

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Glykobiologie nádorů hlavy a krku

Jaroslav Valach

2013

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Anatomický ústav 1. LF UK

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

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

1 ÚVOD	4
2 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	5
3 MATERIÁL A METODIKA	5
4 VÝSLEDKY	8
4. 1 Funkce vybraných členů rodiny endogenních lektinů v možné etiopatogenezi nádorů.....	8
4. 1. 1 <i>Stromální galektin-1 a myofibroblasty jako prognostický faktor nádorů hlavy a krku</i>	8
4. 1. 2 <i>Ztráta galektinu-9 u dlaždicových epitelů karcinomů hlavy a krku</i>	9
4. 2 Stanovení rozdílu transkriptomu normálních fibroblastů a fibroblastů izolovaných z nádorů hlavy a krku.....	10
4. 3 Porovnání vlivu normálních a nádorových epitelových buněk na normální fibroblasty a fibroblasty připravené z nádorů.....	11
5 ZÁVĚR	13
6 POUŽITÁ LITERATURA	15
7 SEZNAM PUBLIKACÍ	17
8 OCENĚNÍ A PATENTY	19
9 SUMMARY	20

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. 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 nejhorsí prognózou (Plzák et al., 2010). Prognostické informace jsou přitom nezbytné pro zhodnocení a výběr optimální léčebné modalit s cílem dosáhnout co nejlepší kvality života a nejdějšího přežití.

2 Hypotéza a cíle 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:

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

3 Materiál a metodika

V rámci disertační práce jsme analyzovali normální tkáň (sliznice hlavy a krku) a z nich vycházející dlaždicové karcinomy dutiny ústní, orofaryngu a hrtanu. 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. Vzorky na genetickou analýzu byly ošetřeny pomocí RNA Later (Ambion Inc, USA), který ochraňuje RNA před nežádoucí degradací a hluboce zmrazeny v tekutém dusíku. Ze vzorků byly připraveny řezy o síle 10 μm 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). Pomocí insertového systému (Lacina et al, 2007 a, b), 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 kryoprotektivu Tissue Tek (Sakkura,

Zoeterwoude, Nizozemí), zmraženy v tekutém dusíku a následně uchovány při -80°C . Řezy o síle $10\ \mu\text{m}$ jsme připravili pomocí Cryocut-E (Reichert-Jung, Vídeň, Rakousko). Užity byly dvě základní metody. Jednak imunocyto- a imunohistochemie k detekci příslušných endogenních lektinů či jiných proteinových markerů použitím specifických protilátek prvního kroku, jednak reverzní lektinová histochemie využívající neoglykokonjugátů k průkazu endogenních vazebných míst pro příslušné sacharidové motivy.

K vizualizaci histochemických reakcí byly převážně užity nepřímé fluorescenční metody a získaný obraz byl zpracován pomocí počítačového analyzačního systému LUCIA (Laboratory Imaging, Praha, ČR), který umožňuje mimo jiné i měření profilu fluorescenčních intenzit.

4 Výsledky

4.1 Funkce vybraných členů rodiny endogenních lektinů v možné etiopatogenezi nádorů.

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

Pozitivní 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 další vývoj onemocnění u daného pacienta. 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. Přítomnost galektinu-1 je specifická a nejedná se o vlastnost danou všem členům rodiny galektinů. U nádorů s bohatou expresí galektinu-1 s četnými myofibroblasty jsme identifikovali 6 transkriptů *MAP3K2*, *TRIM23*, *PTPLAD1*, *FUSIP1*, *SLC25A40* a *SPIN1* se známým negativním prognostickým významem. Tyto transkripty byly signifikantně zvýšeny společně s expresí genu pro galektin-1. Vzhledem k dřívějším úvahám o nádoru jako ráně, která se nehojí

(Dvorak, 1986), lze konstatovat, že se galektin-1 může podílet na vzniku myofibroblastů jako buněčného elementu typického jak pro nádorové stroma, tak pro hojící se ránu.

4. 1. 2 Ztráta galektinu-9 u dlaždicových epitelů karcinomů hlavy a krku

Pozitivní exprese galektinu-9 v bazální vrstvě dlaždicového epitelu je možným znakem jeho normálnosti. Hlavním výsledkem studie je zjištění, že u většiny vzorků normální tkáň je exprese galektinu-9 přítomná v bazální vrstvě epitelu obsahující proliferující buňky. Nádorové tkáň byly vždy negativní a okraje resekatu měly mozaikový vzhled. Za velmi důležitý považujeme galektin-9 negativní výsledek z histologicky normálních, ale fenotypově aberantních epitelů bukální sliznice u pacientů s kontralaterální malignitou v dutině ústní, kde fenotypová aberantnost spočívala v přítomnosti exprese obou studovaných keratinů (K14, K19) ve všech vrstvách epitelu. Ve zdravé tkáni jsou tyto keratiny přítomny pouze ve stratum basale.

Domníváme se, že by se průkazem galektinu-9 mohl rozšířit výčet prognostických znaků u dysplázií dlaždicových epitelů v oblasti hlavy a krku.

4. 2 Stanovení rozdílu transkriptomu normálních fibroblastů a fibroblastů izolovaných z nádorů hlavy a krku

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. Z dlaždicového karcinomu jsme izolovali fibroblasty a jejich schopnost ovlivnit normální keratinocyty jsme ověřili *in vitro*. Zároveň 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. Pomocí ELISA analýzy jsme dále zjistili, že proteiny IGF-2 a BMP-4 jsou do kultivačního média produkovány fibroblasty připravenými z nádoru a zároveň že přidání obou faktorů do kultivačního média je schopné ovlivnit diferenciaci zdravých keratinocytů směrem k fenotypu podobnému nádorové tkáni. Tato studie tak přinesla na komplexní úrovni jedno z prvních celogenomových

srovnání transkriptomu obou populací fibroblastů a je základem pro další analýzy.

4. 3 Porovnání vlivu normálních a nádorových epitelových buněk na normální fibroblasty a fibroblasty připravené z nádorů

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 prodloužena. Stromální nádorové fibroblasty tedy odlišně reagují na aktivaci epitelovými buňkami v porovnání s normálními dermálními fibroblasty. Normální dermální fibroblasty i fibroblasty připravené z dlaždicových karcinomů produkují po stimulaci zdravými a nádorovými epitelovými buňkami chemokiny CXCL-1 a IL-8 (Kolář et al, 2012). Tyto chemokiny jsou zároveň schopné stimulovat prozánětlivé prostředí, které podporuje nádorovou progresi (Mishra et al, 2011). V této studii bylo tedy prokázáno, že existuje jistá míra podobnosti mezi nádorem a hojící se ránou.

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 epitelu-mesenchemovým přechodem. Tato interpretace však vyžaduje další experimentální potvrzení.

5 Závěr

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. 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 dělicími 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.

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.

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

6 Použitá literatura

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.

Kolář M., Szabo P., Dvořánková B., Lacina L., Gabius H.J., Strnad H., Sáčková J., Vlček C., Plzák J., Chovanec M., Čada 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., Kučerová L., Čada Z., Bouček 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).

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

Plzák J., Lacina L., Chovanec M., Dvořánková B., Szabo P., Čada 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.

7 Seznam publikací

1. Seznam publikací *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s IF

- 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., Sáčková 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. 59: 134-137 (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)**.

b) bez IF 0

2. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s IF - 0

b) bez IF - 0

8 Ocenění a patenty

1. Cena Alberta Schweitzera za lékařství za rok 2012
2. Výroční cena České anatomické společnosti za nejlepší publikaci roku 2012

Spoluautor patentu č. 302 505 – Použití galektinů a způsob přípravy myofibroblastů a nanovláken extracelulární matrix.

9 Summary

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- β , 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 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 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.