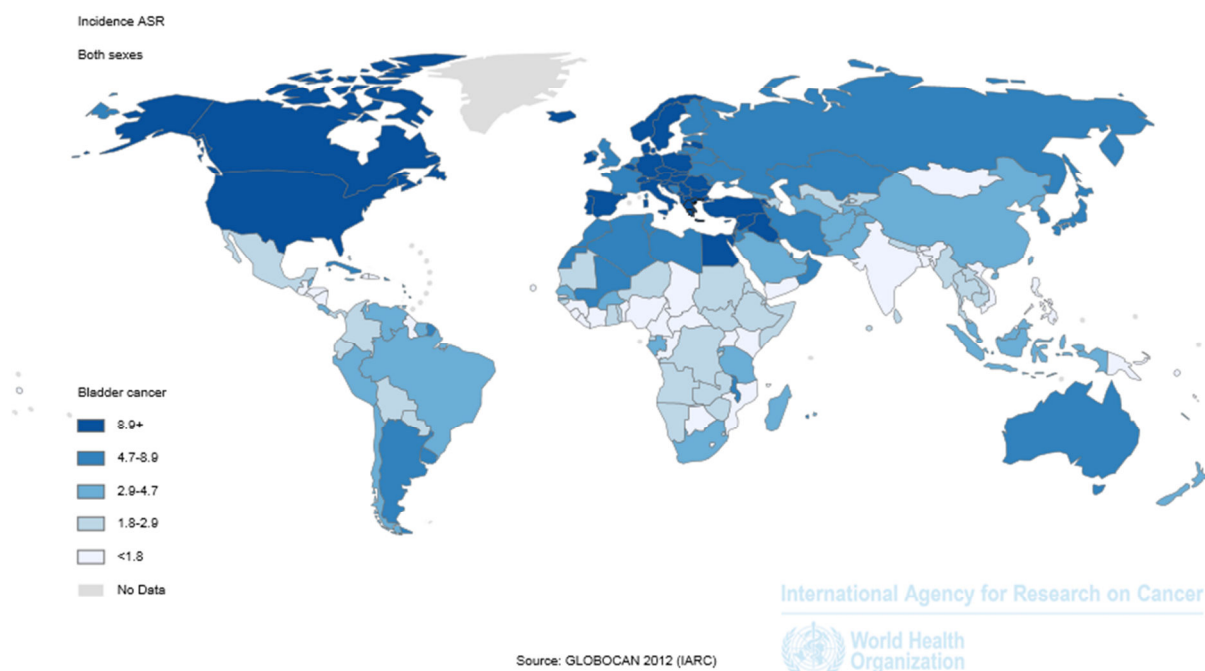
Zloćudni tumori mokraćnog mjehura su najčešća maligna bolest urinarnog trakta. Procjenjuje se da godišnje u svijetu od tih tumora oboli oko 380 000 osoba, te ih oko 150 000 umre. Zloćudni tumori (rak) mokraćnog mjehura su histološki vrlo heterogena skupina tumora, a najčešći tip raka mokraćnog mjehura je urotelni karcinom. Incidencija zloćudnih tumora mokraćnog mjehura je različita u različitim populacijama, tj. zemljopisnim regijama, a razlike potječu od različitih demografskih osobina populacije poput starosti, spola i rase te s obzirom na različitu izloženost rizičnim čimbenicima poput pušenja, izlaganje drugim negativnim okolišnim čimbenicima (nitrozo spojevi, infestacije sa *S. haematobium*) te još uvijek slabo razjašnjenim nasljednim elementima. Neki od tih čimbenika uvjetuju smrtnost specifično vezanu uz tu bolest<sup>1</sup>.

### 1.1.1 Zemljopisna rasprostranjenost i incidencija

S obzirom na procjene obolijevanja i smrtnosti od različitih tipova zloćudnih tumora iz 2012. godine koju je utvrdila Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) kroz projekt GLOBOCAN, zloćudni tumori mokraćnog mjehura zauzeli su 6. mjesto prema incidenciji te 9. mjesto s obzirom na smrtnost u općoj svjetskoj populaciji (Slika 1). Tumori mokraćnog mjehura su 7. najčešće dijagnosticirana zloćudna bolest kod muškaraca, dok su kod žena na 18. mjestu. Incidencija tumora mokraćnog mjehura je različita na različitim zemljopisnim lokacijama što se objašnjava regionalnim razlikama u izlaganju štetnim, okolišnim čimbenicima, iako treba uzeti u obzir i razlike u bilježenju pojavnosti te bolesti. Općenito, incidencija je viša u razvijenim zemljama u odnosu na manje razvijene zemlje. Jedan od razloga koji pridonosi različitosti u incidenciji pri usporedbi zemalja sličnih demografskih osobina i okolišnih čimbenika jest činjenica da neke zemlje ne bilježe rane stadije tumora niskog malignog potencijala, dok druge to čine<sup>2</sup>. Slika 2 prikazuje prostornu incidenciju tumora mokraćnog mjehura s obzirom na zemljopisnu rasprostranjenost.



**Slika 1. Incidencija i smrtnost različitih tipova tumora u populaciji s obzirom na spol.** Zloćudni tumori mokraćnog mjehura su sedmi po učestalosti kod muškaraca, te 18. kod žena. Prema smrtnosti kod muškaraca je na devetom mjestu, a kod žena na 17. mjestu. Preuzeto iz projekta GLOBOCAN (<http://globocan.iarc.fr>).



**Slika 2. Godišnja incidencija tumora mokraćnog mjehura (na 100.000 osoba) prema zemljopisnoj regiji (oba spola, sve dobne skupine).** Najveća incidencija opaža se u najrazvijenijim, zapadnim zemljama. Preuzeto iz projekta GLOBOCAN (<http://globocan.iarc.fr>).

### 1.1.2 Pušenje

Pušenje je jedan od najvažnijih promjenjivih rizičnih čimbenika za tumore mokraćnog mjehura. Rizik za razvoj tumora mokraćnog mjehura kod pušača je 2 do 5 puta veći u odnosu na nepušače. Prestanak pušenja znatno smanjuje rizik od ove bolesti, ali kod bivših pušača rizik ostaje veći u odnosu na osobe koje nikada nisu pušile. Kod muškaraca, u odnosu na muške osobe koje nikada nisu pušile, rizik je 3.89 puta u odnosu na pušače (95% CI: 3.46-4.37) te 2.14 puta viši za osobe koje su nekadašnji pušači (95% CI: 1.92-2.37). Žene koje puše imaju 4.65 puta veći rizik za razvoj tumora mokraćnog mjehura u odnosu na one koje ne puše (95% CI: 3.73-5.79) te 2.52 (95% CI: 3.73-5.79) puta veći rizik ukoliko su nekada pušile<sup>2</sup>. Kod oba spola očigledna je ovisnost o dnevnoj dozi te pušačkom stažu, ali čak i pojedinci koji su pušili <10 cigareta dnevno te su prestali pušiti prije više od 10 godina imaju povišen rizik od obolijevanja u odnosu na nepušače<sup>3-5</sup>.

Duhanski dim sadrži različite štetne tvari, a sastojci poput policikličkih aromatskih ugljikovodika, 4-aminobifenila (4-ABF) te nezasićenih aldehida su dokazani kancerogeni mokraćnog mjehura<sup>6,7</sup>. Također, pokazano je da varijabilnost u strukturi i funkciji određenih enzima kao što su N-acetiltransferaza 2 (NAT2) i glutation-S-transferaza-M1 (GSTM1), koje su uključene u metabolizam kancerogena duhanskog dima, modificiraju rizik za obolijevanje

od tumora mokraćnog mjehura<sup>6,8</sup>. Pasivno pušenje još uvijek nije dovedeno u značajnu svezu s povećanim rizikom za tumore mokraćnog mjehura<sup>9</sup>.

### **1.1.3 Industrijski kancerogeni**

Pokazano je kako izlaganje beta-naftilaminu, benzidinu i 4-ABF značajno korelira s razvojem tumora mokraćnog mjehura<sup>10</sup>. Radno izlaganje tim kemikalijama je najzastupljenije u tekstilnoj industriji i u industriji prerade gume. Od 1970. godine zabranjeno je korištenje tih kemikalija u industrijske svrhe jer su prepoznate kao općeniti kancerogeni za čovjeka. Unatoč tomu, u današnje vrijeme, još uvijek postoji mogućnost izlaganja potencijalnim karcinogenima mokraćnog mjehura kao što su npr. o-toluidine kod ljudi zaposlenih u industriji boja, gume, pesticida te farmaceutske industriji<sup>11</sup>. Najnovija istraživanja pokazuju da su za oko 7% tumora mokraćnog mjehura u muškaraca te za 2% kod žena, zaslužni vanjski čimbenici povezani s radnom okolinom<sup>12</sup>.

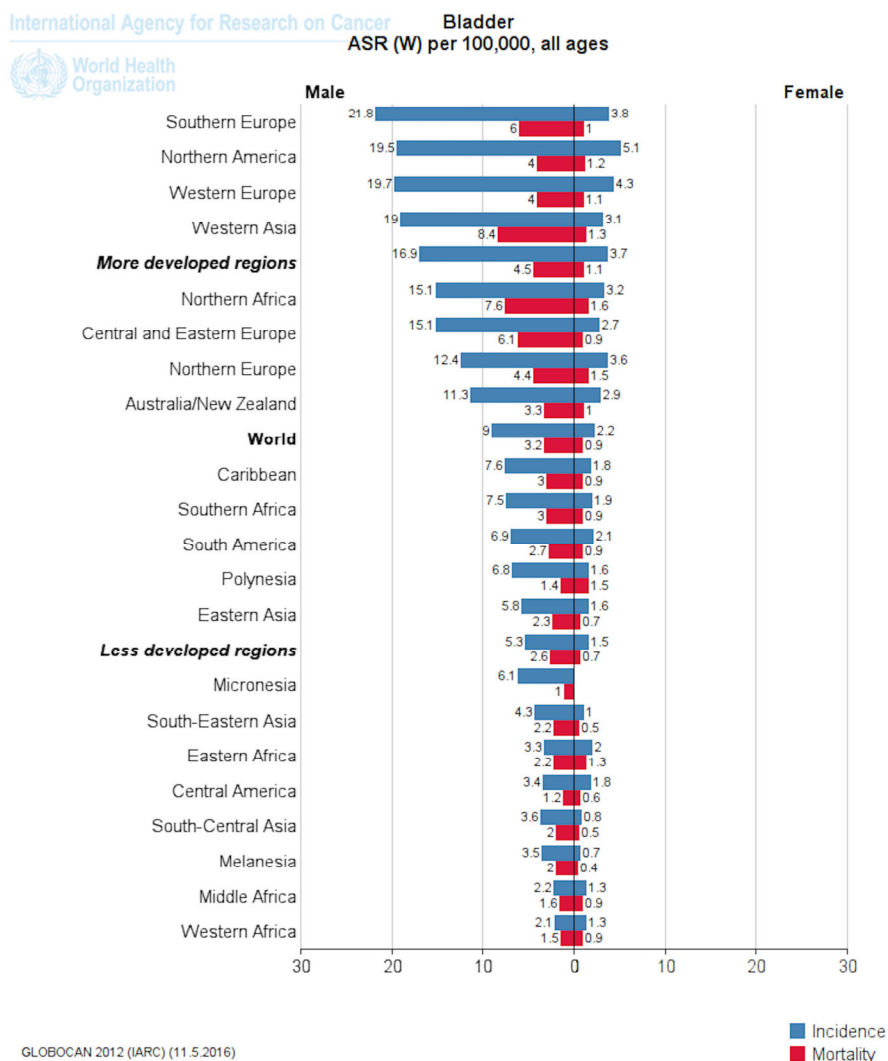
### **1.1.4 Dob**

Incidencija tumora mokraćnog mjehura raste s životnom dobi, a većina pacijenata je starija od 65 godina u trenutku postavljanja dijagnoze. To je tipična karakteristika većine zloćudnih tumora te nastaje zbog akumulacije štetnih mutacija tijekom života, a koje su posljedica izlaganja kancerogenima. Također, sa starenjem slabe mehanizmi popravljivanja oštećene DNA molekule, te je kod starijih osoba slabiji imunološki odgovor u borbi protiv neoplastičnih tvorbi. Srednja dob pacijenata oboljelih od tumora mokraćnog mjehura iznosi 70 godina za muškarce, te 72 godine za žene<sup>13</sup>. Starija je životna dob također povezana s mortalitetom specifično vezanim za ovu bolest<sup>14-16</sup>, što se donekle može objasniti slabijom tolerancijom agresivne terapije u starijih osoba, iako je moguće da je bolest kod starijih osoba agresivnija<sup>14-16</sup>.

### **1.1.5 Spol**

Rizik obolijevanja od tumora mokraćnog mjehura općenito je veći kod muškaraca u odnosu na žene (Slika 3), a razlozi ove pojave još nisu sasvim razjašnjeni. Objašnjenje se je u prošlosti tražilo u različitoj spolnoj zastupljenosti pušača te činjenici da su muškarci više izloženi kancerogenima tijekom svog radnog staža, a s druge strane ne smiju se zanemariti različiti utjecaji muških i ženskih spolnih hormona. U prošlosti su muškarci bili znatno zastupljenija skupina u populaciji pušača. Također, muškarci su bivali više izloženi industrijskim kancerogenima. Međutim, drugom polovinom 20. stoljeća porastao je broj žena

koje puše, a i žene su počele obavljati tradicionalno muške poslove. Unatoč tim promjenama kod muškaraca je i dalje značajno povećana incidencija tumora mokraćnog mjehura<sup>17</sup>. Hipoteza koja u novije vrijeme pokušava objasniti tu činjenicu uzima u obzir biološke razlike između spolova, pogotovo one koje se odnose na razliku u spolnim hormonima i njihovim receptorima. Dosadašnja istraživanja pokazuju kako su u hormonalnu regulaciju uključeni androgeni i estrogenski hormoni i njihovi receptori, a njihova točna uloga u razvoju tumora mokraćnog mjehura još uvijek nije u potpunosti razjašnjena<sup>18,19</sup>.



**Slika 3. Incidencija i smrtnost tumora mokraćnog mjehura s obzirom na spol i zemljopisnu regiju.** Vrijednosti su standardizirane s obzirom na dob (ASR, engl. *age-standardized rates*). *Incidence* engl. incidencija, *mortality* eng. smrtnost. Preuzeto iz GLOBOCAN projekta (<http://globocan.iarc.fr>).

### 1.1.6 Drugi faktori rizika

Drugi faktori rizika koji se vezuju uz pojavu tumora mokraćnog mjehura jesu rasa, terapijsko zračenje zdjelice, kronična upala mokraćnog mjehura, izlaganje ciklofosfoamidima, prekomjerno korištenje fenacetina (zabranjen od strane FDA još 1983. godine), korištenje kineske biljke *Aristolochia fangchi*, koja sadrži nefrotoksin i urotelni karcinogen aristolokičnu kiselinu<sup>20,21</sup>.

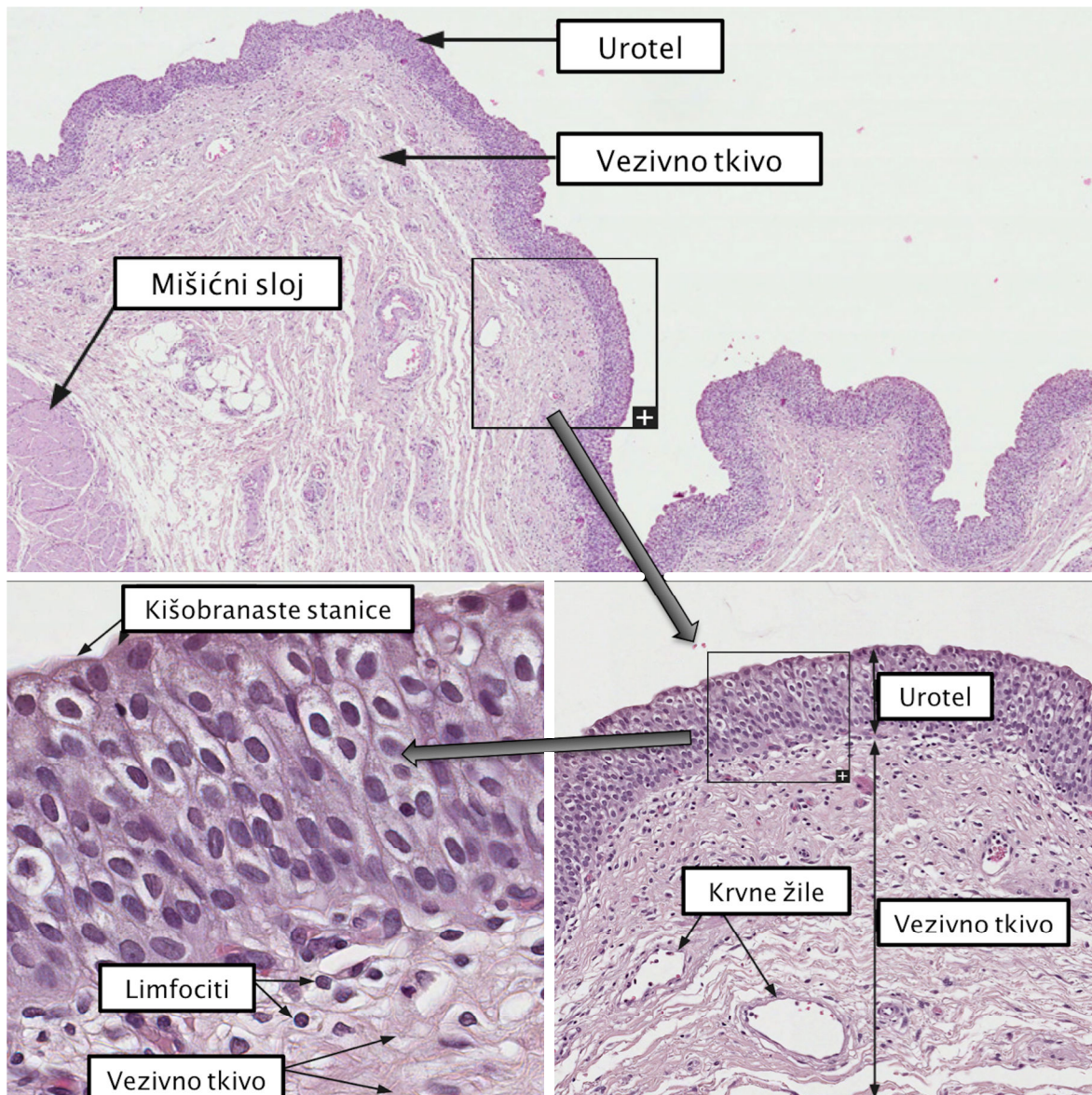
Incidencija tumora mokraćnog mjehura otprilike je dva puta niža kod crne rase u odnosu na bijelu rasu. Unatoč tomu, u trenutku dijagnoze bolest se kod pacijenta crne rase obično prezentira u uznapredovanom obliku bolesti te se uz tu rasu vezuje veća stopa smrtnosti od raka mokraćnog mjehura<sup>13</sup>. Terapijsko zračenje zdjelice se najčešće primjenjuje za liječenje raka prostate kod muškaraca te raka maternice i cerviksa kod žena. Taj postupak podiže rizik za obolijevanje od raka mokraćnog mjehura za 70% kod muškaraca te 50% kod žena<sup>22,23</sup>. Na Bliskom istoku (pogotovo u Egiptu) puno se slučajeva tumora mokraćnog mjehura veže uz upalni proces izazvan kroničnom infestacijom parazitom *Schistosoma haematobium*. U razvijenim zemljama kronične upale mjehura često su povezane s trajnom kateterizacijom pacijenata s ozljedama kralježničke moždine. Tumor mokraćnog mjehura koji se povezuje s kroničnim upalnim stanjima mokraćnog mjehura jest skvamoznog tipa. U usporedbi s urotelnim karcinomima mokraćnog mjehura, skvamozni karcinomi mokraćnog mjehura obično su uznapredovanog stadija bolesti prilikom postavljanja dijagnoze<sup>24</sup>.

## 1.2 Patohistologija tumora mokraćnog mjehura

### 1.2.1 Građa urotela

Urotel (prijelazni epitel) je epitel koji pokriva unutrašnju površinu mokraćnog mjehura. Sačinjavaju ga 2-3 sloja stanica u rastegnutom stanju, te 6-7 slojeva stanica kada je mjehur kontrahiran (nakon pražnjenja). Urotel sačinjavaju kišobranaste stanice (engl. *umbrella cells*) u površinskom sloju, intermedijarne stanice koje čine srednji sloj urotela, i bazalne stanice koje su najbliže lamini propriji (Slika 4). Kišobranaste stanice su eliptičnog oblika s gustom eozinofilnom citoplazmom te tvore površinski sloj urotela. Prisutnost tih stanica unutar lezije, ukazuje da lezija nije neoplastična ili da se radi o niskogradusnom tumoru, jer te stanice obično nedostaju kod tumora visokog gradusa. Intermedijarne stanice su kubičnog ili blago štapićastog oblika, glatkih jezgrinih kontura i sitnozrnati kromatina. Bazalne stanice urotela su pak kubične i tvore jedan sloj stanica<sup>25</sup>.

Spektar benignih proliferativnih i metaplastičnih procesa urotela je često vrlo izazovan u dijagnostičkom smislu. Za starije osobe karakteristične su urotelne invaginacije u lamini propriji, tzv. von Brunn-ova gnijezda, koja mogu prerasti u sliku cistitisa<sup>26</sup>. U trigonskom području kod žena je česta skvamozna metaplazija, međutim najčešće se smatra benignom promjenom u nedostatku keratinizacije. Citološka različitost također je očigledna u upalnim stanjima i naziva se reaktivnom atipijom. Reaktivne urotelne stanice mogu imati povećane jezgre, ali imaju tipično glatke jezgrine konture, sitnozrnati kromatin, te povremeno malene nukleoluse. U ovom slučaju stanice zadržavaju svoju polarnost, moguća je prisutnost mitozu koje nisu atipične i pronalaze se u bazalnom sloju<sup>25</sup>.



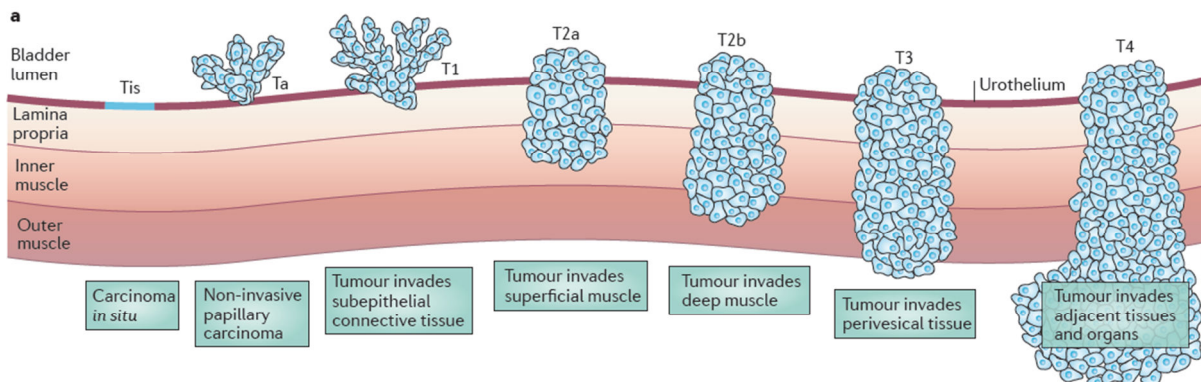
**Slika 4. Histološki prikaz normalnog urotela čovjeka.** Histološki prerezi bojani H&E. Preuzeto i modificirano s web stranice *The Human Protein Atlas* 01.07.2016. godine s (<http://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/urinary+bladder>). Na površini je epitel građen od 5 do 6 slojeva stanica, na površini kojeg su kišobranaste stanice – tzv. urotel. Ispod urotela je sloj veziva – lamina proprija, a mjehur je obavijen mišićnim slojem (musculus detrusor).



## 1.2.2 TNM klasifikacije tumora mokraćnog mjehura

Tumori mokraćnog mjehura sačinjavaju široku dijagnostičku grupu tumora, a koja obuhvaća klasičan urotelni karcinom kao i spektar njegovih morfoloških varijanti. Osim tumora urotela, rjeđe se pojavljuju karcinomi skvamoznih stanica, adenokarcinomi, karcinomi malih stanica i drugi<sup>27</sup>. Više od 90% svih slučajeva tumora mokraćnog mjehura jesu tumori urotela. Opisuju se korištenjem *Tumor-Node-Metastasis* sistema (tzv. TNM klasifikacija) kojom se označava stupanj uznapredovalosti tumorske bolesti (Tis-T4), a gradus tumora određuju morfološke značajke tumorskih stanica s kojima obično korelira njihov maligni potencijal. Prilikom postavljanja dijagnoze oko 60% tumora su mišićno neinvazivni tip papilarnih tumora (Ta) niskog gradusa (Slika 5). Nadalje, tumori koji su penetrirali laminu propriu, no nisu se proširili u mišić pripadaju skupini T1 tumora i uobičajeno su visokog gradusa. Oko 20% tumora dijagnosticira se u mišićno invazivnome stadiju (T2-T4)<sup>28</sup>.

Karakteristično za mišićno neinvazivne tumore mokraćnog mjehura (NMIBC) jest njihovo opetovano pojavljivanje nakon prvotne resekcije, no oni rijetko poprimaju invazivni karakter te je predviđeno petogodišnje preživljenje oko 90%. Mišićno-invazivni tumori (MIBC) mokraćnog mjehura imaju znatno lošiju prognozu s petogodišnjim preživljenjem manjim od 50%<sup>29</sup>.



**Slika 5. Prikaz TNM klasifikacije tumora mokraćnog mjehura.** Tis (*tumor in-situ*) – predstavlja maligne promjene urotela koje ne pokazuju invaziju u dublje slojeve stijenke mjehura kao ni urastanje u lumen mjehura; Ta – maligne promijenjene stanice urotela tvore vilozne strukture koje rastu u lumen mjehura, te su zadržane na uroteliju (bez prodora u laminu propriju); T1 – invazija u laminu propriju, T2-T4 – mišićno invazivni tumori mokraćnog mjehura. Preuzeto iz Knowles MA et Hurst CD, *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity*, Nat Rev Cancer, 2015<sup>30</sup>.

### 1.2.3 Neinvazivne novotvorine urotela

#### 1.2.3.1 Papilarne lezije

Papilarne lezije kategoriziraju se prema WHO/ISUP (*World Health Organisation/International Society of Urological Pathologists*) klasifikaciji iz 2016. godine kao papilomi, papilarne urotelne neoplazme niskog malignog potencijala (PUNLMP, engl. *papillary urothelial neoplasm of low malignant potential*), papilarni urotelni karcinomi niskog gradusa (LGTCC, engl. *low grade transitional cell carcinoma*) i papilarni urotelni karcinomi visokog gradusa (HGTCC, engl. *high grade transitional cell carcinoma*) (Slika 6)<sup>31</sup>. Najniži rizik od ponavljanja bolesti i progresije karakterističan je za urotelne papilome koji se morfološki definiraju kao egzofitni papilarni rast s tankom fibrovaskularnom stromom prekrivenom normalnim urotelom bez stanične atipije i niskog mitotskog indeksa. Česte su kišobranaste stanice koje su učestalo vakuolizirane. Kategorija PUNLMP je definirana kao značajno zadebljanje urotela (često više od 10 slojeva) ali bez stanične atipije. LGTCC predstavlja urotel uredne polarnosti i arhitekture, no prožet je s hiperkromatskim jezgrama te s pojedinačnim mitozama ograničenim na donje slojeve. Naposljetku, HGTCC je definiran umjereno do znatno narušenom arhitekturom urotela koja uključuje učestalo grananje i fuziju papilarnog rasta. Ova vrsta papilarne lezije pokazuje karakterističan gubitak polarnosti, jezgrin pleomorfizam, aberantnu raspodjelu kromatina i čestu pojavu nukleolusa<sup>31,32</sup>.

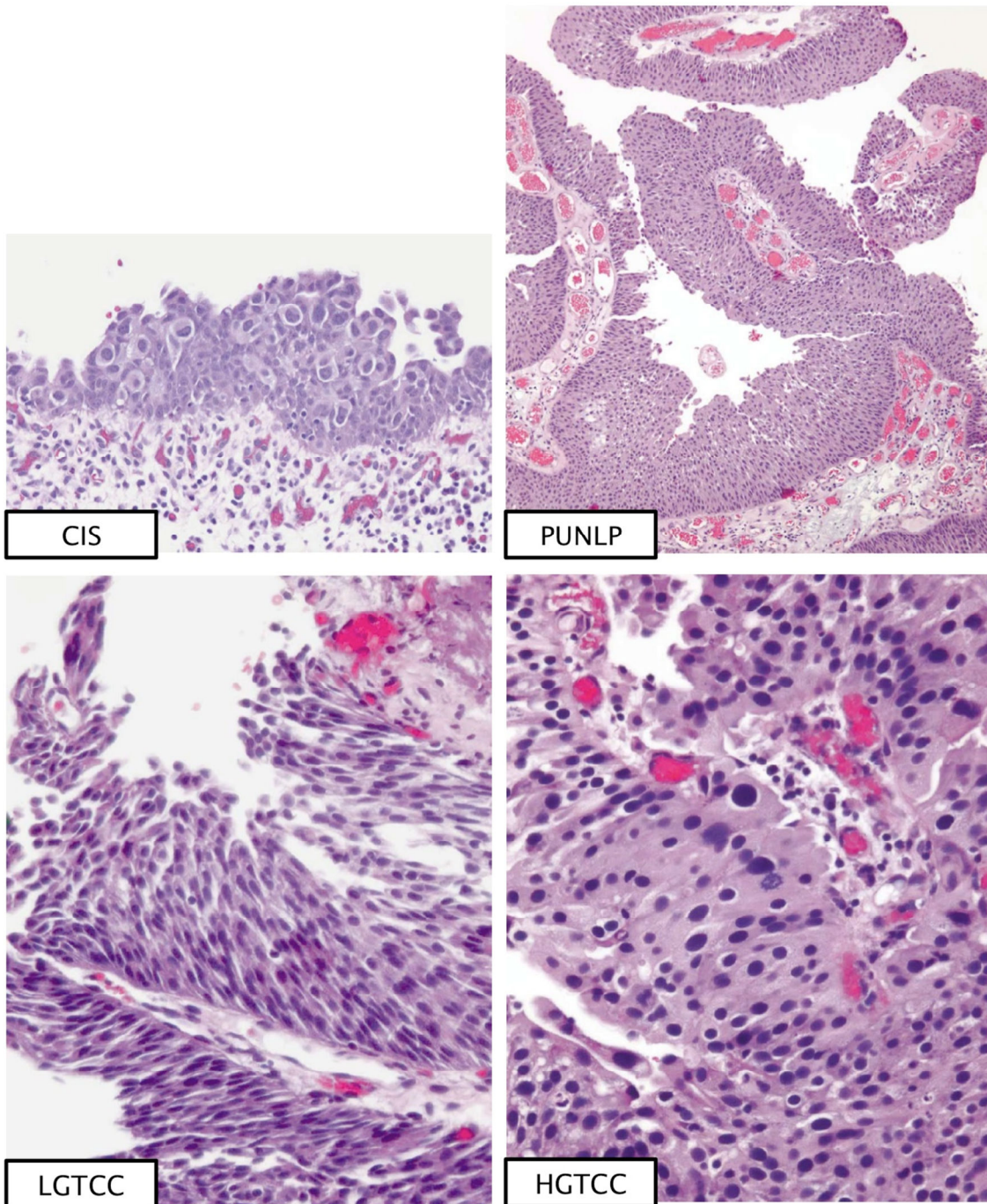
#### 1.2.3.2 Plosnate (ravne) lezije

Displazija urotela uključuje spektar više morfoloških promjena, a definira se kao blaža promjena staničnih i drugih strukturnih elemenata, a koja može uključivati gubitak stanične polarnosti, nagomilavanje jezgara i hiperkromaziju. Mitoze su rijetka pojava i uglavnom ograničene na bazalni sloj epitela. Displazija urotela je u oko 20% slučajeva preteča pojave zloćudnog tumora, a u preostalih 80% slučajeva ne napreduje dalje, već vjerojatno predstavlja atipičnu pojavu reaktivnih promjena ranih novotvorina<sup>33</sup>.

Karcinom *in situ* (CIS od lat. *carcinoma in situ*) urotela predstavlja pred-invazivnu leziju u većini slučajeva te je histoloških osobina sličnih kao HGTCC. Klasični oblik CIS-a uključuje narušenu polarnost, jezgrin pleomorfizam i povećanje jezgara, uočljive nukleoluse i česte mitoze u površinskom dijelu urotela (Slika 6). U literaturi su opisane mnogobrojne varijante CIS-a poput mikropapilarnog, „prilijepljenog“ ili tipa *Paget* stanica. Za ovaj tip lezija je karakterističan izražaj citokeratina 20 (CK20) čitavom debljinom urotela, gubitak izražaja CD44 u bazalnom sloju te jak jezgri izražaj proteina p53 u većini tumorskih

stanica<sup>33,34</sup>. CK20 je citokeratin niske molekulske mase koji gradi intermedijarne filamente te čini strukturnu potporu površinskom sloju kišobranastih stanica. U neoplastičnim tvorbama urotela CK20 je izražen čitavom debljinom urotela te nije izričito ograničen na površinski sloj. Dodatni molekularni biljezi koji su opisani u slučajevima urotelnog CIS-a uključuju gubitak izražaja E-kadherina te porast izražaja proteina Ki-67<sup>35</sup>.

U današnje vrijeme se pridaje velika pažnja molekularnom profiliranju tumora kako bi se poboljšala terapija zloćudnih tumora mokraćnog mjehura. Do sada su pouzdano utvrđena dva ključna molekularna puta koja opisuju nastanak i razvoj tumora mokraćnog mjehura. Ovakav model predlaže da je put nastanka papilarne varijante NMIBC kreće razvojem urotelne hiperplazije koju prati pojačana vaskularizacija, a smatra se da MBIC potječu od displazije urotela i karcinoma *in situ* (CIS). Glavne molekularne osobine NMIBC i MIBC prikazane su na slici 2, a važno je naglasiti da velik broj tumora prikazuje znatnu molekularnu heterogenost. Na slici 6 prikazani su najčešći oblici neinvazivnih tumora mokraćnog mjehura<sup>20</sup>.



**Slika 6. Najčešći oblici neinvazivnih tumora mokraćnog mjehura.** Na slici su prikazane neinvazivne lezije urotela. CIS – tumor *in situ*, PUNLMP – pred-neoplastična lezija niskog malignog potencijala, LGTCC – tumor prijelaznog epitela niskog gradusa, HGTCC – tumor prijelaznog epitela visokog gradusa. Preuzeto iz Kirkali, Z. *et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. Urology* 66, 4-34, doi:10.1016/j.urology.2005.07.062 (2005)<sup>20</sup>.

#### 1.2.4 Invazivni urotelni karcinom

Invazivni urotelni karcinomi su morfološki raznolika skupina tumora koji se povezuju s CIS ili HGTCC oblicima tumora. Invazije koje mogu biti prisutne u slučajevima LGTCC su slabijeg invazivnog potencijala. Međutim, novija istraživanja ukazuju da su kod LGTCC često prisutne fokalne *in situ* promjene visokog gradusa kao popratna pojava te se smatra da je invazija posljedica upravo takvih točkastih visoko-gradusnih promjena<sup>36</sup>. Invazivni urotelni karcinomi sadrže gnijezda invazivnih tumorskih stanica koja mogu prikazivati minimalnu do značajnu jezgenu atipiju. Također, čak jedna trećina invazivnih tumora mokraćnog mjehura ima neku od divergentnih osobina kao što je npr. dediferencijacija u skvamozni tip stanica. Upravo takve osobine invazivnih urotelnih karcinoma vrlo često određuju agresivnost tumora (mikropapilarni tip, „*nested*“ tip) ili ograničen odgovor na terapiju (skvamozna diferencijacija).<sup>32</sup>

## 1.2.5 Drugi histološki tipovi karcinoma mokraćnog mjehura

Ukoliko urotelni karcinom pokazuje znakove divergentne diferencijacije klasificira se se kao urotelni karcinom, a u opisu će biti naznačen postotak divergentne diferencijacije. Međutim, ukoliko se u mokraćnom mjehuru pronalaze neoplastične promjene isključivo izgleda atipičnih stanica druge histologije (npr. skvamoznih stanica, adenokarcinoma, sitnostaničnog karcinoma), tada se tumor klasificira odvojeno<sup>31</sup>.

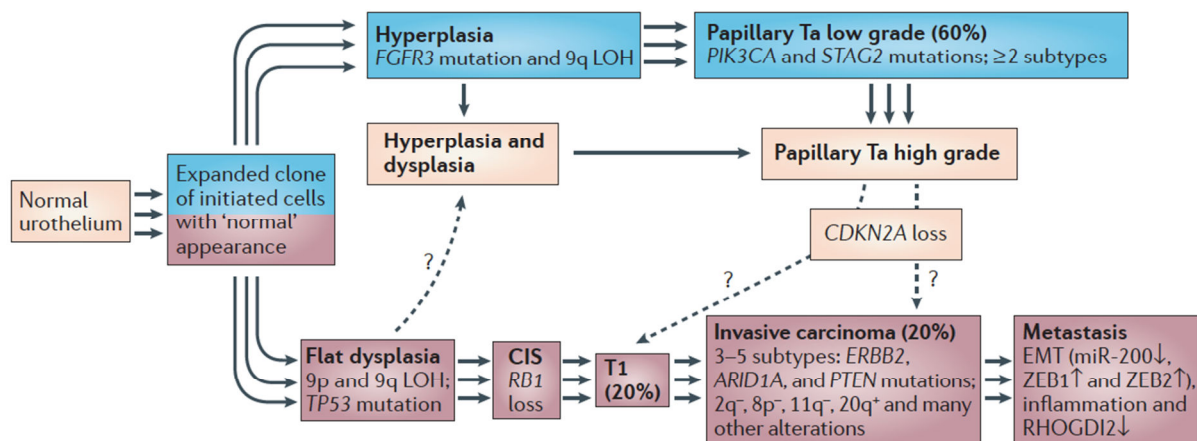
Karcinom skvamoznih stanica dijagnosticira se ukoliko je invazivni dio lezije isključivo skvamozne diferencijacije. Gradus ovakve lezije određuje doseg diferencijacije tumorskih stanica; umjereno i dobro diferencirane lezije sadržavaju međustanične mostove i keratinsku osnovu. Kod slabo diferenciranih lezija, keratinizacija je oskudna te se dijagnoza donosi na osnovu prisutnosti dezmosoma i guste ružičaste citoplazme. *In situ* promjene koje se vežu s ovim lezijama mogu biti pravi *in situ* karcinom skvamoznih stanica ili pak karcinom urotela visokog gradusa. Novija istraživanja koja prate izražaj gena kod ova dva tipa invazivnih tumora mokraćnog mjehura ukazuju na njihovo moguće zajedničko podrijetlo<sup>37</sup>. Karcinom skvamoznih stanica mokraćnog mjehura karakterističan je za područje Bliskog istoka, a u općoj se populaciji vrlo rijetko pojavljuje<sup>31</sup>.

Adenokarcinom mokraćnog mjehura je zloćudna novotvorina koja prikazuje žljezdani fenotip. Vrlo je rijedak tip tumora mokraćnog mjehura te je zastupljen tek u 2% slučajeva invazivnih tumora mokraćnog mjehura. Poznate su različite varijante adenokarcinoma mokraćnog mjehura poput mucinoznog, miješanog, varijante tipa adenokarcinoma kolona, varijante sa stanicama prstena pečatnjaka (*signet ring cell*) i drugi<sup>31</sup>.

Sitnostanični karcinom pojavljuje se u 1% slučajeva invazivnih tumora mokraćnog mjehura, a sastavljen je od neuroendokrinih karcinomskih stanica visokog gradusa. Te tumorske stanice su malene i točkastog kromatina, neprimjetnih nukleola te oskudne citoplazme. Mitoze su vrlo primjetne kod ovog tipa tumora, a moguća je i prisutnost nekroze<sup>31,35</sup>.

### 1.3 Molekularna patogeneza tumora mokraćnog mjehura

Između neinvazivnih tumora niskog gradusa i invazivnih tumora mokraćnog mjehura visokog gradusa postoji razlika u kliničkom ishodu bolesti koja je vjerojatno odraza razlika na molekularnoj razini. U literaturi se najčešće opisuju dva zasebna puta molekularne patogeneze tumora mokraćnog mjehura utemeljena na specifičnim genetičkim promjenama karakterističnim za oba tipa tumora. Takozvani "Ta put" karcinogeneze vodi prema nastanku papilarnih neinvazivnih tumora niskog gradusa te "CIS put" koji rezultira nastankom tumora visokog gradusa, ne nužno papilarne forme, koji najčešće napreduju u mišićno-invazivne tumore (MIBC, engl. *muscle invasive bladder cancer*). Podrijetlo Ta tumora visokog gradusa trenutno nije poznato, a moguće je da nastaju *de novo* od displazije urotela ili napredovanjem gradusa kod postojećih Ta tumora niskog gradusa (Slika 7)<sup>30</sup>.



**Slika 7. Shematski prikaz molekularne patogeneze tumora mokraćnog mjehura.** „Ta put“ označen je plavom pozadinom, a „CIS put“ crvenom bojom. Preuzeto iz Knowles MA et Hurst CD, *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity*, Nat Rev Cancer, 2015<sup>30</sup>

### 1.3.1 Ta put

„Ta put“ opisuje nastanak papilarnih, neinvazivnih tumora niskog gradusa. Genetske promjene prisutne u tom putu povezane su s hiperplazijom i staničnim rastom. Normalni urotel prelazi u niskogradusne papilarne tumore aktivacijom protoonkogena, a rezultat su pojava histoloških promjena kao što su papilomi, PUNLMP i LGTCC. Tipične mutacije za Ta put su gubitak heterozigotnosti kromosoma 9 (LOH, engl. *loss of heterozigosity*), te mutacije u genima za FGFR3, RAS i PI3K.

Delecije dijelova kromosoma 9 vjerojatno su najranija mutacija prisutna kod PUNLMP i neinvazivnog tumora mokraćnog mjehura. Delecije 9p i 9q kraka česte su i kod CIS tumora kao i kod MIBC. Na tom se kromosomu nalaze mnogi poznati tumor supresorski geni kao što su CDKN2A (9p21) čiji su produkti proteini TP16 (INK4a) i TP14 (ARF). Protein INK4a je negativni regulator proteina RB, a ARF je inhibitor proteina TP53 za koje je poznato da su učestalo mutirani kod visokogradusnih tumora mokraćnog mjehura. Delecija kromosoma 9 također dovodi do gubitka tumor supresorskih gena TSC1, PTCH1 i DBC1. Nedostatak proteina TSC1 (9q34) aktivirati će onkogeni potencijal signaliziranjem preko PI3K puta što je tipično za 15% tumora mokraćnog mjehura<sup>30</sup>. Proteini PTCH1 (9q22) i DBC1 (9q33) su povezani s pojačanom staničnom proliferacijom, a njihove su delecije prisutne u 60% tumora mokraćnog mjehura<sup>38</sup>. Štoviše, mutacija gena PTCH1 karakteristična je za Gorlinov sindrom, vrlo rijetki kongenitalni sindrom vezan za pedijatrijske slučajeve tumora mokraćnog mjehura<sup>39</sup>.

Somatske mutacije u receptoru za fibroblastni faktor rasta (FGFR3) jako koreliraju s razvojem niskogradusnih ranih stadija tumora mokraćnog mjehura i glavno su obilježje „Ta puta“. FGFR3 je receptorska tirozinska kinaza uključena u stanične procese kao što su stanični rast, diferencijacija, migracija, zacjeljivanje, i angiogeneza. U literaturi su opisane različite mutacije za ovaj receptor, a većina ih se nalazi u egzonima 7, 10 i 15<sup>40</sup>. Mnoge od opisanih mutacija dovode do dimerizacije receptora neovisne o ligandu, njegove autofosforilacije i posljedične trajne aktivacije nizvodnih signalnih puteva koji uključuju Ras-MAPK i PI3K put. Najčešća mutacija ovog receptora, koja se događa u 70% slučajeva, jest S249C, a uzrokuje unakrsno povezivanje dvaju FGFR3 receptora pomoću disulfidnih veza te njihovu dimerizaciju<sup>41</sup>. Mutacije u FGFR3 receptoru prisutne su u 70-75% niskogradusnih Ta tumora mokraćnog mjehura<sup>42</sup>.



Tirozinska kinaza Ras je najčešće mutirani protein u humanim tumorima, a kod tumora mokraćnog mjehura, pojavljuje su u 10-20 % slučajeva<sup>27</sup>. Posljedice mutacija u Ras proteinu, kao i onih u FGFR3 rezultiraju aktivacijom MAPK puta. U 85% Ta tumora mokraćnog mjehura mutiran je jedan od ta dva proteina koji predstavljaju alternativne putove koji dovode do razvoja istog fenotipa tumora mokraćnog mjehura<sup>43</sup>.

Put fosfatidil-inozitol-3-kinaze (PI3K) je uz RAS-MAPK signalni put jedan od dva najvažnija puta uključena u rast tumora mokraćnog mjehura. PI3K put je aktiviran pomoću nekoliko mogućih mehanizama, uključujući FGFR3 i Ras. Osim već spomenutih mutacija u FGFR3 i Ras proteinu, za tumore mokraćnog mjehura karakteristične su i mutacije u PIK3CA, AKT1 i TSC1 kao i deaktivacijske mutacije PTEN gena koji svi sudjeluju u PI3K putu. PIK3CA predstavlja  $\alpha$  katalitičku podjedinicu PI3K kinaze, a mutacije u tom proteinu su tipične za „Ta put“ kao i mutacije u kinazi AKT (poznata i pod nazivom PKB) koja nizvodno aktivira mTOR izvršnu kinazu<sup>44</sup>. Mutacije u PTEN genu su pak obilježje invazivne i uznapredovale bolesti.

### 1.3.2 CIS put

Genetske promjene koje su povezane uz „CIS put“ imaju za posljedicu tumorsku invaziju. Mutacije u tumor supresorskim genima TP53, PTEN i RB1 glavna su obilježja „CIS puta“ i odgovorne su za lošu prognozu<sup>45</sup>. Za CIS tumore mokraćnog mjehura karakteristične su mutacije u TP53 genu kao i gubitak heterozigotnosti kromosoma 17.<sup>46</sup> Ostale uobičajene promjene kod CIS tumora uključuju LOH na 14q (70%), 8p (65%), 13q (56 %), 11p (54%) te 4q (52%)<sup>47</sup>.

Primarni CIS tumori, koji nisu povezani s papilarnim oblikom tumora, kao niti s invazivnim tipom tumora prezentiraju prekomjerno izraženi TP53, međutim ne posjeduju delecije kromosoma 9. S druge strane, sekundarni CIS tumori, oni koje se pronalazi uz papilarne lezije, mogu sadržavati i genske promjene kromosoma 9. Delecije kromosoma 9 su najčešća promjena kod niskogradusnih, kao i kod visokogradusnih tumora mokraćnog mjehura, a promjene normalnog urotela u displastični u 75% slučajeva sadrže deleciju tog kromosoma<sup>31</sup>. Nadalje, za sekundarne CIS tumore tipično je da posjeduju djelomično sličan obrazac izražaja gena kao i papilarni tumori uz koje se pojavljuju<sup>47,48</sup>.

Mutacije u tumor supresorskom genu TP53 nalaze se u mnogim invazivnim tumorima čovjeka. TP53 je lociran na kromosomu 17p13, a tumor supresorski protein p53 koji nastaje njegovim prepisivanjem ima ulogu transkripcijskog čimbenika koji regulira izražaj gena

zaduženih za stanični ciklus i apoptozu. Mutacije u tom genu, uobičajeno se ne pronalaze kod Ta tumora, ali ih sadržava 20% T1 tumora te 50% T2 tumora mokraćnog mjehura<sup>49</sup>. Otprilike 5-20% niskogradusnih tumora prelazi u visokogradusne, a za tu su promjenu odgovorne mutacije u genu TP53<sup>50</sup>.

Tumor supresorski gen retinoblastoma (Rb) je također mutiran u 50% slučajeva invazivnih tumora mokraćnog mjehura, a njegove su mutacije rijetka pojava kod tumora stadija Ta. Inaktivacija Rb povezuje s genetskom nestabilnošću te se dovodi u svezu s progresijom bolesti i smanjenim preživljenjem. Gubitak funkcije tog gena dovodi od aberantne kontrole diobenog vretena što rezultira s aneuploidijom. Pacijenti čiji tumori sadrže mutaciju u genu Rb u kombinaciji s mutacijama TP53 imaju najveći rizik za progresiju bolesti nakon cistektomije<sup>51</sup>.

Bitno je naglasiti da znatan broj tumora mokraćnog mjehura ne pokazuje mutacije u FGFR3 ili TP53 genima što ukazuje da postoje i drugi putevi molekularne patogeneze koji mogu dovesti do razvoja tumora mokraćnog mjehura<sup>52</sup>.

## 1.4 Kronična upala vodi ka nastanku zloćudnog tumora

Tumore u većini slučajeva uzrokuju mutacije zadobivene tijekom života u tjelesnim stanicama, dok je manje od 10% zloćudnih tumora uzrokovano mutacijama koje su naslijeđene od roditelja (kroz mutacije u spolnim stanicama). Razvoj tumora povezan je lošom prehranom, pretilošću, nečistim zrakom, pušenjem te autoimunim poremećajima<sup>27</sup>, a u podlozi svih tih čimbenika je kronično upalno stanje zahvaćenog tkiva. Mnogo je upalnih razloga koji mogu dovesti do nastanka tumora, a infekcije su prihvaćene kao jedan od najvažnijih. Čak je oko 20% svih tumora povezano s nekom vrstom upale, najčešće s upalom koja je mikrobiološkog porijekla<sup>53</sup>. Iako se podrijetlom i mehanizmom nastanka upalni procesi međusobno razlikuju (npr. autoimuna upala, upala izazvanih kemikalijama ili fizičkim sredstvima) biološka osnova njihovog protumorskog djelovanja je vrlo slična i neovisna o etiologiji upalnog procesa<sup>54,55</sup>. Ukratko, kisikovi i dušikovi radikali koji nastaju tijekom upalnih zbivanja imaju potencijal da oštete staničnu DNA i izazovu mutacije koje mogu inicirati tumor. Tijekom upale aktiviraju se NF- $\kappa$ B i STAT3 transkripcijski čimbenici koji dovode do povećanja ekspresije gena koji podržavaju ključne aspekte tumorskog razvoja od stanične proliferacije, otpornosti na apoptozu, angiogeneze i metastaziranja<sup>56</sup>.

### 1.4.1 Utjecaj upale na aspekte maligne transformacije

U prošlosti se transformacija tumorskih stanica smatrala autonomnim staničnim procesom, a koncept tumorigeneze počivao je na genski transformiranim stanicama i njihovom razvoju u zloćudne novotvorine. Proučavanjem okruženja u kojem se nalaze tumorske stanice, pokazano je da razvoj i progresija tumora ovisi o međudnosu tumorskih stanica i strome koja ih okružuje te sposobnosti tumorskih stanica da izmjene upalni odgovor u svom okruženju i iskoriste ga za svoje potrebe. Normalna tkivna arhitektura se održava faktorima rasta i njihovim receptorima koji započinju signalne kaskade za održavanje proliferacije, homeostaze i preživljenja stanica. Tumorski rast ima za posljedicu gubitak tkivne homeostaze jer tumorske stanice koriste faktore rasta u svrhu mijenjanja mehanizama endocitoze koji osiguravaju pravilno recikliranje receptora za faktore rasta, inhibiraju mehanizme koji zaustavljaju stanični rast te omogućavaju pojačano signaliziranje nizvodno od receptorskih tirozinskih kinaza usmjereno ka staničnoj proliferaciji<sup>57-59</sup>. Nizvodno od mnogih receptorskih tirozinskih kinaza za čimbenike rasta nalazi se porodica proteina nazvana signal transducer and activator of transcription (STAT), koja je dosada povezana s upalnim fenotipom različitih zloćudnih tumora (tumori želuca, debelog crijeva, jetre, pluća i

gušterače). Najznačajniji pripadnik ove porodice je transkripcijski čimbenik STAT3. Kod zloćudnih tumora kolorektuma povezanih s kolitisom (CAC, engl. *colitis associated cancer*), pokazano je da je aktivacija čimbenika STAT3, potaknuta upalnim citokinom IL6 kojeg proizvode stanice mijeloidne loze, ključna za proliferaciju pred-malignih stanica i inhibiciju njihove apoptoze in vivo<sup>60,61</sup>. Nedavno je pokazano kako signaliziranje sfingozin-1-fosfatom (S1P) vodi ka aktivaciji nuklearnog faktora κB (NF-κB) koji aktivira IL6, a koji onda aktivira Stat3 (osovina NF-κB –IL6 –STAT3) što uzrokuje pojačan izražaj receptora za S1P (S1PR) i na taj način održava kroničnu upalu koja vodi ka CAC<sup>62</sup>. Također, blaga upala jetre uzrokovana pretilošću ili hepatocelularni karcinoma (HCC) izazvan dietilnitrozaminom (DEN) aktiviraju STAT3 signalnu kaskadu zbog proizvodnje IL6 te tumor nekrotizirajućeg faktora α (TNFα)<sup>63</sup>. Sve to jasno pokazuje vrlo važnu ulogu koju STAT3 ima u razvoju zloćudnih tumora, te neki autori zbog svega toga STAT3 smatraju proto-onkogenom.

Druge važne posljedice upalnog signaliziranja u tumorima počivaju na učincima transkripcijskog faktora NF-κB. On je aktiviran u većini tumora zbog upalnih procesa i onkogenih mutacija, a njegova aktivacija uzrokuje izražaj gena koji potiču proliferaciju, preživljenje i upalu *per se*<sup>56,64</sup>. Značaj tog transkripcijskog čimbenika dobro je opisan u slučajevima nastanka HCC i CAC. Kod miševa koji su deficitarni za *multidrug resistance protein 2* (MDR2) i razvijaju HCC povezan s upalom, endotelne i upalne stanice proizvodnjom TNFα potiču aktivaciju NF-κB koji je neophodan za progresiju HCC, ali ne i početnu transformaciju hepatocita<sup>65</sup>. Kod mišjeg modela CAC-a, inhibicija glavnog puta aktivacije NF-κB uslijed ablacije inhibitora NF-κB kinaze-β (IKKβ) u crijevnom epitelu, smanjena je incidencija CAC, dok je ablacija IKKβ u stanicama mijeloidne loze uzrokovala smanjenu veličinu tumora<sup>66</sup>. Također, pokazano je da leukocitni infiltrat proizvodnjom TNFα potiče inicijaciju i progresiju CAC modela<sup>67</sup>. Protein *myeloid differentiation primary response 88* (MYD88) koji se nalazi nizvodno od *Toll-like* receptora (TLR) i aktivira NF-κB, dokazano potiče makrofage na proizvodnju upalnog citokina IL6 te transformirajućeg faktora rasta β (TGFβ) koji su neophodni za razvoj CAC<sup>68</sup>.

Osim NF-κB-IL6-STAT3 okosnice koja potiče proliferaciju tumorskih stanica, značajnu ulogu u tom smislu ima i interleukin 22 (IL22). Noviji podaci pokazuju da CD11c+ stanice proizvodnjom tog citokina potiču aktivaciju transkripcijskog čimbenika STAT3 u endotelnim stanicama crijeva i na taj način djeluju kao medijatori procesa cijeljenja u tkivu koje je oštećeno i zahvaćeno kolitisom nakon upotrebe dextran natrij sulfata (DSS)<sup>69</sup>. Štoviše, kod

miševa koji nemaju neutralizirajući receptor za IL22 vezni protein (IL22BP), inhibirana je pojava CAC<sup>70</sup>.

Preživljenje tumorskih stanica postiže se i procesima dediferencijacije pred-malignih stanica, a ekspanzija takvih tumorskih matičnih stanica potaknuta je upalnim procesima u tkivima zahvaćenim tumorom. Transkripcijski čimbenik STAT3 regulira malignu aktivnost tumorskih matičnih stanica u različitim tkivima<sup>71-73</sup>. Kod adenokarcinoma jednjaka IL6 i IL1 $\beta$  iniciraju upalu koja potiče migraciju progenitorskih stanica želučane kardije koje uzrokuju malignu transformaciju jednjaka<sup>74</sup>.

Vrlo važan stanični proces koji utječe na stopu proliferacije tumorskih stanica jest senescencija (prestanak staničnog dijeljenja) koja pomoću proteina Rb i p53 uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa<sup>75</sup>. U mišjem modelu limfoma, transkripcijski čimbenik NF- $\kappa$ B pojačava senescentni sekretorni fenotip (SASP, engl. *senescence-associated secretory phenotype*) koji je neophodan za suzbijanje tumora kemoterapijom<sup>76</sup>. Pokazano je kako su pred-maligni senescentni hepatociti vrlo imunogenični što uzrokuje nakupljanje limfocita T i njihovo posljedično uklanjanje<sup>77</sup>.

Osim prekomjerne proliferacije i smanjene stope apoptoze, vrlo važno obilježje tumora je njihova genomska nestabilnost. Kronični upalni procesi značajno podižu stopu mutacija u tumorima te kompromitiraju popravak DNA pridonoseći pojačanoj genetskoj nestabilnosti. Izvor somatskih mutacija u tumorima mogu biti reaktivni slobodni kisikovi i dušikovi radikali (ROS i RNS) koje u tkivima otpuštaju makrofazi i neutrofili<sup>78</sup>. Citokini poput TNF, IL1 $\beta$ , IL4, IL13 i TGF $\beta$  mogu potaknuti izražaj deaminaze AID koja uvodi mutacije u ključne tumor supresorske gene kao što je TP53 ili protoonkogen MYC<sup>79</sup>. Nadalje, upala uzrokuje hipermetilaciju DNA i posljedično gensko utišavanje proteina MMR i MLH1 kao i drugih tumor supresorskih gena poput TP53 te se tako oslabi popravljanje DNA<sup>80,81</sup>.

Prethodno opisani gubitak tkivne homeostaze i proliferacija tumorskih stanica u većini slučajeva malignih tumorskih bolesti nisu direktni uzrok smrtnosti, već su u 90% slučajeva tomu razlog metastaze primarnih tumora. Poznato je kako mnogobrojni medijatori upale pridonose metastatskom potencijalu tumora, a monociti i makrofazi znatno olakšavaju invaziju tumorskih stanica, njihovu ekstrasvazaciju te metastatski rast<sup>82,83</sup>. TGF $\beta$ , iako djeluje kao supresor rasta i stanične proliferacije u ranim stadijima tumorogeneze, djeluje i kao snažni promotor epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) prilikom koje tumorske stanice preuzimaju svojstva mezenhimskih stanica što pojačava njihovu mogućnost invazije<sup>84</sup>. Nadalje,

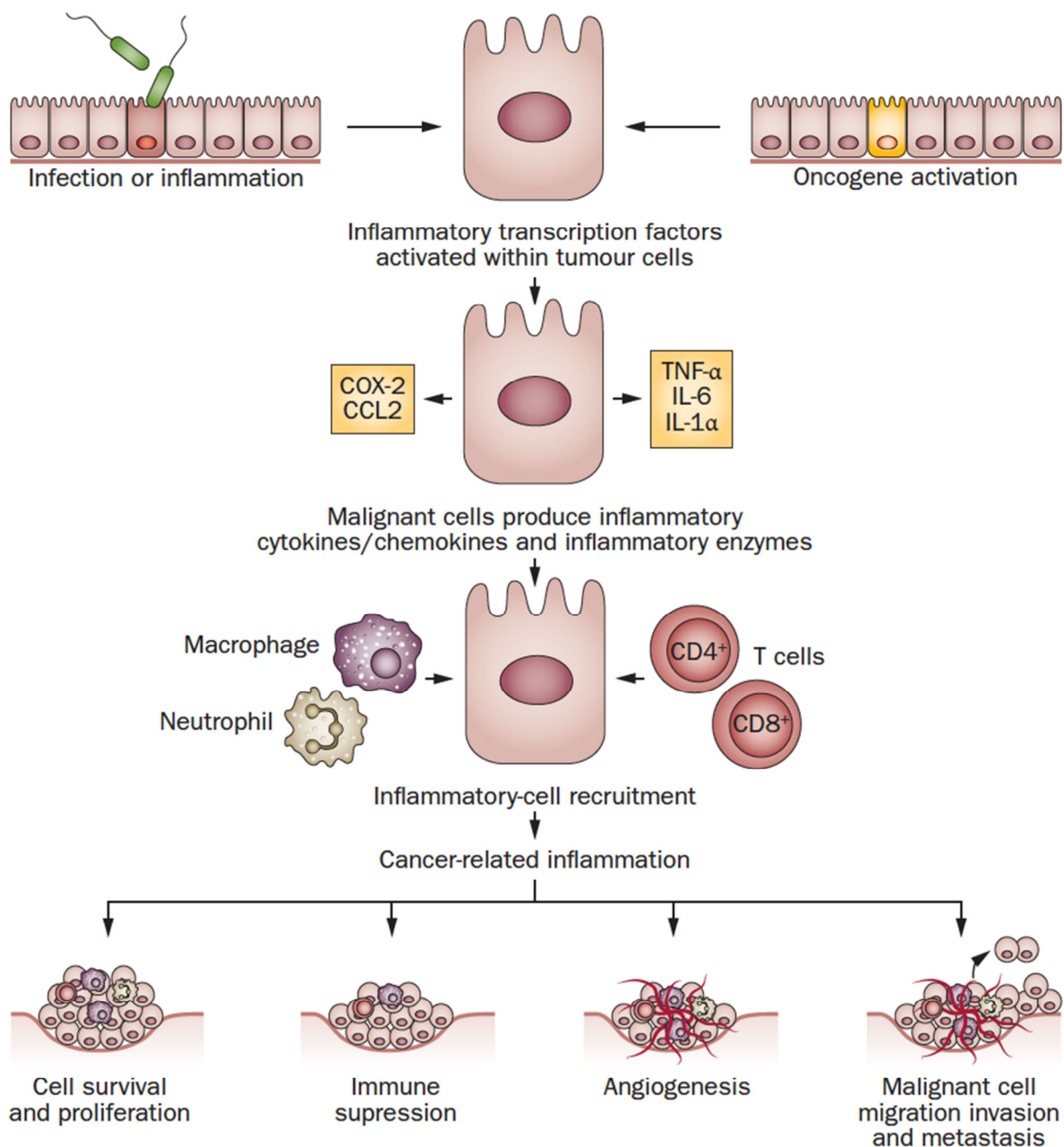
intravazaciju tumorskih stanica u krvožilni i limfatički sustav olakšava direktna komunikacija tumorskih stanica s makrofazima prisutnim u tumorima (TAM, eng. *tumor-associated macrophages*)<sup>85</sup> te upalni čimbenici koji osiguravaju bolje preživljenje cirkulirajućih metastaza<sup>86</sup>.

#### 1.4.2 Utjecaj tumora na imunološki odgovor

Osim što upalni imunološki odgovor djeluje na osobine tumora, tumorske stanice imaju značajan modulatorni utjecaj na mehanizme urođene i stečene imunost. Imunološki odgovor na tumorski rast započinje preuzimanjem tumorskih antigena od strane antigen-prezentirajućih stanica (APCs, engl. *antigen-presenting cells*). Vaskularno-endotelni faktor rasta (VEGFA) kojeg luče tumorske stanice djeluje kao supresor dozrijevanja dendritičkih stanica te djeluje inhibicijski na stanice mijeloidne lože<sup>87</sup>. Pokazano je kako i TGFβ, IL10 te IL6, koje proizvode tumori, mogu djelovati na APCs<sup>88-90</sup>.

Nadalje, u mišjem modelu duktalnog adenokarcinoma gušterače, tumor proizvodi čimbenik stimulacije kolonija granulocita–makrofaga (GM-CSF od engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) te na taj način potiče razvoj i nakupljanje granulocita i mijeloidnih stanica koje suprimiraju antigen-specifične T limfocite u tumoru<sup>91</sup>. Izlučivanjem kemokina CCL, CXCL5, CXCL12 i faktora matičnih stanica SCF (engl. *stem cell factor*), tumori novače i mijeloidne matične stanice MDSC (engl. *myeloid-derived stem cells*) koje u tumorima suprimiraju T-limfocite<sup>92</sup>.

Još jedan od načina na koji tumori mijenjaju upalni ambijent jest regrutacijom regulatornih limfocita T ( $T_{reg}$ ), čiji su učinci uglavnom imunosupresijski. Stanice Hodgkinovog limfoma kao i stanice raka jajnika, izlučuju CCL22, koji je kemokinski ligand za CCR4, putem kojih regrutiraju  $T_{reg}$  stanice. Stanice raka jajnika u hipoksičnim uvjetima luče i CCL28, koji se veže za CCR10 kojeg preferencijalno izražavaju  $T_{reg}$  stanice<sup>93</sup>.  $T_{reg}$  stanice luče TGFβ, il10 i IL35 i suprimiraju protutumorsko djelovanje T-limfocita te potiču proces angiogeneze u tumorima (Slika 8)<sup>94</sup>.



**Slika 8. Molekularna osnova upale povezane s razvojem zloćudnih tumora.** Upala ili onkogeni uzrokuju aktivaciju transkripcijskih čimbenika NF- $\kappa$ B, STAT3 ili HIF-1 $\alpha$  koji potiču izražaj citokina i kemokina (uključujući TNF $\alpha$  i IL6) te upalnih enzima (COX2). Imunološke stanice nakupljaju se na mjestu tumora te daljim autokrinim i parakrinim djelovanjem utječu na razvoj tumora. Preuzeto iz Mantovani, A. et al. *Cancer-related inflammation. Nature* 454, 436–444 (2008)<sup>95</sup>.

## 1.5 Upalni citokin IL6 i razvoj tumora

Humani gen za IL6 nalazi se na kromosomu 7 i kodira klasični upalni citokin IL6 koji je još poznat kao interferon- $\beta$ 2 i čimbenik stimulacije B-stanica (engl. *B cell stimulating factor 2*). Molekularna masa zrelog IL6 je između 21-28 kDa ovisno o tipu stanica koje su ga proizvele te količini post-translacijskih modifikacija kao što su O-glikozilacija i fosforilacija. Zbog brzog citoplazmatskog uklanjanja (engl. *clearance*), razina IL6 regulirana je prvenstveno na razini izražaja gena<sup>96,97</sup>. Izražaj IL6 potaknut je transkripcijskim čimbenicima NF- $\kappa$ B, C/EBP, AP-1, CREB te glukokortikoidnim receptorom Fos/Jun<sup>98,99</sup>. Izražaj IL6 može, također, biti potaknut drugim glasniciama poput bakterijskih lipopolisaharida, virusa, citokina IL1 i TNF $\alpha$  te faktora rasta EGF, PDGF i TGF $\beta$ <sup>100-102</sup>. Proizvode ga i izlučuju različiti tipovi stanica poput T i B-limfocita, fibroblasta, monocita, keratinocita, mesangijalnih i endotelnih stanica i nekoliko vrsta tumorskih stanica<sup>103</sup>.

Uloga IL6 u upalnim procesima vrlo je složena. Početno je u literaturi opisan kao protuupalni citokin, međutim danas je poznato da je njegova uloga prvenstveno u aktivaciji imunološkog sustava<sup>104</sup>. Klasični put signaliziranja IL6 započinje njegovim vezanjem na IL6R $\alpha$  podjedinicu membranskog receptora. Kompleks IL6-IL6R $\alpha$  se nadalje veže na glikoprotein 130 (gp130), drugu podjedinicu receptora koja je u mogućnosti započeti unutarstaničnu signalnu kaskadu<sup>105</sup>. S obzirom da je izražaj IL6R $\alpha$  podjedinice ograničen na hepatocyte i određene leukocyte, ovaj klasični način signaliziranja IL6, moguć je samo u tim stanicama. S druge strane, gp130 podjedinica je izražena na svim stanicama što omogućava tzv. *trans*-signaliziranje slobodnim IL6 u svim tjelesnim stanicama<sup>104,106</sup>. *Trans*-signaliziranje započinje proteolitičkim cijepanjem IL6R $\alpha$  podjedinice, otpuštanjem iz stanica u topljivom obliku te njezinim vezanjem na slobodni IL6. Topljivi kompleks IL6/IL6R $\alpha$  u mogućnosti je vezati se na gp130 podjedinicu usidrenu u membrane svih tjelesnih stanica te ih aktivirati. Klasično i *trans*-signaliziranje rezultiraju aktivacijom zajedničkih nizvodnih sekundarnih glasnika iako uključuju različite međustanične signalne posrednike. Aktivacije gp130 podjedinice uzrokuje auto- i transfosforilaciju Janus kinaza (JAK1, JAK2) koje provode signal do efektorske kinaze PI3K kao i transkripcijskih čimbenika STAT1, STAT3 i SHP2<sup>104,106</sup>.



### 1.5.1 Protumorska uloga IL6

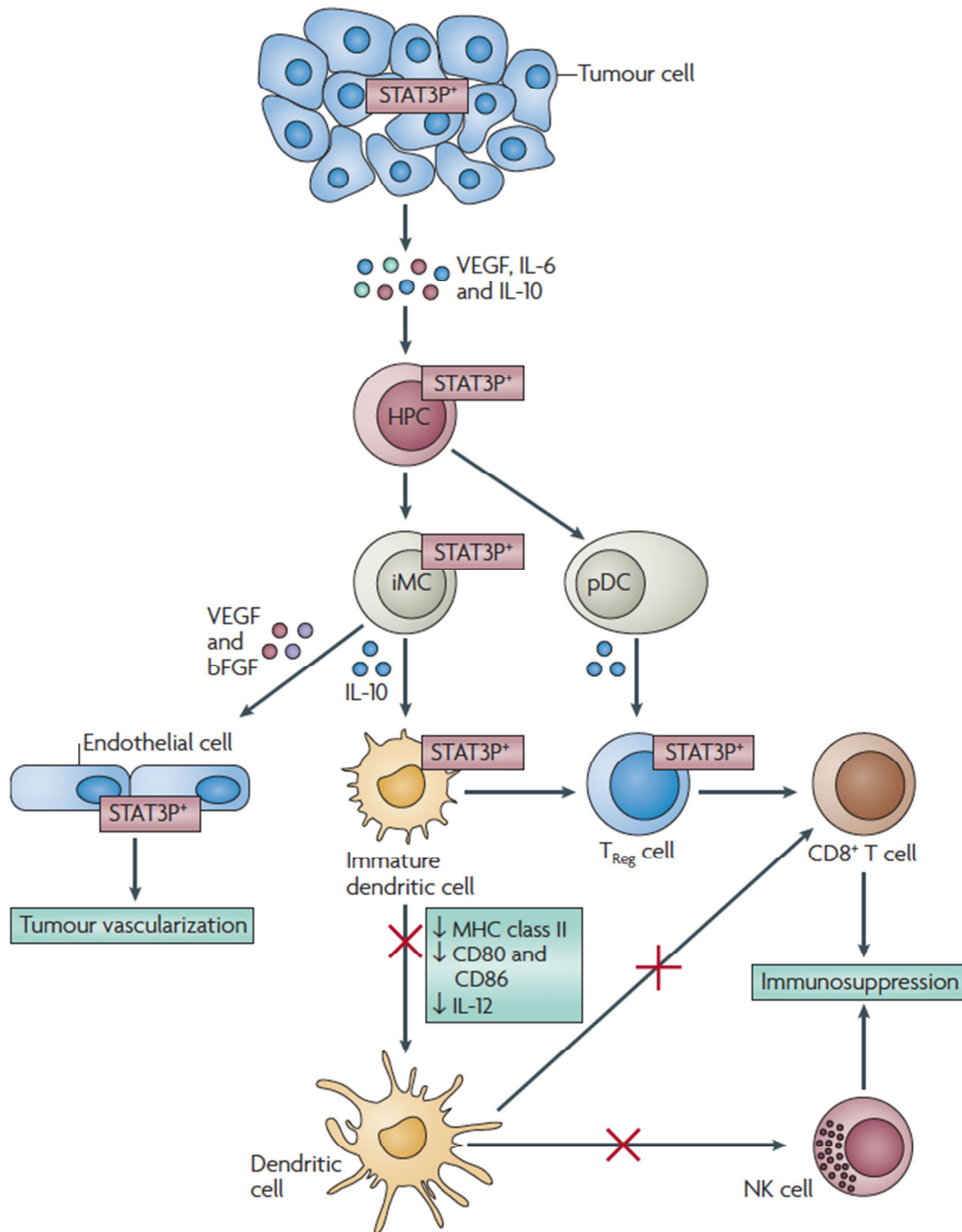
Jedan od najboljih dokaza štetnog učinka IL6 u tumorima leži u činjenici da su visoke razine tog citokina u serumu pacijenata oboljelih od tumora najčešće pokazatelj lošije prognoze tumorske bolesti. Takav je obrazac uočen kod zloćudnih tumora želuca, gušterače, dojke, debelog crijeva, pluća kao i kod melanoma i mijeloma<sup>107,108</sup>. Osim što doprinosi iniciranju tumora, IL6 potiče i progresiju tumora<sup>60,109</sup>. Većina protumorskih efekata uzrokovana prekomjernim izražajem IL6 posredovana je djelovanjem transkripcijskog faktora STAT3 koji se danas smatra jednim od staničnih protoonkogen<sup>110</sup>. Staničnim signaliziranjem preko IL6-STAT3 potiče se proliferacija tumorskih stanica uslijed pojačanog izražaja ciklina D1, koji djeluje kao kontrolna točka staničnog ciklusa, kao i zbog pojačanog izražaja protoonkogen<sup>c-myc</sup>. Također, uslijed regulacije metaboličkog senzora mTORC, koji osigurava pojačanu sintezu proteina u stanicama tumora, IL6 indirektno potiče staničnu proliferaciju<sup>111</sup>.

Nadalje, IL6 poboljšava preživljenje tumorskih stanica, jer STAT3 inducira izražaj antiapoptoskih faktora poput bcl2, bcl-XL i survivina<sup>112,113</sup>. U stanicama ljudskog mijeloma pokazano je da STAT3 predvodi metilaciju odnosno deaktivaciju tumor supresorskog gena TP53, što tumorskim stanicama omogućava prevladavanje apoptotskih kontrolnih točaka uslijed oštećenja DNA molekule<sup>114</sup>.

Signaliziranje citokinom IL6 u tumorskim stanicama potiče: tumorski rast, invazivni potencijal, metastaziranje i angiogenezu. Glavni posrednici tih procesa su enzimi poznati kao matriks metaloproteaze (MMPs, engl. *matrix metalloproteinases*), a aktivacija transkripcijskog čimbenika STAT3 dovedena je u svezu s pojačanim izražajem enzima MMP2 te agresivnijim fenotipom melanoma<sup>115</sup>. Aktivacija transkripcijskog čimbenika STAT3 u endotelnim stanicama tumora, TAM makrofazima ili MDSC pojačava njihov izražaj molekula VEGF i bFGF te pozitivno regulira angiogenezu<sup>116</sup>.

Protumorsko djelovanje citokina IL6 seže i dalje od isključivog utjecaja na tumorske stanice, jer IL6 djeluje na lokalnu imunološku reakciju unutar tumorske strome. Pod utjecajem IL6 dolazi do supresije stečene imunosti, jer IL6 nepovoljno utječe na razvoj antigen-prezentirajuće stanice poput dendritičkih stanica (DC, engl. *dendritic cells*) koje su potrebite za aktivaciju citotoksičnih limfocita T (CTL)<sup>117,118</sup>. Aktivacija IL6 u mijeloidnim progenitorskim stanicama je u mogućnosti preusmjeriti polarizaciju tih stanica s DC ka makrofazima i monocitima koji mogu suprimirati imunološki sustav. Također, signaliziranje

putem IL6-STAT3 zaustaviti će sazrijevanje već diferenciranih DC što rezultira inaktivacijom limfocita T (Slika 9)<sup>118</sup>.



**Slika 9. Upalni učinak citokina IL6 ostvaruje se posredovanjem transkripcijskog čimbenika STAT3.** Tumori izlučuju upalne citokine poput vaskularno-endotelnog faktora rasta (VEGF), interleukina 10 (IL10), i IL6 čiji se izražaj ostvaruje aktivacijom STAT3, a oni, pak, aktiviraju STAT3. Pojačana aktivnost STAT3 u progenitorskim stanicama hematopoetske loze (HPCs) vodi ka nastanku nezrelih mijeloidnih stanica (iMCs) te povećava broj nezrelih dentritičkih i plazmacitoidnih dendritičkih stanica (pDCs) koje potiču nastanak regulatornih T stanica ( $T_{reg}$ ) u tumorskoj okolini. Aktivnost transkripcijskog čimbenika STAT3 inhibira izražaj MHC II molekula, CD80, CD86 i IL12 prisutnih na DC te na taj način smanjuje protutumorski učinak  $CD8^+$  T limfocita i NK stanica. Putem aktivacije STAT3, citokin IL6 utječe na proizvodnju IL10, VEGF i bFGF mijeloidnih stanica koji dodatno pojačavaju supresiju imunološkog odgovora u tumorima te potiču vaskularizaciju. Preuzeto iz Yu, H., Kortylewski, M. & Pardoll, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 7, 41-51<sup>119</sup>

### 1.5.2 Antitumorsko djelovanje IL6

Osim prethodno opisanih negativnih utjecaja citokina IL6 u malignim tumorskim bolestima, u novije vrijeme izlaze na vidjelo i mogući pozitivni učinci IL6 signaliziranja na imunološki odgovor na tumore. IL6 igra vrlo bitnu ulogu u limfnim čvorovima gdje ga proizvode dendritičke stanice. Prilikom imunizacije potreban je za učinkovitu aktivaciju, ekspanziju i preživljenje limfocita T kao i njihovo djelovanje interferonom  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) te zaštitu od suzbijanja regulatornim T stanicama (T<sub>reg</sub>)<sup>120-122</sup>. Poznato je kako naivne CD4+ T stanice stimulirane citokinom TGF $\beta$  izražavaju transkripcijski čimbenik Foxp3 te prelaze u T<sub>reg</sub>, dok u prisutnosti TGF $\beta$  i IL6 diferenciraju u pomoćničke Th17 stanice<sup>118</sup>. Također, putem antiapoptotskih čimbenika bcl2 i bcl-xl te protoonkogeni cFos i JunB, IL6 štiti T limfocite od apoptoze te potiče njihovu proliferaciju<sup>123</sup>.

### 1.6 Upalni procesi u zloćudnim tumorima mokraćnog mjehura

Upala je vrlo često uočljiva u tumorima mokraćnog mjehura i očituje se bogatim imunološkim infiltratom na mjestima tumora<sup>124</sup>. Također, pokazano je kako kronično upalno stanje, izazvano infekcijom parazitom *Shistosoma haematobium* i dugotrajnom upotrebom katetera, kao i bubrežni i mokraćni kamenci, mogu doprinijeti razvoju tumora mokraćnog mjehura<sup>125-127</sup>. Imunološke stanice mogu igrati dvojaku ulogu u razvoju tumora mokraćnog mjehura. Stanice stečene imunosti pokazuju protutumorsku ulogu dok urođeni imunološki sustav igra protumorsku ulogu. Supresorske stanice mijeloidne loze (MDSC) vrlo su važne progenitorske stanice za razvoj granulocita, makrofaga i dendritičkih stanica. Njihova uloga u promicanju tumorigeneze i metastaziranja svodi se na podupiranje angiogeneze i limfogeneze kao i na poticanje tumorskih stanica na bolje preživljenje<sup>128</sup>.

Pokazano je kako MDSC potiču angiogenezu lučenjem VEGF, TNF, IL1 $\beta$ , kao i osnovnog fibroblastnog faktora rasta (bFGF)<sup>129</sup>. *Eruslanov et al.* su pokazali kako Cd11b mijeloidne stanice djeluju na suzbijanje imunološkog sustava u tumorima mokraćnog mjehura<sup>130</sup>. Opisali su dvije mijeloidne podgrupe koje su prvenstveno odgovorne za proizvodnju upalnih citokina i kemokina u tumoru mokraćnog mjehura; to su granulociti neutrofilnog tipa CD15<sup>high</sup>CD33<sup>low</sup> te monociti CD15<sup>high</sup>CD33<sup>high</sup>. Te stanice izlučuju citokine i kemokine Ccl2, Ccl3, Csf2, Il8 i Il6, koji doprinose patogenezi upale i imunosupresiji u tumorima mokraćnog mjehura. Mnogi pacijenti imaju povišene CD15<sup>high</sup>CD33<sup>low</sup> stanice<sup>130</sup>.

Neutrofili mogu imati dvostruku ulogu u tumorima mokraćnog mjehura. U stanju su obilježiti tumorske stanice te na taj način djelovati protutumorski, ali su u mogućnosti potaknuti pretjerano upalno stanje, opskrbiti tumorske stanice s faktorima rasta, izlučivati enzime za razgradnju vanstaničnog matriksa te su najveći proizvođač VEGF faktora rasta<sup>131</sup>. Dugotrajan učinak ovih čimbenika može imati povoljan utjecaj na razvoj tumora. *Gunes et al.* su pronašli kod pacijenata oboljelih od raka mokraćnog mjehura povećan izražaj tri neutrofilna proteina, HNP-1, -2, i -3 iz podskupine  $\alpha$ -defenzina, proteina koji pomažu sakupljanju leukocita, a mogli bi doprinijeti metastaziranju<sup>132</sup>. Sporedan učinak ovih proteina uključuje poticanje tumorskih stanica na proliferaciju te moguće poboljšanje angiogeneze<sup>133</sup>. Ovi su proteini u tumorima mokraćnog mjehura proizvod neutrofila i eozinofila, a naknadno su zabilježeni i u urinu pacijenata. Povišena razina HNP proteina, odlika su staničnog oštećenja, a u velikim količinama su citotoksični za sve vrste stanica<sup>133</sup>. Inače je omjer neutrofila/limfocita mjera općeg upalnog stanja. *Gondo et al.* su pronašli kako kombinacija neutrofila/limfocita, veličine tumora te razine hemoglobina mogu biti prognostički faktor preživljenja za pacijente koji su podvrgnuti radikalnoj cistektomiji<sup>134</sup>.

Učinak makrofaga povezanih s tumorima (TAMs, engl. tumor associated macrophages) je također povezan s angiogenezom tumora mokraćnog mjehura<sup>135</sup>. Povećan broj imunosupresivnih M2 makrofaga u tumorima u pozitivnoj je korelaciji s veličinom tumora, stadijom i gradusom<sup>136,137</sup>. Pokazano je kako u hipoksičnom okruženju, u kojemu se nalaze tumori, dolazi do povišene razine adenozina koji potiče makrofage na otpuštanje angiogenetskih čimbenika<sup>138</sup>, a *Hanada et al* predlažu da bi se broj makrofaga trebao koristiti kao prognostički ukazatelj kod pacijenata oboljelih od tumora mokraćnog mjehura, kako bi primili agresivniji tip terapije<sup>135</sup>. Također, u tumorima mokraćnog mjehura dolazi do povećanog izražaja CD47 proteina koji je obilježje tumorskih matičnih stanica raka mokraćnog mjehura, a poznato je kako ovaj protein inhibira fagocitozu koju provode makrofazi<sup>139</sup>.

T limfociti su glavni proizvođači IL2 koji se može pronaći u urinu pacijenata koji primaju BCG terapiju<sup>140</sup>. *Reijke et al.* predlažu kako bi ovaj interleukin u kombinaciji s IL6 trebao biti korišten za kontroliranje terapije s BCG cjepivom i posljedičnog imunološkog odgovora<sup>140</sup>. BCG terapija se administrira pacijentima nakon transuretralne resekcije kroz 6 tjedana intravezikalnim instilacijama u svrhu smanjenja stope povratka tumora, a uspješnost ove terapije iznosi 70%<sup>131,141,142</sup>. Tijekom terapije bakterije se hvataju na urotel mjehura putem fibronektina te ulaze u kako u zdrave, tako i u tumorske stanice<sup>143</sup>. Ovaj proces potiče

jaki imunološki odgovor u mjehuru aktivacijom izražaja IL1, IL2, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IL18, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  te GM-CSF<sup>131,144-146</sup>. Neutrofili su od izuzetne važnosti prilikom BCG terapije te sačinjavaju 75% stanica koje se nakupljaju nakon tretmana<sup>147</sup>. Aktivacija neutrofila vodi ka izražaju mnogih proupalnih citokina i to prvenstveno Th1 loze T limfocita<sup>131</sup>. S obzirom na uspjeh BCG terapije smatra se da bi imunoterapija specifična za tumore mogla biti uspješna u liječenju tumora mokraćnog mjehura<sup>148</sup>.

Općenito je prihvaćeno da kronično upalno stanje mokraćnog mjehura ima velik utjecaj na razvoj tumora mokraćnog mjehura, no još uvijek nije razjašnjen mehanizam koji karcinome mjehura čini osjetljivima na akutnu upalu.

## 2 HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Upalni procesi kao podloga za razvoj zloćudnih tumora mokraćnog mjehura još su uvijek slabo objašnjeni. Poznato je da kronična upala uzrokovana infestacijom sa *Shistosoma haematobium* može uzrokovati zloćudnu bolest mokraćnog mjehura, dok s se akutna upala inducirana s BCG-om koristi za liječenje urotelnog karcinoma.

Inteleukin 6 jedan je od glavnih proupalnih citokina, te ima važnu ulogu u razvoju mnogih tumora, a njegova uloga u nastanku zloćudnih tumorima mokraćnog mjehura nije istražena. Osnovna pretpostavka provedenog istraživanja jest da IL6, kao i njegov transkripcijski čimbenik STAT3, imaju važnu ulogu u razvoju zloćudnih tumora mokraćnog mjehura. Stoga će predloženo istraživanje razjasniti učinak potpunog odstranjenja citokina IL6 (koristeći *knock-out* miševe) na razvoj tumora mokraćnog mjehura. Predloženi genetski model koji uspoređuje normalne miševe (koji imaju IL6), s životinjama bez IL6 omogućiti će nedvosmisleno utvrđivanje učinaka tog citokina na različite aspekte razvoja tumora mokraćnog mjehura.

### 2.1 Hipoteza

Osnovna pretpostavka istraživanja je da IL6 – jedan od osnovnih proupalnih citokina, ima značajnu ulogu u razvoju malignih tumora mokraćnog mjehura.

## 2.2 Ciljevi istraživanja

Istraživanje funkcije upalnih procesa pri nastanku tumora mokraćnog mjehura ključno je za razumijevanje, prevenciju i liječenje te bolesti. Interleukin 6 kao ključna proupalna molekula u navedenom kontekstu ima važnu ulogu, stoga su ciljevi ovog istraživanja sljedeći:

- ispitati utjecaj nedostataka citokina IL6 na elemente upale, te na nastanak i razvoj tumora mokraćnog mjehura kod miševa,
- istražiti izražaj 83 imunološka biljega u tkivu mokraćnog mjehura kod IL6 knock-out (KO) miša u odnosu na divlji tip miševa nakon indukcije tumora mokraćnog mjehura,
- karakterizacija izražaja svih gena u induciranim tumorima mokraćnog mjehura miša, te
- utvrditi izražaj IL6 i STAT3 gena te drugih upalnih markera (TGF $\beta$ , RelA, VEGFA, Cyclin D1) u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura ljudi.

## 3 MATERIJALI I METODE

### 3.1 Materijali

#### 3.1.1 Reagensi

Uobičajeni reagensi korišteni u svrhu ovog rada su slijedeći (proizvođači su označeni u kurzivu): agaroz (Invitrogen); albumin iz goveđeg seruma (BSA, Carl Roth GmbH); amonijev persulfat (APS, Sigma Aldrich); aprotinin (Sigma Aldrich); bromfenolno plavilo (Carl Roth GmbH); N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin (BBN, TCI America); cinkov klorid (Sigma Aldrich); DAPI (Sigma Aldrich); deoksi-nukleotid trifosfat (dNTP, Invitrogen); dimetil-sulfoksid (DMSO, Sigma Aldrich); dinatrijev hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Sigma Aldrich); ditiotreitrol (DTT, Sigma Aldrich); Dulbeccova modifikacija Eagleovog medija; etanol (Sigma Aldrich); etidijev bromid (Carl Roth GmbH); etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA, Riedel-deHaen); etilenglikoltetraoctena kiselina (EGTA, Carl Roth GmbH); fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF, Carl Roth GmbH); fenol crveno (Sigma Aldrich); fotografski film (Fuji); glicerol (Kemika); glicin (Carl Roth GmbH); hidroksietil-piperazinetansulfonična kiselina (HEPES, Sigma Aldrich); izopropanol (Kemika); kalcijev klorid (Carl Roth GmbH); kalijev dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Sigma Aldrich); kalijev klorid (KCl, Sigma Aldrich); koktel fosfataznih inhibitora (engl. *PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche*); koktel proteaznih inhibitora (engl. *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche*); ksilen (Kemika); leupeptin (Sigma Aldrich), magnezijev klorid (Carl Roth GmbH); magnezijev sulfat ( $\text{MgSO}_4$ , Sigma Aldrich);  $\beta$ - merkaptoetanol (Carl Roth GmbH); metanol (Sigma Aldrich); metilen plavo (Sigma Aldrich); mlijeko u prahu (Carl Roth GmbH); natrijev acetat ( $\text{NaCH}_2\text{COOH}$ , Carl Roth GmbH); natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ , Sigma Aldrich); natrijev deoksikolat (DOC, Carl Roth GmbH); natrijev dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Sigma Aldrich); natrijev dodecilsulfat (SDS, AppliChem); natrijev fluorid (NaF, Sigma Aldrich); natrijev klorid (NaCl, Kemika); natrijev ortovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Sigma Aldrich); nitrocelulozna membrana (GE Healthcare); N,N,N,N-tetrametil-etilendiamin (TEMED, Sigma Aldrich); NP-40 (Fluka); octena kiselina (Kemika); otopina 40% akrilamid/0.8% bisakrilamid (AppliChem); paraformaldehid (Sigma Aldrich); pojačivač kemiluminiscencije luminol (Santa Cruz Biotechnology); polietilenglikolsorbitan monolaurate (Tween-20, Carl Roth GmbH); PonceauS (Carl Roth GmbH); QIAzol (Qiagen); saharoza (Kemika); Tris baza (Trizma base, Sigma Aldrich); Triton X-100 (Carl Roth GmbH).



### 3.1.2 Početnice

Početnice korištene tijekom ovog istraživanja dizajnirane se uz pomoć online dostupnog alata za izradu početnica *Realtime PCR Tool* internet sučelja tvrtke *Integrated DNA Technologies* (<https://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>) (Tablica 1).

**Tablica 1. Obilježja korištenih početnica.** Prefiks „h“ u nazivu početnice označava početnicu za humani gen, a prefiks „m“ početnicu za mišji gen.

Početnica	Naziv gena	Slijed nukleotida
hCCND1 F	Ciklin D1	5'-ACG AAG GTC TGC GCG TGT T-3'
hCCND1 R	Ciklin D1	5'-CCG CTG GCC ATG AAC TAC CT-3'
hIL6 F	IL6	5'-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3'
hIL6 R	IL6	5'-GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC-3'
hp65 F	RelA/p65	5'-ACC GCT GCA TCC ACA GTT TCC A-3'
hp65 R	RelA/p65	5'-GGT CGT AGT CCC CAC GCT GC-3'
hRPS23 F	RPS23	5'-TGG AGG TGC TTC TCA TGC AA-3'
hRPS23 R	RPS23	5'-AAT GGC AGA ATT TGG CTG TTT G-3'
hSTAT3 F	STAT3	5'-ACC AGC AGT ATA GCC GCT TC-3'
hSTAT3 R	STAT3	5'-GCC ACA ATCCGG GCA ATC T-3'
hTGFβ1 F	TGFB1	5'-GCG TGC TAA TGG TGG AAA C-3'
hTGFβ1 R	TGFB1	5'-CGG TGA CAT CAA AAG ATA ACC AC-3'
hVEGFα F	VEGFA	5'-AGC CTT GCC TTG CTG CTC TA-3'
hVEGFα R	VEGFA	5'-GTG CTG GCC TTG GTG AGG-3'
mACTIN F	Aktin	5'-GCT GAT CCA CAT ATG CTG GA3'
mACTIN R	Aktin	5'-CAT TGC TGA CAG GAT GCA GAA3'
mB220 F	B220	5'-GGT ACC TGT ACG CCC AAC AC-3'
mB220 R	B220	5'-CCT GCT CCT CAA ACT TCG AC-3'
mCCND1	Ciklin D1	5'-GTA AGA TAC GGA GGG CGC ACA G-3'
mCCND1	Ciklin D1	5'-ACC CTG ACA CCA ATC TCC TCA AC-3'
mCD2R F	CD2R	5'-CAT GGT CTT CTG GGG GAG AC-3'
mCD2R R	CD2R	5'-CAA CAC AAC CCT GAC CTG TG-3'
mCXCR1 F	CXCR1	5'-CTA GGA CAT TGC CCA CCA CT-3'
mCXCR1 R	CXCR1	5'-ACT CCA TGC CCA AAG ACT GC-3'
mF4/80 F	F4/80	5'-GAT GGC CAA GGA TCT GAA AA-3'
mF4/80 R	F4/80	5'-CTC TGT GGT CCC ACC TTC AT-3'

### 3.1.3 Protutijela

Protutijela korištena tijekom ovog istraživanja prikazana su u tablici 2 i 3.

**Tablica 2. Obilježja korištenih primarnih protutijela.**

Naziv protutijela	Porijeklo	Vrsta protutijela	Proizvođač
anti-actin	miš	monoklonsko	Sigma-Aldrich
anti-GAPDH	miš	monoklonsko	Cell Signaling
anti-histone H3	kunić	poliklonsko	Cell Signaling
anti-Ki67	kunić	poliklonsko	Abcam
anti- NF- $\kappa$ B p65	kunić	poliklonsko	Santa Cruz Biotechnology
anti-fosfo-NF- $\kappa$ B p65 (S536)	kunić	poliklonsko	Cell Signaling
anti-fosfo-STAT3 (Y705)	kunić	poliklonsko	Cell Signaling
anti-STAT3	miš	monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology
anti-vinculin	miš	monoklonsko	Sigma-Aldrich

**Tablica 3. Obilježja korištenih sekundarnih protutijela**

Naziv protutijela	Konjugat	Porijeklo	Proizvođač
anti-kunićje IgG	HRP	koza	Dako
anti-mišje IgG	HRP	koza	BioRad
anti-mišje IgG	Alexa488	magarac	Invitrogen

### 3.1.4 Biljezi

DNA biljeg – 1 kb DNA marker (*BioLabs*)

Proteinski biljeg – Precision plus protein TM Dual color standards (*Bio-Rad*)

– Protein Marker VI (10-245) prestained (*AppliChem*)

### 3.1.5 Komercijalno dostupni kompleti

- Komplet za reverznu transkripciju (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems*)
- Komplet za RT-PCR (*SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems*)
- Komplet za dokazivanje fragmentacije DNA (*ApoAlert<sup>TM</sup> DNA Fragmentation Assay, Clontech*)

- Matrica za qPCR (*RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array System, PAMM-052Z: Mouse Innate and Adaptive Immune Responses, Qiagen*) (Tablica 4)

**Tablica 4. Popis gena čiji se izražaj prati korištenjem PAMM-052Z matrice za qPCR.** Tablica sadrži poziciju gena na matričnoj ploči od 96 jažica te pripadajuće ulazni broj u bazi podataka Refseq.

Pozicija	Refseq	Naziv gena
A01	NM_011318	Apcs
A02	NM_009778	C3
A03	NM_007577	C5ar1
A04	NM_009807	Casp1
A05	NM_011331	Ccl12
A06	NM_013653	Ccl5
A07	NM_009916	Ccr4
A08	NM_009917	Ccr5
A09	NM_009835	Ccr6
A10	NM_007720	Ccr8
A11	NM_009841	Cd14
A12	NM_013488	Cd4
B01	NM_011611	Cd40
B02	NM_011616	Cd40lg
B03	NM_009855	Cd80
B04	NM_019388	Cd86
B05	NM_001081110	Cd8a
B06	NM_007768	Crp
B07	NM_009969	Csf2
B08	NM_021274	Cxcl10
B09	NM_009910	Cxcr3
B10	NM_172689	Ddx58
B11	NM_010177	FasI
B12	NM_054039	Foxp3
C01	NM_008091	Gata3
C02	NM_010391	H2-Q10
C03	NM_010398	H2-T23
C04	NM_010493	Icam1
C05	NM_010503	Ifna2
C06	NM_010508	Ifnar1
C07	NM_010510	Ifnb1
C08	NM_008337	Ifng
C09	NM_010511	Ifngr1
C10	NM_010548	Il10
C11	NM_008355	Il13
C12	NM_010552	Il17a
D01	NM_008360	Il18
D02	NM_010554	Il1a
D03	NM_008361	Il1b
D04	NM_008362	Il1r1
D05	NM_008366	Il2
D06	NM_031252	Il23a
D07	NM_021283	Il4
D08	NM_010558	Il5
D09	NM_031168	Il6

Pozicija	Refseq	Naziv gena
D10	NM_008363	Irak1
D11	NM_016849	Irf3
D12	NM_016850	Irf7
E01	NM_008401	Irgam
E02	NM_008413	Jak2
E03	NM_016923	Ly96
E04	NM_017372	Lyz2
E05	NM_011949	Mapk1
E06	NM_016700	Mapk8
E07	NM_010776	Mbl2
E08	NM_010824	Mpo
E09	NM_010846	Mx1
E10	NM_010851	Myd88
E11	NM_008689	Nfkb1
E12	NM_010907	Nfkbia
F01	NM_145827	Nlrp3
F02	NM_172729	Nod1
F03	NM_145857	Nod2
F04	NM_009019	Rag1
F05	NM_011281	Rorc
F06	NM_013612	Slc11a1
F07	NM_009283	Stat1
F08	NM_011486	Stat3
F09	NM_011487	Stat4
F10	NM_009284	Stat6
F11	NM_019507	Tbx21
F12	NM_174989	Ticam1
G01	NM_030682	Tlr1
G02	NM_011905	Tlr2
G03	NM_126166	Tlr3
G04	NM_021297	Tlr4
G05	NM_016928	Tlr5
G06	NM_011604	Tlr6
G07	NM_133211	Tlr7
G08	NM_133212	Tlr8
G09	NM_031178	Tlr9
G10	NM_013693	Tnf
G11	NM_009424	Traf6
G12	NM_018793	Tyk2
H01	NM_007393	Actb
H02	NM_009735	B2m
H03	NM_008084	Gapdh
H04	NM_010368	Gusb
H05	NM_008302	Hsp90ab1

### 3.1.6 Puferi i otopine

- RIPA pufer – za izolaciju ukupnih proteina: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% DOC, 1% SDS, proteazni inhibitori i inhibitori fosfataza koji se dodaju svježe prije upotrebe (1 mM PMSF, 2 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin, 1 mM natrijev ortovanadat)
- Pufer za frakcioniranje citoplazmatskih proteina: 10 mM HEPES pH 8.0, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM DTT, proteazni inhibitori i inhibitori fosfataza koji se dodaju svježe prije upotrebe (1 mM PMSF, koktel proteaznih inhibitora)
- Pufer za frakcioniranje jezgrinih proteina: 20 mM HEPES pH 8.0, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% glicerol, 1 mM DTT, proteazni inhibitori i inhibitori fosfataza koji se dodaju svježe prije upotrebe (1 mM PMSF, 2 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin, 1 mM natrijev ortovanadat)
- 50X TAE pufer: 2 M Tris, 0.5 M EDTA, 1 M octena kiselina
- 6X DNA pufer za nanošenje uzoraka: 50% glicerol, 0.1 M EDTA, 1% SDS, 0.2% bromfenolno plavilo, 0.2% ksilen cijanol
- Pufer za gel za razdvajanje (engl. *separation gel*): 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS
- Pufer za gel za sabijanje (engl. *stacking gel*): 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS
- 2X Laemmli pufer: 25 mL Tris, pH 6.8, 20 mL glicerol, 20 mL SDS, 10%, 1 mg bromfenolno plavilo, 5% β-merkaptioetanol
- 10X PBS (engl. *Phosphate-Buffered Saline*), pH 7.3: 80 g NaCl, 2 g KCl, 11.5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 10X pufera za elektroforezu (engl. *running buffer*): 30 g Tris, 144 g glicin, 10 g SDS, do 1 L H<sub>2</sub>O
- 10X pufer za transfer: 22.3 g Tris, 105 g glicin, do 1 L H<sub>2</sub>O
- 20X TBS (engl. *Tris-Buffered Saline*), pH 7.6: 201.17 mM Tris, 1.98 M NaCl
- Otopina za ispiranje membrana: 1X TBS, 0.1% Tween, pH 7.4
- Otopina Ponceau S: 0.5 g Ponceau S, 10 mL octena kiselina, do 100 ml H<sub>2</sub>O
- Blokirajuća otopina za imunoblot analizu: 1X TBS, pH 7.5, 5% BSA, 0.1% natrijev azid, fenol red
- Otopina za permeabilizaciju stanica: 1X PBS, 0.2% Triton X-100
- Otopina za ispiranje stanica: 1X PBS, 0.1% Tween
- MOWIOL otopina: 2.4 g Mowiol 4-88, 6 ml glicerol, 6 ml H<sub>2</sub>O, 12 ml 0.2 M TrisHCl, pH 8.5

- Otopina za fiksaciju tkiva miša: 4% paraformaldehid u 1X PBS
- Blokirajuća otopina za imunofluorescenciju: 1X PBS, 1% BSA, 1% DMSO

### 3.1.7 Gelovi

- Agarozni gelovi – pripremaju se otapanjem odgovarajuće količine agaroze u 1X TAE puferu. Djelomično ohlađenoj otopini se, prije početka polimerizacije, dodaje etidijev bromid do konačne koncentracije 0.5 µg/ml te se otopina izlijeva u kalup s umetnutim češljicom koji osigurava jažice za nanošenje uzorka. Korišteni su 1-2% gelovi ovisno o veličini DNA fragmenta koji se razdvaja u gelu.
- Poliakrilamidni gelovi – sastoje se od dva sloja gela te sadrže SDS u puferu za razdvajanje i sabijanje, ukoliko se provodi elektroforeza proteina. Elektroforeza DNA u poliakrilamidnim gelovima provodi se bez SDS-a te u jednoslojnom gelu.
  - Gel za razdvajanje – 8 do 15% - 40% akrilamid/0.8% bisakrilamid, H<sub>2</sub>O, pufer za razdvajanje, 10% APS, TEMED
  - Gel za sabijanje: 40% akrilamid/0.8% bisakrilamid (mL), H<sub>2</sub>O, pufer za sabijanje, 10% APS, TEMED
  - Gel za elektroforezu DNA: 30% akrilamid/0.8% bisakrilamid, H<sub>2</sub>O, 1X TAE pufer, 10% APS, TEMED

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Protokol istraživanja

Istraživanje je provedeno na C56/B6 soju miševa divljeg tipa te miševima istog soja koji nose deleciju mutaciju gena za citokin IL6. Upotrebom kemikalije N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin (BBN) u vodi za piće miševima su inducirani tumori mokraćnog mjehura te su tkiva mokraćnog mjehura analizirana nakon akutnog (2 tjedna) i kroničnog (20 tjedana) tretmana.

Tkiva mokraćnog mjehura miša koji su bili u kroničnom tretmanu analizirana su metodom RNA sekvenciranja te lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR). Profili izražaja relevantnih imunoloških biljega wt miševa u kroničnom tretmanu te wt miševa miševa koji su bili u akutnom tretmanu uspoređeni su sa izražajem gena IL6 KO miševa podvrgnutih istim tretmanima.

Provedenom histopatološka analizom te imunohistokemijskim bojenjima i metodom TUNEL utvrđene su fenotipske karakteristike tumora wt i IL6 KO soja.

Analiziran je diferencijalni izražaj gena IL6, STAT3, NF- $\kappa$ B, TGF $\beta$ , ciklin D te VEGFA u uzorcima tumorskog i kontrolnog tkiva mokraćnog mjehura pacijenata.

### 3.2.2 Uzorci pacijenata

Za istraživanje je korištena randomizirana kohorta od 36 parova uzoraka tumorskog i zdravog tkiva mokraćnog mjehura pacijenta koji su bolovali od primarnog tumora mokraćnog mjehura te su kirurški liječeni u KBC Split u razdoblju od srpnja 2009. do listopada 2010. godine (Tablica 5). Muškog spola je bilo 29 pacijenata, a 7 ispitanika bile su žene. Srednja dob pacijenata bila je  $68.9 \pm 13.4$  godina u rasponu od 34 do 89 godina. Tkiva su netom po uzorkovanju smrznuta u tekućem dušiku. Histopatološka analiza rutinski uklopljenih tkiva pokazala je da se radi o 21 nisko-gradusnih te 15 visoko-gradusnih tumora. Klasifikacija tumora utvrđena je s obzirom na pojavu invazije u laminu propriju odnosno okolno mišićno tkivo (Ta, n=20; T1, n=8; T2-T4, n=8). Iz tkiva je standardiziranim procesom izolirana RNA, DNA te proteini koji su kasnije podvrgnuti lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR) te *western blot* analizi. U Tablici 5 detaljno su prikazane patološke osobine uzoraka pacijenata. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu, a ispitanici su potpisali informirani pristanak.

**Tablica 5. Patohistološke osobine tumora mokraćnog mjehura pacijenata.**

PACIJENT	DOB	SPOL	INVAZIVNOST	GRADUS	STADIJ	BROJNOST
BC01	79	Žensko	NE	NIZAK	Ta	2
BC02	61	Muško	NE	NIZAK	Ta	2
BC03	58	Muško	NE	NIZAK	Ta	1
BC04	79	Muško	NE	NIZAK	Ta	1
BC05	49	Muško	NE	VISOK	Ta	2
BC06	66	Muško	DA	VISOK	T1	1
BC07	78	Muško	NE	NIZAK	Ta	1
BC08	61	Muško	DA	VISOK	T2	1
BC09	57	Žensko	DA	VISOK	T1	10
BC10	57	Muško	DA	NIZAK	T1	3
BC11	78	Muško	DA	VISOK	T2	1
BC12	76	Muško	NE	NIZAK	Ta	1
BC13	35	Muško	NE	NIZAK	Ta	5
BC14	80	Muško	NE	NIZAK	Ta	1
BC15	62	Muško	NE	NIZAK	Ta	2
BC16	80	Muško	DA	VISOK	T1	1
BC17	66	Muško	NE	NIZAK	Ta	1
BC18	79	Žensko	DA	VISOK	T2	5
BC19	89	Žensko	NE	NIZAK	Ta	1
BC20	69	Muško	DA	VISOK	T1	3
BC21	83	Žensko	DA	VISOK	T2	3
BC22	77	Muško	NE	NIZAK	Ta	2
BC23	76	Muško	NE	NIZAK	Ta	1
BC24	67	Muško	DA	VISOK	T1	1
BC25	79	Žensko	DA	NIZAK	T1	12
BC26	82	Muško	DA	VISOK	T1	3
BC27	46	Muško	NE	NIZAK	Ta	2
BC28	34	Muško	NE	NIZAK	Ta	4
BC29	70	Muško	NE	NIZAK	Ta	3
BC30	74	Muško	NE	NIZAK	Ta	2
BC31	81	Muško	DA	VISOK	T4	1
BC32	53	Muško	NE	NIZAK	Ta	1
BC33	79	Muško	DA	VISOK	T2	1
BC34	79	Žensko	DA	VISOK	T2	6
BC35	74	Muško	DA	VISOK	T1	1
BC36	69	Muško	NE	NIZAK	Ta	1
<b>SAŽETAK</b>	11 <35-65> 25 <65-89>	29 M 7 Ž	20 Inv. 16 NEInv.	20 VISOK 16 NIZAK	20 Ta 9 T1 6 T2 1 T4	18 jednostruki 18 višebrojni

### 3.2.3 Izolacija RNA, DNA i proteina iz tkiva

Neposredno po prikupljanju tkiva su smrznuta u tekućem dušiku do trenutka izolacije bioloških molekula. Ukupna RNA, DNA i proteini iz tkiva izolirani su korištenjem *QIAzol lysis reagent* (Qiagen) prema uputama proizvođača. Dobivena mRNA prevedena je u komplementarnu DNA (cDNA) koristeći *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (*Applied Biosystems*). Izolirana DNA pohranjena je na -20°C, a RNA i proteini na -80°C do daljnje obrade.

### 3.2.4 Priprema ukupnih tkivnih lizata i frakcioniranje tkivnih lizata

Za pripremu staničnih suspenzija iz svježih tumorskih uzoraka pacijenata korišten je tkivni homogenizator *McIllwain Tissue Chopper* te naknadno filtriranje kroz stanično sito (*Cell strainer, Gibco*). Stanice su ostavljene pola sata na ledu u hipotoničnom puferu za frakcioniranje citoplazmatskih proteina te su naknadno provučene kroz 25 G iglu prilikom čega dolazi do lize isključivo citoplazmatske membrane. Nakon centrifugiranja 5 min na 1000 rpm razdvaja se citoplazmatska frakcija u supernatant. Netaknute jezgre u talogu su resuspendirane u puferu za frakcioniranje jezgrinih proteina, centrifugiranjem je istaložen netopljivi debris, a jezgri lizat je usporedno s citoplazmatskim lizatom, analiziran pomoću denaturirajuće SDS poliakrilamidne gel elektroforeze i *western blota*.

Za pripremu ukupnih tkivnih lizata korišten je RIPA pufer za staničnu lizu. Tkivni lizat je ostavljen 20 min u puferu na ledu te su ukupni proteini razdvojeni centrifugiranjem na 8000 rpm.

### 3.2.5 Denaturirajuća SDS poliakrilamidna gel elektroforeza i *western blot*

Nakon lize tkiva, proteini se razdvajaju se po veličini pomoću denaturirajuće elektroforeze u SDS poliakrilamidnom gelu. Pripremljeni lizati se denaturiraju miješanjem s 2X Laemmli puferom te zagrijavanjem na 95°C pet minuta. U svakom gelu koristi se biljeg veličine proteina. Prilikom elektroforeze proteini su početno razdvojeni pri 100 V, a nakon ulaska u gel za razdvajanje pri 120 V. Nakon što su uzorci razdvojeni gel elektroforezom, preneseni su na 0.45 µm nitroceluloznu membranu (200 mA, 90 minuta) u mješavini 1X pufera za transfer i 20%-tnog (v/v) metanola. Učinkovitost prijenosa provjerena je reverzibilnim bojenjem membrane u otopini Ponceau S. Membrane su blokirane u puferu 1X TBS/5% BSA jedan sat na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje. Imunodetekcija je izvedena inkubacijom membrana preko noći na 4°C u otopini 1X TBS/5% BSA s



odgovarajućim primarnim protutijelom. Membrane su isprane u puferu 1x TBS/0.1% Tween, kako bi se uklonio višak primarnog protutijela, a zatim je dodano odgovarajuće sekundarno protutijelo pripremljeno u puferu 1X TBS s 5% bezmasnog mlijeka u prahu ili u otopini 1X TBS 5% BSA ukoliko je korišten fosfat-specifično primarno protutijelo. Membrane su isprane u 1X TBS/0.1% Tween. Sekundarno protutijelo obilježeno je peroksidazom iz hrena (engl. *horseradish peroxidase-HRP*), što omogućuje vizualizaciju proteina metodom kemiluminiscencije. Na membrane se dodaje mješavina vodikovog peroksida i luminola, supstrat enzima peroksidaze, a produkt reakcije se detektira na fotografskom filmu. Cijeli postupak, elektroforeza i prijenos na membranu, izvodi se u uređaju Mini Protean 3 (*BioRad*), a detekcija u aparatu za razvijanje fotografskog papira (*Fuji*).

### 3.2.6 Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR)

U svrhu određivanja relativne količine izražaja gena, cDNA ciljnih gena umnoži se lančanom reakcijom polimerazom (PCR) u stvarnom vremenu tzv. kvantitativnim PCR-om (dalje u tekstu qPCR). Ova metoda počiva na vezivanju asimetrične cijaninske boje naziva *SYBR Green* na dvostruku uzvojnici DNA. Prilikom svakog ciklusa kada dolazi do umnožavanja dijela cDNA gena od interesa, dolazi i do proporcionalnog pojačanja fluorescencijskog signala koje je uzrokovano vezivanjem boje na dvostruko uzvojiti produkt. Reagensi i parametri ove reakcije su slijedeći:

- PCR reakcija: kalup DNA, *SYBR Green PCR Master Mix* koji sadrži pufer, *SYBR Green* i smjesu dNTP-a, početnice 5' i 3', polimeraza, voda
- PCR program: 1. 50°C 2 min, 2. 95°C početna denaturacija 10 min te 3. 95°C 15 sek (denaturacija), 60°C 1 min (vezanje početnica za kalup te polimerizacija), – 40 ciklusa, 4. 95°C 15 sek, 60°C 1min, 95°C 15 sek (dodatni korak disocijacijske krivulje početnica).

Po završetku qPCR provodi se analiza relativnog izražaja gena u odnosu na izražaj odabranog kontrolnog/konstitutivnog (*housekeeping*) gena koji služi kao standard izražaja. Razina izražaja pojedinog gena u ovom istraživanju normalizirana je prema izražaju gena RPS23 kod ljudskih uzoraka te prema aritmetičkoj sredini izražaja GAPDH i Hsp90ab1 za mišje uzorke. Izražaj gena kod miševa tretiranih BBN-om analiziran je korištenjem matričnih ploča *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array* (Qiagen). Rezultati se prikazuju kao relativna promjena, a računaju se prema formuli  $2^{-\Delta Ct(\textit{housekeeping gen} - \textit{proučavani gen})}$ .

### 3.2.7 Transgenični miševi i BBN tretman

U istraživanju su se koristili divlji tip (wt) miševa C57BL/6J te transgenični miševi tzv. *knock-out* (KO) miševi za IL6 (IL6<sup>-/-</sup> dalje u tekstu), koji su bili istovjetnog soja s nedostatkom funkcionalnog gena za IL6. Miševi su kupljeni od američke tvrtke *The Jacksons Laboratory*. Eksperimentalne skupine po 10-12 miševa podvrgnute su akutnom i kroničnom tretmanu korištenjem kemikalije N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin (BBN) u vodi za piće sa svrhom indukcije tumora mokraćnog mjehura. Indukcija tumora BBN-om slijedila je već objavljene i ustaljene protokole<sup>72,149</sup>. Kontrolne, netretirane skupine miševa bile su ujednačene dobi od 6 do 8 tjedana starosti te su boravile u istim uvjetima kao i miševi tretirani s BBN-om. Akutni tretman kemikalijom BBN trajao je 2 tjedna, nakon čega su miševi žrtvovani, dok je kronični tretman trajao 12 tjedana, a miševi su žrtvovani 20 tjedana nakon početka tretmana. Ovakvim pristupom moguće je utvrditi razlike između KO i wt miševa s tumorima (razlike u tumorigenezi koje su uvjetovane s IL6), kao i promjene koje nastaju zbog indukcije tumora među miševima istog genotipa (npr. promjenu izražaja nekog gena u tumorskom tkivu, u odnosu na normalno tkivo). Miševi korišteni u ovom istraživanju su uzgajani, anestetizirani i žrtvovani prema europskim i hrvatskim smjernicama za brigu i upotrebu laboratorijskih životinja. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Ministarstva poljoprivrede te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu.

### 3.2.8 Patohistološka i imunohistokemijska analiza tkiva

Neposredno nakon žrtvovanja, mokraćni mjehur miša podijeljen je na dva jednaka dijela, od kojih je jedan korišten za izolaciju bioloških molekula (RNA, DNA i proteini), a drugi dio za histološku analizu. Tkiva za histološku analizu fiksirana su preko noći u 4% paraformaldehidu te su slijedeći dan dehidrirana u serijskim razrjeđenjima etanola po jedan sat redosljedom 75%, 90%, 95%, tri puta 100% te tretirana dva puta po jedan sat ksilenom za prosvjetljavanje. Uzorci su ostavljeni preko noći na 60°C u parafinu te su slijedeći dan uklopljeni u svježi parafin. Rezovi tumorskih uzorka mokraćnog mjehura pacijenata rutinski su uklopljeni u KBC Split. Rezovi debljine 5 µm su deparafinizirani uranjanjem u dvije otopine ksilola po 15 min, rehidrirani serijskim razrjeđenjima etanola redosljedom jedna minuta u 100%, jedna do dvije minute 100%, jedna minuta 96% te su naknadno isprani u običnoj vodi.

Imunohistokemijsko bojanje specifičnim antitijelima provedeno je nakon deparafinizacije i predtretmana rezova iskuhavanjem 10 min u puferskoj otopini 10 mM

natijeovog citrata s 0.05% Tween detergentom (pH 6.0) s postepenim hlađenjem i ispiranjem tri puta destiliranom vodom. Endogene peroksidaze su po potrebi blokirane inkubacijom 10 min u otopini 3% vodikovog peroksida koja je tri puta isprana destiliranom vodom. Rezovi su inkubirani u otopini 1% BSA u PBS puferu jedan sat na sobnoj temperaturi. Primarna antitijela protiv Ki67 i STAT3 proteina nanešena su u razrjeđenju 1:500 u 1% BSA u PBS puferu te se inkubacija odvijala preko noći. Antitijelo je isprano tri puta po pet min otopinom 0.025% Triton X detergenta u PBS puferu. Sekundarno antitijelo inkubirano je jedan sat na sobnoj temperaturi razrijeđeno 1:500 u otopini 0.025% Triton X detergenta u PBS puferu te je isprano tri puta s 0.025% Triton X detergenta u PBS puferu. Ukoliko je korišteno sekundarno antitijelo s konjugatom peroksidaze hrena, rezovi su inkubirani s otopinom diaminobenzidina (DAB) razrjeđenja 1:500 10 minuta te su isprani tri puta destiliranom vodom u trajanju od jedne min.

Bojanje hematoksilinom izvedeno je uranjanjem u hematoksilin 10 sek te ispiranjem toplom vodom i vodom sobne temperature, a bojanje eozinom izvedeno je uranjanjem 1 sek u otopinu eozina te ispiranjem u vodi sobne temperature. Naknadna dehidracija provedena je uranjanjem u serijske otopine etanola redosljedom tri minute u 70%, dva puta po 10 sek u 95%, dva puta po 10 sek u 100% te uranjanjem dvije otopine ksilena po 10 sek. Bojanje eozinom izvedeno je uranjanjem 2 sek u otopinu eozina te ispiranjem u vodi sobne temperature.

Za završno montiranje rezova na predmetnice korištena je otopina medija MOWIOL ili komercijalni medij za montiranje (Dako CS703). Imunodetekcija je provedena epifluorescencijskim mikroskopom (Zeiss, Axio Immager D1) ili običnim svjetlosnim mikroskopom.

### 3.2.9 Dokazivanje fragmentacije DNA

Za dokazivanje fragmentacije DNA molekule koja predstavlja jedno od obilježja apoptoze, korišten je komplet *ApoAlert<sup>TM</sup> DNA Fragmentation Assay (Clontech)*. Ovaj se komplet temelji na ugradnji fluorescencijski obilježenih deoksi-uridin-trifosfata (dUTP) na 3'-hidroksilnim krajevima fragmentirane DNA molekule pomoću enzima terminalne deoksinukleotid transferaze (TdT). Prema naputku proizvođača, prerezi tkiva su deparafinizirani i rehidrirani te refiksirani u otopini 4% paraformaldehida. Uslijedio je 5 minutni tretman enzimom proteinaza K (20 µg/mL vodena otopina) u svrhu razgradnje proteina, inkubacija s TdT enzimom u tami 60 minuta koje se na poslijetku inhibira upotrebom završnog pufera iz kompleta koji sadrži natrij-citrat. Ukupna DNA boji se 1 min DAPI fluorescencijskom bojom te ispere PBS puferom. Preparati su analizirani epifluorescencijskim mikroskopom (Zeiss, Axio Immager D1).

### 3.2.10 Sekvenciranje RNA

Objedinili smo po 3 uzorka ukupne RNA izolirane iz mokraćnih mjehura wt miševa koji su podvrgnuti kroničnom tretmanu BBN-om kao i netretiranih wt miševa u jedan skupni uzorak za sekvenciranje. Sekvencirali smo po tri skupna uzorka za grupu tretiranih kao i netretiranih wt miševa te smo na taj način pokrili raspon od 9 uzoraka mjehura wt miševa po grupi uzoraka. RNA sekvenciranje nove generacije (engl. *next generation sequencing*) provela je tvrtka *Applied Biological Materials (ABM) Inc. (Richmond, B.C. Canada)* metodom *Illumina* sekvenciranja. Zatražili smo 40 milijuna čitanja s jednog kraja nakon obogaćivanja RNA knjižnice s RNA koja sadrži poliadenilatne slijedove (eng. *poly(A)-enrichment*). U sklopu svog servisa, ova tvrtka je provela i početnu analizu FASTQ tekstualnog formata rezultata sekvenciranja koristeći FASTQC alat za kontrolu kvalitete rezultata sekvenciranja. Svi su analizirani uzorci zadovoljili kriterij za daljnju analizu. Slijedovi čitanja dobiveni sekvenciranjem srađeni su s transkriptomom miša korištenjem *TopHat* algoritma. Upotrebom *Cufflinks* algoritma utvrđene su količine pojedinih transkripata u uzorcima BBN tretiranih i netretiranih wt miševa. Diferencijalna analiza zastupljenosti transkripata gena mokraćnog mjehura kod tretiranih miševa u odnosu na netretirane, provedena je upotrebom *Cuffdiff* algoritma. *TopHat*, *Cufflinks* i *Cuffdiff* su algoritmi na osnovi programskog jezika C++<sup>150-152</sup>. Za daljnju analizu ontologije gena čiji se izražaj mijenja tijekom tretmana BBN-om, korištena su internet sučelja GOrilla i Revigo<sup>153,154</sup>. Prag biološke značajnosti promjene uzet u obzir za ovu metodu iznosi  $FC > \pm 2$ .

### 3.2.11 Statistički postupci

Promjene u izražaju ciljnih gena kod pacijenata analizirane su primjenom neparametrijskih statističkih metoda. Upotrebom *Wilcoxon rank sum* statističkog testa analizirane su varijance izražaja ciljnih gena u tumorima u odnosu na zdravo tkivo. Da bismo utvrdili je li porast izražaja gena veći od 2 puta značajan za tumore mokraćnog mjehura koristili smo binomijalni test. Promjene u izražaju gena grupirane su prema gradu, invazivnosti, spolu i dobi pacijenata te je provedena Kruskal-Wallis analiza varijance. Spearmanov koeficijent korelacije je izračunat u analizi izražaja gena kod pacijenata.

Za praćenje izražaja upalnih biljega u mokraćnom mjehuru miša tretiranog kemikalijom BBN korištena je veličina uzorka koju nalaže literatura za navedeni tip eksperimenta proveden na istosojnim miševima<sup>155</sup>. Analizirana su 4 miša po eksperimentalnoj skupini, a u svrhu homogenizacije uzorka iz statističke analize je isključen uzorak s najvećim postotkom devijantno izraženih gena po matičnoj ploči u skupini<sup>156</sup>. Značaj diferencijalnog izražaja gena za IL6 između eksperimentalnih skupina utvrđena je upotrebom ANOVA testa.

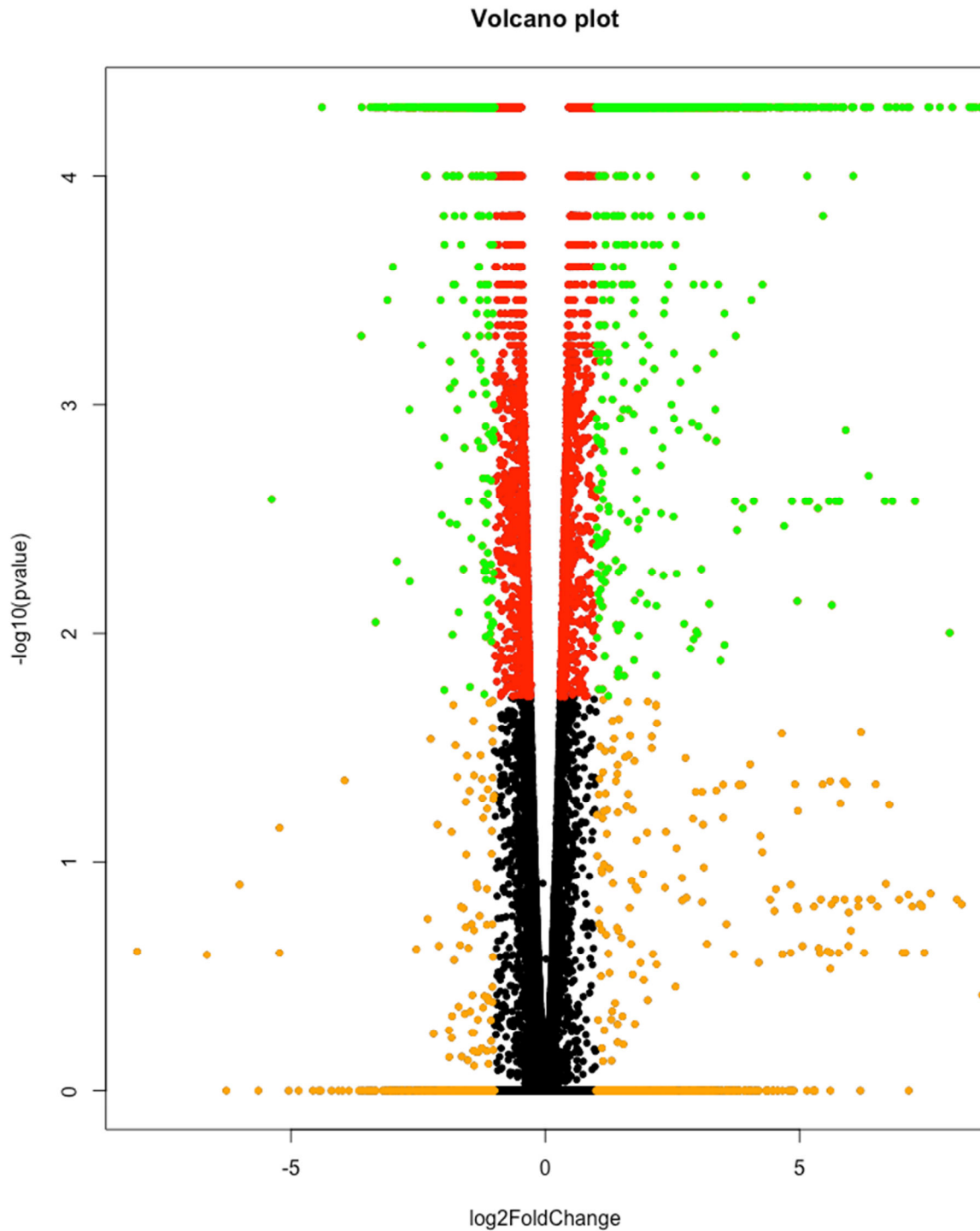
Značaj diferencijalnog izražaja gena utvrđenog sekvencioniranjem ukupnih RNA u tkivu mokraćnog mjehura wt miša, utvrđen je pomoću CuffDiff multivarijantne analize, a korekcija P-vrijednosti je učinjena prema Benjamini-Hochberg modelu<sup>151</sup>.

Primijenjena statistička obrada te izrada grafičkih prikaza u ovoj doktorskoj disertaciji napravljeni su korištenjem programskog jezika „R“ te programa za statističku obradu GraphPad Prism7. Razina značajnosti svih rezultata postavljena je na  $P < 0.05$ .

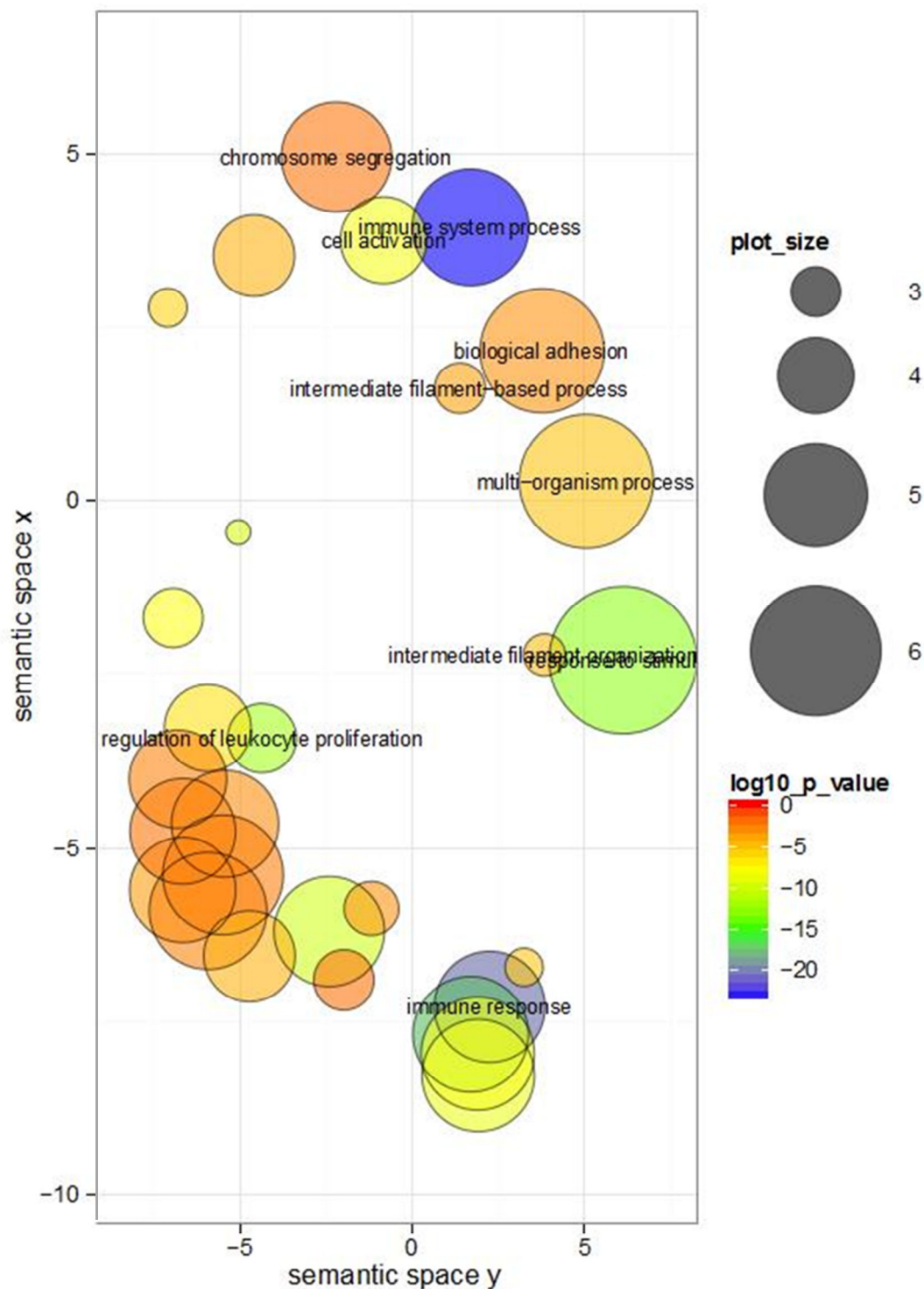
## 4 REZULTATI

### 4.1 Tretman kemikalijom BBN izaziva izrazit upalni fenotip tumora mokraćnog mjehura kod miševa

U svrhu istraživanja utjecaja upale prilikom razvoja tumora mokraćnog mjehura, miševе smo tretirali poznatim urotelnim karcinogenom N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozaminom (BBN). Zanimale su nas promjene u izražaju gena prilikom razvoja tumora pa smo proveli analizu apsolutnih promjena na razini izražaja gena metodom RNA sekvenciranja (*engl. RNA seq*). Izražaj gena u tkivima mokraćnog mjehura divljeg tipa miševa (wt) koji su bili pod kroničnim tretmanom kemikalijom BBN (te razvili tumor mokraćnog mjehura) uspoređen je s izražajem gena u zdravim mjehurima istosojnih miševa. RNA sekvenciranje je rezultiralo s ~50 milijuna čitanja koja su sravnjena s referentnim transkriptomom miša. Tretman kemikalijom BBN uzrokovao je statistički značajno različit (diferencijalni) izražaj 5861 gena u tkivu mokraćnog mjehura miša. Nakon postavljanja biološkog praga značajnosti na dvostruku promjenu (*engl. fold change, FC > ±2*), utvrdili smo 2449 biološki značajnih promjena koje se odnose na povećanje izražaja 1729 gena te smanjenje izražaja 720 gena. Razdioba gena s diferencijalnim izražajem nakon kroničnog tretmana kemikalijom BBN grafički je prikazana na slici 10. Dobivene podatke analizirali smo upotrebom baze podataka *Gene Ontology (GO) Consortium* putem korisničkog sučelja GOrilla. Analiza je uključila gene čiji je izražaj značajno promijenjen preko postavljenog biološkog praga. Pomoću tog korisničkog sučelja diferencijalno izraženi geni su sistematizirani u ontologijske (GO) kategorije. Na slici 11 prikazana je semantička raspodjela GO kategorija vezanih za biološke procese u koje se kategoriziraju drugačije izraženi geni u tumorski promijenjenim mokraćnim mjehurima miševa tretiranih s BBN-om. Diferencijalno izraženi geni u mokraćnim mjehurima tretiranih životinja najznačajnije su svrstani u kategoriju GO podskupine općih imunoloških procesa te imunološkog odgovora. Analiza izražaja s obzirom na molekularnu ulogu gena pokazala je kako su najviše promijenjeni izražaji gena povezani s aktivnošću citokina, geni za stanično signaliziranje kao i geni staničnih receptora (Slika 12).

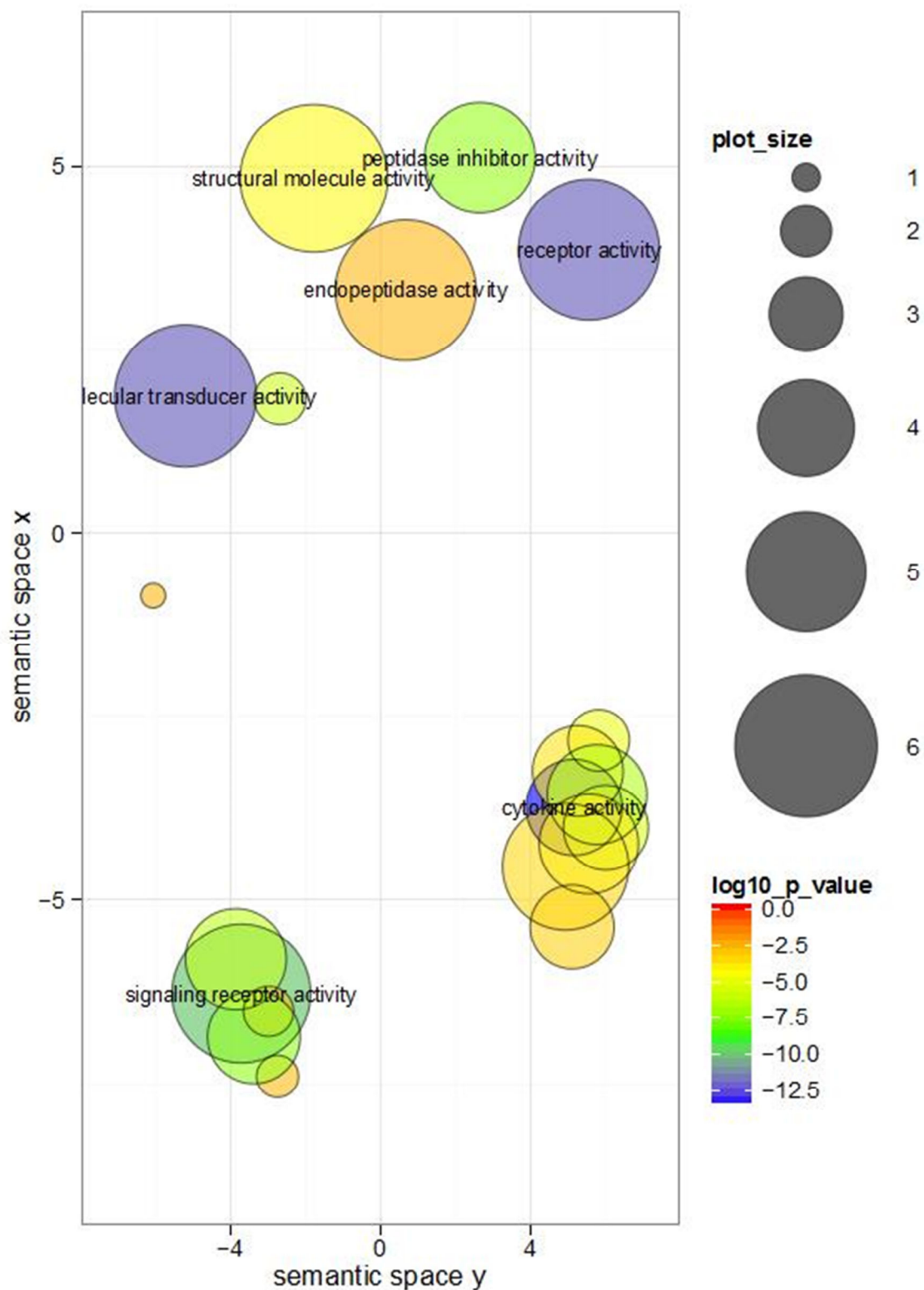


**Slika 10. Promjena izražaja gena u zloćudnim tumorima mokraćnog mjehura.** Prikaz obrasca promjene izražaja gena u tumorima mokraćnog mjehura miša divljeg tipa nakon kroničnog tretmana kemikalijom BBN dobivenim RNA sekvenciranjem. Crna boja predstavlja gene čiji izražaj ne prelazi niti statistički niti biološki prag značajnosti,  $P < 0.05$ ,  $FC \leq \pm 2$  (eng. *fold change*); žutom su bojom označeni statistički neznačajne promjene u izražaju gena preko biološkog praga značajnosti,  $p < 0.05$ ,  $FC \geq \pm 2$ ; crvenom bojom su označeni geni statistički značajnog ali biološki nepromijenjenog izražaja,  $p > 0.05$ ,  $FC \leq \pm 2$ ; zelenom bojom su označeni geni koji su statistički značajno različito izražani,  $p < 0.05$ ,  $FC \geq \pm 2$ .



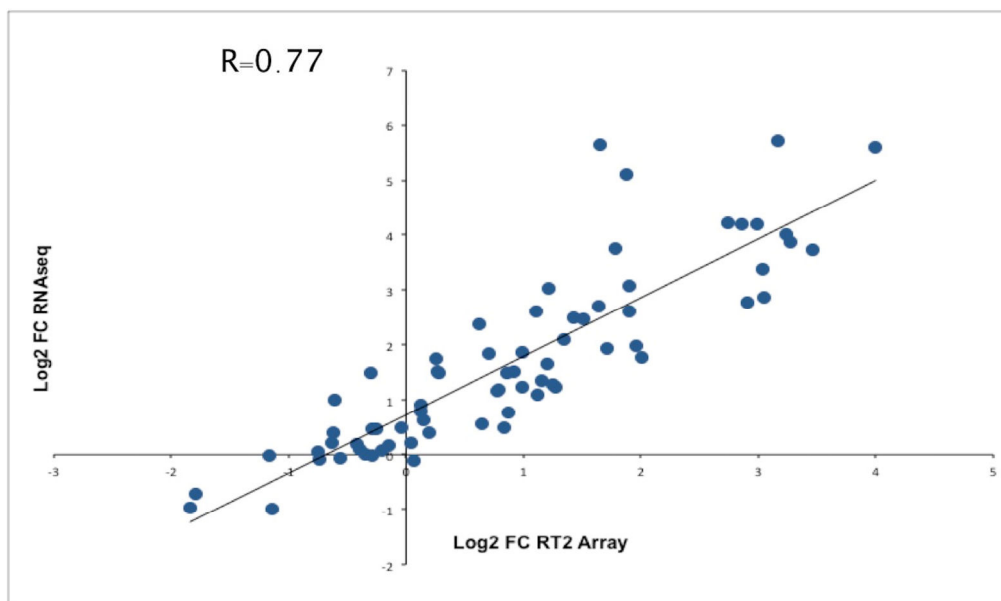
**Slika 11. Grupiranje gena s promijenjenim izražajem u biološke skupine.** Biološki procesi povezani su s diferencijalnim izražajem gena u tumorima izazvanim BBN-om. Semantička raspodjela zastupljenih GO kategorija vezanih za biološke procese u koje se grupiraju različito izraženi geni u tumorima izazvanim BBN-om. Boja kruga ukazuje na statističku snagu GO kategorije gena, a promjer kruga pokazuje relativnu širinu GO kategorije kojoj pripadaju pridruženi geni, a koji su različito izraženi nakon kroničnog tretmana. Vidljivo je da su geni imunološkog sustava najznačajnije promijenjeni.





**Slika 12. Molekularno-funkcionalno grupiranje gena različito izraženih prilikom tretmana BBN-om.** Semantička raspodjela zastupljenih GO kategorija vezanih za molekularnu ulogu u kojima se grupiraju diferencijalno izraženi geni u tumorima izazvanim BBN-om. Boja kruga ukazuje na statističku snagu GO kategorije gena, a promjer kruga indicira relativnu širinu GO kategorije kojoj pripadaju geni koji su diferencijalno izraženi nakon kroničnog tretmana.

Rezultati dobiveni sekvenciranjem RNA koji ukazuju na izražen upalni fenotip tumora izazvanih tretmanom s kemikalijom BBN, potvrđeni su i lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR) korištenjem matričnih ploča *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array*. Uz pomoć ovih matričnih ploča istražena je razlika u izražaju 86 gena s poznatom ulogom u mišjoj urođenoj i stečenoj imunosti. Rezultati dobiveni tom analizom pokazali su pozitivnu korelaciju s provedenim RNA sekvenciranjem (Slika 13). Početno smo analizirali izražaj 86 upalnih biljega, no izražaj gena *Apcs*, *Crp*, *Il2*, *Il17a*, *Ifna1*, *Ifnb*, *Mbl* i *Rag1* bio je zabilježen samo u akutnom modelu te je relativna kvantifikacija izražaja ovih gena analizirana zasebno. Geni za *Il4*, *Il23a*, *Tlr13*, *Cd40lg*, *Mpo* i *Il5* pokazali su općenito nisku razinu izražaja u tkivu mokraćnog mjehura miša te je njihov diferencijalni izražaj utvrđen na temelju qPCR eksperimenta s matričnim pločama. Sekvenciranjem RNA utvrđen je porast izražaja ovih gena, no s obzirom da njihov izražaj nije utvrđen u mokraćnom mjehuru netretiranih miševa, taj porast nije bilo moguće kvantificirati. Ovaj rezultat je očekivan s obzirom da je prag detekcije sekvencioniranjem RNA nešto niži u odnosu na qPCR tehnologiju.



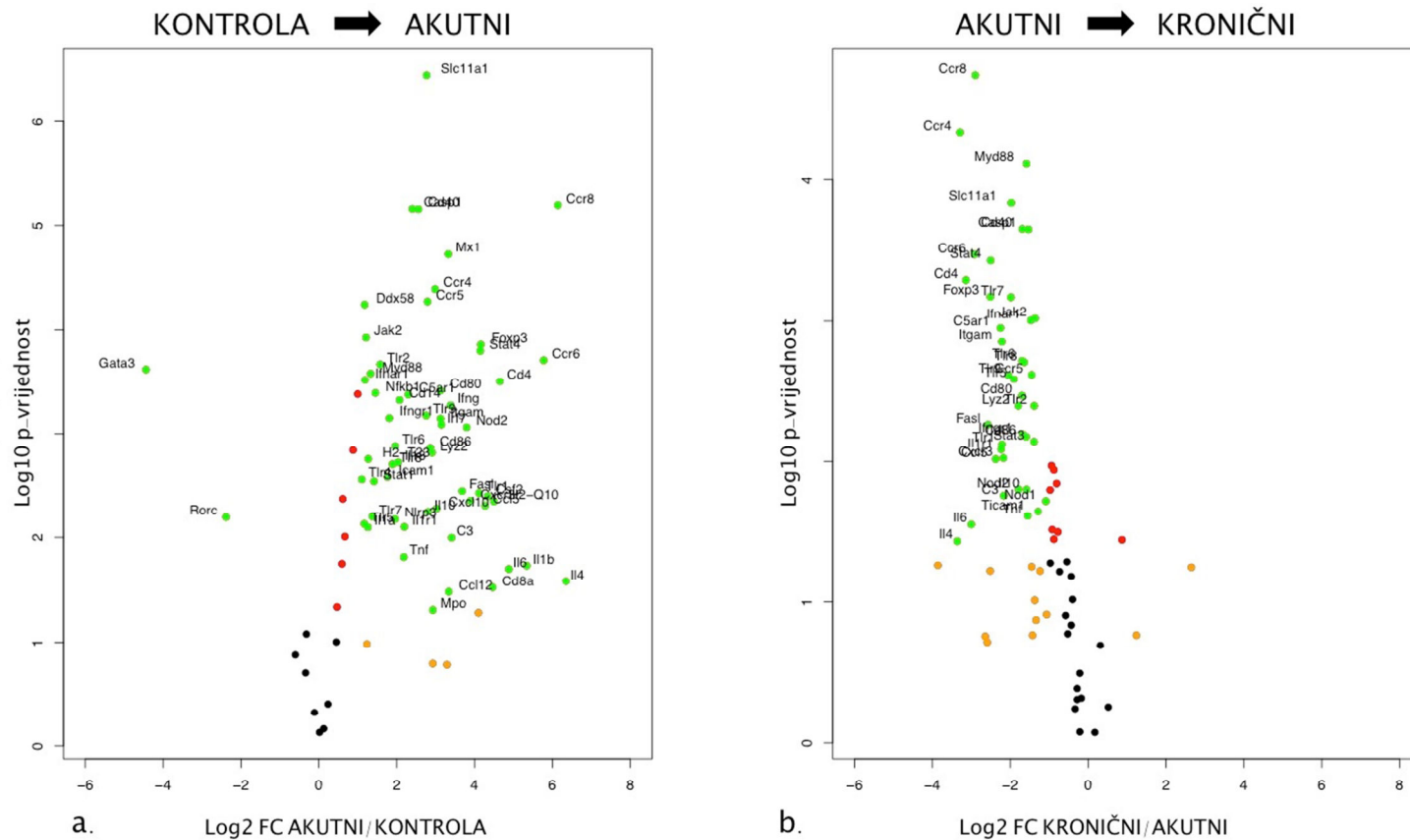
**Slika 13. Korelacija izražaja imunološki važnih gena kod sekvenciranja RNA i qPCR-om.** Pearsonov koeficijent korelacije za omjer promjene (*engl. fold change*, FC) izražaja gena kroz ova dva eksperimenta iznosi 0.77 te ukazuje na dobru pozitivnu korelaciju, tj. na podudarnost rezultata izmjerenu s te dvije metode.

## 4.2 Porast izražaja upalnih biljega prilikom indukcije tumora BBN-om

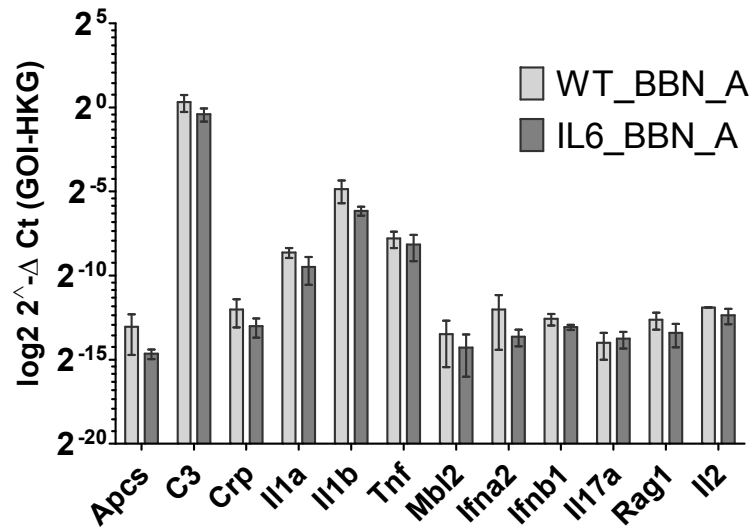
Zanimao nas je upalni profil mokraćnog mjehura tijekom početnih faza nastanka tumora te smo odlučili ispitati izražaj upalnih gena nakon samo dva tjedna tretmana kemikalijom BBN. Izražaj gena u tom trenutku razvoja tumora utvrdili smo metodologijom qPCR. Uočili smo značajan porast izražaja ključnih promotora upale kao što su citokini IL1 $\alpha$  i IL1 $\beta$ , IL18 te IL6. Osim tih citokina, dolazi do porasta izražaja kemokina Ccr6 i Ccr8 važnih za regulaciju limfocita T, kao i jednog od glavnih citokina s važnom ulogom u njihovoj diferencijaciji, IL4. Uz takav porast izražaja gena koji reguliraju diferencijaciju limfocita T prema T<sub>H</sub>2 lozi, bilježimo pad izražaja transkripcijskog faktora Rorc antagonista T<sub>H</sub>1 loze, kao i transkripcijskog faktora Gata3 (koji potiče diferencijaciju T<sub>H</sub>2 stanica, te inhibira razvoj T<sub>H</sub>1 stanica). Transkripcijski faktor Foxp3 koji predstavlja glavnog regulatora supresorskih T limfocita također je izrazito povišen u tumorima. U predtumorskom upalnom stadiju u mokraćnom mjehuru miševa tretiranih s BBN-om, dolazi do porasta izražaja transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B glavni posrednik upalnih zbivanja. U kroničnom modelu tretmana BBN-om koji uzrokuje tumore mokraćnog mjehura te u akutnom upalnom stanju u mokraćnom mjehuru miševa, nismo zabilježili značajan izražaj interferona tipa I, međutim, bilježimo porast interferona  $\gamma$  i njegovog ciljnog transkripcijskog faktora STAT4 (Slika 14a). Bilježimo povećanje izražaja proteina akutnog odgovora no s obzirom da su njihovi izražaji u netretiranim miševima ispod praga detekcije metode prikazuju se isključivo u usporedbi s IL6 KO miševima (Slika 15).

Izrazitu aktivaciju imunološkog sustava već u akutnom tretmanu vidimo i standardnom patohistološkom analizom tkivnih prereza mokraćnog mjehura miša. Primjetan je izrazit imunološki infiltrat u urotelnom sloju te u perivaskularnom području stjenke mjehura (Slika 16).

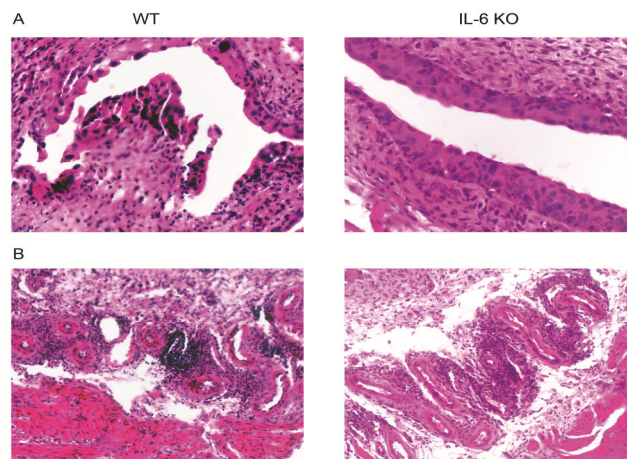
Slijedeće smo provjerili kakav je odnos izražaja upalnih biljega u usporedbi akutnog predtumorskog modela s tumorskim, kroničnim modelom. Utvrdili smo da u mokraćnom mjehuru miša koji je zahvaćen tumorom dolazi do slabljenja upalnog odgovora što se očituje padom izražaja većine upalnih biljega koje smo analizirali, a niti jedan od njih nije pokazao pojačan izražaj u tumorskom kroničnom modelu u odnosu na akutni tretman (Slika 14b).



**Slika 14. Dinamika promjene izražaja imunoloških gena tijekom razvoja tumora.** Prikaz odnosa omjera promjena (engl. *fold change* (FC) i značajnosti promjene u predstadiju tumora **(a)** te prilikom progresije tumora **(b)**. U grafičkom prikazu zelenom bojom su označeni te imenovani geni sa statistički značajnom promjenom izražaja koja prelazi biološki prag  $\text{FC} > 2$ ,  $P < 0.05$ ; crvena boja označava  $\text{FC} < 2$ ,  $P < 0.05$ ; žutom bojom označeni su geni s  $\text{FC} > 2$ ,  $P > 0.05$ ; crna boja označava uzorke čije su vrijednosti  $\text{FC} < 2$ ,  $P > 0.05$ .

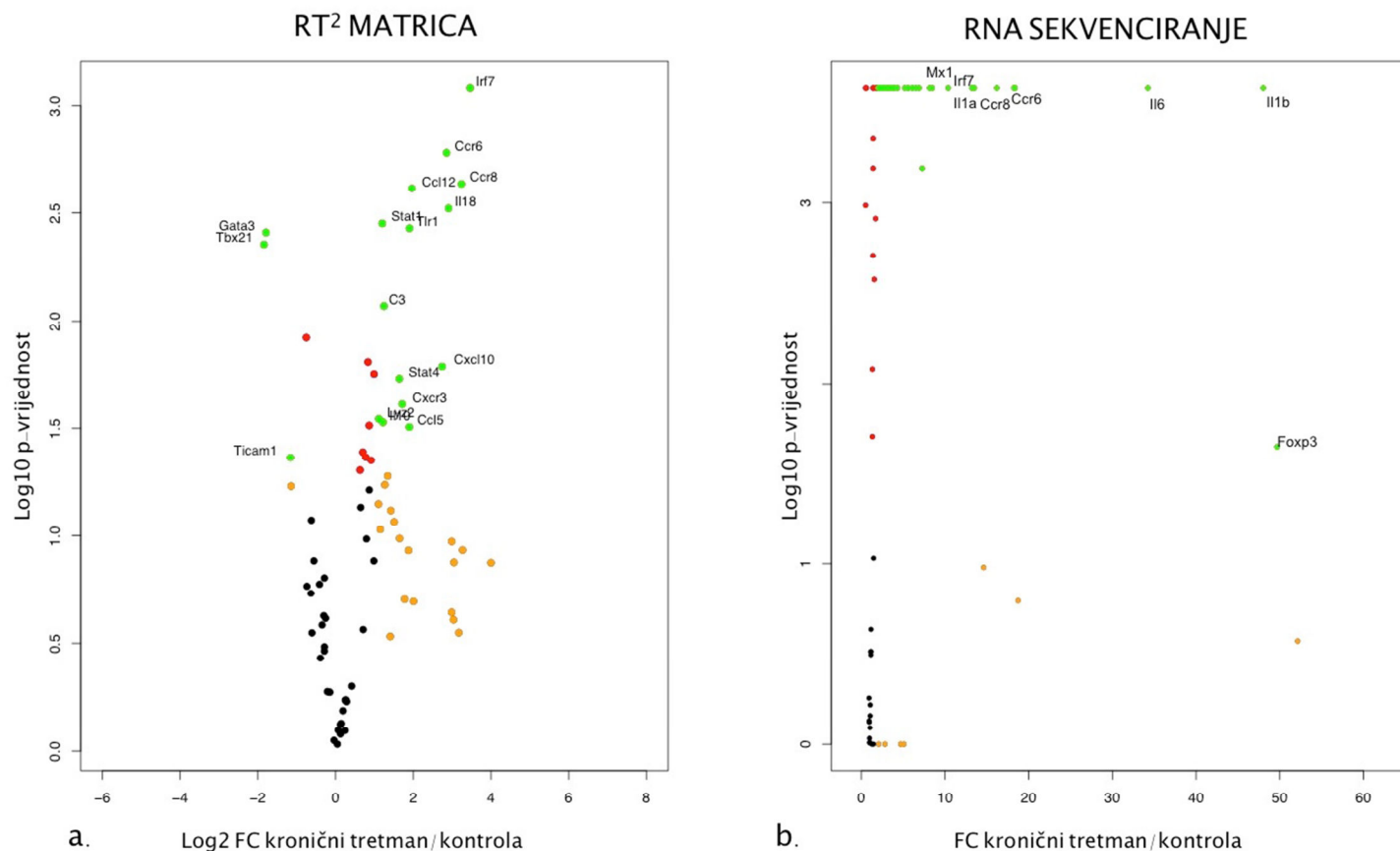


**Slika 15. Diferencijalni izražaj proteina akutnog odgovora.** Prikaz gena s povećanim izražajem u akutnom modelu. Razlika u izražaju navedenih gena između WT i IL6 KO miša nije statistički značajna.



**Slika 16. Patohistološka analiza početnih faza razvoja tumora.** Mišji mjehur nakon dva tjedna tretmana kemikalijom BBN. Upalni infiltrat prisutan je u epitelu mokraćnog mjehura (**a**) te u lamini propriji (**b**) kod wt i kod IL6 KO miševa. Histološki rezovi bojani su hematoksilinom i eozinom (H&E).

U tumorskom (kroničnom) modelu smo proveli usporednu analizu izražaja upalnih čimbenika na razini apsolutne i relativne kvantifikacije izražaja koristeći qPCR matrične ploče i rezultate sekvenciranja RNA. Ustanovili smo visok porast izražaja općenitih promotora upale kao što su citokini  $Il1\alpha$  i  $Il1\beta$ ,  $Il18$  te  $IL6$  koji je bio od osobitog značaja za daljnji tijek istraživanja. Izražaj gena za kemokine  $Ccr6$  i  $Ccr8$  je također izrazito porastao u mokraćnim mjehurima kronično tretiranih miševa. Unatoč nedetektabilnim količinama tipa I interferona, bilježimo porast izražaja njihovog regulatornog faktora  $Irf7$  kao i  $Mx$  gena koji je induciran djelovanjem interferona iz skupine I i II (Slika 17a i b). U tablici 6 nalazi se prikaz izražaja svih analiziranih gena usporedno između relativne kvantifikacije qPCR-om i RNA sekvenciranjem, a slika 18 prikazuje omjer promjene i varijabilnost izražaja svake pojedinačne eksperimentalne skupine u akutnom i kroničnom tretmanu.

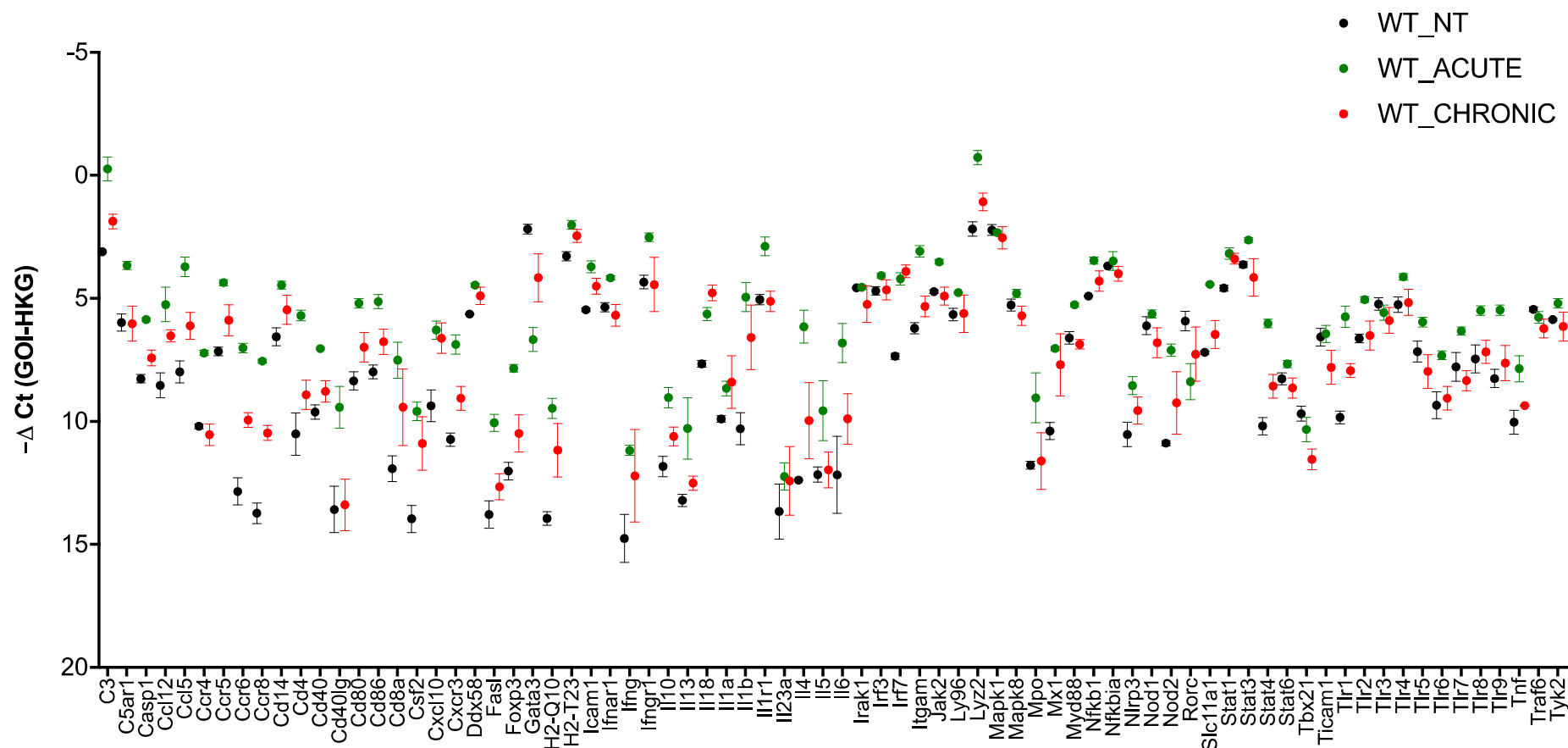


**Slika 17. Odnos omjera promjene (engl. *fold change* (FC)) i značajnosti promjene u tumorskom modelu u odnosu na kontrolne–netretirane mokraćne mjehure miševa.** (a) prikaz rezultata dobivenih matricnim pločama, (b) rezultati sekvenciranja RNA. U grafičkom prikazu zelenom bojom su označeni te imenovani geni sa statistički značajnom promjenom izražaja koja prelazi biološki prag  $\text{FC} > 2$ . Crvena boja označava  $\text{FC} < 2$ , žutom bojom označeni su geni s  $\text{FC} > 2$  ali  $P > 0.05$ , a crna boja bilježi  $\text{FC} < 2$  i  $P > 0.05$ .

**Tablica 6. Usporedne vrijednosti omjera izražaja (FC, engl. *fold change*) imunoloških biljega u eksperimentima qPCR-om te RNA sekvenciranjem. Oznaka UP odnosi se na izražaj gena koji nije detektiran u netretiranom mješuru, a zabilježen je u kroničnom tretmanu. ND - nedeterminiran.**

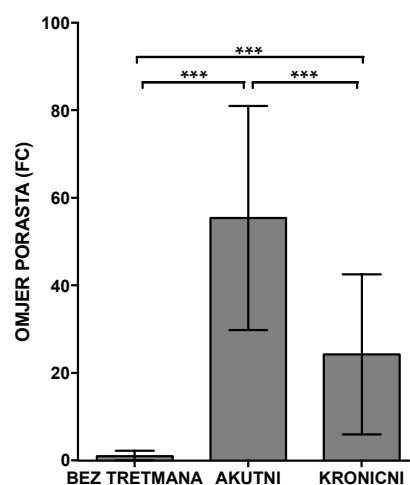
WT KRONIČNI RT2 ploče			WT KRONIČNI RNA Seq		
Gene	log2 FC	pvalue	Gene	log2 FC	pvalue
Il1b	3,999505	0,133572	Il1b	5,585728	0,00023
Irf7	3,462628	0,000829	Irf7	3,723181	0,00023
Csf2	3,269367	0,116766	Csf2	3,870222	0,105054
Ccr8	3,241358	0,002315	Ccr8	4,0164	0,00023
Ifng	3,170648	0,282766	Ifng	5,704029	0,269079
H2-Q10	3,047981	0,133085	H2-Q10	2,862376	0,000642
Cd8a	3,034922	0,24647	Cd8a	3,375099	0,00023
Mx1	2,989955	0,10663	Mx1	4,199415	0,00023
Il4	2,986936	0,227821	Il4	UP	N/D
Il18	2,907237	0,003018	Il18	2,788418	0,00023
Ccr6	2,855841	0,001664	Ccr6	4,18753	0,00023
Cxcl10	2,740516	0,016268	Cxcl10	4,227004	0,161389
Nod2	2,006055	0,202827	Nod2	1,780277	0,00023
Ccl12	1,963882	0,002431	Ccl12	1,985132	0,00023
Tlr1	1,903029	0,003732	Tlr1	3,083328	0,00023
Ccl5	1,897541	0,031167	Ccl5	2,609296	0,00023
Il6	1,877046	0,117176	Il6	5,097636	0,00023
Il1a	1,777543	0,198041	Il1a	3,755628	0,00023
Cxcr3	1,714377	0,02443	Cxcr3	1,934725	0,00023
Foxp3	1,648284	0,10317	Foxp3	5,63434	0,02238
Stat4	1,642132	0,018502	Stat4	2,709738	0,00023
Cd4	1,50985	0,086024	Cd4	2,482291	0,00023
Cd80	1,423003	0,076204	Cd80	2,488199	0,00023
Il23a	1,407696	0,294361	Il23a	UP	N/D
Ccr5	1,341508	0,052782	Ccr5	2,113084	0,00023
Cd86	1,268294	0,057981	Cd86	1,231018	0,00023
C3	1,244952	0,008516	C3	1,285354	0,00023
Il10	1,219557	0,029623	Il10	3,02805	0,00023
Stat1	1,200861	0,003546	Stat1	1,666626	0,00023
Cd14	1,151403	0,093631	Cd14	1,355472	0,00023
Lyz2	1,113684	0,028586	Lyz2	1,093557	0,00023
FasI	1,105684	0,071095	FasI	2,6229	0,00023
Icam1	0,989347	0,017611	Icam1	1,249065	0,00023
Nlrp3	0,984439	0,131023	Nlrp3	1,873834	0,00023
Ilgam	0,914411	0,044502	Ilgam	1,512248	0,00023
Cd40	0,866093	0,061254	Cd40	0,768329	0,001224
Casp1	0,865018	0,030671	Casp1	1,492876	0,00023
H2-T23	0,833381	0,015505	H2-T23	0,489683	0,000642
Slc11a1	0,793611	0,103742	Slc11a1	1,189304	0,00023
Ddx58	0,775436	0,0431	Ddx58	1,168336	0,00023
Tlr9	0,709009	0,27349	Tlr9	1,849552	0,00023
Il13	0,701448	0,040722	Il13	UP	N/D
Nfkb1	0,645363	0,07369	Nfkb1	0,560422	0,00023
Tnf	0,627722	0,049571	Tnf	2,374006	0,00023
Mpo	0,413592	0,500444	Mpo	UP	N/D
Il5	0,28373	0,588536	Il5	UP	N/D
Tlr6	0,266166	0,578239	Tlr6	1,528795	0,00023
Tlr8	0,251431	0,579801	Tlr8	1,75607	0,00023
Cd40lg	0,241629	0,801584	Cd40lg	UP	N/D
Tlr2	0,191376	0,647903	Tlr2	0,411102	0,019645
Ly96	0,145886	0,740988	Ly96	0,631254	0,002658
Ifngr1	0,128224	0,832301	Ifngr1	0,913013	0,00023
Tlr4	0,127259	0,749784	Tlr4	0,798488	0,00023
Irf3	0,069541	0,79802	Irf3	-0,11015	0,555321
C5ar1	0,047191	0,928009	C5ar1	0,207347	0,307135
Il1r1	-0,0385	0,890654	Il1r1	0,492924	0,000441
Jak2	-0,1471	0,533298	Jak2	0,172392	0,309001
Tyk2	-0,21057	0,529908	Tyk2	0,077963	0,693325
Myd88	-0,25649	0,24254	Myd88	0,477279	0,001959
Mapk1	-0,28732	0,328794	Mapk1	-0,00721	0,978319
Nfkbia	-0,28759	0,15713	Nfkbia	0,55353	0,0934
Ifnar1	-0,28887	0,343963	Ifnar1	0,470708	0,00023
Ccr4	-0,30259	0,236053	Ccr4	1,499327	0,00023
Stat6	-0,34648	0,260436	Stat6	0,004746	0,985378
Stat3	-0,39129	0,371396	Stat3	0,097231	0,605278
Mapk8	-0,41371	0,168097	Mapk8	0,194044	0,320778
Irak1	-0,55839	0,130975	Irak1	-0,0655	0,751868
Tlr7	-0,60857	0,283257	Tlr7	1,002479	0,00023
Tlr3	-0,62369	0,084578	Tlr3	0,40543	0,008293
Nod1	-0,63588	0,185668	Nod1	0,209827	0,232082
Tlr5	-0,73887	0,171699	Tlr5	-0,0942	0,738989
Traf6	-0,75432	0,011962	Traf6	0,053436	0,808986
Rorc	-1,1445	0,058817	Rorc	-0,99283	0,00023
Ticam1	-1,15978	0,043229	Ticam1	-0,02408	0,928116
Gata3	-1,79021	0,003904	Gata3	-0,72618	0,00023
Tbx21	-1,84145	0,004436	Tbx21	-0,96691	0,001035





**Slika 18.** Normaliziran izražaj eksperimentalnih skupina za pojedinačne imunološke biljege koji su testirani. Izražaj gena (GOI, engl. gene of interest) normaliziran je prema genu s konstitutivno aktivnim promotorom tzv. “housekeeping gen” (HKG).

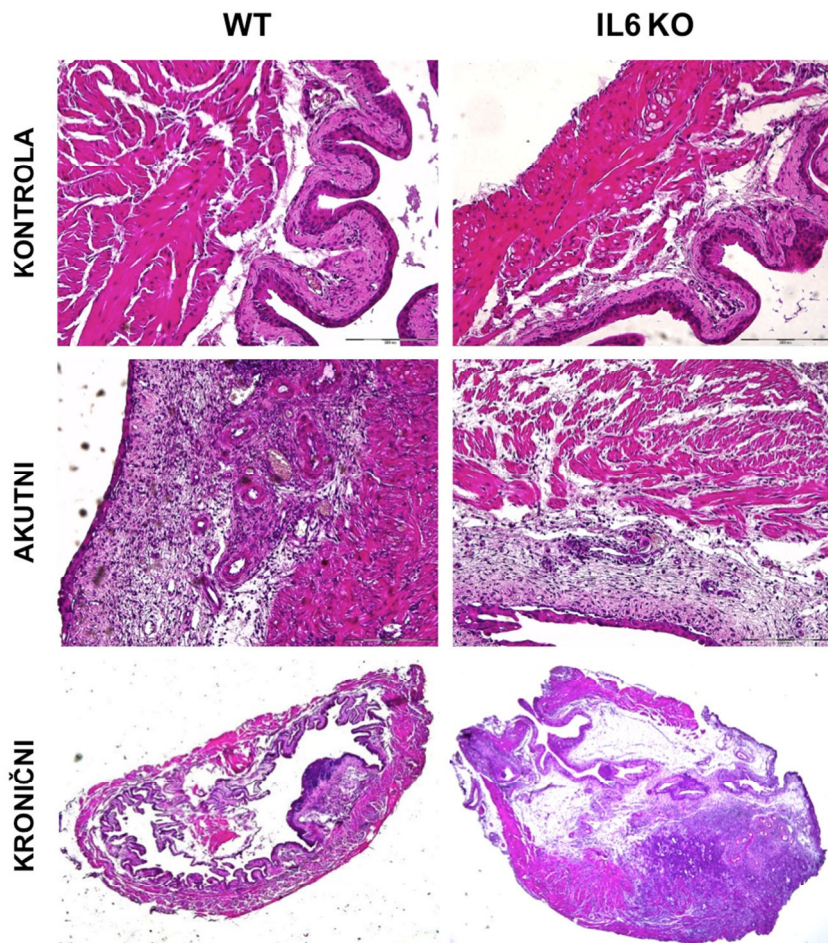
Jedan od gena s najvećim porastom izražaja i u akutnom i u kroničnom modelu jest IL6. Porast izražaja upalnog citokina IL6 dodatno smo potvrdili testirajući zasebno izražaj IL6 u mjehurima svakog pojedinačnog od 10 miševa iz eksperimentalnih skupina te smo utvrdili da u akutnom upalnom odgovoru dolazi do porasta izražaja od 36 puta ( $P < 0.001$ ), dok je u tumorskom modelu njegov izražaj u padu, međutim, još je uvijek 17 puta ( $P < 0.001$ ) viši nego u zdravim mokraćnim mjehurima netretiranih miševa (Slika 19) pa smo pristupili detaljnoj analizi utjecaja IL6 na razvoj tumora mokraćnog mjehura kod miša i čovjeka.



**Slika 19. Izražaj IL6 nakon akutnog i kroničnog tretmana BBN-om.** Izražaj IL6 značajno raste u akutnom modelu, njegova razina pada u mokraćnom mjehuru miševa koji su razvili tumore, ali je unatoč tome značajno višeg izražaja u odnosu na mokraćni mjehur netretiranih miševa.

### **4.3 Patohistološki fenotip tumora mokraćnog mjehura wt i IL6 KO miševa**

Utvdili smo da je Il6 jedan od gena s najvećim porastom izražaja u predtumorskom stadiju (akutni model) te da njegov izražaj slabi s progresijom tumora (kronični model), ali je također znatno jače izražen u mokraćnom mjehuru miša zahvaćenim tumorom u odnosu na zdravi mokraćni mjehur miševa koji nisu bili tretirani BBN-om (slika 19). Zanimalo nas je li uloga ovog proupalnog citokina prilikom razvoja tumora zaštitna ili, pak, Il6 pridonosi lošijoj tumorskoj slici. U tu svrhu smo kemikalijom BBN inducirali tumore kod miševa koji nose deleciju mutaciju za citokin IL6 (IL6 KO) te smo usporedili fenotip tumora IL6 KO miševa s fenotipom tumora kod divljeg tipa (WT) tretiranih miša. Tumore izazvane karcinogenom BBN kod IL6 KO i WT miševa smo analizirali patohistološki te smo utvdili da su tumori IL6 KO miševa znatno više infiltrirani plazma stanicama koje sadrže dosta Russelovih tjelešaca u usporedbi s tumorima WT miša. Upalni infiltrat s plazma stanicama prisutan je u svim slojevima mokraćnog mjehura, a plazma stanice primjetne su već u mjehurima IL6 KO miševa akutnog tretmana (Slika 15). Za tumore IL6 KO miševa karakteristična je i pojava mikroapcesa u epitelnom i subepitelnom sloju. Važno je istaknuti kako su u 4/12 mokraćnih mjehura IL6 KO miševa pronađeni papilarni tumori koji se kod WT miša ne pronalaze. Na slici 19 prikazani su reprezentativni patohistološke slike mokraćnog mjehura WT i IL6 KO miševa podvrgnutih akutnom i kroničnom tretmanu BBN-om.



**Slika 20. Reprezentativni histološki prerezi mokraćnog mjehura miševa podvrgnutih akutnom i kroničnom tretmanu s kemikalijom BBN. Bojenje s hematoksilinom i eozinom (H&E).**

Tablica 7 prikazuje sveobuhvatnu patohistološku analizu tumora oba ispitana soja u akutnom modelu, a tablica 8 prikazuje patohistološke osobine mokraćnih mjehura miševa podvrgnutih kroničnom tretmanu. Na slici 20 prikazani su reprezentativni patohistološki preparati mokraćnog mjehura WT i IL6 KO miševa podvrgnutih akutnom i kroničnom tretmanu BBN-om.

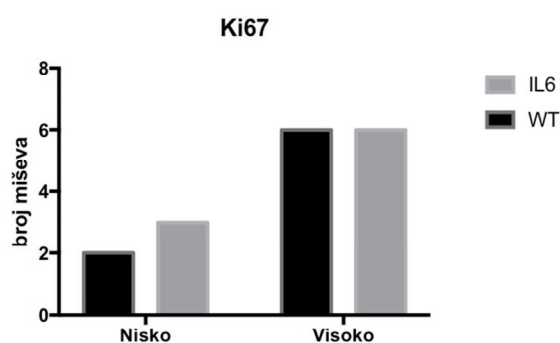
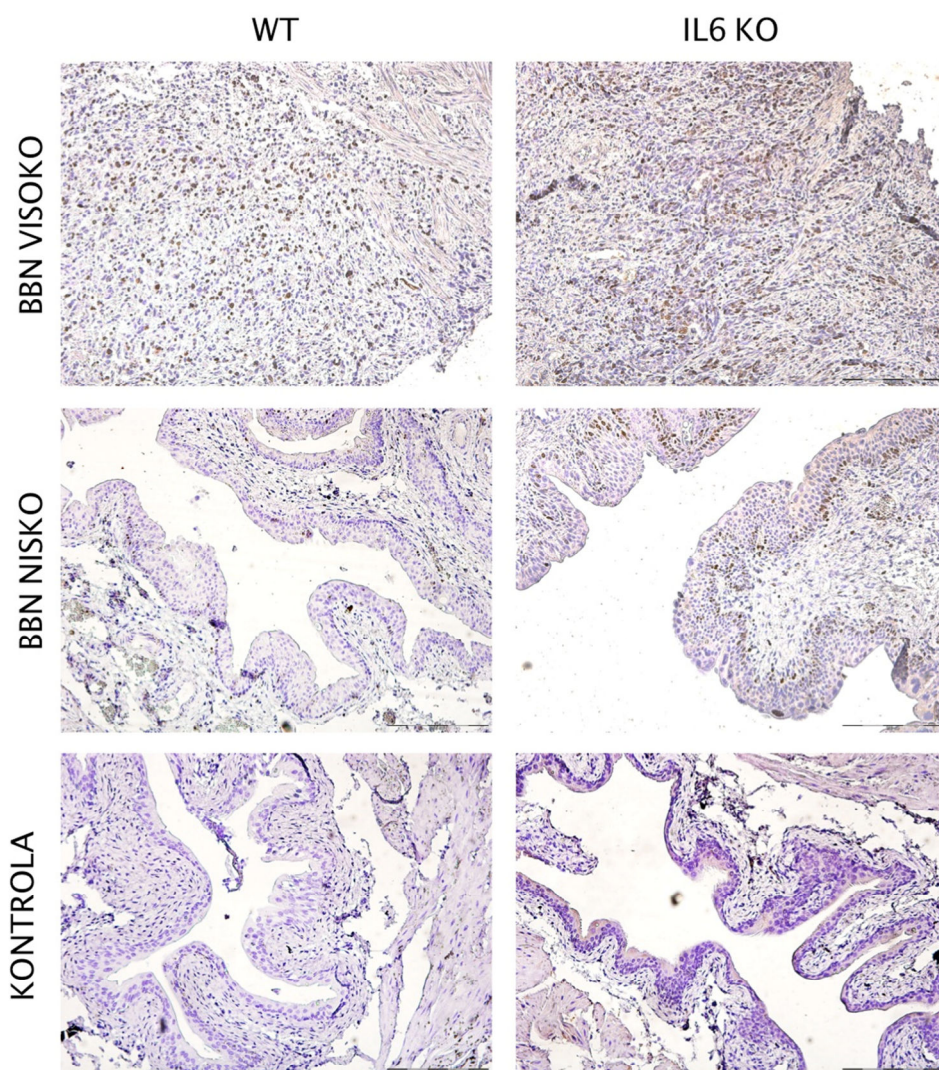
**Tablica 7. Patohistološke osobine mokraćnih mjehura wt i IL6 KO miševa nakon akutnog tretmana.** Kratice : mix – miješana upala, mn – mononuklearna, pmn – pretežno mononuklearna, pg – pretežno granulocitna, pc – plazma stanice, ly – limfociti, ma – makrofazi, PV – perivaskularno, IS – intersticijalno, m.apsc – mikroapscesi, rb – Russellova tjelesca, sq – plocasta (skvamozna) diferencijacija, lp – lamina propria, SE – subepitelno, E – epitelno, M – mišić, S – seroza, LP – lamina propria, Inv – invazija, Microinv. – mikroinvazija, osk – oskudna, LG – low grade, HG – high grade, Pk – pokoji, Sf – siderofag Gr – granulociti dezmozplazija – fibroza, mikrov.prolif. – mikrovilna proliferacija

AKUTNI 0.05% BBN																		
Uzorak	Model	Epitel (% CIS)	Inflammation												Dezmoplazija	Clefs	Edem	Proliferacija mikrovila
			Epitel		Subepitel		Lamina proprija				Mišić		Seroza					
			Stupanj	Količina & tip imunol. stanica	Stupanj	Količina & tip imunol. stanica	Perivaskularno (PV)		Intersticijski (IS)		Stupanj	Količina & tip imunol. stanica	Stupanj	Količina & tip imunol. stanica				
							Stupanj	Količina & tip imunol. stanica	Stupanj	Količina & tip imunol. stanica								
2	WT akutni (0.05%BBN)	>50%	X	X	1	osk	2	mix, pmn, ly, gr	1		1	osk, mix	X	X	1	1	1	1
3	WT akutni (0.05%BBN)	>50%	1	osk mn	1	osk mn	2	mix-pg, gr, ly	0-1		2	osk mix-pg	2	osk mix-pg	1	0	1	1
5	WT akutni (0.05%BBN)	>50%	2	mix	2	mix	2	mix-pg, gr, ly	1	mix	2	mix-pg	2	mix-pg	1	1	1	2
6	WT akutni (0.05%BBN)	<50%	X	X	1		2	mix-pmn	2	mix	1	gr	1	gr	1	2	1	1
7	WT akutni (0.05%BBN)	<50%	X	X	0-1		1	mn	1		0-1		X	X	1	2	1	1
8	WT akutni (0.05%BBN)	>50%	2-3	gr m.apsc	2-3	gr m.apsc	2-3	mix-pg	2	mix	2-3	mix	2-3	mix	2	2	2	2
9	WT akutni (0.05%BBN)	>50%	X	X	1	mn	1	mix-pmn	1	mix	0-1	pok gr	X	X	1	1	1	1
10	WT akutni (0.05%BBN)	>50%	1	gr	1	mn	2	mix-pmn	1		2	gr	2	gr	2	2	2	2
11	WT akutni (0.05%BBN)	>50%	X	X	1	mn	1	mix-pmn	1		1	gr	X	X	0	1	1	0
1	IL6 KO akutni (0.05%BBN)	<50	X	X	1	osk, mn	1	mix, pmn	0-1		1	mix	1	mix	1	1	1	1
2	IL6 KO akutni (0.05%BBN)	>50	2	gr	2	gr	2	mix-pg	1-2	mix, gr, ly, pc	2	mix-pg	2	mix-pg	2	2	2	2
3	IL6 KO akutni (0.05%BBN)	<50	X	X	1	mn	1	mix-pmn	0-1		1	mix s-pc	1	mix s-pc	1	2	1	1
4	IL6 KO akutni (0.05%BBN)	w/o epith.	X	X	X	X	2	mix-pmn	0-1	mix	1	mix	1	mix	X	X	1	X
5	IL6 KO akutni (0.05%BBN)	<50	1	mix	2	mix	2	mix-pg	1-2	mix	1	gr	1	gr	1	2	2	1
6	IL6 KO akutni (0.05%BBN)	<50	X	X	1	mn	2	mix-pmn	2	mix-pmn	1	mix	1	mix	2	1	2	2
7	IL6 KO akutni (0.05%BBN)	>50	X	X	1	mn	2	mix-pmn	1		1	mix	1	mix	1	1	2	1
8	IL6 KO akutni (0.05%BBN)	<50	X	X	1	mn	1	mix-pmn	1	mix-pmn	X	gotovo ništa		gotovo ništa	2	1	2	2
9	IL6 KO akutni (0.05%BBN)	>50	X	X	0-1	mn	1	mix-pmn	1	mix-pmn	0	0	0	0	2	2	2	2
10	IL6 KO akutni (0.05%BBN)	>50	X	X	1	mn	1	mix-pmn	1	mix-pmn	0	0	0	0	2	2	2	2
11	IL6 KO akutni (0.05%BBN)	>50	X	X	1	pok. gr	1	mix-pmn	1	mix-pmmn	X	X	1	gr	2	2	2	2
12	IL6 KO akutni (0.05%BBN)	>50 Invazija	X	X	1		2	mix-pg	2	mix-pg	1	mix	X	X	1	1	1	0

**Tablica 8. Patohistološke osobine mokraćnih mjehura wt i IL6 KO miševa nakon kroničnog tretmana.** Kratice : mix – miješana upala, mn – mononuklearna, pmn – pretežno mononuklearna, pg – pretežno granulocitna, pc – plazma stanice, ly – limfociti, ma – makrofazi, PV – perivaskularno, IS – intersticijalno, m.apsc – mikroapscesi, rb – Russellova tjelesca, sq – plocasta (skvamozna) diferencijacija, lp – lamina propria,, SE – subepitelno, E – epitelno, M – mišić, S – seroza, LP – lamina propria, Inv – invazija, Microinv. – mikroinvazija, osk – oskudna, LG – low grade, HG – high grade, Pk – pokoji, Sf – siderofag Gr – granulociti dezmozplazija – fibroza, mikrov.prolif. – mikrovilna proliferacija

Uzorak	Model	KRONIČNI 0.05% BBN																Dezmoplazija	Edem
		Epitel					Inflammation												
		Invazija			CIS	Papilarni Karcinom	Tumor		Lamina propria		Epitel		Mišić		Seroza				
		Gradus	Cilije	Uključeno tkivo			Stupanj	Epitel (E), subepitel (SE), zastupljene stanice	Stupanj	Stanice	Stupanj	Epithelium (E), subepithelium (SE), present cells	Stupanj	Količina i tip imunol. Stanica	Stupanj	Količina i tip imunol. Stanica			
1	WT chronic (0.05%)	HG		l. propria, sarcomatoid	osk	X	1	mn	1	PV, mix, pk sf	0-1	SE mn	1	mn	1	mn	1	1	
2	WT chronic (0.05%)	HG		l. propria	osk, sq	X	0-1	mix	1	SE mix	1	SE mix	no muscle				1	1	
3	WT chronic (0.05%)	HG		l. propria	osk, sq	X	1	mix-pmn, E-pk gr	1	mn, ly, pc	0-1	SE	1	mn-pc	X	X		1	
4	WT chronic (0.05%)	X		X	sq	X	1	mix-pg, E	1	mn	X	X	1	mn, pk pc	1	mn, pk pc	X	0-1	
5	WT chronic (0.05%)	HG	+	l. propria	sq	X	1	E gr, Str-1 mn	1	mn	0-1		1	mn	X	X	1	0-1	
6	WT chronic (0.05%)	X		X	sq	X	1	SE mix-pmn	1	mn	X	X	0-1		0-1		1	0-1	
7	WT chronic (0.05%)	X		X	sq	X	1	SE mn	1	mix-pmn	X	X	0-1	mn	0-1	mn	0-1	1	
8	WT chronic (0.05%)	?		microinvasion	sq	X	1	mix	1	mix-pg, gr, pc	0-1		X	X	X	X	X	1	
9	WT chronic (0.05%)	?		microinvasion	+	X	0-1	SE mn	2	mix-pmn, pc	0-1		2	mn-pc	X	X	X	0-1	
10	WT chronic (0.05%)	?		microinvasion	sq	X	1-2	mix-pmn	1-2	mix-pmn	0-1	E pk gr	1	mn	X	X	1		
11	WT chronic (0.05%)	HG		l. propria	+	X	0-1	mn	1	mn	X	X	1	mn	X	X	0-1	1	
12	WT chronic (0.05%)	HG		l. propria, muscle	X	X	2-3	mix-pg, gr, pc	1	mn	0-1	SE mn	X	X	X	X	1-2	2	
1	IL6 KO chronic (0.05%)	HG	+	l. propria	sq	X	1	mix-pg, E-gr	0-1	mn	1	E-gr	1-2	mn-pc	X	X	X	1	
2	IL6 KO chronic (0.05%)	HG		microcyst, l. propria + muscle	osk	X	1	mix, E-gr	3	mn, pc!!!	X	X	3	mn, pc!!	3	mn, pc!! Calcification	X	0-1	
3	IL6 KO chronic (0.05%)	X		X	sq	LG	0-1	SE pk gr	1	mn	X	X	X	X	X	X	X	0-1	
4	IL6 KO chronic (0.05%)	?		l. propria	+	LG	1	osk mix, E-pk gr	2	mix-pg, gr, pc!!	X	X	1	?	X	X	1	1	
5	IL6 KO chronic (0.05%)	?		microinvasion	sq	X	0-1	SE, mn	0-1	mn	X	X	0-1	?	0-1	?	X	0-1	
6	IL6 KO chronic (0.05%)	HG		l. propria, muscle	sq	X	2	mix-pg, microabscess, pk pc	1	mix	X	X	1	mix-pg, gr, pc	1	mix-pg, gr, pc	1	1-2	
7	IL6 KO chronic (0.05%)	HG		l. propria	+	HG	2-3	mix-pg, gr, pc!, E-gr, abscess	1	mn	X	X	2	mix-pmn, pc!, gr	2	mix-pmn, pc!, gr	1	1	
8	IL6 KO chronic (0.05%)	HG		l. propria	+	LG	2	mix-pg, gr, pc, E-gr	0-1	mix-pmn, pc!!	X	X	1-2	mn, pc	X	X	1	1-2	
9	IL6 KO chronic (0.05%)	HG		l. propria, muscle	osk	X	2-3	mix-pg, microabscess, pc!	1	mn, pc!!	X	X	2	mn, ly, pc	2	mn, ly, pc	1	2	
10	IL6 KO chronic (0.05%)	X	+	X	focal	X	X	X	1	mn	X	X	X	X	X	X	X	X	
11	IL6 KO chronic (0.05%)	HG		l. propria	sq	X	1	mix-pmn, E-pk gr	1	mn	X	X	1	mn	X	X	0-1	1-2	

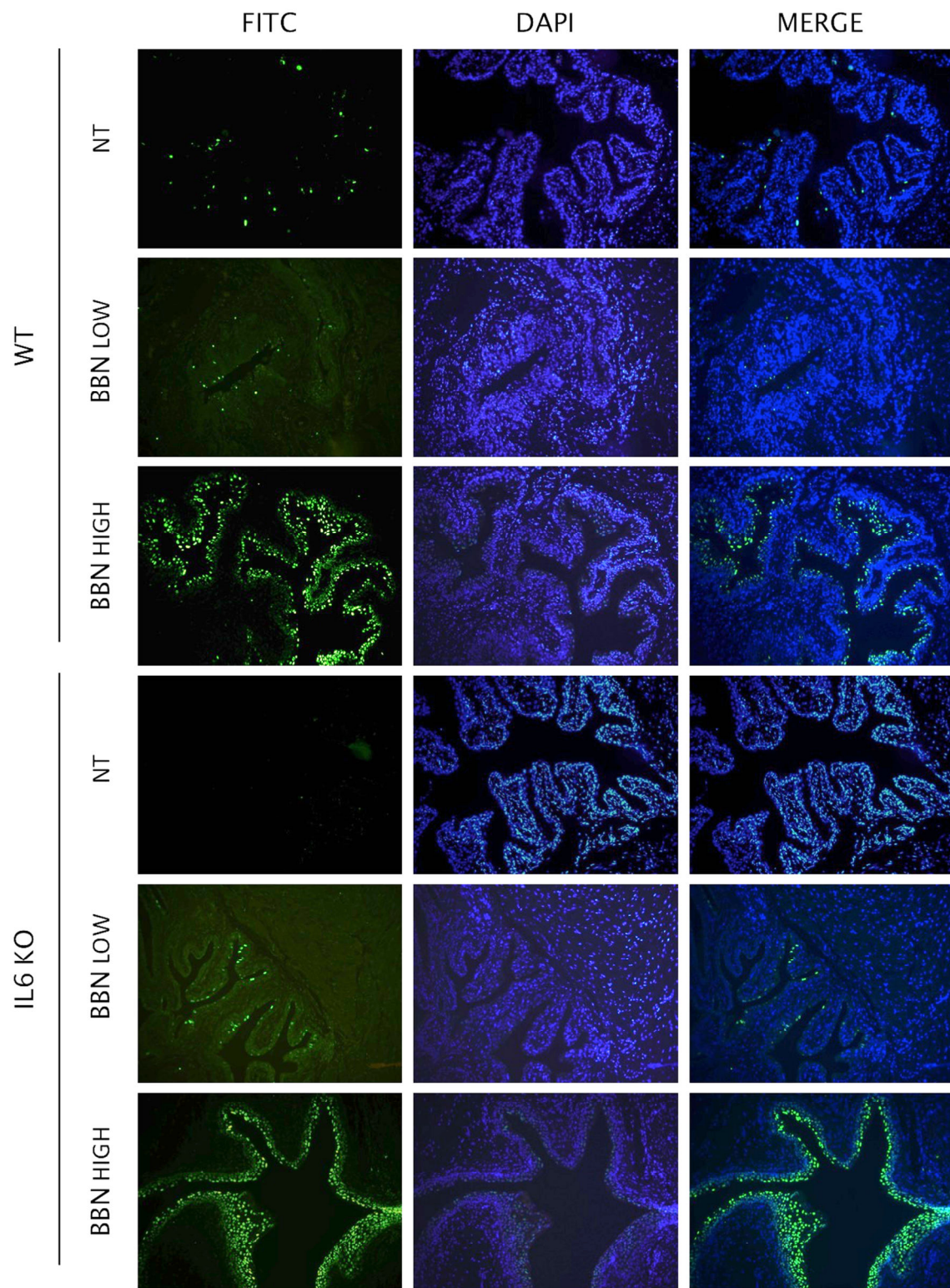
Koristeći specifično imunohistokemijsko bojenje za proliferacijski biljeg Ki67 istražili smo proliferacijsku stopu tumora u WT i IL6 KO miševa te smo utvrdili da nema značajnih razlika u proliferacijskim osobinama tumora između dva eksperimentalna soja. U obje eksperimentalne skupine pronašli smo visokogradusne i niskogradusne tumore čija je stopa zastupljenosti bila podjednaka. U WT grupi miševa 2/8 tumora imalo je slabo nuklearno bojenje za Ki67 proliferacijski biljeg, a ostalih šest jako. Vrlo slično, kod IL6 KO miševa, 3/9 tumora bilo je niske proliferacijske razine, a preostalih šest visoko (Slika 21). Kod tumora niske proliferacijske razine, bojenje Ki67 bilo je najbolje uočljivo u epitelnom i subepitelnom sloju, a kod tumora visoke proliferacijske razine kroz cijelu stjenku mjehura.



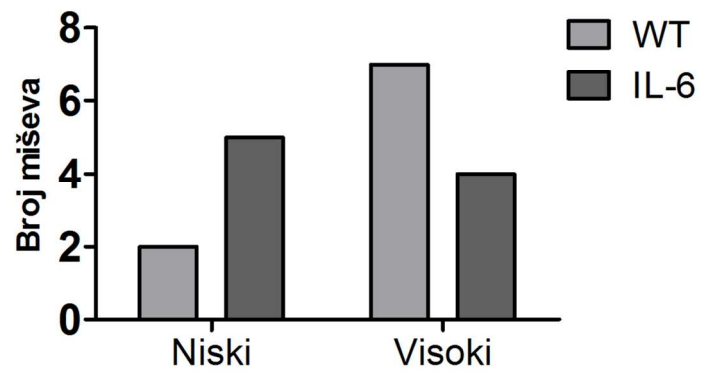
**Slika 21. Stupanj proliferacije u tumorima IL6 KO i WT miševima.** Imunohistokemijsko bojenje za jezgri proliferacijski biljeg Ki67. Grafički prikaz za sve tretirane životinje. Oznake VISOKO/NISKO odnose se na stupanj proliferacije.



S namjerom da utvrdimo razinu programirane stanične smrti tj. apoptoze tumorske preparate oba soja smo fluorescencijski obilježili za detekciju DNA fragmentacije upotrebom TUNEL tehnike. Utvrdili smo da je pojava apoptoze ograničena samo na epitelni sloj mokraćnog mjehura. Unutar obje eksperimentalne grupe razlikovale su se podskupina tumora sa slabo izraženom apoptozom i podskupina s dobro izraženom apoptozom (Slika 22). Zastupljenost ove dvije podskupine se razlikovala između sojeva te su tumori IL6 KO miševa u manjem broju prikazivali visoko apoptotičan fenotip (Slika 23).



**Slika 22. Apoptoza u tumorima mokraćnog mjehura WT i IL6 KO miševa.** Razlikuju se dvije podskupine tumora koje imaju visoku pojavnu apoptozu u epitelu mokraćnog mjehura i one s niskom pojavom apoptoze.

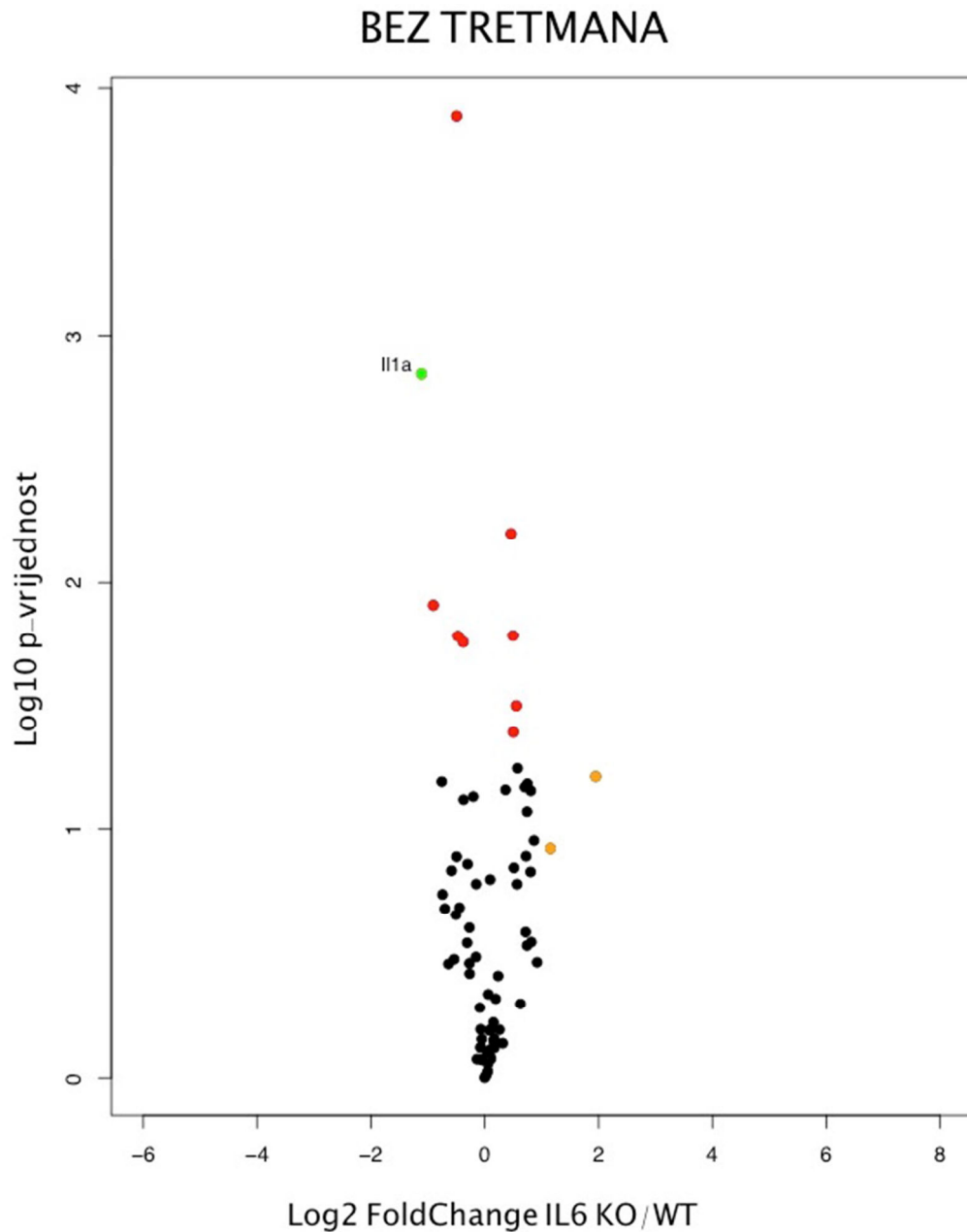


**Slika 23. Stupanj apoptoze u zloćudnim tumorima mokraćnog mjehura WT i IL6 KO miševa.** Zastupljenost visokog i niskog apoptotičnog fenotipa u mokraćnom mjehuru WT i IL6 KO miša kronično tretiranih kemikalijom BBN.

#### **4.4 Diferencijalni izražaj gena prilikom tretmana kemikalijom BBN u WT i IL6 KO miševima**

IL6 KO miševima smo također podvrgnuli akutnom i kroničnom tretmanu te smo testirali izražaj najvažnijih imunoloških biljega u mokraćnom mjehuru upotrebom prethodno opisane qPCR matricne ploče.

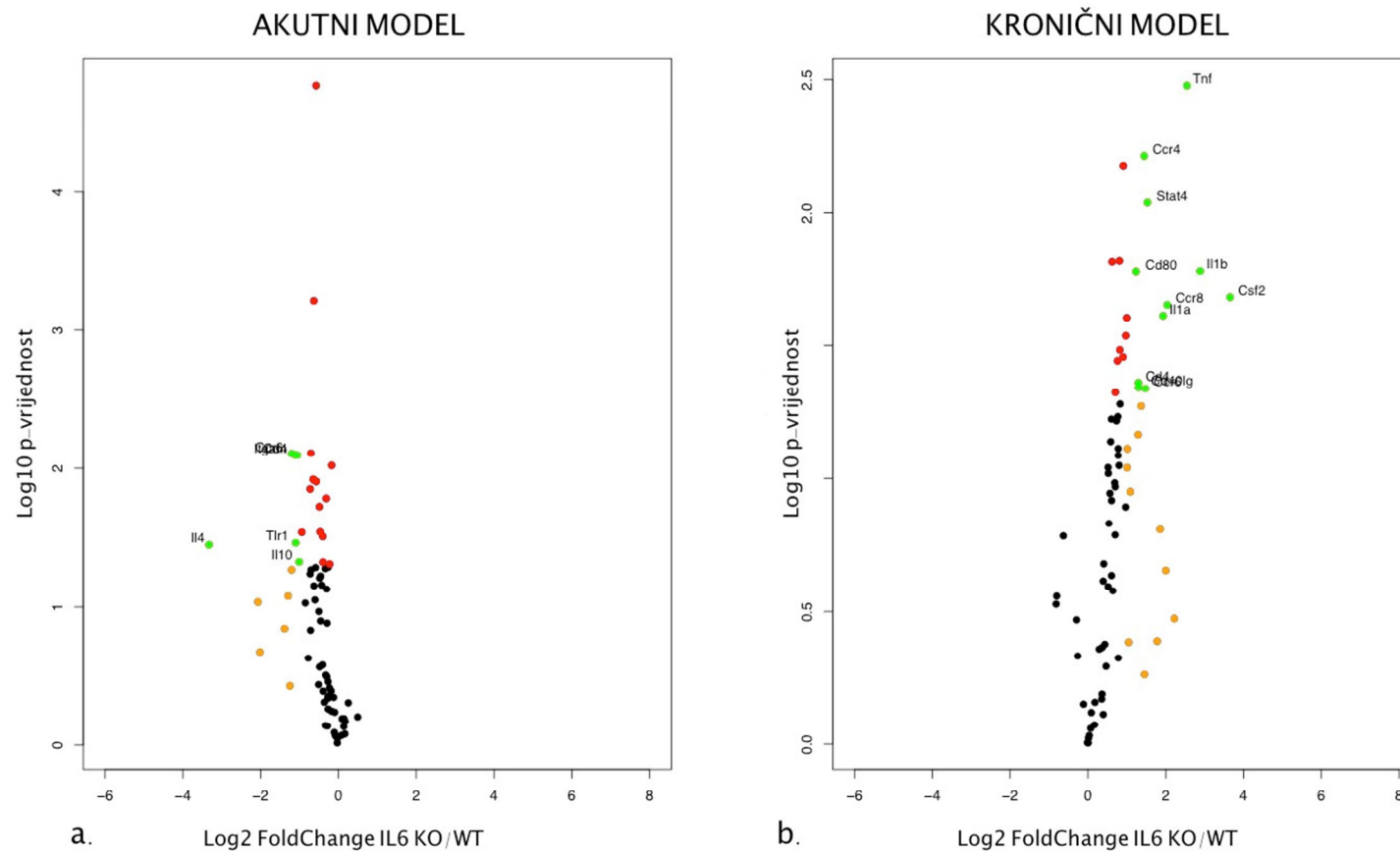
U svrhu razumijevanja posljedičnih promjena izražaja gena koje se događaju tijekom indukcije i progresije tumora izazvanih BBN-om, prvotno smo usporedili izražaj upalnih biljega u mokraćnom mjehuru netretiranih kontrolnih miševa oba soja (normalni/WT i miševi bez interleukina 6/IL6 KO). Analiza izražaja gena pokazala je da su mokraćni mjehuri WT i IL6 KO miša vrlo sličnog profila izražaja imunoloških biljega. Jedina značajna razlika koja se uočava u usporedbi mokraćnih mjehura WT i IL6 KO miša jest smanjen izražaj interleukina 1 $\alpha$  (Il1a) u mokraćnom mjehuru IL6 KO miša (Slika 24).



**Slika 24. Razlika u izražaju imunoloških gena u tkivju mokraćnog mjehura IL6 KO i WT miševa.** Profil izražaja imunoloških biljega u mokraćnom mjehuru netretiranih IL6 KO miševa u odnosu na normalnog miša (WT). U grafičkom prikazu zelenom bojom su označeni te imenovani geni sa statistički značajnom promjenom izražaja koja prelazi biološki prag  $FC > 2$ ,  $P < 0.05$ ; crvena boja označava  $FC < 2$ ,  $P < 0.05$ ; žutom bojom označeni su geni s  $FC > 2$ ,  $P > 0.05$ ; crna boja bilježi  $FC < 2$ ,  $P > 0.05$ .

Analiza izražaja imunoloških biljega prilikom akutnog tretmana kemikalijom BBN pokazala je da kod miševa koji nemaju citokin IL6 postoji smanjen izražaj nekoliko ključnih gena koji reguliraju imunološki odgovor (Slika 25a). Najizraženiji je pad izražaja gena za interleukin 4 kojeg u najvećoj mjeri proizvode aktivirani pomagački T<sub>H</sub>2 limfociti, a primjetan je i ukupan pad izražaja njihovog CD4 koreceptora koji zajedno s TCR receptorima sudjeluje u komunikaciji limfocita T s antigen prezentirajućim stanicama (APC, eng. *antigen presenting cells*). Uz to je smanjen izražaj Ccr6 kemokinskog receptora karakterističnog za podvrste pomagačkih limfocita Treg i T<sub>H</sub>17, a primjetan je i smanjeni izražaj interleukina 10 (Il10) koji djeluje poticajno na razvoj T<sub>H</sub>2 pomagačkih limfocita. Osim smanjenog izražaja gena koji djeluju na imunološki odgovor T stanicama, nedostatak Il6 uzrokovao je i pad izražaja dijela integrinskog receptora Itgam (Cd11b) koji sudjeluje u adherenciji neutrofila i monocita na aktivirani epitel, kao i receptora za raspoznavanje mikrobnih molekula Tlr1.

Iako u akutnom odgovoru bilježimo smanjen profil izražaja imunoloških biljega, u kroničnom tumorskom modelu kod IL6 KO miša ne bilježimo pad izražaja niti jednog od ispitanih gena već isključivo povećanje izražaja gena koji imaju ulogu u regulaciji aktivnosti limfocita T (Slika 25b). U IL6 KO mišu značajno su povišeni opći upalni interleukini Il1a i Il1b te čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (Tnf). Povišen je izražaj kemokinskih receptora specifičnih za T<sub>H</sub>2 i Treg stanice, Ccr4 i Ccr8, kostimulatora za aktivaciju T limfocita Cd40lg, kao i Ccr6 kemokinskog receptora specifičnog za T<sub>H</sub>17 pomagačke T limfocite. Najviša promjena izražaja zabilježena je za faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (Csf2) koji je povišen u IL6 KO mišu u odnosu na WT. Uočeni diferencijalni profil izražaja ukazuje na pojačanu aktivaciju pomagačkih T limfocita u mokraćnim mjehurima IL6 KO miša zahvaćenim tumorima izazvanim BBN-om. Zbog varijabilnosti uzorka, porast izražaja interferona  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) nije se pokazao značajnim, međutim bilježimo značajan porast izražaja njegovog transkripcijskog čimbenika STAT4.

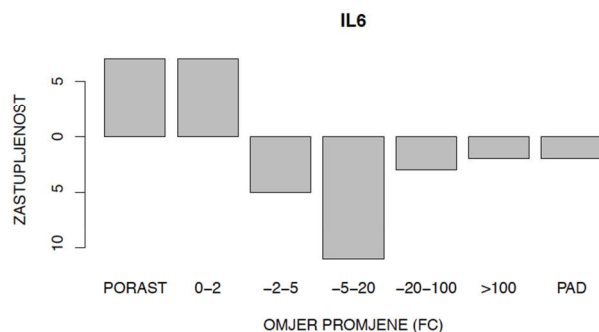


**Slika 25. Različiti izražaj imunoloških biljega u mokraćnom mjeheru IL6 KO miša u odnosu na WT miša nakon tretmana BBN-om.**(a) Diferencijalni izražaj nakon akutnog tretmana BBN-om, (b) Diferencijalni izražaj nakon kroničnog tretmana BBN-om. U grafičkom prikazu zelenom bojom su označeni te imenovani geni sa statistički značajnom promjenom izražaja koja prelazi biološki prag  $FC > 2$ . Crvena boja označava  $FC < -2$ , žutom bojom označeni su geni s  $FC > 2$  ali  $P > 0.05$ , a crna boja bilježi  $FC < 2$  i  $P > 0.05$ .

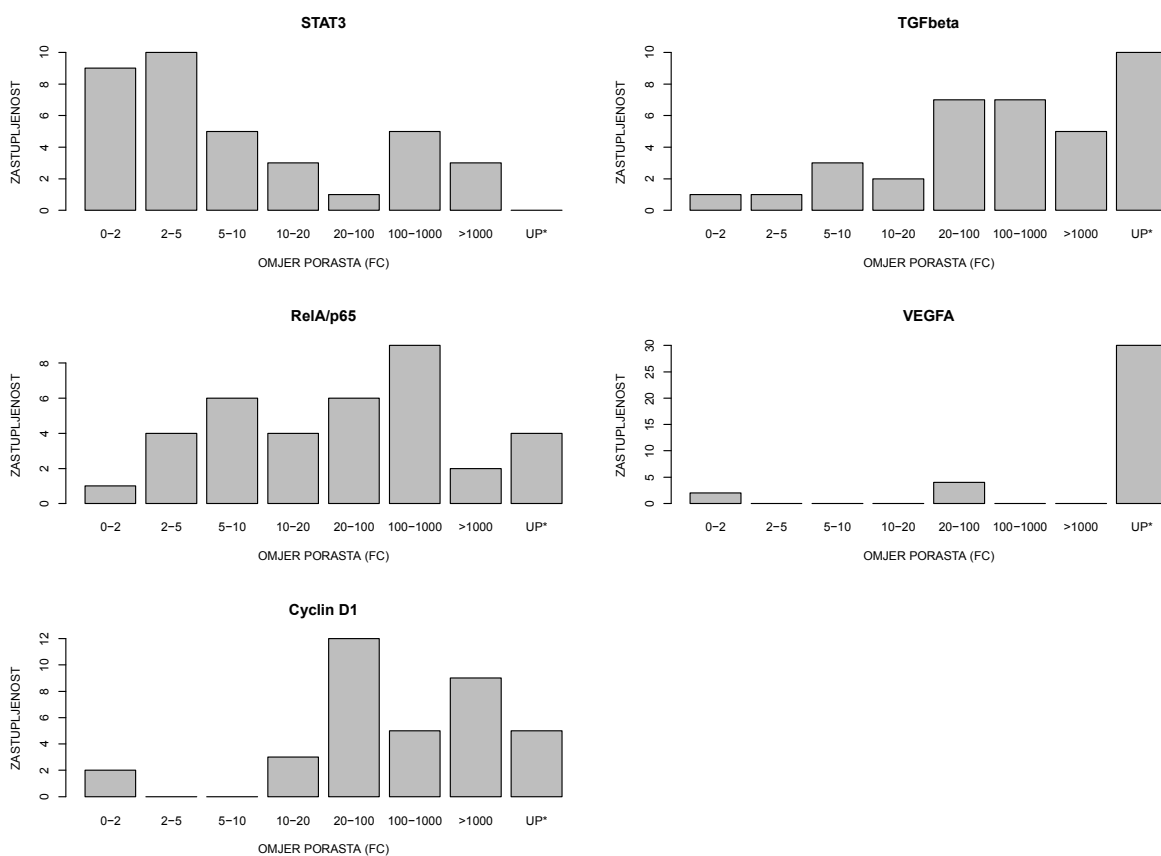
#### **4.5 Izražaj IL6, STAT3, RelA/p65, CCND1, TGFβ1 i VEGFA u tumorima mokraćnog mjehura kod čovjeka**

Metodom qPCR mjerili smo diferencijalni izražaj citokina IL6 te nizvodnih efektorskih proteina njegovog djelovanja; transkripcijskih faktora Stat3 i podjedinice NF-κB RelA/p65 proteina, faktora rasta TGFβ1 i VEGFA te ciklina D1 u tumorskom i pridruženom zdravom tkivu mokraćnog mjehura 36 pacijenata. Postavili smo biološki prag promjene izražaja od 2 puta kao značajnu promjenu u izražaju svakog od testiranih gena. Utvrdili smo da je razina izražaja IL6 smanjena u 23/36 tumorskih uzoraka pacijenata (Slika 26), a izražaj transkripcijskog faktora STAT3 povišen je u 27/36 pacijenata ( $P=0.002$ ), RelA/p65 te TGFβ povišeni su u 35/36 tumora ( $P<0.0001$ ), a ciklin D1 i VEGFA su povišeni u 34/35 tumora ( $P<0.0001$ ). Smanjen izražaj utvrđen je u 1/36 tumora za STAT3, RelA/p65 i TGFβ, a 2/36 tumora pokazala su smanjen izražaj ciklina D1. Niti jedan od tumora nije imao smanjen izražaj VEGFA faktora rasta. Distribucija omjera promjene za svaki od analiziranih gena sumarno je prikazana na slici 27. Ukoliko u zdravom tkivu sparenog uzorka nije zabilježen izražaj pojedinog gena, a u tumorskom tkivu je gen izražen, diferencijalni izražaj je prihvaćen kao značajno povećan. Preliminarnom statističkom analizom smo utvrdili da visina promjene značajno ne ovisi o gradusu ( $P=0.792-0.984$ ), invazivnosti ( $P=0.399-0.949$ ), spolu ( $0.536-0.780$ ) ili dobi ( $P=0.541-0.816$ ) pacijenata. Međutim, uočena je umjerena korelacija između razine izražaja RelA/p65 i STAT3 ( $\rho=0.57$ ,  $P=0.0008$ ), te ciklina D1 i TGFβ ( $\rho=0.66$ ,  $P=0.0003$ ) te slabija korelacija između transkripcijskog faktora STAT3 i TGFβ ( $\rho=0.42$ ,  $P=0.03$ ).





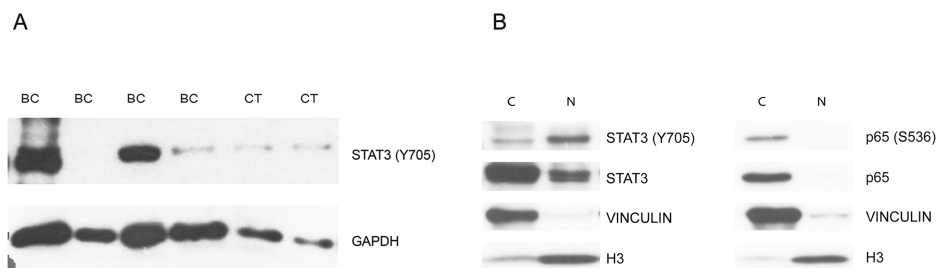
**Slika 26. Diferencijalni izražaj IL6 u tumorima mokraćnog mjehura pacijenata.** Razina IL6 smanjena je ispod biološkog praga omjera promjene  $FC < 2$  kod 21/35 tumorskih uzoraka pacijenata, a do povećanja izražaja dolazi kod 7/35 tumora.



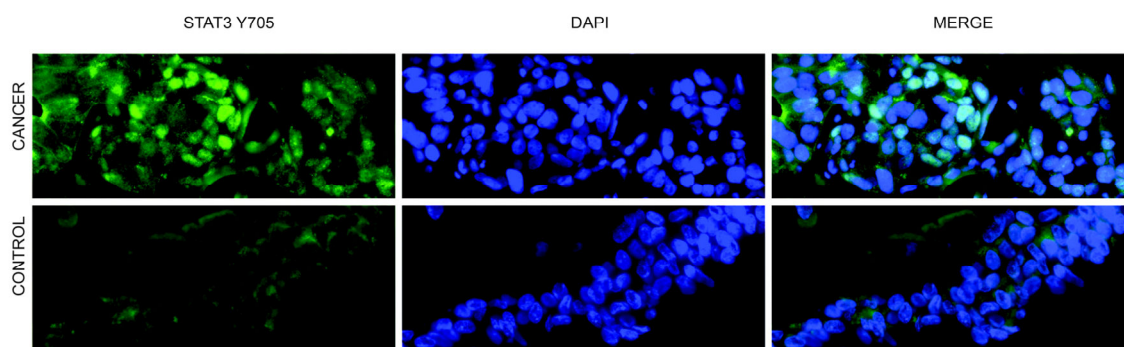
**Slika 27. Razina izražaja STAT3, NF- $\kappa$ B, TGF $\beta$ , VEGF $\alpha$  i ciklina D1 u tumorima mokraćnog mjehura pacijenata.** Biološki prag za porast/pad postavljen je na  $FC > 2$ . UP\* označava porast izražaja kod uzoraka kod kojih je u kontrolnom tkivu razina izražaja bila nedetektabilna.

#### 4.6 Aktivacija STAT3 i RelA/p65 u tumorima mokraćnog mjehura čovjeka

Utvdili smo da u tumorima mokraćnog mjehura kod čovjeka dolazi do povećanog izražaja transkripcijskih faktora STAT3 i NF- $\kappa$ B. Glavno obilježje aktivacije ovih transkripcijskih faktora jest njihova fosforilacija te translokacija iz citoplazme u jezgru stanice gdje izvršavaju funkciju regulacije izražaja ciljnih gena. Analizirali smo 11 uzoraka metodom *western blota* te smo utvdili da dolazi do aktivacije ovih transkripcijskih čimbenika, a reprezentativan prikaz blota nalazi se na slici 28a. Nadalje, razdvojili smo nuklearnu frakciju od citoplazmatske u uzorcima svježih tumora mokraćnog mjehura te smo utvdili da je fosforilirani oblik STAT3 transkripcijskog faktora prisutan u jezgrenoj frakciji, a fosforilirani RelA/p65 je detektiran u citoplazmatskoj frakciji (Slika 28b). Parafinski rezovi tumora mokraćnog mjehura pacijenata koji su pokazivali najjači porast izražaja STAT3 gena su imunofluorescencijski bojani za fosfo-STAT3 prilikom čega je utvrđena nuklearna lokalizacija aktiviranog transkripcijskog čimbenika STAT3 (Slika 29).



**Slika 28. Aktivacija transkripcijskih faktora STAT3 i RelA/p65 u tumorima mokraćnog mjehura pacijenata. (a)** Imunoblot fosforilacije STAT3 na Y705, normalizacija prema GAPDH. **(b)** Imunoblot analiza staničnih frakcija pomoću protutijela za fosfo-Stat3 (Y705) te fosfo-RelA/p65 (S536), biljezi citoplazmatske i nuklearne frakcije su vinkulin i histon H3.



**Slika 29. Nuklearna lokalizacija i aktivacija transkripcijskog faktora STAT3.** Imunofluorescencijsko bojenje parafinskih prereza pacijenata koristeći protutijelo za fosfo-STAT3 (Y705). Kontrola u ovom eksperimentu je biopsija zdravog mjehura.

## 5 RASPRAVA

Još je 1889. godine Stephen Paget postulirao teoriju „sjemenke i tla“ kada je predložio da neoplastične stanice („sjemenke“) mogu započeti tumorigenezu samo ako su u „gostoljubivom“ okruženju. Iako je ova teorija dugo vremena bila zanemarena i istraživanja su bila uglavnom usmjerena na unutarnja svojstva tumorskih stanica, u novije vrijeme je znanstvena pažnja skrenula svoj interes na tumorsko mikro okruženje koje je izrazito imunološki aktivno. Imunologija tumora mokraćnog mjehura još je uvijek neistraženo područje što je pomalo i začuđujuće s obzirom da se terapija mišićno-neinvazivnih tumora mokraćnog mjehura temelji upravo na mijenjanju imunološkog okruženja u mjehurima pacijenata upotrebom cjepiva BCG<sup>157</sup>. Do sada je razvijeno nekoliko životinjskih eksperimentalnih modela za tumore mokraćnog mjehura, a najčešće korišteni model se temelji na indukciji tumora mokraćnog mjehura upotrebom kemikalije BBN<sup>158</sup>. Taj model inducira tumore koji po svojim osobinama najviše nalikuju na invazivne tumore mokraćnog mjehura kod čovjeka kako je pokazano u nekoliko studija koje su uz pomoć tehnologije genskih čipova analizirale izražaj gena važnih za kontrolu stanične proliferacije, diferencijacije, staničnog ciklusa i apoptoze<sup>159-161</sup>. U ovoj se disertaciji po prvi puta pristupilo analizi apsolutnih promjena koje se događaju na razini izražaja cjelokupnog genoma prilikom indukcije tumora mokraćnog mjehura kod miševa. Koristeći metodu RNA sekvenciranja utvrdili smo cjelokupan transkriptom mokraćnih mjehura u kojima je BBN-om induciran zloćudni tumor. Utvrdili smo da do najznačajnijih promjena izražaja gena u mokraćnim mjehurima miševa zahvaćenim invazivnim tumorima dolazi upravo u području modulacije imunološkog odgovora što ovaj eksperimentalni model čini iznimno dobrim za proučavanje imunologije tumora mokraćnog mjehura. Jedan dio rezultata dobivenih RNA sekvenciranjem smo dodatno potvrdili na setu od 83 imunološka biljega upotrebom qPCR tehnologije. Ustanovili smo da u mokraćnom mjehuru miševa dva tjedna nakon početka tretmana dolazi do aktivacije općeg upalnog odgovora na što upućuju povišene razine izražaja interleukina IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  IL18, pro-upalnog citokina IL6, kao i proteina akutne faze, a upalni infiltrat je početno prisutan u epitelnom i subepitelnom sloju mokraćnog mjehura. Posljedično tomu, bilježimo i pojačan izražaj signalnih proteina nizvodno od receptora za glavne proupalne citokine, kao što su MAPK i NF- $\kappa$ B. Tijekom kemijski inducirane neoplastične promjene u tkivu, stanični posrednici urođene imunosti, poput makrofaga, induciraju DNA oštećenje jer otpuštaju reaktivne kisikove i dušikove radikale<sup>162</sup> te na taj način doprinose početku akutne

upalne koja imunološki slični procesu zarastanja rana, a karakterizira ju supresija imunološkog sustava koja u normalnim uvjetima služi držanju pod kontrolom auto-destruktivnog upalnog stanja. Ishod takvog stanja je vrlo neizvjestan jer tumorske stanice koje nose onkogene mutacije luče molekule koje mijenjaju imunološku i potpunu osnovu strome te ovisi o dobroj ravnoteži između citotoksičnih limfocita T i NK stanica koje djeluju u sinergiji s antigen prezentirajućim stanicama i supresorskim stanicama poput pomagačkih T<sub>H</sub>2 i Treg stanica<sup>163</sup>.

Zanimalo nas je što se događa s izražajem gena čiji proteini potiču upalu u trenutku kada u mokraćnom mjehuru miševa pronalazimo već uznapredovale invazivne tumore. Ustanovili smo da je upalni odgovor oslabio u odnosu na stanje u početnim stadijima indukcije tumora, što se vidi prema nižoj ekspresiji gotovo svih testiranih upalnih gena. Tumori su u mogućnosti na različite načine suprimirati upalu u svojoj okolini te štoviše, iskoristiti je za svoj napredak<sup>164</sup>. Regulatorni pomagački limfociti T (Treg) igraju važnu ulogu u regulaciji prepoznavanja antigena, ali povišen broj tih stanica u perifernoj krvi i mikro okruženju tumora je česta pojava kod pacijenata s invazivnim i metastatskim tumorima<sup>165</sup>. Treg stanice izražavaju CD4, CD25 i Foxp3 proteine te se u normalnim uvjetima pronalaze u limfatičkom tkivu. Ukoliko se Treg stanice pronalaze u tumorima pacijenata, značajan su pokazatelj loše prognoze<sup>166</sup>. U tumorima mokraćnog mjehura čovjeka pokazano je da povećan omjer Treg stanica u odnosu na efektorske T stanice u kombinaciji s mikroskopskim fokusima tumora zaostalim nakon resekcije tumora, doprinosi vraćanju tumora bez obzira na stadij tumora<sup>167</sup>. Dolazak Treg limfocita u tumore odvija se putem kemokina Ccl22 koji se veže na Ccr4 receptor kojeg i sami izražavaju<sup>168</sup>. U kroničnom modelu tumora kod miša izražaj kemokina Ccl22 porastao je preko 10 puta (podatak iz ukupnog sekvenciranja RNA, nije grafički prikazan) te bilježimo porast transkripcijskog faktora Foxp3 koji je ključan za diferencijaciju naivnih T limfocita u Treg limfocite, što ukazuje na moguću imunosupresivni doprinos Treg stanica razvoju tumora. Kod ljudi je pokazano da pacijenti s Foxp3+ invazivnim tumorima mokraćnog mjehura imaju smanjenu stopu preživljenja<sup>169</sup>. U tumorskom mokraćnom mjehuru miša, povišena je i ekspresija kemokinskog receptora Ccr8, specifičnog za limfocite Treg i T<sub>H</sub>2 koje u tumorima imaju važnu ulogu supresije imunološkog odgovora<sup>163,170</sup>. Ekspresija tog kemokinskog receptora povišena je u tumorima pacijenata, a tumori kod ljudi često proizvode velike količine liganda za Ccr8 receptor<sup>171</sup>.

Zanimljivo je istaknuti kako u mišjim tumorima nismo zabilježili izražaj ključnih gena povezanih s pomagačkim T<sub>H</sub>17 limfocitima, a pokazano je kako su T<sub>H</sub>17 stanice prisutne u tumorima mokraćnog mjehura kod čovjeka, kao i u krvi pacijenata oboljelih od ove bolesti<sup>172</sup>.

Diferencijaciju T<sub>H</sub>17 stanica u timusu započinju TGFβ i IL6 ili IL21<sup>173-175</sup>, a njihova aktivacija ovisi o transkripcijskom faktoru Rorc<sup>176</sup> čiji je izražaj u tumorima čak niži nego u zdravim mjehurima netretiranih miševa. Također, aktivaciju tih limfocita prati i njihovo izlučivanje interleukina IL17<sup>177</sup> koji je bio nedetektabilan u tumorima kod miševa podvrgnutim kroničnom tretmanu. Izražaj IL17 uočili smo samo tijekom akutnog tretmana koji vjerojatno potiče od limfocita Tγδ koji imaju važnu ulogu u proizvodnji IL17 u ranim stadijima bolesti, a poznato je da su upravo oni dobro zastupljena podgrupa limfocita u epitelnom tkivu<sup>178</sup>.

Citokin IL6 je začetnik signalnih puteva koji reguliraju stanični rast, proliferaciju i apoptozu te svojim djelovanjem može potaknuti razvoj tumora, a s druge strane, potreban je za uspješnu diferencijaciju izvršnih limfocita T i B koji imaju protutumorski potencijal<sup>179</sup>. Njegova uloga u razvoju tumora mokraćnog mjehura nije detaljno opisana u literaturi. *Chen et al.* su pokazali kako je razina tog citokina povišena u urinu i serumu kod pacijenata koji boluju od tumora mokraćnog mjehura u odnosu na zdrave ispitanike, te da tumori izazvani ortotopičkom implantacijom stanica s utišanim genom za IL6 imaju slabiji invazivni potencijal<sup>180</sup>. *Tsui et al.* pokazuju na staničnim linijama tumora mokraćnog mjehura kako konstitutivan izražaj IL6 ovisi o osobinama tumora iz kojeg te stanice potječu. Slabo diferencirane T24 tumorske stanice proizvode visoke razine IL6, dok RT4 stanice s WT p53 genom te HT1376 stanice dobro diferenciranog visokogradusnog tumora izražavaju znatno manje količine IL6<sup>181</sup>. Naši podaci pokazuju kako u tumorskom tkivu pacijenata dolazi do pada izražaja IL6 u odnosu na okolno tkivo koje nije zahvaćeno tumorom. Izražaj IL6 u tumorima koje smo izazvali kod miševa je povećan u odnosu na kontrolne netretirane miševe, no važno je naglasiti kako postoji značajan pad njegovog izražaja u mjehurima s invazivnim tumorima u kroničnom modelu (u odnosu na akutno tretirane mjehure miševa). Buduće bi studije trebale pokazati što se događa s izražajem IL6 prilikom još dužih studija od našeg kroničnog modela.

Nastojeći bolje objasniti ulogu IL6 u imunološkim procesima pri razvoju tumora mokraćnog mjehura, podvrgnuli smo miševe koji nose deleciju mutaciju (IL6 KO) za citokin IL6 akutnom i kroničnom tretmanu BBN-om. Korištenje takvih, genetskih modela (s i bez određenog gena) smatra se konačnom linijom dokaza o ulozi određenog gena i proteina u patogenezi bilo kojeg poremećaja. Poznato je da IL6 KO miševi imaju mnogostrukе fenotipske abnormalnosti poput usporenog zaraštanja rana, slabijeg akutnog odgovora na patogene, smanjenog kapaciteta za regeneraciju jetre te da ne razvijaju neke eksperimentalne

modele autoimunih bolesti<sup>182-185</sup>. Istraživanja tumora provedena upotrebom IL6 KO miša pokazala su i zaštitnu i zloćudnu ulogu ovog citokina u procesu njihovog razvoja<sup>186-188</sup>. Početno smo miševе podvrgnuli akutnom tretmanu BBN-om te smo utvrdili da je kod IL6 KO miševa najuočljivija promjena pad izražaja IL4 koji je ključan za razvoj imunosupresivnih T<sub>H</sub>2 limfocita<sup>189</sup>. Taj je rezultat u skladu s istraživanjima koja pokazuju da je IL6 potreban za početnu polarizaciju naivnih, pomagačkih limfocita T<sub>H</sub>0 prema T<sub>H</sub>2 podskupini koja daljnjim izlučivanjem IL4 autokrinim putem potiče svoju proliferaciju<sup>190,191</sup>. Uočili smo pad izražaja Ccr6 receptora specifičnog za T<sub>H</sub>17 i Treg limfocite, kao i Ccr4 receptora na T<sub>H</sub>2 i Treg stanicama što sveukupno ukazuje na oslabljen akutni odgovor limfocitima T u mokraćnom mjehuru miša tretiranog s BBN-om, a u skladu s dosadašnjim istraživanjima koja su pokazala kako ablacija IL6 dovodi do zakašnjelog upalnog odgovora limfocitima T prilikom tkivne upale<sup>182,185</sup>. Usporedbom netretiranih miševa oba soja (IL6 KO i WT), utvrdili smo da je izražaj IL1 $\alpha$  u mokraćnim mjehurima IL6 KO miševa niži u odnosu na WT miševе. IL1 $\alpha$  je za razliku od IL1 $\beta$ , konstitutivno prisutan u svim nehematopoetskim stanicama u prekursorskom obliku, a njegov izražaj raste prilikom tkivne hipoksije i upalnog stanja kada dolazi do njegove proteolitičke aktivacije<sup>192</sup>. Pokazano je kako upravo taj interleukin započinje kaskadu upalnog odgovora otpuštanjem iz nekrotičnih stanica u kojima je bio prisutan, a IL1 $\beta$  se počinje lučiti nešto kasnije nakupljanjem limfocita u oštećenom tkivu<sup>193,194</sup>. Naši rezultati pokazuju da IL6 možda regulira bazalni izražaj IL1 $\alpha$  u mokraćnom mjehuru kod miša, a smanjena razina tog interleukina mogla bi doprinijeti zakašnjelom odgovoru akutne upale koji je uočen.

Analizom kroničnog modela koji je rezultirao invazivnim tumorima u mokraćnom mjehuru oba soja miševa, utvrdili smo kako u IL6 KO miševima raste izražaj receptora prisutnog na imunosupresivnim limfocitima T, Ccr4 i Ccr8, što je u skladu s opisanim utjecajem IL6 na diferencijaciju T<sub>H</sub>1 stanica. Poznato je kako u prisutnosti citokina TGF $\beta$ , naivni T<sub>H</sub>0 limfociti izražavaju Foxp3 transkripcijski faktor te postaju limfociti Treg, dok je u prisutnosti TGF $\beta$  i IL6 razvoj Treg stanica suprimiran te se odvija u smjeru razvoju T<sub>H</sub>17 limfocita<sup>117,118,195</sup>. Utvrdili smo, također, kako su tumori mokraćnog mjehura IL6 KO miša infiltrirani plazma stanicama koje sadržavaju Russelova tjelešca što je u skladu s povećanim izražajem proteina CD80 koji se nalazi na površini aktiviranih limfocita B te služi kao kostimulator limfocita T, potreban za njihovu aktivaciju i preživljenje<sup>196</sup>. Uloga limfocita B i plazma stanica infiltriranih u tumore puno je manje istražena od uloge limfocita T. Podvrsta limfocita B nazvanih analogijom Breg stanicama također može imati imunosupresivnu ulogu

u tumorima<sup>197,198</sup>. Prisutnost limfocita B u tumorskom okruženju povezano je s povećanim metastatskim potencijalom tumora mokraćnog mjehura zbog pojačavanja signaliziranja androgenim receptorom i interleukinom 18<sup>199</sup>.

Uz pomoć TUNEL tehnike, utvrdili smo da manji broj tumora kod IL6 KO miševa pokazuje jaki apoptotičan fenotip što može ukazivati da IL6 regulira apoptozu u tumorima mokraćnog mjehura. I na posljetku, značajna promjena koju treba istaknuti jest da kod IL6 KO miševa dolazi do jakog porasta faktora stimulacije granulocita i makrofaga Csf2 koji je povezan s lošom prognozom kod osoba oboljelih od tumora mokraćnog mjehura<sup>200</sup>. Poznato je kako tumori koji luče Csf2 mogu biti vrlo agresivne prirode zbog imunosupresivnog fenotipa i jakog angiogenskog potencijala kao što je slučaj kod primarnih i metastatskih karcinoma pluća<sup>201,202</sup>. Stanice tumora mokraćnog mjehura izlučuju ovaj faktor matičnih stanica i na taj način autokrino promoviraju svoj rast<sup>203,204</sup>, a naši rezultati pokazuju kako IL6 možda ima protektivnu ulogu ograničavajući izražaj Csf2.

U ljudskim smo tumorima istražili izražaj gena koji se nalaze nizvodno od receptora za IL6 primarno STAT3. Transkripcijski faktori STAT3 i NF-κB su glavni promotori upalnih procesa i o njihovom djelovanju ovise ishodi mnogih tumora<sup>205</sup>. U mišjem modelu tumora mokraćnog mjehura, Stat3 je opisan kao vrlo važan faktor za razvoj tumora mokraćnog mjehura. Tako Stat3 transgenični miševi s povećanim izražajem tog transkripcijskog faktora u matičnim stanicama urotela razvijaju invazivne tumore i CIS zaobilazeći neinvazivan papilarni stadij tumora nakon izlaganja BBN-u. Nadalje, aktivacija Stat3 proteina pokazana je neizostavnom za inicijaciju tumora u Ha-Ras niskogradusnom papilarnom modelu tumora miša<sup>206</sup>. Naši rezultati na tumorskim uzorcima čovjeka podupiru prethodne studije koje tvrde da je aktivacija tog transkripcijskog faktora važna za razvoj tumora mokraćnog mjehura te ovdje pokazujemo kako u tumorima mokraćnog mjehura čovjeka dolazi do povećanog izražaja i aktivnosti STAT3. STAT3 je u tumorima pacijenata bio povišen unatoč smanjenom izražaju IL6 što može upućivati da je u tim tumorima čovjeka dominantan neki drugi citokin poput IL11 ili LIF u aktivaciji gp130/STAT3 signalnog puta<sup>61,207</sup>. Tumori koji su prikazali jaku fosforilaciju i nuklearnu translokaciju molekule STAT3 bili su i visoko proliferativni što govori u prilog dosadašnjim spoznajama o važnosti aktivacije STAT3 signalnog puta za proliferaciju i preživljenje stanica raka mokraćnog mjehura<sup>208,209</sup>.

Jednako važan promotor upale je i transkripcijski faktor NF-κB, a njegova potencijalna uloga u tumorima mokraćnog mjehura je početno istražena zbog dobre povezanosti NF-κB s intersticijskim cistitisom<sup>210</sup>. Njegova nuklearna i citoplazmatska



lokalizacija su pozitivno povezane s gradusom i T kategorijom tumora te postoje dokazi da je taj transkripcijski faktor možda uključen u rezistenciju tumora mokraćnog mjehura na cisplatinu<sup>211,212</sup>. U tumorima mokraćnog mjehura ispitanih pacijenata bilježimo korelaciju izražaja NF- $\kappa$ B i STAT3 transkripcijskih faktora što je u skladu s prijašnjim istraživanjima koja pokazuju kako su ova dva puta povezana i međusobno mogu voditi do unakrsne aktivacije i sinergijskog djelovanja u nekim tumorima<sup>205</sup>. Pokazano je da se utjecanjem na STAT3 signalni put u stanicama raka mokraćnog mjehura može inhibirati njihov rast i preživljenje regulacijom ciklina D1<sup>208</sup>. Osim toga, povećan izražaj ovog regulatora staničnog ciklusa doveden je u svezu s metastaziranjem i rizikom od ponavljanja tumora mokraćnog mjehura<sup>213</sup>, a naši su rezultati u skladu s tim istraživanjima, iako nismo uočili povezanost razine izražaja vezano uz stadij tumora kako je prethodno opisano<sup>214-216</sup>. Ciklin D1 je također pod kontrolom NF- $\kappa$ B transkripcijskog faktora.

TGF $\beta$  je regulatorni citokin koji je najčešće opisan kao supresor tumorskog rasta, ali njegov konstitutivan izražaj može također pridonijeti progresiji tumora<sup>217,218</sup>. Nekoliko je istraživačkih grupa prethodno ispitalo povezanost tog citokina s razvojem tumora mokraćnog mjehura na tumorskim stanicama, serumu i urinu pacijenata. Nedavno je pokazano kako TGF $\beta$  potiče invaziju i metastaziranje tumora mokraćnog mjehura na način da inducira izražaj gena Malat1 koji je i kritični regulator metastatskog potencijala raka pluća<sup>219</sup>. Porasta izražaja TGF $\beta$ 1 gena u tumorima koji smo utvrdili je u skladu s istraživanjem *Hung et al.* koji su pokazali kako izražaj tog gena raste u tumorskim stanicama u odnosu na kontrolne<sup>220,221</sup>.

Angiogeneza je ključan korak prilikom progresije tumora, a VEGFA je jedan od najvažnijih čimbenika koji omogućava tumorsku angiogenezu<sup>222</sup>. Oba upalna puta koja smo analizirali u tumorima mokraćnog mjehura nadziru i invaziju tumora. Poznato je kako konstitutivna aktivnost transkripcijskog čimbenika STAT3 izravno povećava izražaj VEGFA, a NF- $\kappa$ B utječe na angiogenezu regulacijom izražaja HIF-1 $\alpha$ <sup>223,224</sup>. Povećane razine VEGFA u serumu su povezane s metastatskim tumorima mokraćnog mjehura, a povećan izražaj ovog faktora rasta je pokazatelj ranog povratka bolesti i invazivnog potencijala<sup>225-227</sup>.

Provedeno je istraživanje otkrilo da ljudski tumori mokraćnog mjehura imaju snižen izražaj interleukina 6, dok su ostali proupalni citokini povišeni kao i standardni proupalni transkripcijski čimbenici Stat3 i NF- $\kappa$ B. Pokušavajući saznati kakvu ulogu u razvoju tih tumora ima IL6 inducirani su tumori mokraćnog mjehura u miševima bez IL6 (IL6 KO) i normalnim miševima (koji imaju IL6). Potpuno odstranjenje IL6 dovelo je do nešto lošije patološke slike tumora, te je otkrilo da IL6 potiče izražaj citokina IL1 $\alpha$  u normalnom tkivu

mjehura, te GM CSF u tumorski promijenjenom tkivu mokraćnog mjehura miša. Imajući u vidu kompleksnost imunološkog sustava, činjenicu da testirani model najviše utječe na promjenu baš tog biološkog sustava dodatnim će istraživanjima trebati utvrditi komplicirane mehanizme međuovisnosti utvrđenih promjena u procesu razvoja zloćudnog tumora mokraćnog mjehura.

## 6 ZAKLJUČCI

1. Tumori mokraćnog mjehura u miševima inducirani s kemikalijom BBN najviše remete izražaj gena imunološkog sustava, zbog čega su izvrstan model za proučavanje imunoloških elementa u razvoju tog tumora.

2. Uspoređujući izražaj gena između IL6 KO i WT miševa vidljivo je da interleukin 6 (IL6) potiče izražaj IL1a u normalnom, te GM-CSF u zloćudno promijenjenom tkivu mokraćnog mjehura.

3. Izražaj IL6 u BBN-om induciranim tumorima miša višestruko je povećan, ali potpuno uklanjanje tog citokina dovodi do pada izražaja više proupalnih citokina i lošije patološke slike tumora.

4. Ljudski zloćudni tumori mokraćnog mjehura imaju smanjen izražaj IL6 te povećanu aktivnost STAT3 i NF-kB transkripcijskih čimbenika i njihovih ciljnih gena.

## 7 SAŽETAK

**UVOD** Uloga upale u procesu razvoja tumora mokraćnog mjehura slabo je istražena. Kronična upala izazvana infekcijom parazitom *Shistosoma haematobium* povezana je s nastankom tumora mokraćnog mjehura, a najuspješnija terapija tih tumora temelji se na upalnoj reakciji izazvanoj primjenom BCG-a. Pokazano je kako su jedni od najvažnijih promotora upale u tumorima citokin interleukin 6 (IL6) i transkripcijski faktor STAT3. Uz pomoć mišjeg modela u kojima su tumori mokraćnog mjehura izazvani karcinogenom BBN, istražili smo ulogu IL6 usporedivši tumore miša divljeg tipa (WT) s tumorima miševa koji ne sadrže gena za IL6 (IL6 KO). Istražili smo apsolutne i relativne promjene izražaja IL6 i STAT3 te drugih imunološki važnih gena u tumorskom tkivu mokraćnog mjehura miševa i ljudi.

**METODE** Istraživanje apsolutnih promjena izražaja svih gena u modelu tumora izazvanog BBN-om provedeno je postupkom RNA sekvenciranja, a relativni izražaj IL6, STAT3 te imunološki važnih biljega istražen je lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR) u tumorima miševa i pacijenata. Upotrebom kemikalije BBN inducirani su tumori mokraćnog mjehura u WT i IL6 KO miševima. Tumori miševa i pacijenata su analizirani patohistološkim metodama te imunodetekcijom specifičnim protutijelima.

**REZULTATI** U ovom istraživanju pokazali smo da do najznačajnijih promjena u izražaju gena tijekom indukcije tumora dolazi unutar skupine gena vezanih za imunološki odgovor. Bilježimo zakašnjeli upalni odgovor limfocitima T u akutnom modelu te značajan porast izražaja gena koji ukazuju na supresiju limfocita T tijekom razvoja tumora mokraćnog mjehura. Utvrdili smo da je izražaj IL6 povećan u tumorima kod miša, no da opada s napredovanjem tumora. Potpuno odstranjenje IL6 uzrokovalo je lošiji fenotip nastalih tumora, vjerojatno zbog pojačanog izražaja gena povezanih s utišavanjem imunološkog odgovora na tumore. U mjehurima netretiranih IL6 KO miševa smanjen je izražaj IL1 $\alpha$ , a u tumorima tih miševa dolazi do značajnog porasta GM-CSF. U tumorima ljudi dolazi do smanjenja izražaja upalnog citokina IL6 te povećanja aktivnosti važnih upalnih transkripcijskih čimbenika STAT3 i NF- $\kappa$ B kao i TGF $\beta$  ciklina D1 i VEGF.

**ZAKLJUČAK** Ovim istraživanjem pokazali smo da su tumori izazvani kemikalijom BBN odličan model za proučavanje imunoloških procesa pri nastanku i razvoju tumora mokraćnog mjehura. Utvrdili smo da je razina izražaja IL6 u tumorima povećana, ali da potpuno odstranjivanje IL6 iz organizma potiskuje imunološki odgovor u tumorima mokraćnog mjehura. Također, promatrajući izražaj gena utvrdili smo da IL6 regulira količinu GM-CSF u tumorima, te IL1 $\alpha$  u zdravom tkivu mokraćnog mjehura. Unatoč smanjenom izražaju IL6 u tumorima pacijenata, izražaj STAT3, NF- $\kappa$ B, VEGFA, ciklina D1 i TGF $\beta$  je povećan.

## 8 SUMMARY

### **The role of interleukin 6 in the development of bladder cancer**

**BACKGROUND** The role of inflammation in urinary bladder cancer (BC) pathogenesis is poorly understood. Chronic inflammation caused by *Schistosoma haematobium* infestation can induce BC, while acute inflammation caused by BCG is used as a therapy for BC. It has been shown that one of the main molecular links between inflammation and cancer are cytokine IL6 and transcription factor STAT3. By using BBN-induced bladder cancer model in wild type (WT) and IL6 deficient mice (IL6 KO) we tested the effect of IL6 on BC development. Histopathological and immunohistochemical analysis as well as gene expression profiling (by RNA sequencing and RT<sup>2</sup>-PCR profiling) show important role of IL6 in BC development

**METHODS** We performed the absolute and relative quantitation of differential gene expression in murine model of BBN-induced bladder cancer by means of RNA sequencing and real-time PCR. Pathohistological features of murine and patient tumors were examined and immunodetection was performed to analyze proliferative properties of tumors. Relative expression of inflammation-related genes in bladder cancer patients was determined using real-time PCR.

**RESULTS** In this study, we demonstrate significant changes in inflammation-related gene expression during development of bladder cancer induced by BBN. IL6 was upregulated in murine bladder cancer model, but we also observe significant decrease in gene expression during tumor progression. We show that IL6 KO mice display aberrant T cell-related gene expression in response to acute treatment with BBN. Furthermore, IL6 KO mice show immunosuppressive bladder cancer profile and a significant increase in GM-CSF. IL6 expression was downregulated in human patient samples, but expression of STAT3, NF- $\kappa$ B, TGF $\beta$ , cyclin D1 and VEGFA was significantly upregulated.

**CONCLUSION** This study provides evidence that BBN-induced bladder cancer is an optimal model for investigating inflammatory events during bladder cancer progression. We confirm that IL6 KO mice display impaired acute-phase response and we show that impaired IL6 signaling causes immunosuppression during bladder cancer. Our findings demonstrate that IL6 might be involved in regulation of GM-CSF and IL1 $\alpha$ .

## 9 LITERATURA

- 1 Ferlay, J. *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**, 2893-2917, doi:10.1002/ijc.25516 (2010).
- 2 Freedman, N. D., Silverman, D. T., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A. & Abnet, C. C. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* **306**, 737-745, doi:10.1001/jama.2011.1142 (2011).
- 3 Alberg, A. J. *et al.* A prospective cohort study of bladder cancer risk in relation to active cigarette smoking and household exposure to secondhand cigarette smoke. *Am J Epidemiol* **165**, 660-666, doi:10.1093/aje/kwk047 (2007).
- 4 Chyou, P. H., Nomura, A. M. & Stemmermann, G. N. A prospective study of diet, smoking, and lower urinary tract cancer. *Ann Epidemiol* **3**, 211-216 (1993).
- 5 Mills, P. K., Beeson, W. L., Phillips, R. L. & Fraser, G. E. Bladder cancer in a low risk population: results from the Adventist Health Study. *Am J Epidemiol* **133**, 230-239 (1991).
- 6 Bartsch, H., Malaveille, C., Friesen, M., Kadlubar, F. F. & Vineis, P. Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco cancer risk. IV: Molecular dosimetry studies implicate aromatic amines as bladder carcinogens. *Eur J Cancer* **29A**, 1199-1207 (1993).
- 7 Bernardini, S. *et al.* Influence of cigarette smoking on P53 gene mutations in bladder carcinomas. *Anticancer Res* **21**, 3001-3004 (2001).
- 8 Risch, A., Wallace, D. M., Bathers, S. & Sim, E. Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum Mol Genet* **4**, 231-236 (1995).
- 9 Van Hemelrijck, M. J., Michaud, D. S., Connolly, G. N. & Kabir, Z. Secondhand smoking, 4-aminobiphenyl, and bladder cancer: two meta-analyses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**, 1312-1320, doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0613 (2009).
- 10 Verma, D. K., Purdham, J. T. & Roels, H. A. Translating evidence about occupational conditions into strategies for prevention. *Occup Environ Med* **59**, 205-213; quiz 214 (2002).

- 11 Markowitz, S. B. & Levin, K. Continued epidemic of bladder cancer in workers exposed to ortho-toluidine in a chemical factory. *J Occup Environ Med* **46**, 154-160, doi:10.1097/01.jom.0000111602.76443.15 (2004).
- 12 Rushton, L. *et al.* Occupational cancer burden in Great Britain. *Br J Cancer* **107 Suppl 1**, S3-7, doi:10.1038/bjc.2012.112 (2012).
- 13 Scosyrev, E., Noyes, K., Feng, C. & Messing, E. Sex and racial differences in bladder cancer presentation and mortality in the US. *Cancer* **115**, 68-74, doi:10.1002/cncr.23986 (2009).
- 14 Nielsen, M. E. *et al.* Advanced age is associated with poorer bladder cancer-specific survival in patients treated with radical cystectomy. *Eur Urol* **51**, 699-706; discussion 706-698, doi:10.1016/j.eururo.2006.11.004 (2007).
- 15 Resorlu, B., Beduk, Y., Baltaci, S., Ergun, G. & Talas, H. The prognostic significance of advanced age in patients with bladder cancer treated with radical cystectomy. *BJU Int* **103**, 480-483, doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08033.x (2009).
- 16 Fairey, A. S. *et al.* Age  $\geq$  80 years is independently associated with survival outcomes after radical cystectomy: results from the Canadian Bladder Cancer Network Database. *Urol Oncol* **30**, 825-832, doi:10.1016/j.urolonc.2011.07.014 (2012).
- 17 Donsky, H., Coyle, S., Scosyrev, E. & Messing, E. M. Sex differences in incidence and mortality of bladder and kidney cancers: national estimates from 49 countries. *Urol Oncol* **32**, 40 e23-31, doi:10.1016/j.urolonc.2013.04.010 (2014).
- 18 Miyamoto, H. *et al.* Promotion of bladder cancer development and progression by androgen receptor signals. *J Natl Cancer Inst* **99**, 558-568, doi:10.1093/jnci/djk113 (2007).
- 19 Miyamoto, H. *et al.* Expression of androgen and oestrogen receptors and its prognostic significance in urothelial neoplasm of the urinary bladder. *BJU Int* **109**, 1716-1726, doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10706.x (2012).
- 20 Kirkali, Z. *et al.* Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* **66**, 4-34, doi:10.1016/j.urology.2005.07.062 (2005).
- 21 Ferwana, M. *et al.* Pioglitazone and risk of bladder cancer: a meta-analysis of controlled studies. *Diabet Med* **30**, 1026-1032, doi:10.1111/dme.12144 (2013).

- 22 Kumar, S. *et al.* Second neoplasms in survivors of endometrial cancer: impact of radiation therapy. *Gynecol Oncol* **113**, 233-239, doi:10.1016/j.ygyno.2008.12.039 (2009).
- 23 Lonn, S. *et al.* Comparison of second cancer risks from brachytherapy and external beam therapy after uterine corpus cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**, 464-474, doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0892 (2010).
- 24 Scosyrev, E., Yao, J. & Messing, E. Urothelial carcinoma versus squamous cell carcinoma of bladder: is survival different with stage adjustment? *Urology* **73**, 822-827, doi:10.1016/j.urology.2008.11.042 (2009).
- 25 Harik, L. R. & O'Toole, K. M. Nonneoplastic lesions of the prostate and bladder. *Arch Pathol Lab Med* **136**, 721-734, doi:10.5858/arpa.2011-0584-RA (2012).
- 26 Smith, A. K., Hansel, D. E. & Jones, J. S. Role of cystitis cystica et glandularis and intestinal metaplasia in development of bladder carcinoma. *Urology* **71**, 915-918, doi:10.1016/j.urology.2007.11.079 (2008).
- 27 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* **66**, 7-30, doi:10.3322/caac.21332 (2016).
- 28 Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M. & Reuter, V. E. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*, doi:10.1016/j.eururo.2016.02.028 (2016).
- 29 Prout, G. R., Jr., Barton, B. A., Griffin, P. P. & Friedell, G. H. Treated history of noninvasive grade 1 transitional cell carcinoma. The National Bladder Cancer Group. *J Urol* **148**, 1413-1419 (1992).
- 30 Knowles, M. A., Habuchi, T., Kennedy, W. & Cuthbert-Heavens, D. Mutation spectrum of the 9q34 tuberous sclerosis gene TSC1 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* **63**, 7652-7656 (2003).
- 31 Moch, H., Cubilla, A. L., Humphrey, P. A., Reuter, V. E. & Ulbright, T. M. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*, doi:10.1016/j.eururo.2016.02.029 (2016).
- 32 Amin, M. B. *et al.* ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Pathology. *Eur Urol* **63**, 16-35, doi:10.1016/j.eururo.2012.09.063 (2013).



- 33 Hodges, K. B., Lopez-Beltran, A., Davidson, D. D., Montironi, R. & Cheng, L. Urothelial dysplasia and other flat lesions of the urinary bladder: clinicopathologic and molecular features. *Hum Pathol* **41**, 155-162, doi:10.1016/j.humpath.2009.07.002 (2010).
- 34 Coleman, J. F. & Hansel, D. E. Utility of diagnostic and prognostic markers in urothelial carcinoma of the bladder. *Adv Anat Pathol* **16**, 67-78, doi:10.1097/PAP.0b013e318199f89e (2009).
- 35 Kamat, A. M. *et al.* ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Screening, diagnosis, and molecular markers. *Eur Urol* **63**, 4-15, doi:10.1016/j.eururo.2012.09.057 (2013).
- 36 Watts, K. E. *et al.* Clinicopathologic characteristics of 23 cases of invasive low-grade papillary urothelial carcinoma. *Urology* **80**, 361-366, doi:10.1016/j.urology.2012.04.010 (2012).
- 37 Hansel, D. E., Zhang, Z., Petillo, D. & Teh, B. T. Gene profiling suggests a common evolution of bladder cancer subtypes. *BMC Med Genomics* **6**, 42, doi:10.1186/1755-8794-6-42 (2013).
- 38 Ross, R. L., Askham, J. M. & Knowles, M. A. PIK3CA mutation spectrum in urothelial carcinoma reflects cell context-dependent signaling and phenotypic outputs. *Oncogene* **32**, 768-776, doi:10.1038/onc.2012.87 (2013).
- 39 Shanley, S. & McCormack, C. Diagnosis and Management of Hereditary Basal Cell Skin Cancer. *Recent Results Cancer Res* **205**, 191-212, doi:10.1007/978-3-319-29998-3\_11 (2016).
- 40 Tomlinson, D. C., Baldo, O., Harnden, P. & Knowles, M. A. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J Pathol* **213**, 91-98, doi:10.1002/path.2207 (2007).
- 41 Adar, R., Monsonego-Ornan, E., David, P. & Yayon, A. Differential activation of cysteine-substitution mutants of fibroblast growth factor receptor 3 is determined by cysteine localization. *J Bone Miner Res* **17**, 860-868, doi:10.1359/jbmr.2002.17.5.860 (2002).

- 42 Gomez-Roman, J. J. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 3 is overexpressed in urinary tract carcinomas and modulates the neoplastic cell growth. *Clin Cancer Res* **11**, 459-465 (2005).
- 43 Kompier, L. C. *et al.* FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One* **5**, e13821, doi:10.1371/journal.pone.0013821 (2010).
- 44 Wu, X. *et al.* The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion. *BJU Int* **93**, 143-150 (2004).
- 45 Chatterjee, S. J. *et al.* Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* **22**, 1007-1013, doi:10.1200/JCO.2004.05.174 (2004).
- 46 Spruck, C. H., 3rd *et al.* Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* **54**, 784-788 (1994).
- 47 Rosin, M. P., Cairns, P., Epstein, J. I., Schoenberg, M. P. & Sidransky, D. Partial allelotype of carcinoma in situ of the human bladder. *Cancer Res* **55**, 5213-5216 (1995).
- 48 Dyrskjot, L. *et al.* Gene expression in the urinary bladder: a common carcinoma in situ gene expression signature exists disregarding histopathological classification. *Cancer Res* **64**, 4040-4048, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3620 (2004).
- 49 Mallofre, C., Castillo, M., Morente, V. & Sole, M. Immunohistochemical expression of CK20, p53, and Ki-67 as objective markers of urothelial dysplasia. *Mod Pathol* **16**, 187-191, doi:10.1097/01.MP.0000056628.38714.5D (2003).
- 50 Han, H., Wolff, E. M. & Liang, G. Epigenetic alterations in bladder cancer and their potential clinical implications. *Adv Urol* **2012**, 546917, doi:10.1155/2012/546917 (2012).
- 51 Cordon-Cardo, C., Cote, R. J. & Sauter, G. Genetic and molecular markers of urothelial premalignancy and malignancy. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 82-93 (2000).
- 52 Neuzillet, Y. *et al.* A meta-analysis of the relationship between FGFR3 and TP53 mutations in bladder cancer. *PLoS One* **7**, e48993, doi:10.1371/journal.pone.0048993 (2012).

- 53 Kuper, H., Adami, H. O. & Trichopoulos, D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* **248**, 171-183 (2000).
- 54 Arthur, J. C. *et al.* Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* **338**, 120-123, doi:10.1126/science.1224820 (2012).
- 55 Grivennikov, S. I. *et al.* Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* **491**, 254-258, doi:10.1038/nature11465 (2012).
- 56 Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899, doi:10.1016/j.cell.2010.01.025 (2010).
- 57 Amit, I. *et al.* A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat Genet* **39**, 503-512, doi:10.1038/ng1987 (2007).
- 58 Mosesson, Y., Mills, G. B. & Yarden, Y. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 835-850, doi:10.1038/nrc2521 (2008).
- 59 Wilson, T. R. *et al.* Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* **487**, 505-509, doi:10.1038/nature11249 (2012).
- 60 Grivennikov, S. *et al.* IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* **15**, 103-113, doi:10.1016/j.ccr.2009.01.001 (2009).
- 61 Bollrath, J. *et al.* gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* **15**, 91-102, doi:10.1016/j.ccr.2009.01.002 (2009).
- 62 Liang, J. *et al.* Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* **23**, 107-120, doi:10.1016/j.ccr.2012.11.013 (2013).
- 63 Park, E. J. *et al.* Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* **140**, 197-208, doi:10.1016/j.cell.2009.12.052 (2010).
- 64 Karin, M. & Greten, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* **5**, 749-759, doi:10.1038/nri1703 (2005).

- 65 Pikarsky, E. *et al.* NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* **431**, 461-466, doi:10.1038/nature02924 (2004).
- 66 Greten, F. R. *et al.* IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**, 285-296, doi:10.1016/j.cell.2004.07.013 (2004).
- 67 Popivanova, B. K. *et al.* Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* **118**, 560-570, doi:10.1172/JCI32453 (2008).
- 68 Schiechl, G. *et al.* Tumor development in murine ulcerative colitis depends on MyD88 signaling of colonic F4/80+CD11b(high)Gr1(low) macrophages. *J Clin Invest* **121**, 1692-1708, doi:10.1172/JCI42540 (2011).
- 69 Pickert, G. *et al.* STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* **206**, 1465-1472, doi:10.1084/jem.20082683 (2009).
- 70 Huber, S. *et al.* IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* **491**, 259-263, doi:10.1038/nature11535 (2012).
- 71 Marotta, L. L. *et al.* The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)/CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *J Clin Invest* **121**, 2723-2735, doi:10.1172/JCI44745 (2011).
- 72 Ho, P. L., Lay, E. J., Jian, W., Parra, D. & Chan, K. S. Stat3 activation in urothelial stem cells leads to direct progression to invasive bladder cancer. *Cancer research* **72**, 3135-3142, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3195 (2012).
- 73 Scheitz, C. J., Lee, T. S., McDermitt, D. J. & Tumbar, T. Defining a tissue stem cell-driven Runx1/Stat3 signalling axis in epithelial cancer. *EMBO J* **31**, 4124-4139, doi:10.1038/emboj.2012.270 (2012).
- 74 Quante, M. *et al.* Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia. *Cancer Cell* **21**, 36-51, doi:10.1016/j.ccr.2011.12.004 (2012).
- 75 Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 729-740, doi:10.1038/nrm2233 (2007).

- 76 Chien, Y. *et al.* Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* **25**, 2125-2136, doi:10.1101/gad.17276711 (2011).
- 77 Kang, T. W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547-551, doi:10.1038/nature10599 (2011).
- 78 Mills, K. D., Ferguson, D. O. & Alt, F. W. The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunol Rev* **194**, 77-95 (2003).
- 79 Okazaki, I. M., Kotani, A. & Honjo, T. Role of AID in tumorigenesis. *Adv Immunol* **94**, 245-273, doi:10.1016/S0065-2776(06)94008-5 (2007).
- 80 Mishra, A. *et al.* Aberrant overexpression of IL-15 initiates large granular lymphocyte leukemia through chromosomal instability and DNA hypermethylation. *Cancer Cell* **22**, 645-655, doi:10.1016/j.ccr.2012.09.009 (2012).
- 81 Schetter, A. J., Heegaard, N. H. & Harris, C. C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* **31**, 37-49, doi:10.1093/carcin/bgp272 (2010).
- 82 Peinado, H., Lavotshkin, S. & Lyden, D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol* **21**, 139-146, doi:10.1016/j.semcancer.2011.01.002 (2011).
- 83 Qian, B. Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39-51, doi:10.1016/j.cell.2010.03.014 (2010).
- 84 Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420-1428, doi:10.1172/JCI39104 (2009).
- 85 Wyckoff, J. B. *et al.* Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* **67**, 2649-2656, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1823 (2007).
- 86 McDonald, B. *et al.* Systemic inflammation increases cancer cell adhesion to hepatic sinusoids by neutrophil mediated mechanisms. *Int J Cancer* **125**, 1298-1305, doi:10.1002/ijc.24409 (2009).
- 87 Curiel, T. J. *et al.* Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* **9**, 562-567, doi:10.1038/nm863 (2003).

- 88 Muller, G. *et al.* Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells in vivo. *J Invest Dermatol* **119**, 836-841, doi:10.1046/j.1523-1747.2002.00496.x (2002).
- 89 Geissmann, F. *et al.* TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* **162**, 4567-4575 (1999).
- 90 Menetrier-Caux, C. *et al.* Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **92**, 4778-4791 (1998).
- 91 Bayne, L. J. *et al.* Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer Cell* **21**, 822-835, doi:10.1016/j.ccr.2012.04.025 (2012).
- 92 Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 162-174, doi:10.1038/nri2506 (2009).
- 93 Facciabene, A. *et al.* Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* **475**, 226-230, doi:10.1038/nature10169 (2011).
- 94 Facciabene, A., Motz, G. T. & Coukos, G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res* **72**, 2162-2171, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3687 (2012).
- 95 Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444, doi:10.1038/nature07205 (2008).
- 96 Castell, J. V. *et al.* Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat. *Eur J Biochem* **177**, 357-361 (1988).
- 97 Simpson, R. J., Hammacher, A., Smith, D. K., Matthews, J. M. & Ward, L. D. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci* **6**, 929-955, doi:10.1002/pro.5560060501 (1997).
- 98 Terasaka, Y., Miyazaki, D., Yakura, K., Haruki, T. & Inoue, Y. Induction of IL-6 in transcriptional networks in corneal epithelial cells after herpes simplex virus type 1 infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 2441-2449, doi:10.1167/iovs.09-4624 (2010).

- 99 Baccam, M., Woo, S. Y., Vinson, C. & Bishop, G. A. CD40-mediated transcriptional regulation of the IL-6 gene in B lymphocytes: involvement of NF-kappa B, AP-1, and C/EBP. *J Immunol* **170**, 3099-3108 (2003).
- 100 Ray, A., Tatter, S. B., May, L. T. & Sehgal, P. B. Activation of the human "beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6" promoter by cytokines, viruses, and second messenger agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6701-6705 (1988).
- 101 Isshiki, H. *et al.* Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol Cell Biol* **10**, 2757-2764 (1990).
- 102 Park, J. I. *et al.* Transforming growth factor-beta1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF-kappaB, JNK, and Ras signaling pathways. *Oncogene* **22**, 4314-4332, doi:10.1038/sj.onc.1206478 (2003).
- 103 Ataie-Kachoe, P., Pourgholami, M. H. & Morris, D. L. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **24**, 163-173, doi:10.1016/j.cytogfr.2012.09.001 (2013).
- 104 Rose-John, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* **8**, 1237-1247, doi:10.7150/ijbs.4989 (2012).
- 105 Rose-John, S., Scheller, J. & Schaper, F. "Family reunion"--A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* **26**, 471-474, doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.011 (2015).
- 106 Silver, J. S. & Hunter, C. A. gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol* **88**, 1145-1156, doi:10.1189/jlb.0410217 (2010).
- 107 Heikkila, K., Ebrahim, S. & Lawlor, D. A. Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *Eur J Cancer* **44**, 937-945, doi:10.1016/j.ejca.2008.02.047 (2008).
- 108 Lippitz, B. E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol* **14**, e218-228, doi:10.1016/S1470-2045(12)70582-X (2013).

- 109 Fisher, D. T. *et al.* IL-6 trans-signaling licenses mouse and human tumor microvascular gateways for trafficking of cytotoxic T cells. *J Clin Invest* **121**, 3846-3859, doi:10.1172/JCI44952 (2011).
- 110 Hirano, T., Ishihara, K. & Hibi, M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* **19**, 2548-2556, doi:10.1038/sj.onc.1203551 (2000).
- 111 Thiem, S. *et al.* mTORC1 inhibition restricts inflammation-associated gastrointestinal tumorigenesis in mice. *J Clin Invest* **123**, 767-781, doi:10.1172/JCI65086 (2013).
- 112 Diaz, N. *et al.* Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin Cancer Res* **12**, 20-28, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1749 (2006).
- 113 Gritsko, T. *et al.* Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **12**, 11-19, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1752 (2006).
- 114 Hodge, D. R. *et al.* Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. *Cancer Res* **65**, 4673-4682, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3589 (2005).
- 115 Xie, T. X. *et al.* Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* **23**, 3550-3560, doi:10.1038/sj.onc.1207383 (2004).
- 116 Kujawski, M. *et al.* Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* **118**, 3367-3377, doi:10.1172/JCI35213 (2008).
- 117 Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. & Palucka, A. K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* **1**, 510-514, doi:10.1038/82763 (2000).
- 118 Park, S. J. *et al.* IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* **173**, 3844-3854 (2004).
- 119 Yu, H., Kortylewski, M. & Pardoll, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* **7**, 41-51, doi:10.1038/nri1995 (2007).



- 120 Leal, I. S., Florido, M., Andersen, P. & Appelberg, R. Interleukin-6 regulates the phenotype of the immune response to a tuberculosis subunit vaccine. *Immunology* **103**, 375-381 (2001).
- 121 Eddahri, F. *et al.* Interleukin-6/STAT3 signaling regulates the ability of naive T cells to acquire B-cell help capacities. *Blood* **113**, 2426-2433, doi:10.1182/blood-2008-04-154682 (2009).
- 122 Pasare, C. & Medzhitov, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**, 1033-1036, doi:10.1126/science.1078231 (2003).
- 123 Dejean, A. S. *et al.* Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat Immunol* **10**, 504-513, doi:10.1038/ni.1729 (2009).
- 124 Michaud, D. S. Chronic inflammation and bladder cancer. *Urol Oncol* **25**, 260-268, doi:10.1016/j.urolonc.2006.10.002 (2007).
- 125 Delnay, K. M., Stonehill, W. H., Goldman, H., Jukkola, A. F. & Dmochowski, R. R. Bladder histological changes associated with chronic indwelling urinary catheter. *J Urol* **161**, 1106-1108; discussion 1108-1109 (1999).
- 126 Locke, J. R., Hill, D. E. & Walzer, Y. Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage. *J Urol* **133**, 1034-1035 (1985).
- 127 Welk, B., McIntyre, A., Teasell, R., Potter, P. & Loh, E. Bladder cancer in individuals with spinal cord injuries. *Spinal Cord* **51**, 516-521, doi:10.1038/sc.2013.33 (2013).
- 128 Zhu, Z., Shen, Z. & Xu, C. Inflammatory pathways as promising targets to increase chemotherapy response in bladder cancer. *Mediators Inflamm* **2012**, 528690, doi:10.1155/2012/528690 (2012).
- 129 Peranzoni, E. *et al.* Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* **22**, 238-244, doi:10.1016/j.coi.2010.01.021 (2010).
- 130 Daurkin, I., Eruslanov, E., Vieweg, J. & Kusmartsev, S. Generation of antigen-presenting cells from tumor-infiltrated CD11b myeloid cells with DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Immunol Immunother* **59**, 697-706, doi:10.1007/s00262-009-0786-4 (2010).

- 131 Suttman, H. *et al.* Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer research* **66**, 8250-8257, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1416 (2006).
- 132 Gunes, M. *et al.* Plasma human neutrophil proteins-1, -2, and -3 levels in patients with bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **139**, 195-199, doi:10.1007/s00432-012-1305-0 (2013).
- 133 Albrethsen, J. *et al.* Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *BMC Cancer* **5**, 8, doi:10.1186/1471-2407-5-8 (2005).
- 134 Gondo, T. *et al.* Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and establishment of novel preoperative risk stratification model in bladder cancer patients treated with radical cystectomy. *Urology* **79**, 1085-1091, doi:10.1016/j.urology.2011.11.070 (2012).
- 135 Hanada, T. *et al.* Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *Int J Urol* **7**, 263-269 (2000).
- 136 Ajili, F., Kourda, N., Darouiche, A., Chebil, M. & Boubaker, S. Prognostic value of tumor-associated macrophages count in human non-muscle-invasive bladder cancer treated by BCG immunotherapy. *Ultrastruct Pathol* **37**, 56-61, doi:10.3109/01913123.2012.728688 (2013).
- 137 Ajili, F. *et al.* Prognostic impact of angiogenesis in nonmuscle invasive bladder cancer as defined by microvessel density after immunohistochemical staining for CD34. *Ultrastruct Pathol* **36**, 336-342, doi:10.3109/01913123.2012.672847 (2012).
- 138 Granata, F. *et al.* Production of vascular endothelial growth factors from human lung macrophages induced by group IIA and group X secreted phospholipases A2. *J Immunol* **184**, 5232-5241, doi:10.4049/jimmunol.0902501 (2010).
- 139 Hofner, T. *et al.* Expression and prognostic significance of cancer stem cell markers CD24 and CD44 in urothelial bladder cancer xenografts and patients undergoing radical cystectomy. *Urol Oncol* **32**, 678-686, doi:10.1016/j.urolonc.2014.01.001 (2014).

- 140 Schamhart, D. H., de Boer, E. C., de Reijke, T. M. & Kurth, K. Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use. *Eur Urol* **37 Suppl 3**, 16-23, doi:52388 (2000).
- 141 Lima, L. *et al.* The predominance of M2-polarized macrophages in the stroma of low-hypoxic bladder tumors is associated with BCG immunotherapy failure. *Urol Oncol* **32**, 449-457, doi:10.1016/j.urolonc.2013.10.012 (2014).
- 142 Suttman, H., Lehan, N., Bohle, A. & Brandau, S. Stimulation of neutrophil granulocytes with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis. *Infect Immun* **71**, 4647-4656 (2003).
- 143 Brincks, E. L., Risk, M. C. & Griffith, T. S. PMN and anti-tumor immunity--the case of bladder cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol* **23**, 183-189, doi:10.1016/j.semcancer.2013.02.002 (2013).
- 144 Jackson, A. M. *et al.* Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy. *Clin Exp Immunol* **99**, 369-375 (1995).
- 145 Cochran, A. J., Mackie, R. M., Jackson, A. M., Ogg, L. J. & Ross, C. E. Immunological changes in cancer patients receiving BCG. *Dev Biol Stand* **38**, 441-448 (1977).
- 146 Bohle, A. & Brandau, S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol* **170**, 964-969, doi:10.1097/01.ju.0000073852.24341.4a (2003).
- 147 Jinesh, G. G., Chunduru, S. & Kamat, A. M. Smac mimetic enables the anticancer action of BCG-stimulated neutrophils through TNF-alpha but not through TRAIL and FasL. *J Leukoc Biol* **92**, 233-244, doi:10.1189/jlb.1211623 (2012).
- 148 Nishiyama, T. *et al.* Immunotherapy of bladder cancer using autologous dendritic cells pulsed with human lymphocyte antigen-A24-specific MAGE-3 peptide. *Clin Cancer Res* **7**, 23-31 (2001).
- 149 Ito, N., Shirai, T., Fukushima, S. & Hirose, M. Dose-response study of urinary bladder carcinogenesis in rats by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *J Cancer Res Clin Oncol* **108**, 169-173 (1984).

- 150 Trapnell, C. *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* **28**, 511-515, doi:10.1038/nbt.1621 (2010).
- 151 Trapnell, C. *et al.* Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol* **31**, 46-53, doi:10.1038/nbt.2450 (2013).
- 152 Trapnell, C. *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* **7**, 562-578, doi:10.1038/nprot.2012.016 (2012).
- 153 Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D. & Yakhini, Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* **10**, 48, doi:10.1186/1471-2105-10-48 (2009).
- 154 Supek, F., Bosnjak, M., Skunca, N. & Smuc, T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* **6**, e21800, doi:10.1371/journal.pone.0021800 (2011).
- 155 Wei, C., Li, J. & Bumgarner, R. E. Sample size for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. *BMC Genomics* **5**, 87, doi:10.1186/1471-2164-5-87 (2004).
- 156 Yang, S. *et al.* Detecting outlier microarray arrays by correlation and percentage of outliers spots. *Cancer Inform* **2**, 351-360 (2006).
- 157 Redelman-Sidi, G., Glickman, M. S. & Bochner, B. H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer--a current perspective. *Nature reviews. Urology* **11**, 153-162, doi:10.1038/nrurol.2014.15 (2014).
- 158 Zhang, N., Li, D., Shao, J. & Wang, X. Animal models for bladder cancer: The model establishment and evaluation (Review). *Oncology letters* **9**, 1515-1519, doi:10.3892/ol.2015.2888 (2015).
- 159 Yao, R. *et al.* Altered gene expression profile in mouse bladder cancers induced by hydroxybutyl(butyl)nitrosamine. *Neoplasia* **6**, 569-577, doi:10.1593/neo.04223 (2004).
- 160 Kim, S. K. *et al.* Identification of gene expression signature modulated by nicotinamide in a mouse bladder cancer model. *PloS one* **6**, e26131, doi:10.1371/journal.pone.0026131 (2011).

- 161 Williams, P. D., Lee, J. K. & Theodorescu, D. Molecular credentialing of rodent bladder carcinogenesis models. *Neoplasia* **10**, 838-846 (2008).
- 162 Bui, J. D. & Schreiber, R. D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol* **19**, 203-208, doi:10.1016/j.coi.2007.02.001 (2007).
- 163 Motz, G. T. & Coukos, G. Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* **39**, 61-73, doi:10.1016/j.immuni.2013.07.005 (2013).
- 164 Palucka, A. K. & Coussens, L. M. The Basis of Oncoimmunology. *Cell* **164**, 1233-1247, doi:10.1016/j.cell.2016.01.049 (2016).
- 165 Sakaguchi, S., Setoguchi, R., Yagi, H. & Nomura, T. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **305**, 51-66 (2006).
- 166 Curiel, T. J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* **10**, 942-949, doi:10.1038/nm1093 (2004).
- 167 Parodi, A. *et al.* Residual tumor micro-foci and overwhelming regulatory T lymphocyte infiltration are the causes of bladder cancer recurrence. *Oncotarget* **7**, 6424-6435, doi:10.18632/oncotarget.7024 (2016).
- 168 Adeegbe, D. O. & Nishikawa, H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol* **4**, 190, doi:10.3389/fimmu.2013.00190 (2013).
- 169 Winerdal, M. E. *et al.* FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. *BJU Int* **108**, 1672-1678, doi:10.1111/j.1464-410X.2010.10020.x (2011).
- 170 Soler, D. *et al.* CCR8 expression identifies CD4 memory T cells enriched for FOXP3+ regulatory and Th2 effector lymphocytes. *J Immunol* **177**, 6940-6951 (2006).
- 171 Eruslanov, E. *et al.* Expansion of CCR8(+) inflammatory myeloid cells in cancer patients with urothelial and renal carcinomas. *Clin Cancer Res* **19**, 1670-1680, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2091 (2013).
- 172 Chugh, S. *et al.* Involvement of Th17 cells in patients of urothelial carcinoma of bladder. *Hum Immunol* **74**, 1258-1262, doi:10.1016/j.humimm.2013.06.032 (2013).

- 173 Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179-189, doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001 (2006).
- 174 Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231-234, doi:10.1038/nature04754 (2006).
- 175 Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238, doi:10.1038/nature04753 (2006).
- 176 Mitra, S. *et al.* A molecular marker of disease activity in autoimmune liver diseases with histopathological correlation; FoXp3/RORgammat ratio. *APMIS* **123**, 935-944, doi:10.1111/apm.12457 (2015).
- 177 Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 485-517, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710 (2009).
- 178 Keijsers, R. R., Joosten, I., van Erp, P. E., Koenen, H. J. & van de Kerkhof, P. C. Cellular sources of IL-17 in psoriasis: a paradigm shift? *Exp Dermatol* **23**, 799-803, doi:10.1111/exd.12487 (2014).
- 179 Ataie-Kachoie, P., Pourgholami, M. H., Richardson, D. R. & Morris, D. L. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *J Clin Pathol* **67**, 932-937, doi:10.1136/jclinpath-2014-202493 (2014).
- 180 Chen, M. F., Lin, P. Y., Wu, C. F., Chen, W. C. & Wu, C. T. IL-6 expression regulates tumorigenicity and correlates with prognosis in bladder cancer. *PLoS One* **8**, e61901, doi:10.1371/journal.pone.0061901 (2013).
- 181 Tsui, K. H. *et al.* Mechanisms by which interleukin-6 attenuates cell invasion and tumorigenesis in human bladder carcinoma cells. *Biomed Res Int* **2013**, 791212, doi:10.1155/2013/791212 (2013).
- 182 Kopf, M. *et al.* Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* **368**, 339-342, doi:10.1038/368339a0 (1994).
- 183 Cressman, D. E. *et al.* Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* **274**, 1379-1383 (1996).

- 184 Mendel, I., Katz, A., Kozak, N., Ben-Nun, A. & Revel, M. Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. *Eur J Immunol* **28**, 1727-1737, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199805)28:05<1727::AID-IMMU1727>3.0.CO;2-# (1998).
- 185 McFarland-Mancini, M. M. *et al.* Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *J Immunol* **184**, 7219-7228, doi:10.4049/jimmunol.0901929 (2010).
- 186 Hatzi, E. *et al.* N-myc oncogene overexpression down-regulates IL-6; evidence that IL-6 inhibits angiogenesis and suppresses neuroblastoma tumor growth. *Oncogene* **21**, 3552-3561, doi:10.1038/sj.onc.1205440 (2002).
- 187 Mule, J. J., McIntosh, J. K., Jablons, D. M. & Rosenberg, S. A. Antitumor activity of recombinant interleukin 6 in mice. *J Exp Med* **171**, 629-636 (1990).
- 188 Nguyen, D. P., Li, J. & Tewari, A. K. Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). *BJU Int* **113**, 986-992, doi:10.1111/bju.12452 (2014).
- 189 Paul, W. E. & Zhu, J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* **10**, 225-235, doi:10.1038/nri2735 (2010).
- 190 Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E. & Flavell, R. A. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* **185**, 461-469 (1997).
- 191 Diehl, S. *et al.* Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* **13**, 805-815 (2000).
- 192 Rider, P., Carmi, Y., Voronov, E. & Apte, R. N. Interleukin-1alpha. *Semin Immunol* **25**, 430-438, doi:10.1016/j.smim.2013.10.005 (2013).
- 193 Bersudsky, M. *et al.* Non-redundant properties of IL-1alpha and IL-1beta during acute colon inflammation in mice. *Gut* **63**, 598-609, doi:10.1136/gutjnl-2012-303329 (2014).
- 194 Chen, C. J. *et al.* Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* **13**, 851-856, doi:10.1038/nm1603 (2007).

- 195 Chen, X. *et al.* Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood* **114**, 891-900, doi:10.1182/blood-2009-01-197178 (2009).
- 196 Slavik, J. M., Hutchcroft, J. E. & Bierer, B. E. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res* **19**, 1-24, doi:10.1007/BF02786473 (1999).
- 197 Gunderson, A. J. & Coussens, L. M. B cells and their mediators as targets for therapy in solid tumors. *Exp Cell Res* **319**, 1644-1649, doi:10.1016/j.yexcr.2013.03.005 (2013).
- 198 de Visser, K. E., Korets, L. V. & Coussens, L. M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* **7**, 411-423, doi:10.1016/j.ccr.2005.04.014 (2005).
- 199 Ou, Z. *et al.* Tumor microenvironment B cells increase bladder cancer metastasis via modulation of the IL-8/androgen receptor (AR)/MMPs signals. *Oncotarget* **6**, 26065-26078, doi:10.18632/oncotarget.4569 (2015).
- 200 Lee, Y. Y. *et al.* CSF2 Overexpression Is Associated with STAT5 Phosphorylation and Poor Prognosis in Patients with Urothelial Carcinoma. *J Cancer* **7**, 711-721, doi:10.7150/jca.14281 (2016).
- 201 Lammel, V. *et al.* Hypereosinophilia driven by GM-CSF in large-cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* **76**, 493-495, doi:10.1016/j.lungcan.2012.02.014 (2012).
- 202 Shalom, G., Sion-Vardy, N., Dudnik, J. & Ariad, S. Leukemoid reaction in lung cancer patients. *Isr Med Assoc J* **12**, 255-256 (2010).
- 203 Tachibana, M. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor receptor expression on human transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* **75**, 1489-1496 (1997).
- 204 Tachibana, M. *et al.* Autocrine growth of transitional cell carcinoma of the bladder induced by granulocyte-colony stimulating factor. *Cancer Res* **55**, 3438-3443 (1995).
- 205 Grivennikov, S. I. & Karin, M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**, 11-19, doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.005 (2010).



- 206 Mo, L. *et al.* Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis. *J Clin Invest* **117**, 314-325, doi:10.1172/JCI30062 (2007).
- 207 Ernst, M. & Putoczki, T. L. Molecular pathways: IL11 as a tumor-promoting cytokine-translational implications for cancers. *Clin Cancer Res* **20**, 5579-5588, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2492 (2014).
- 208 Chen, C. L. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 activation is associated with bladder cancer cell growth and survival. *Mol Cancer* **7**, 78, doi:10.1186/1476-4598-7-78 (2008).
- 209 Dangles, V. *et al.* Gene expression profiles of bladder cancers: evidence for a striking effect of in vitro cell models on gene patterns. *Br J Cancer* **86**, 1283-1289, doi:10.1038/sj.bjc.6600239 (2002).
- 210 Abdel-Mageed, A. B. & Ghoniem, G. M. Potential role of rel/nuclear factor-kappaB in the pathogenesis of interstitial cystitis. *J Urol* **160**, 2000-2003 (1998).
- 211 Levidou, G. *et al.* Clinical significance of nuclear factor (NF)-kappaB levels in urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Virchows Arch* **452**, 295-304, doi:10.1007/s00428-007-0560-y (2008).
- 212 Kontos, S., Kominea, A., Melachrinou, M., Balampani, E. & Sotiropoulou-Bonikou, G. Inverse expression of estrogen receptor-beta and nuclear factor-kappaB in urinary bladder carcinogenesis. *Int J Urol* **17**, 801-809, doi:10.1111/j.1442-2042.2010.02603.x (2010).
- 213 Kopperapu, P. K. *et al.* Expression of cyclin d1 and its association with disease characteristics in bladder cancer. *Anticancer Res* **33**, 5235-5242 (2013).
- 214 Wagner, U. *et al.* Cyclin D1 overexpression lacks prognostic significance in superficial urinary bladder cancer. *J Pathol* **188**, 44-50, doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199905)188:1<44::AID-PATH320>3.0.CO;2-Q (1999).
- 215 Liukkonen, T. *et al.* Evaluation of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression in the progression of superficial bladder cancer. Finbladder Group. *Urol Res* **28**, 285-292 (2000).
- 216 Shariat, S. F., Ashfaq, R., Sagalowsky, A. I. & Lotan, Y. Association of cyclin D1 and E1 expression with disease progression and biomarkers in patients with nonmuscle-

- invasive urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol* **25**, 468-475, doi:10.1016/j.urolonc.2006.09.011 (2007).
- 217 Massague, J. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 616-630, doi:10.1038/nrm3434 (2012).
- 218 Kubiczikova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R. & Sevcikova, S. TGF-beta - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med* **10**, 183, doi:10.1186/1479-5876-10-183 (2012).
- 219 Fan, Y. *et al.* TGF-beta-induced upregulation of malat1 promotes bladder cancer metastasis by associating with suz12. *Clin Cancer Res* **20**, 1531-1541, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1455 (2014).
- 220 Hung, T. T., Wang, H., Kingsley, E. A., Risbridger, G. P. & Russell, P. J. Molecular profiling of bladder cancer: involvement of the TGF-beta pathway in bladder cancer progression. *Cancer Lett* **265**, 27-38, doi:10.1016/j.canlet.2008.02.034 (2008).
- 221 Eder, I. E. *et al.* Expression of transforming growth factors beta-1, beta 2 and beta 3 in human bladder carcinomas. *Br J Cancer* **75**, 1753-1760 (1997).
- 222 Claesson-Welsh, L. & Welsh, M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med* **273**, 114-127, doi:10.1111/joim.12019 (2013).
- 223 Niu, G. *et al.* Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* **21**, 2000-2008, doi:10.1038/sj.onc.1205260 (2002).
- 224 Rius, J. *et al.* NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* **453**, 807-811, doi:10.1038/nature06905 (2008).
- 225 Bernardini, S. *et al.* Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer. *J Urol* **166**, 1275-1279 (2001).
- 226 Crew, J. P. *et al.* Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* **57**, 5281-5285 (1997).
- 227 Fauconnet, S. *et al.* Expression analysis of VEGF-A and VEGF-B: relationship with clinicopathological parameters in bladder cancer. *Oncol Rep* **21**, 1495-1504 (2009).

# 10 ŽIVOTOPIS

## MARINA DEGORICIJA

Medicinski Fakultet, Šoltanska 2, Split, 21000, Hrvatska | 0038521557880 | marina.degoricija@mefst.hr

### OBRAZOVANJE

Sveučilište u Splitu, Medicinski Fakultet, Hrvatska

**Poslijediplomski studij-Biologija Novotvorina**

**2009 – Danas**

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-Matematički Fakultet, Hrvatska

**Diplomski studij Molekularne Biologije, *Biologiae ingeniarius diplomate probatus***

**- *sectione Biologiae molecularis***

**2002 –**

**2008**

Diplomski rad: "Characterization of murine embryonic fibroblasts with impaired phosphoinositide 3-kinase beta function"

### RADNO ISKUSTVO

Sveučilište u Splitu, Medicinski Fakultet, Zavod za Imunologiju I Medicinsku Genetiku

Znanstveni novak-Asistent

**2009 – Danas**

Područje rada: **Uloga upalnih procesa u nastanku tumora mokraćnog mjehura**

Mentor: prof.dr.sc. Janoš Terzić

Institute of Pharmacology and Toxicology, Vetsuisse Faculty, Zürich, Switzerland

Kolaboracijski posjet

**6/2012 – 9/2012**

Funkcionalna karakterizacija protein DVC1 u popravku DNA.

Voditelj projekta: dr.sc. Kristijan Ramadan

Institute of Biochemistry II, Goethe University Medical School, Frankfurt am Main, Germany

Kolaboracijski posjet

**3/2012 – 6/2012**

Biokemijska analiza protein DVC1

Voditelj projekta: Ivan Đikić, MD, PhD

University of Torino, Molecular Biotechnology Center, Department of Genetics, Biology and

Biochemistry, Torino, Italy

Diplomant

**2007 – 2008**

Uloga fosfoinozimid-3 kinaze beta u fibroblastima te ERBB2- uzrokovanim tumorima.

Sterilnost PI3K-beta miševa. PI3K gamma inhibitori.

Mentor: prof.dr.sc. Emiio Hirsch

### PUBLIKACIJE

- Lessel D, Vaz B, Halder S, Lockhart PJ, Marinovic-Terzic I, Lopez-Mosqueda J, Philipp M, Sim JC, Smith KR, Oehler J, Cabrera E, Freire R, Pope K, Nahid A, Norris F, Leventer RJ, Delatycki MB, Barbi G, von Ameln S, Högel J, **Degoricija M**, Fertig R, Burkhalter MD, Hofmann K, Thiele H, Altmüller J, Nürnberg G, Nürnberg P, Bahlo M, Martin GM, Aalfs CM, Oshima J, Terzic J, Amor DJ, Dikic I, Ramadan K, Kubisch C: [Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features](#). Nat Genet. 2014 Nov;46(11):1239-44.
- Paradzik M, Bucevic-Popovic V, Situm M, Jaing CJ, **Degoricija M**, McLoughlin KS, Ismail SI, Punda-Polic V and Terzic J: [Association of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus \(KSHV\) with bladder cancer in Croatian patients..](#) Tumour Biol. 2014 Jan;35(1):567-72.
- **Degoricija M**, Situm M, Korać J, Miljković A, Matić K, Paradzik M, Marinović Terzić I, Jerončić A, Tomić S, Terzić J: [High NF-κB and STAT3 activity in human urothelial carcinoma: a pilot study](#). World J Urol. 2014 Dec;32(6):1469-75