

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní program: Experimentální chirurgie



MDDr. et MUDr. Jaroslav Valach

Glykobiologie nádorů hlavy a krku

Glycobiology of the head and neck cancer

Typ závěrečné práce: Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Karel Smetana ml., DrSc.

Praha, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

Souhlasím – Nesouhlasím *

V Praze, 4. 4. 2013

Jaroslav Valach

Podpis

Identifikační záznam:

Valach, Jaroslav, *Glykobiologie nádorů hlavy a krku. [Glycobiology of the head and neck cancer]*. Praha, 2013. **Počet stran 28**, bez příloh. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika ústní čelistní a obličejové chirurgie VFN a 1. LF UK. Školitel Smetana, Karel.

Abstrakt

Glykobiologie představuje progresivně se rozvíjející obor buněčné biologie. Interakce protein-sacharid nemá jenom organizační a podpůrnou funkci, ale je kódujícím a selektivním faktorem. Galektiny, skupina živočišných lektinů (proteinů vázajících sacharidy), které mají vysokou afinitu k β -galaktosidům, se v buňce podílejí na široké škále dějů. Galektiny ovlivňují mezibuněčné interakce, transmembránovou signalizaci, apoptózu, sestřih pre-mRNA a jejich přítomnost byla potvrzena i v celé řadě nádorů. Ve stromatu nádorů vycházejících z dlaždicového epitelu je galektin-1 exprimován ve vysoké míře. V předchozích studiích jsme prokázali, že přechod fibroblastů na myofibroblasty, kromě už známého TGF- β , je indukován i galektinem-1. Studovali jsme vztah mezi expresí galektinu-1, přítomností myofibroblastů a genovou expresí vybraných genů v klinickém materiálu získaném peroperačně z dlaždicových karcinomů hlavy a krku. Prokázali jsme zvýšenou expresi galektinu-1 ve stromatu nádorů, které obsahovaly myofibroblasty oproti nádorům bez jejich přítomnosti. Pomocí genomického přístupu za použití mikrochipové analýzy byl vyhodnocen transkriptom na celogenomové úrovni u tumorů s vysokou expresí galektinu-1 a u tumorů bez tohoto lektinu. Pozornost se soustředila na geny spojené se špatnou prognózou vývoje onemocnění (*MAP3K2*, *TRIM23*, *PTPLAD1*, *FUSIP1*, *SLC25A40* a *SPIN 1*). Zvýšená exprese galektinu-1 byla ve shodě se zvýšenou expresí těchto genů. Dále jsme sledovali přítomnost galektinu-9 u zdravé a nádorové tkáně z oblasti hlavy a krku a jeho vliv na expresi diferenciačních znaků, keratinů 14 a 19. Buňky ze stratum basale zdravé tkáně (obsahující proliferující buňky) obsahovaly galektin-9. Nádorová tkáň byla vždy galektin-9 negativní. Nejpočetnější buněčnou složkou nádorového stromatu jsou nádorově asociované fibroblasty (CAF). Jejich biologická aktivita ovlivňuje vlastnosti nádorů. Pomocí analýzy transkriptomu (Illumina) jsme určili skupinu 560 genů, které jsou rozdílně exprimované u zdravých a CAF fibroblastů. Vybrané proteiny IGF-2 a BMP 4 produkované CAF mají schopnost měnit fenotyp zdravých epitelových buněk, které získají znaky nádorových buněk. Zkoumali jsme, jak se mění genová exprese CAF oddělených inzertovým systémem od zdravých a maligních epiteliálních buněk. Exprese zánětlivých chemokinů IL-8 a CXCL-1 byla u CAF kontinuální na rozdíl od zdravých fibroblastů, kde byla exprese chemokinů pouze dočasná.

Závěrem lze konstatovat, že naše výsledky potvrdily, že existuje významný vztah mezi vlastnostmi stromatu a expresí genů spojených s vývojem onemocnění u dlaždicových karcinomů hlavy a krku.

Klíčová slova: galektin, nádorově asociované fibroblasty, nádorové stroma

Abstract

Glycobiology represents a very progressive subject of cell biology. Protein-saccharide interactions play not only supporting and cell organization role, but they also represent medium for information storage and its decoding. Galectins, group of animal lectins (saccharide-binding proteins), which have selective affinity to β -galactosides, are multifactorial molecules. They participate in cell-cell and cell-matrix interaction, transmembrane signaling, apoptosis, pre-mRNA splicing and are also present in various types of carcinomas. High expression of galectin-1 has been detected in cancer stroma originated from squamous cell epithelium. In the previous study we established that the fibroblasts - myofibroblasts transition, apart from the known TGF-beta, is also induced by galectin-1. We compared relationship between galectin-1 expression, presence of myofibroblasts and gene expression in tissue samples from patients with head and neck squamous cell carcinoma. Cancer stroma with myofibroblasts was rich in galectin-1 expression in comparison with stroma without myofibroblasts. Moreover, we used microarray analysis (ILLUMINA) to compare the whole genome transcriptome from samples with and without presence of galectin-1. High expression of galectin-1 in tissue samples corresponded with expression of selective genes (*MAP3K2*, *TRIM23*, *PTPLAD1*, *FUSIP1*, *SLC25A40* a *SPIN 1*) representing markers of poor prognosis for the patients with this type of tumor. The biological function of galectin-9 is still not well known. In this thesis we also looked at presence of galectin-9 in relation with expression of differentiation cell markers such as keratin-14 and keratin-19. Cells from the basal layer of epithelium always expressed galectin-9 although the cancer tissue was negative. Most abundant cell types in cancer stroma are cancer associated fibroblasts (CAF). Illumina transcriptoma analysis showed that 560 genes are expressed differently in normal fibroblasts compared to CAF. Two selected proteins, BMP-4 and IGF-2, are able to change the phenotype of normal keratinocytes which acquired cancer cell-like properties. In this context, we used transwell membrane system to look at biological activity of CAF under influence of normal and cancer cells during a long time period. Expression of inflammation chemokines IL-8, CXCL-1 by CAF was continual in contrast with normal fibroblasts which was just temporary. Finally, we may conclude that relation between biological activity of cancer stroma and expression of genes is important in progression of head and neck squamous cell carcinoma.

Key words: galectin, cancer associated fibroblasts, tumor stroma

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Karlu Smetanovi, ml., DrSc., za pomoc při přípravě, zpracování a vyhodnocení vzorků, za odborné připomínky, podnětné návrhy a podporu při vedení disertační práce. Velice také děkuji prof. MUDr. Jiřímu Mazánkovi, DrSc., a prof. MUDr. Janu Betkovi, DrSc., za vytvoření optimálních podmínek pro odběr vzorků na klinice Ústní, čelistní a obličejové chirurgie VFN a 1. LF UK a klinice Otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole.

Děkuji také mým nejbližším spolupracovníkům z Anatomického ústavu RNDr. Barboře Dvořánkové, PhD., MUDr. Lukáši Lacinovi, PhD., RNDr. Pavlu Szabovi, PhD., a z Ústavu molekulární genetiky AV ČR vvi. pak Ing. Hynku Strnadovi, PhD., a Mgr. Michalu Kolářovi, PhD.

Rukopis této práce laskavě přečetl a připomínkami opatřil prof. MUDr. Jiří Mazánek, DrSc., za což mu patří můj dík.

Za vynikající technickou asistenci při zpracování materiálu děkuji paní Marii Jindrákové a Radaně Kavkové.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantových projektů IGA MZ České republiky NT 13-488 a Univerzity Karlovy v Praze, projekty PRVOUK 27-1, SVV a UNCE 204013.

Seznam zkratek

CAF - *cancer-associated fibroblast*

CRD - *carbohydrate recognition domain*

CXCL1/GRO α – *cytokine*

BMP-4 - *bone morphogenetic protein*

ECM - *extracellular matrix*

EMT - *epithelial-mesenchymal transition*

IGF-2 - *insulin-like growth factor*

IL-8 - *interleukin*

K-14,-19 - *keratin*

TGF- β - *transforming growth factor β*

α -SMA - *α smooth muscle actin*

Obsah

PROHLÁŠENÍ.....	I
ABSTRAKT	II
PODĚKOVÁNÍ	IV
SEZNAM ZKRATEK.....	V
1 ÚVOD	2
2 GLYKOKÓD	4
3 LEKTINY.....	6
4 GALEKTINY.....	7
5 NÁDOROVÉ STROMA	8
6 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	10
7 MATERIÁL A METODIKA	11
8 VÝSLEDKY.....	13
8. 1 Funkce vybraných členů rodiny endogenních lektinů v možné etiopatogenezi nádorů.	14
8. 1. 1 <i>Stromální galektin-1 a myofibroblasty jako prognostický faktor nádorů hlavy a krku</i>	14
8. 1. 2 <i>Ztráta galektinu-9 u dlaždicových epitelů karcinomů hlavy a krku (ref. 1).....</i>	16
8. 2 Stanovení rozdílu transkriptomu normálních fibroblastů a fibroblastů izolovaných z nádorů hlavy a krku (ref. 2)	17
8. 3 Porovnání vlivu normálních a nádorových epitelových buněk na normální fibroblasty a fibroblasty připravené z nádorů (ref. 3).....	18
9 DISKUSE	19
10 SPLNĚNÍ CÍLŮ DISERTAČNÍ PRÁCE.....	20
10 POUŽITÁ LITERATURA	21

1 Úvod

Dlaždicové karcinomy hlavy a krku jsou zhoubné epiteliální novotvary vznikající maligní transformací buněk epitelů sliznic horní části dýchacího a trávicího systému. Tvoří 85-90 % všech zhoubných nádorů hlavy a krku. Celosvětovou incidencí kolem 500 000 nových případů ročně se řadí na 5. místo v četnosti mezi lidskými malignitami. Jsou charakterizovány lokální agresivitou, častým regionálním lymfatickým metastazováním a méně často metastazováním vzdáleným, časnými recidivami a vysokou frekvencí výskytu mnohočetných nádorů. Z rizikových faktorů se na vzniku těchto nádorů podílí kouření a abusus alkoholu, zejména destilátů (Plzák et al, 2010).

I přes pokroky v diagnostice a zavedení nových kombinovaných léčebných postupů (chirurgie, radioterapie, chemoterapie, biologická léčba) nedošlo v posledních dekádách k výraznému zlepšení prognózy pacientů s délkou pětiletého přežití na hranici 50 %. Tato statistika řadí dlaždicové karcinomy mezi malignity s nejhůrší prognózou.

Běžně užívané prognostické znaky (TNM staging, histopatologický grading, extranodální šíření, vaskulární a perineurální šíření, celkový zdravotní stav nemocného, performance status atd.) v řadě případů selhávají. Jedinými specifickými prognostickými znaky rutinně užívanými při plánování léčebného postupu jsou tak i nadále lokalizace a rozsah onemocnění spolu s patologickými charakteristikami. Nádory však vykazují značnou heterogenitu biologického chování a nezdíka se u pacientů s onemocněním ve shodném stádiu setkáváme s odlišnou odezvou na léčbu. Z tohoto hlediska je nutné definovat nové znaky lépe charakterizující onemocnění a odpověď na terapii. V současnosti je velké úsilí zaměřeno na objasnění molekulárních dějů spojených se vznikem nádorů a stejně tak na identifikaci molekulárních znaků lépe popisujících jejich biologické chování. Definování těchto tzv. biologických markerů by mělo napomoci při výběru účinného minimálně zatěžujícího léčebného postupu.

V posledních letech se vědecké úsilí v pochopení povahy nádorů soustřeďuje na jednotlivé molekulárně-biologické znaky dlaždicových karcinomů. Do současnosti byla na molekulární úrovni popsána řada parametrů vykazujících vztah k biologickému chování dlaždicových karcinomů hlavy a krku. K nejslibnějším patří především diferenciační znaky jako například keratin 8, keratin 19, proliferační znak Ki67, proteiny řídící buněčný cyklus, jako cykliny, cyklin dependentní kinázy a jejich inhibitory, proteiny rodiny p53, komponenty extracelulární matrix a proteázy např. matrix-metaloproteinázy, dále růstové faktory a jejich receptory, EGFR a TGFβ. K zajímavým znakům patří i glykobiologické parametry, především exprese endogenních lektinů a jejich vazebných míst (Plzák et al, 2010).

Předložená disertace se zabývá lidskými endogenními lektiny a jejich vazebnými epitopy u dlaždicových nádorů hlavy a krku v porovnání s normálními zdravými epitely, s důrazem na pochopení a objasnění úlohy těchto lektinů v epitel-mezenchymové interakci nádorového parenchymu a stromatu.

2 Glykokód

Pochopení významu sacharidů a jejich konjugátů vedlo k vytvoření nových pojmů v buněčné biologii jako je např. glykofenotyp nebo glykokód (Gabius, 2009).

Sacharidy jsou nejpočetnější skupinou organických molekul a jsou považovány za jednu ze základních stavebních jednotek živé přírody, kde mají mnoho rozdílných biologických funkcí (Varki, 1993). Hrají roli nejen jako energetické rezervoáry, ale mají i úlohu strukturální a v posledních letech je zkoumána také jejich role při ukládání a přenosu informace. Přestože sacharidy nejsou primárním produktem genetické informace, a oproti nukleovým kyselinám a proteinům - jichž více než polovina jsou glykoproteiny (Apweiler et al, 1999) - je přenos takové informace omezený, právě vysoká diverzita glykosidické vazby monosacharidů, tedy velký počet hydroxylových skupin, poskytuje mnohem větší rozmanitost při tvorbě jednotlivých vazeb ve srovnání s nukleotidy či aminokyselinami. Jinými slovy, při zachování identického počtu základních strukturních prvků v řetězci přesahuje informační potenciál oligo- a polysacharidů počtem možných permutací možnosti nukleotidů i proteinů.

Pro lepší pochopení velkého informačního potenciálu uveďme jednoduchý příklad. Trinukleotid tvořený čtyřmi typy purinových a pyrimidinových nukleotidů dává 64 možných permutací. Tripeptid tvořený třemi aminokyselinami může existovat ve 20^3 , tedy v 8000 možných permutací. Naproti tomu u trisacharidu, který je složen ze třech přirozeně se vyskytujících monosacharidů, se můžeme setkat s počtem asi 9×10^6 možných isomerů, které mohou dát potenciál pro 9×10^9 možných permutací (Sharon, Lis, 1989, 1993).

Recentní studie dokazují, že biologická informace nesená těmito oligosacharidy může být interpretována specifickými proteiny, tzv. lektiny, které rozpoznávají cukernou doménu. Vzhledem k významné roli oligosacharidů v úloze přenosu epigenetické informace hovoří někteří autoři o tzv. **glykokódu** (Gabius et al, 2002). Cukerný kód má pak několik rovin. První úroveň můžeme chápat jako sekvenci monosacharidů v oligo- či polysacharidovém řetězci, která je dále ovlivněna konformací. Druhou úroveň představuje větvení sacharidových řetězců a třetí lokalizace v prostoru a čase, exprese specifických glykokonjugátů může být typická pouze pro určitý stupeň vývoje či diferenciace. Přítomnost či absence určitých glykokonjugátů se může také vázat pouze na konkrétní stav např. při nemoci (Schachter, 1999; Gabius et al, 2002). V moderní biologii se výzkum sacharidového kódu jako cíle selektivně působících terapeutik stal pravděpodobně hlavním předmětem základního i aplikovaného výzkumu sacharidů.

O tom, že sacharidy jsou mimořádně důležitou skupinou přírodních látek, svědčí i skutečnost, že za jejich výzkum byly uděleny tři Nobelovy ceny: Hermanu Emilu Fischerovi (1912) za syntézu sacharidů a purinů, Walteru Normanu Harworthovi (1937) za syntézu sacharidů a vitamínu C a Luisu Frederiku Leloirovi (1970) za objev nukleotidů a jejich významu pro biosyntézu sacharidů.

3 Lektiny

V živém organismu je neustálá potřeba dorozumívání se na buněčné úrovni. Buněčné rozpoznávání je základem většiny biologických dějů, jako je například vývoj zárodku, interakce patogenu s buněčnými povrchy a imunitní odpověď. Nezastupitelná je jeho role v rozšiřování nádorových buněk v organismu. Aby tyto procesy vůbec probíhaly, musí mít organismus k dispozici receptor („čtecí zařízení“), což jsou často proteiny buněčných povrchů, které obvykle postrádají katalytickou aktivitu enzymů. V glykobiologii jsou touto receptorovou molekulou lektiny. Ty specificky rozeznávají cukerný motiv a v něm uloženou informaci. K tomu, aby látka mohla plnit funkci nositele informace, musí splňovat několik požadavků. Jednak musí být přítomno specifické kódování (informace musí být jednoznačná a musí být i dešifrovatelná s nízkou pravděpodobností špatné interpretace). Dále musí být šifrovací sekce biomolekuly poměrně malá, aby její syntéza nebyla energeticky náročná, a musí být také prostorově snadno přístupná. Konečně kódovací sloučeniny musejí mít dostatečný potenciál pro rychlé strukturální změny. Všechny tyto požadavky splňují sacharidy v míře více než dostatečné (Sharon, 2007).

Lektiny jsou proteiny odlišné od imunoglobulinů, které vážou mono-, oligo- a polysacharidy reverzibilně a s vysokou specifitou, ale současně nevykazují žádnou katalytickou aktivitu. Každý lektin obsahuje typicky jednu, častěji dvě a více domén rozpoznávajících sacharidy (tzv. *carbohydrate recognition domain*, CRD). Když reagují s buňkami, vážou nejen sacharidy na jejich povrchu, ale vyvolávají i zesíťování buněk a jejich následné shlukování - aglutinaci. Tato vlastnost je charakteristická a základní pro všechny lektiny. Tento děj je inhibován sacharidovými ligandy, pro které jsou lektiny specifické. Receptory lektinového typu se vyskytují ve všech organismech, od virů a bakterií přes rostliny až k živočichům a savcům. Tvoří heterogenní skupinu oligomerních proteinů, které se liší velikostí, strukturou i stereochemií svých CRD domén, ale lze vystopovat jisté podobnosti v sekvencích aminokyselin. Lektiny byly poprvé izolovány z rostlin, dnes jsou však známy u všech organismů, včetně člověka (Sharon, 2004; Loris, 2002).

Lektiny se formálně člení na jednoduché a mozaikové. Jednoduché mají molekulovou hmotnost pod 40 kDa a vedle CRD mohou obsahovat další domény. Řadí se mezi ně všechny rostlinné a z živočišných lektinů dnes hojně studované galektiny (dříve zvané S-lektiny). Mozaikové lektiny obsahují několik druhů vazebných míst, z nichž jenom jedno má vlastnosti CRD. Patří sem virové hemoaglutininy na jedné straně a živočišné C-, P- a I-lektiny na straně druhé (Crocker et al, 1998).

4 Galektiny

Galektiny jsou evolučně velmi konzervativní živočišné lektiny, které jsou popsány nejen u obratlovců a bezobratlých, ale i u virů. Galektiny jsou charakterizovány vysokou vazebnou afinitou k β -galaktosidům, přítomností specifických sekvenčních úseků v CRD doméně, divalentností či schopností multivalentních vazeb nebo až možností zesíťování ligandů na buněčné membráně nebo v extracelulární matrix.

Galektiny se klasicky dělí podle struktury do tří podskupin (Hirabayashi, 1993; Cooper, 2002; Houzelstein et al, 2004):

I) „*prototype*“ – s jednou CRD doménou (Galektin-1,-2,-5,-7,-10,-13,-14), většinou existují jako dimery;

II) „*tandem repeat*“ – s dvěma různými CRD doménami na téže polypeptidovém řetězci, které jsou vzájemně odlišné a jsou odlišné i od jiných galektinů (Galektin-4,-6,-8,-9,-12);

III) „*chimera*“ – kromě CRD obsahuje ještě jinou doménu (Galektin-3).

Interakce galektinů s jejich glykoligandy není závislá na koncentraci Ca^{2+} iontů (Gabius et al, 1997). Uplatnění galektinů *in vivo* je velmi široké. Prakticky každá buňka disponuje alespoň jedním typem galektinu. Existence jemných rozdílů ve specifitě vazby k různým glykoligandům je zřejmě důvodem, proč jsou v organismech přítomné galektiny, které rozpoznávají velmi podobné spektrum cukerných epitopů. Galektiny se podílí na regulaci proliferace, diferenciaci, apoptózy a hrají roli v mezibuněčné interakci. Řada galektinů působí v imunitních procesech, například v amplifikaci kaskády u zánětlivých pochodů nebo v regulaci autoimunitních dějů (Rabinovich et al, 2002; Buzás et al, 2006).

V dnešní době se také poddhaluje význam galektinů v nádorové biologii (André et al, 1999). Recentní studie dokazují, že některé z charakteristických rysů nádorových buněk jsou spojeny s kvalitativními či kvantitativními odchylkami oligosacharidových sekvencí buněčného povrchu. Galektiny mohou sloužit také jako nezávislý prognostický znak. Například zvýšená cytoplasmatická exprese galektinu-1 a galektinu-3 je popsána u všech typů karcinomů štítné žlázy (Chiariotti et al, 1995) stejně jako u kolorektálního karcinomu (Nagy et al, 2003), kde je prokázán vztah k pokročilému stádiu a ke kratší době přežití. Obdobně výskyt galektinu-3 u karcinomu prsu (Moisa et al, 2007) je spojen s horší prognózou onemocnění.

5 Nádorové stroma

Známa teorie Stephena Pageta „seed and soil“, která postuluje závislost nidační a proliferační schopnosti diseminovaných nádorových buněk na vhodných podmínkách vzdáleného prostředí, je historicky první moderní hypotézou, která však nedokáže komplexně postihnout všechny aspekty metastazujícího procesu u jednotlivých typů nádorů (Weinberg, 2007; Fidler et al, 2003).

Pohled na úlohu nádorového stromatu prošel značným vývojem. V dnešní době není nádorové stroma již chápáno jako pouhá pasivní složka nádoru, která plní jen funkci podpůrnou ve vztahu k nádorovému parenchymu, naopak je považováno za důležitý faktor, který ovlivňuje biologickou povahu nádoru. Stroma tvoří tzv. *niche* pro progresi a migraci nádorových buněk, stejně tak umožňuje nidaci pro metastazující buňky. Nádorové stroma představuje velice dynamickou populaci, kde dochází k permanentní remodelaci, degradaci poškozených částí a syntéze částí nových (Li et al, 2007; Egeblad et al, 2010). Nádorové stroma se tak podobá *niche*, které ke své činnosti potřebují kmenové buňky (Watt et al, 2011).

Je již dlouho známo, že nádorové stroma má rozdílnou morfologickou strukturu oproti mezenchymové složce normální tkáně. Nádorové stroma je komplexní tkáň, složená z fibroblastů a extracelulární matrix, cév a různých typů leukocytů (Polyak et al, 2009; Plzák et al, 2010). Poměr a složení buněčné a extracelulární části stromatu není u všech nádorů stejné. Nejpočetnější buněčnou složkou stromatu jsou nádorově asociované fibroblasty. Jejich původ je nejasný. Mohou vznikat z lokálního mesenchymu vlivem parakrinní aktivity nádorových buněk, epitelomezenchymovou transformací nádorových buněk, ale i například z pericytů, makrofágů nebo z cirkulujících mesenchymových kmenových buněk kostní dřeni (Mishra et al, 2009). Nádorově asociované fibroblasty jsou důležitou složkou mikroprostředí podobného *niche*, které je vhodné pro udržování kmenovosti mesenchymových a nádorových kmenových buněk (De Wever et al, 2003; Motlík et al, 2007; Szabo et al, 2011).

Komunikace nádorového stromatu s epitelovou složkou nádoru ústí v jev nazývaný epitelomezenchymová interakce (EMI). Tento biologický děj je pravděpodobně zodpovědný za uvolnění některých predisponovaných nádorových buněk z epitelové složky, jejich transformaci v mezenchymovou buňku, která je pak schopná po transportu cévním řečištěm založit vzdálené metastázy za pomoci opačného děje – mezenchymo-epitelové transformace (MET) (Weinberg, 2007).

Dalším vědecky inspirujícím poznatkem je fakt, že na nádorová onemocnění je v současnosti nahlíženo jako na onemocnění kmenových buněk. Hypotéza tzv. nádorových kmenových buněk (cancer stem cells) byla vyslovena na konci osmdesátých let minulého století.

Je předpokládána existence malé subpopulace nádorových buněk, které mají obdobné vlastnosti jako buňky kmenové. Nádorové kmenové buňky pravděpodobně vykazují nelimitovanou mitotickou aktivitu, schopnost sebeobnovy, repopulace nádoru, vysokou schopnost migrace a rezistence vůči chemoterapeutikům a záření. Je tedy velmi pravděpodobné, že jsou zodpovědné za relaps onemocnění po onkologické léčbě (Ailles et al, 2007). Nádorové kmenové buňky by tak navíc - díky výše uvedeným vlastnostem - mohly být těmi nejvýznamnějšími buňkami, které podstupují epitel-mezenchymovou transformaci a jsou tak připravené založit vzdálenou metastázu. V současné době je již široce akceptováno, že se v nádorovém parenchymu vyskytují tyto buňky s vlastnostmi buněk kmenových – tzv. nádorové kmenové buňky, které se aktivně podílejí na formování a šíření nádoru (Cordon-Cardo, 2010). Je známo, že normální tkáňové kmenové buňky potřebují specifické mikroprostředí, které sehraje zásadní roli při udržování jejich kmenových vlastností. Je tedy vysoce pravděpodobné, že toto specifické mikroprostředí budou vyžadovat i nádorové kmenové buňky. Tímto mikroprostředím by mohlo být právě nádorové stroma. Zvláštní vlastnosti nádorového stromatu tak podporují přežívání nádorových buněk a stimulují růst a šíření nádoru (Li, Neaves, 2006).

Z výše uvedeného vyplývá, že maligní tumory jsou komplexními systémy (Egeblad et al, 2010) a stejně jako normální tkáň obsahují zásobu kmenových buněk (Sell 2010). Stromální mikroprostředí může ovlivňovat biologické vlastnosti nádoru jako je lokální invazivita a metastatický potenciál (Plzák et al, 2010). Poslední výzkumy v oblasti glykobiologie nádorového stromatu naznačily, že právě glykobiologické aspekty interakce nádorové buňky se stromatem představují nadějný cíl nové generace protinádorové terapie (Smetana et al, 2013).

6 Cíle disertační práce

Ve své práci jsem se zaměřil na oblast glykobiologie nádorů hlavy a krku se zřetelem na možné ovlivnění následujících okruhů interakcí nádorových buněk se stromatem. Sledovány byly zejména:

1. Funkce vybraných členů rodiny endogenních lektinů v možné etiopatogenezi nádorů.
2. Rozdíly v transkriptomu normálních fibroblastů a fibroblastů izolovaných z nádorů hlavy a krku.
3. Vlivy normálních a nádorových epitelových buněk na normální fibroblasty a fibroblasty získané z nádorů.

7 Materiál a metodika

Materiál a metody jsou detailně popsány v příložených publikacích. V disertaci je uveden pouze stručný souhrn pro lepší pochopení textu. V rámci disertační práce jsme analyzovali normální tkáně (sliznice hlavy a krku) a z nich vycházející dlaždicové karcinomy. Veškerý materiál byl získán na základě informovaného souhlasu pacienta, jehož text byl schválen příslušnou etickou komisí spolupracujícího zdravotnického zařízení (Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a Fakultní nemocnice v Motole) v souladu s principy bioetiky ve smyslu Helsinské konvence.

Tkáně byly buď zmrazeny a histologicky zpracovány, nebo byly použity jako zdroj buněk pro kultivační experimenty. Jako zdroj normálních fibroblastů a keratinocytů byly za stejných podmínek použity zbytkové kůže po plastických operacích (Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha). Kromě toho byly použity i standardní komerčně dostupné buněčné linie (3T3, HaCaT, FaDu). Zjišťované proteiny byly znázorňovány metodou nepřímé imunofluorescence. Použité protilátky byly buď komerčně dostupné, nebo byly připraveny v laboratoři spolupracujícího pracoviště (Hans-Joachim Gabius, Universita Ludwiga Maximiliana, Mnichov). Kontrolní reakce pro ověření specificity použitých protilátek prvního kroku byly provedeny nahrazením izotypovou protilátkou proti antigenu, který se v příslušných buňkách/tkáních nevyskytuje, čímž bylo vyloučeno riziko falešně pozitivní reakce podmíněné interakcí Fc fragmentu protilátky s Fc receptorem. Kromě toho bylo jako kontroly užito i úplné vynechání protilátky prvního kroku. Vazebná místa pro galektiny byla znázorněna pomocí biotinylovaných rekombinantních galektinů rovněž připravených v laboratoři H.-J. Gabiuse. Na Ústavu hematologie a krevní transfúze (pod vedením RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.) byla prováděna korelace získaných dat s HPV statusem pacientů. Sada vzorků byla též podrobena analýze transkriptomu na celogenomové úrovni (ILLUMINA) v Ústavu molekulární genetiky Akademie věd (pod vedením RNDr. Čestmíra Vlčka, CSc.).

Vzorky na genetickou analýzu byly ošetřeny pomocí RNA Later (Ambion Inc, USA), který ochraňuje RNA před nežádoucí degradací, a hluboce zmrazeny v tekutém dusíku. Do dalšího zpracování byly uchovány v -80°C . Ze vzorků byly připraveny řezy o síle $10\ \mu\text{m}$ a z nich extrahována celková RNA pomocí kitu RNeasy Micro Kit (QIAGEN INC, USA) a ve dvou krocích přepsána do cRNA kitem Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion Inc, USA). Zdravé fibroblasty a zdravé interfolikulární keratinocyty byly připraveny ze vzorků normální lidské kůže z hrudníku (Lacina et al, 2007). Buňky dlaždicového karcinomu hypofaryngu linie FaDu (HTB-43, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) byly kultivovány za standardních podmínek (Smetana et al, 2008). Pomocí insertového systému, kde

jsou obě buněčné populace odděleny membránou (Transwell Inserts, Corning, Acton, USA), která umožní průnik proteinů v kultivačním médiu, byly kokultivovány normální dermální fibroblasty spolu s normálními keratinocyty či FaDu nádorovými buňkami. Po desetidenní kultivaci byla z fibroblastů izolována RNA. Pomocí systému Beadstation 500 (Illumina, USA) byl hodnocen transkripční profil všech studovaných nádorů a normálních tkání, normálních kultivovaných fibroblastů a fibroblastů kultivovaných pod vlivem zdravých keratinocytů a pod vlivem nádorových buněk FaDu.

Pro imunohistochemickou analýzu byly všechny vzorky uchovány v tkáňovém médiu Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, The Netherlands) a byly zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -80°C . Řezy o síle $10\ \mu\text{m}$ jsme připravili pomocí Cryocut-E (Reichert-Jung, Vienna, Austria). Užíváno bylo dvou základních metod. Jednak imunocyto- a imunohistochemie k detekci příslušných endogenních lektinů či jiných proteinových markerů. A dále reverzní lektinové cyto- a histochemie k průkazu endogenních vazebných míst pro užité sacharidové znaky.

Vzorky jsme po vyjmutí z tkáňového média a omytí ve fosfátovém pufovacím roztoku (PBS, pH 7,3) obarvili standardně pomocí hematoxylinu-eosinu k posouzení základních histopatologických charakteristik. Vzorky pro imunofluorescenční vyšetření jsme dále fixovali pomocí 4% paraformaldehydu po dobu pěti minut a opláchli opět v PBS. Prasečí sérum (DAKO, Glostrup, Denmark) jsme použili jako blokační agens k prevenci vazby protilátek cestou interakce Fc oblastí imunoglobulinů s buněčnými Fc receptory. Galektiny jsme imunohistochemicky detekovali specifickou králičí polyklonální protilátkou z domácí produkce (H.-J. Gabius). Keratiny, hladký svalový aktin a CD 45 jsme detekovali myší monoklonální protilátkou (DAKO, resp. Sigma Aldrich, Praha, Česká republika). Výsledek imunohistochemické reakce byl vizualizován TRITC či FITC značenou sekundární protilátkou. Jádra byla standardně obarvena DAPI (Sigma Aldrich) a řezy či buňky byly montovány za použití média Vectashield (Vector Laboriem, Burlingame, CA, USA) a vyšetřovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon-Eclipse. Data byla analyzována pomocí programu Lucia 5.1 (Laboratory Imaging, Praha, Česká republika).

Produkce cytokinů do kultivačního média byla zjišťována komerčně dostupnými ELISA kity dle pokynů distributora.

8 Výsledky

Výsledky jsou detailně uvedeny a diskutovány v následujících publikacích:

- Fík Z., **Valach J.**, Chovanec M., Mazánek J., Kodet R., Kodet O., Tachezy R., Foltynová E., André S., Kaltner H., Gabius H.J., Smetana K., Jr. *Loss of adhesion/growth-regulatory galectin-9 from squamous cell epithelium in head and neck carcinomas*. J Oral Pathol Med. 42: 166-173 (2013) (IF-2011: 1,628).
- Strnad H., Lacina L., Kolář M., Čada Z., Vlček C., Dvořánková B., Betka J., Plzák J., Chovanec M., Šáchová J., **Valach J.**, Urbanová M., Smetana K., Jr. *Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes*. Histochem Cell Biol. 133: 201-211 (2010) (IF-2010: 4,727), počet citací: 8 (dle WOS, s vyloučením autocitací).
- Szabo P., **Valach J.**, Smetana K., Jr, Dvořánková B. *Comparative analysis of production of IL-8 and CXCL-1 by normal and cancer stromal fibroblasts*. Folia Biol. In press (2013) (IF-2011: 1,151).
- **Valach J.**, Fík Z., Strnad H., Chovanec M., Plzák J., Čada Z., Szabo P., Šáchová J., Hroudová M., Urbanová M., Šteffl M., Pačes J., Mazánek J., Vlček Č., Betka J., Kaltner H., André S., Gabius H.J., Kodet R., Smetana K., Jr., Gál P., Kolář M. *Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor-prognosis factors*. Int J Cancer 131: 2499-2508 (2012) (IF-2011: 5,444).

8. 1 Funkce vybraných členů rodiny endogenních lektinů v možné etiopatogenezi nádorů.

8. 1. 1 Stromální galektin-1 a myofibroblasty jako prognostický faktor nádorů hlavy a krku

(ref. 4)

V této práci jsme se zaměřili na účinek galektinu-1 jako faktoru indukujícího tvorbu stromálních myofibroblastů a extracelulární matrix. Galektin-1 je bohatě zastoupen v nádorovém stromatu. (Lacina et al, 2007a; Saussez et al, 2009). V jiných pracích byla navíc popsána jeho vysoká exprese i v granulační tkáni hojící se rány u prasete domácího a potkana (Klíma et al, 2009; Gál et al, 2011). Zároveň má vysokou afinitu k $\alpha 5\beta 1$ integrinu a hraje tak významnou roli v buněčné adhezi a proliferaci (André et al, 2007; Wang et al, 2009).

Celkově jsme analyzovali 31 vzorků dlaždicových karcinomů hlavy a krku. Převažovaly nádory patologické klasifikace T2 s histologickým stupněm G2. Do kategorie N0 bez uzlinového postižení spadalo 42 %, do kategorií N1 a N2 shodně po 35 % testovaných nádorů. Všichni pacienti byli klasifikováni jako M0, tzn. v době diagnózy nebyly prokázány vzdálené metastázy. Lokalizací převažoval karcinom tonzily. Ve vzorcích normální tkáně a resekčního okraje nebyly přítomny myofibroblasty obsahující hladký svalový aktin (SMA). Ve vzorcích nádorů byly myofibroblasty přítomny ve více než 60 %. Kolokalizací SMA s endotelovým markerem CD 31 jsme byli schopni odlišit myoblasty cév od myofibroblastů. Nebyl prokázán vztah mezi klinickým stádiem nádorů a histologickým stupněm na jedné straně a SMA-pozitivitou na straně druhé. Žádná statisticky signifikantní vazba nebyla prokázána ani mezi detekcí HPV viru a SMA pozitivitou nádorově asociovaných fibroblastů. Většina karcinomů tonzily byla SMA pozitivních, zatímco nádory s SMA negativními nádorově asociovanými fibroblasty byly lokalizovány v dutině ústní, faryngu a na měkkém patře.

Přítomnost galektinu-1 při imunofluorescenčním vyšetření byla silně pozitivní ve stromatu všech nádorů s přítomností myofibroblastů. V nádorovém stromatu, kde byla prokázána absence SMA pozitivních myofibroblastů, byla pozitivita signálu velmi slabá nebo vůbec žádná. Již dříve prokázaly práce naší laboratoře antagonistickou povahu galektinu-3 vůči galektinu-1. V testovaných vzorcích byl epitel zdravé tkáně a resekčního okraje galektin-3 pozitivní, zatímco nádorový epitel byl negativní nebo byla pozitivita signálu pro galektin-3 velmi slabá. Žádný fluorescenční signál pro galektin-3 nebyl pozorován v nádorovém stromatu bohatém na myofibroblasty. Tím bylo prokázáno, že přítomnost galektinu-1 je specifická a nejedná se o vlastnost danou všem členům rodiny galektinů. Na úrovni mRNA exprese galektinu-1 a přítomnost myofibroblastů v normální tkáni pozitivně korelovaly. Naproti tomu v nádorech byla tato korelace ztracena. Tuto ztrátu lze vysvětlit přítomností dalšího zdroje SMA, kterým jsou myofibroblasty ve stromatu nádoru. Podobně u angiogeneze reprezentované přítomností

růstových faktorů VEGF a EDN1 byla prokázána statisticky významná korelace s expresí galektinu-1 u tumorů obsahujících SMA negativní fibroblasty. Naopak u nádorů, kde se vyskytují SMA pozitivní nádorově asociované fibroblasty, tato korelace prokázána nebyla. Výsledky jednoznačně potvrdily přítomnost interdisciplinárního přístupu při vyšetření vzorků nádorů.

Dvacet jedna vzorků z našeho souboru s imunofluorescenčně definovanou přítomností galektinu-1 ve stromatu a četnými SMA exprimujícími nádorově asociovanými fibroblasty bylo analyzováno pomocí mRNA mikrochipové analýzy, kdy byl vyhodnocen transkriptom na celogenomové úrovni u tumorů s vysokou expresí galektinu-1 a u tumorů bez tohoto lektinu. U nádorů s bohatou expresí galektinu-1 s četnými myofibroblasty jsme identifikovali šest transkriptů *MAP3K2*, *TRIM23*, *PTPLAD1*, *FUSIP1*, *SLC25A40* a *SPIN1* se známým negativním prognostickým významem. Tyto transkripty byly signifikantně zvýšeny společně s expresí galektinu-1. Jako statisticky významný byl zaznamenán rozdíl v expresi těchto genů u nádorů SMA pozitivních a SMA negativních v korelaci s přítomností genu pro galektin-1.

Vzhledem k úvahám o nádoru jako ráně, která se nehojí (Dvorak, 1986) se nabízí otázka, zda se galektin-1 nemůže podílet na vzniku myofibroblastů jako buněčného elementu typického jak pro nádorové stroma, tak pro hojící se ránu. Bylo zjištěno, že galektin-1 indukuje konverzi fibroblastů na myofibroblasty (Dvořánková et al, 2011) s aditivním účinkem k $TGF\beta 1$, který je známým induktorem tohoto procesu (De Wever et al, 2003; Dvořánková et al, 2011).

8. 1. 2 Ztráta galektinu-9 u dlaždicových epitelů karcinomů hlavy a krku (ref. 1)

Galektiny hrají významnou roli v buněčné adhezi a regulaci růstu. V naší další studii jsme se zaměřili na „tandem-repeat“ typ galektin-9, jehož funkce v dlaždicových epitelech nebyla dosud dostatečně zmapována (Chovanec et al, 2005; Čada et al, 2009). Výskyt galektinu-9 byl korelován s expresí známých diferenciacních znaků jako jsou keratin 14 a 19. Výskyt těchto molekul byl sledován u 62 nádorů, u 20 vzorků z okraje chirurgického resektátu a u 32 vzorků normální tkáně z kontralaterální bukální sliznice. Hlavním výsledkem studie je zjištění, že u tří čtvrtin vzorků normální tkáně je exprese galektinu-9 přítomná v bazální vrstvě epitelu obsahující proliferující buňky. Nádorové tkáně byly vždy negativní a okraje resektátu měly z hlediska exprese galektinu mozaikový vzhled. U negativních „normálních“ epitelů byla vždy přítomna exprese obou studovaných keratinů (K14, K19) ve všech vrstvách epitelu, zatímco ve zdravé tkáni jsou tyto keratiny přítomny pouze ve stratum basale.

Tyto výsledky naznačují určitý vztah mezi „normálností“ epitelů a expresí studovaného galektinu. Za velmi důležitý považujeme negativní výsledek z histologicky normálních - ale fenotypově (K14 a K19) aberantních - epitelů bukální sliznice u pacientů s kontralaterální malignitou v dutině ústní. Galektin-9 byl rovněž bohatě zastoupen v infiltrujících leukocytech. Domníváme se, že by se průkazem galektinu-9 mohl rozšířit výčet prognostických znaků u dysplázií dlaždicových epitelů v oblasti hlavy a krku.

8. 2 Stanovení rozdílu transkriptomu normálních fibroblastů a fibroblastů izolovaných z nádorů hlavy a krku (ref. 2)

V předchozích studiích vycházejících z našeho pracoviště jsme ukázali, že fibroblasty připravené ze stromatu dlaždicových nádorů mají vysokou biologickou aktivitu k normálním epitelovým buňkám (Lacina et al, 2007 a, b). Naší otázkou bylo, jaký je rozdíl mezi normálními a z nádorového stromatu získanými fibroblasty. Pomocí metody vyvinuté na našem pracovišti (Lacina et al, 2007 a, b) jsme izolovali z dlaždicového karcinomu fibroblasty a jejich schopnost ovlivnit normální keratinocyty jsme ověřili *in vitro*. Výsledky ukázaly, že fibroblasty izolované z nádoru jsou biologicky aktivní. Z buněk jsme připravili mRNA a pomocí postupů popsanych v metodologické části jsme porovnali transkriptom obou populací fibroblastů. Expresní rozdíl činil 560 genů. Fibroblasty připravené z nádorového stromatu ovlivňují epitelové buňky i po vzájemném oddělení obou populací mikroporézní membránou, soustředili jsme se tedy na produkty genů secernované do okolí buněk. Jako kandidátní molekuly byly určeny IGF-2 a BMP 4. Dále bylo zjištěno pomocí ELISA analýzy, že oba proteiny jsou do kultivačního média produkovány fibroblasty připravenými z nádoru. Navíc přítomnost obou proteinů potvrdil imunofluorescenční průkaz ve vzorcích nádorové tkáně. Ověřili jsme také, že přidání obou faktorů do kultivačního média je schopné ovlivnit diferenciaci zdravých keratinocytů směrem k fenotypu podobnému nádorové tkáni. Uvedené výsledky jsou v souladu s pozorováním ostatních (Ellis et al, 1998; Mathur et al, 2003, Nosho et al, 2005; Sayer et al, 2005; Arciniegas et al, 2006; Grbesa et al, 2006; Trojan et al, 2006; Bendall et al, 2005; Pavelic et al, 2007). Tato studie tak přinesla na komplexní úrovni jedno z prvních celogenomových srovnání transkriptomu obou populací fibroblastů a je základem pro další analýzy.

8. 3 Porovnání vlivu normálních a nádorových epitelových buněk na normální fibroblasty a fibroblasty připravené z nádorů (ref. 3)

Normální dermální fibroblasty i fibroblasty připravené z dlaždicových karcinomů produkují po stimulaci zdravými i nádorovými epitelovými buňkami chemokiny CXCL-1 a IL-8 (Kolář et al, 2012). V této studii bylo prokázáno, že existuje jistá míra podobnosti mezi nádorem a hojící se ránou. Toto pozorování je v souladu i s dnes již klasickou prací Dvoraka (1986). Zároveň je třeba podotknout, že tyto chemokiny jsou schopné stimulovat prozánětlivé prostředí, které podporuje nádorovou progresi (Mishra et al, 2011).

V této studii jsme dále ukázali, že stimulace dermálních fibroblastů normálními i nádorovými epitelovými buňkami je pouze časově omezená. Naproti tomu stimulace fibroblastů připravených z nádorové tkáně a produkce obou chemokinů je dlouhodobá. Tento výsledek může být interpretován odlišností fibroblastů z nádorového stromatu od aktivovaných normálních fibroblastů. Hypoteticky by nádorové fibroblasty mohly mít původ v nádorovém epitelu, z něhož by vznikly výše zmíněným epitelově-mesenchymovým přechodem. Tato interpretace však vyžaduje další experimentální potvrzení.

9 Diskuse

Vzhledem k dřívějším úvahám o určité podobě mezi nádorem a hojící se ránou (Dvorak, 1986) je role biologicky aktivních fibroblastů a epitelo-mesenchymová interakce u obou procesů klíčová. Tyto indukční interakce mezi epitelovými a mezenchymovými buňkami v rámci vzájemné komunikace (cross-talk) zásadním způsobem ovlivňují vývoj dlaždicového epitelu. V biologii nádorů jsou nádorově asociované fibroblasty důležitými buněčnými elementy, které jsou schopné měnit fenotyp zdravých keratinocytů. Na základě našich experimentů, ve kterých byl účinek obou růstových faktorů- IGF-2 a BMP-4- blokován specifickými protilátkami, jsme dospěli k závěru, že může být vzájemná epitelo-mesenchymová interakce u nádorů kontrolovaná a růstové faktory nebo jejich receptory mohou být považovány za potenciální terapeutické cíle.

Nádorové stroma a stroma hojící se rány je bohaté na přítomnost galektinu-1. Zdá se, že galektin-1 se může podílet na vzniku myofibroblastů jako buněčného elementu typického jak pro nádorové stroma, tak pro hojící se ránu. Zjistili jsme, že stromální exprese galektinu-1 má v dlaždicových karcinomech hlavy a krku vztah k přítomnosti myofibroblastů a koreluje s aktivací genů spojených se špatnou prognózou pro pacienta. Galektin-1 indukuje konverzi fibroblastů na myofibroblasty s aditivním účinkem ke známému induktoru TGF- β 1 (De Wever et al, 2003; Dvořánková et al, 2011). Z uvedených nálezů soudíme, že by se galektin-1 mohl uplatnit nejen jako prognostický faktor, ale také při podpoře hojení ran nebo v technologické přípravě myofibroblastů. Málo známý galektin-9 byl přítomen v dlaždicovém epitelu jen ve *stratum basale* s dělícími se buňkami, na rozdíl od nádorů, kde byl vždy negativní. Jeho absence či přítomnost by tak mohla rozšířit výčet prognostických znaků u dysplázií dlaždicových epitelů v oblasti hlavy a krku.

Komunikace mezi nádorovým parenchymem a podpůrným stromatem se děje parakrinním mechanismem produkcí signálních molekul. Jedná se o cytokiny, chemokiny a růstové, proliferační a transformační faktory produkované oběma složkami. Nádorově asociované fibroblasty izolované z dlaždicového karcinomu se liší od normálních fibroblastů v produkci určitých chemokinů (IL-8, CXCL-1) důležitých při formování biologicky aktivního nádorového mikroprostředí. Přerušení komunikace mezi nádorově asociovanými fibroblasty a nádorovými buňkami by mohlo být potenciálním cílem pro budoucí protinádorovou terapii.

10 Splnění cílů disertační práce

V disertační práci jsme prokázali, že:

1) Stromální exprese galektinu-1 má v dlaždicových karcinomech hlavy a krku vztah k přítomnosti myofibroblastů a koreluje s aktivací genů spojených se špatnou prognózou pro pacienta. Exprese galektinu-9 v bazální vrstvě dlaždicového epitelu je možným znakem jeho normálnosti.

2) Fibroblasty izolované ze stromatu dlaždicových karcinomů jsou biologicky aktivní a liší se od normálních fibroblastů v expresi 560 genů. IGF-2 a BMP-4 se zdají být klíčovými pro indukci změny fenotypu normálních keratinocytů do podoby nádorových buněk.

3) Stromální fibroblasty a normální dermální fibroblasty produkují chemokiny IL 8 a CXCL 1. V případě fibroblastů izolovaných z nádoru je tato produkce ve srovnání se situací u normálních fibroblastů prolougovaná. Stromální nádorové fibroblasty tedy odlišně reagují na aktivaci epitelovými buňkami v porovnání s normálními dermálními fibroblasty.

10 Použitá literatura

- Ailles L.E., Weissman I.L. (2007) *Cancer stem cells in solid tumors*. *Curr Opin Biotechnol*. Oct; 18(5): 460-6.
- André S., Kojima N., Yamazaki C., Fink H., Kaltner H., Kayser K., Gabius H.J. (1999) *Galectins-1 and -3 and their ligands in tumor biology*. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 461–474.
- André S., Sanchez-Ruderisch H., Nakagawa H., Buchholz M., Kopitz J., Forberich P., Kemmner W., Böck C., Deguchi K., Detjen K.M., Wiedenmann B., von Knebel Doeberitz M., Gress T.M., Nishimura S.I., Rosewicz S., Gabius H.J. (2007) *Tumor suppressor p16 INK4a: modulator of glycomic profile and galectin-1 expression to increase susceptibility to carbohydrate-dependent induction of anoikis in pancreatic carcinoma cells*. *FEBS J* 274: 3233–3256.
- Apweiler R., Hermjakob H., Sharon N. (1999) *On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database*. *Biochim Biophys Acta*. Dec 6; 1473(1): 4-8.
- Arciniegas E., Neves Y.C., Carrillo L.M. (2006) *Potential role for insulin-like growth factor II and vitronectin in the endothelial-mesenchymal transition process*. *Differentiation* 74(6): 277-92.
- Bendall L. (2005) *Chemokines and their receptors in disease*. *Histol Histopathol* 20: 907–26.
- Buzás E.I., György B., Pásztói M., Jelinek I., Falus A., Gabius H.J. (2006) *Carbohydrate recognition systems in autoimmunity*. *Autoimmunity* 39(8): 691-704.
- Cooper D.N. (2002) *Galectinomics: finding themes in complexity*. *Biochim Biophys Acta* 1572 (2-3): 209-31.
- Cordon-Cardo C. (2010) *Cancer stem cells*. *Ann Oncol* 21 Suppl 7: 93-4.
- Crocker P.R., Clark E.A., Filbin M., Gordon S., Jones Y., Kehrl J.H., Kelm S., Le Douarin N., Powell L., Roder J., Schnaar R.L., Sgroi D.C., Stamenkovic K., Schauer R., Schachner M., van den Berg T.K., van der Merwe P.A., Watt S.M., Varki A. (1998) *Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins*. *Glycobiology*, Feb; 8(2)v-vi.
- Čada Z., Smetana K. Jr., Lacina L., Plzáková Z., Stork J., Kaltner H., Russwurm R., Lensch M., André S., Gabius H.J. (2009) *Immunohistochemical fingerprinting of the network of seven adhesion/growth-regulatory lectins in human skin and detection of distinct tumour-associated alterations*. *Folia Biol (Praha)* 55(4): 145-52.
- De Wever O., Mareel M. (2003) *Role of tissue stroma in cancer cell invasion*. *J Pathol* Jul 200(4): 429-47.

- Dvorak H.F. (1986) *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. *New Engl J Med* 315: 1650-1659.
- Dvořánková B., Szabo P., Lacina L., Gal P., Uhrova J., Zima T., Kaltner H., André S., Gabius H.J., Sykova E., Smetana K. Jr. (2011) *Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair*. *Cells Tissues Organs*, 194(6): 469-80.
- Egeblad M., Rasch M.G., Weaver V.M. (2010) *Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution*. *Curr Opin Cell Biol.*, Oct; 22(5): 697-706.
- Ellis I.R., Schor S.L. (1998) *Differential mitogenic and biosynthetic response of fetal and adult skin fibroblasts to TGF-beta isoforms*. *Cytokine* 10(4): 281-9.
- Fidler I.J. (2003) *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. *Nature Rev Cancer* 3: 453-458.
- Gabius H.J. (1997) *Animal lectins*. *Eur J Biochem*, Feb 1; 243(3): 543-76.
- Gabius H.J., André S., Kaltner H., Siebert H.C. (2002) *The sugar code: functional lectinomics*. *Biochim Biophys Acta* 1572(2-3): 165-77.
- Gabius H.J. (ed) (2009) *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*. Weinheim, Wiley-VCH.
- Gál P., Vasilenko T., Kostelníková M., Jakubco J., Kovác I., Sabol F., André S., Kaltner H., Gabius H.J., Smetana K. Jr. (2011) *Open Wound Healing In Vivo: Monitoring Binding and Presence of Adhesion/Growth-Regulatory Galectins in Rat Skin during the Course of Complete Re-Epithelialization*. *Acta Histochem Cytochem*, 26; 44(5): 191-9.
- Grbesa I., Ivkic M., Pegan B., Gall-Troselj K. (2006) *Loss of imprinting and promoter usage of the IGF2 in laryngeal squamous cell carcinoma*. *Cancer Lett* 18; 238(2): 224-9.
- Hirabayashi J., Kasai K. (1993) *The family of metazoan metal-independent betagalactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution*. *Glycobiology* 3(4): 297-304.
- Houzelstein D., Gonçalves I.R., Fadden A.J., Sidhu S.S., Cooper D.N., Drickamer K., Leffler H., Poirier F. (2004) *Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family*. *Mol Biol Evol* 21(7): 1177-87.
- Chiariotti L., Berlingieri M.T., Battaglia C., Benvenuto G., Martelli M.L., Salvatore P., Chiappetta G., Bruni C.B., Fusco A. (1995) *Expression of galectin-1 in normal human thyroid gland and in differentiated and poorly differentiated thyroid tumors*. *Int J Cancer*, Jun 22; 64(3): 171-5.

Chovanec M., Smetana K. Jr. (2005) *Detection of new diagnostic markers in pathology by focus on growth-regulatory endogenous lectins. The case study of galectin-7 in squamous epithelia.* Prague Med Rep 106(2): 209-16.

Klíma J., Lacina L., Dvořánková B., Herrmann D., Carnwath J.W., Niemann H., Kaltner H., André S., Motlík J., Gabius H.J., Smetana K. Jr.(2009) *Differential regulation of galectin expression/reactivity during wound healing in porcine skin and in cultures of epidermal cells with functional impact on migration.* Physiol Res. 58(6): 873-84.

Kolář M., Szabo P., Dvořánková B., Lacina L., Gabius H.J., Strnad H., Sáčková J., Vlček C., Plzák J., Chovanec M., Cada Z., Betka J., Fík Z., Pačes J., Kovářová H., Motlík J., Jarkovská K., Smetana K. Jr. (2012) *Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses.* Biol Cell, Dec; 104(12): 738-51.

Lacina L., Dvořánková B., Smetana K. Jr., Chovanec M., Plzák J., Tachezy R., Kideryová L., Kucerová L., Cada Z., Boucek J., Kodet R., André S., Gabius H.J. (2007) *Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture.* Int J Radiat Biol 83(11-12): 837-48 (a).

Lacina L., Smetana K. Jr., Dvořánková B., Pytlík R., Kideryová L., Kucerová L., Plzák Z., Štork J., Gabius H.J., André S. (2007) *Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes.* Br J Dermatol 156: 819-829 (b).

Li H., Fan X., Houghton J.M. (2007) *Tumor Microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer.* Journal of Cellular Biochemistry 101: 805–815.

Li L., Neaves W.B. (2006) *Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters.* Cancer Res 66: 4553–4557.

Lis H., Sharon N. (1993) *Protein glycosylation. Structural and functional aspects.* Eur J Biochem, Nov 15; 218(1): 1-27. Review.

Loris R. (2002) *Principles of structures of animal and plant lectins.* Biochem Biophys Acta. Sep 19; 1572(2-3): 198-208.

Mathur S.P., Mathur R.S., Underwood P.B., Kohler M.F., Creasman W.T. (2003) *Circulating levels of insulin-like growth factor-II and IGF-binding protein 3 in cervical cancer.* Gynecol Oncol 91(3): 486-93.

Mishra P.J., Mishra P.J., Glod J.W., Banerjee D. (2009) *Mesenchymal stem cells: flip side of the coin.* Cancer Res, Feb 15; 69(4): 1255-8.

Mishra P.J., Banerjee D. (2011) *Activation and differentiation of mesenchymal stem cells.* Methods Mol Biol 717: 245-53.

Moisa A., Fritz P., Eck A., Wehner H.D., Mürdter T., Simon W., Gabius H.J. (2007) *Growth/adhesion-regulatory tissue lectin galectin-3: stromal presence but not cytoplasmic/nuclear expression in tumor cells as a negative prognostic factor in breast cancer*. *Anticancer Res*, Jul-Aug; 27(4B): 2131-9.

Motlík J., Klíma J., Dvoránková B., Smetana K. Jr. (2007) *Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation*. *Theriogenology*, Jan 1; 67(1): 105-11.

Nagy N., Legendre H., Engels O., André S., Kaltner H., Wasano K., Zick Y., Pector J.C., Decaestecker C., Gabius H.J., Salmon I., Kiss R. (2003) *Refined prognostic evaluation in colon carcinoma using immunohistochemical galectin fingerprinting*. *Cancer*, Apr 15; 97(8): 1849-58.

Nosho K., Yamamoto H., Adachi Y., Endo T., Hinoda Y., Imai K. (2005) *Gene expression profiling of colorectal adenomas and early invasive carcinomas by cDNA array analysis*. *Br J Cancer* 11; 92(7): 1193-200.

Pavelić J., Matijević T., Knezević J. (2007) *Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family*. *Indian J Med Res* 125(4): 511-22.

Plzák J., Lacina L., Chovanec M., Dvoránková B., Szabo P., Cada Z., Smetana K. Jr. (2010) *Epithelial-stromal interaction in squamous cell epithelium-derived tumors: an important new player in the control of tumor biological properties*. *Anticancer Res*, Feb; 30(2): 455-62.

Polyak K., Haviv I., Campbell I.G. (2009) *Co-evolution of tumor cells and their microenvironment*. *Trends Genet*, Jan; 25(1): 30-8.

Rabinovich G.A., Rubinstein N., Toscano M.A. (2002) *Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes*. *Biochim Biophys Acta*, Sep 19; 1572(2-3): 274-84.

Saussez S., Decaestecker C., Cludts S., Ernoux P., Chevalier D., Smetana K. Jr., André S., Leroy X., Gabius H.J. (2009) *Adhesion/growth-regulatory tissue lectin galectin-1 in relation to angiogenesis/lymphocyte infiltration and prognostic relevance of stromal up-regulation in laryngeal carcinomas*. *Anticancer Res*, Jan; 29(1): 59-65.

Sayer R.A., Lancaster J.M., Pittman J., Gray J., Whitaker R., Marks J.R., Berchuck A. (2005) *High insulin-like growth factor-2 (IGF-2) gene expression is an independent predictor of poor survival for patients with advanced stage serous epithelial ovarian cancer*. *Gynecol Oncol* 96(2): 355-61.

Sell S. (2010) *On the stem cell origin of cancer*. *Am J Pathol*, Jun; 176(6): 2584-494.

Schachter H. (1999) *Molecular basis of glycoconjugate disease*. *Biochim Biophys Acta*. 1455:61-2.

- Sharon N., Lis H. (1989) *Lectins as cell recognition molecules*. Science, Oct 13; 246(4927): 227-34.
- Sharon N., Lis H. (2004) *History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules*. Glycobiology 14: 53–62.
- Sharon N. (2007) *Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules*. J Biol Chem, Feb 2; 282(5): 2753-64. Review.
- Smetana K. Jr., André S. (2008) *Mammalian lectin as tool in glycochemistry and histochemistry with relevance for diagnostic procedure*. Methods Mol Biol 418: 171-86.
- Smetana K. Jr., André S. (2013) *Context-dependent multifunctionality of galectin-1: a challenge for defining the lectin as therapeutic target*. Expert Opin Ther Targets 17(4): 379-92.
- Strnad H., Lacina L., Kolár M., Cada Z., Vlcek C., Dvoránková B., Betka J., Plzák J., Chovanec M., Sáchová J., Valach J., Urbanová M., Smetana K. Jr. (2010) *Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes*. Histochem Cell Biol 133(2): 201-11.
- Szabó P., Kolář M., Dvořánková B., Lacina L., Štork J., Vlček Č., Strnad H., Tvrdek M., Smetana K. Jr. (2011) *Mouse 3T3 fibroblasts under the influence of fibroblasts isolated from stroma of human basal cell carcinoma acquire properties of multipotent stem cells*. Biol Cell, May; 103(5): 233-48.
- Trojan L., Bode C., Weiss C., Mayer D., Grobholz R., Alken P., Michel M.S. (2006) *IGF-II serum levels increase discrimination between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer and improve the predictive value of PSA in clinical staging*. Eur Urol 49(2): 286-92.
- Varki A. (1993) *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. Glycobiology, Apr; 3(2): 97-130.
- Wang J., Lu Z.H., Gabius H.J., Rohowsky-Kochan C., Ledeen R.W., Wu G. (2009) *Cross-linking of GM1 ganglioside by galectin-1 mediates regulatory T cell activity involving TRPC5 channel activation: possible role in suppressing experimental autoimmune encephalomyelitis*. Immunol, Apr 1; 182(7): 4036-45.
- Watt F.M., Fujiwara H. (2011) *Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin*. Cold Spring Harb Perspect Biol 1;3(4) pii: a005124. doi:10.1101/cshperspect.a005124.
- Weinberg R. (ed) (2007) *The biology of cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group.