



**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, 26. 5. 2014

Ondřej Kodet

Podpis

\* Nehodící škrtněte

**Identifikační záznam:**

KODET, Ondřej. *Studium epitelově mezenchymových interakcí v nádorech vycházejících z dlaždicových epitelů. [Study of Epithelial Mesenchymal Interactions in Tumors Derived From Squamous Epithelium]*. Praha, 2014. Počet stran 102, 7 příloh. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Anatomický ústav 1. LF UK, Dermatovenerologická klinika 1. LF UK a VFN. Školitel: Lacina, Lukáš.

## **Abstrakt:**

Tato dizertační práce je tematicky věnována epitelově mezenchymovým interakcím v nádorech vycházejících z dlaždicových epitelů a to včetně minoritní buněčné populace (melanocytů) zastoupené v tomto epitelu. Navazuje také na předchozí studie na téma glykobiologie, resp. studium endogenních lektinů, galektinů, v dlaždicobuněčných karcinomech hlavy a krku.

Galektiny reprezentují v současném pojetí buněčné a zejména pak nádorové biologie molekuly s nezanedbatelným potenciálem. Účastní se kromě regulace pre- i postnatální homeostázy v normálních tkáních také mnoha dějů patologických, jako jsou autoimunitní reakce či maligní bujení.

V této práci jsme prokázali přítomnost galektinu-1 a -2 a jejich glykoligandů v interfazických a mitotických jádrech, kde se mohou podílet na regulaci buněčného cyklu. Dále jsme prokázali galektin-9 jako poměrně citlivý znak přechodu normálního epitelu v dysplastický dlaždicový epitel v oblasti hlavy a krku.

Epitelově mezenchymové interakce reprezentují mechanismy odpovídající za dynamické udržování homeostázy organismu jak během prenatálního vývoje, postnatálního růstu, tak i během cyklické obměny některých tkání. Účastní se i fáze hojení, ale také hrají významnou úlohu v procesu nádorové transformace, progresu a metastazování. Tyto interakce napomáhají utvářet specifické mikroprostředí, označované ve vývojové i nádorové biologii jako „*niche*“. Prostřednictvím nádorově asociovaných fibroblastů v *in vitro* modelu jsme prokázali vliv na expresi kmenových znaků nádorové linie karcinomu hypofaryngu. Dále jsme porovnali vliv nádorově asociovaných fibroblastů z rozdílných nádorů na linii duktálního karcinomu prsu, kde jsme prokázali, že jejich biologická funkce v *in vitro* modelu je prakticky uniformní. V dalším experimentu jsme prostřednictvím proteomické analýzy detekovali v dermálních fibroblastech pod vlivem nádorové linie karcinomu hypofaryngu indukci exprese kontraktilních proteinů cytoskeletu, a tedy jejich možnou konverzi v myofibroblasty.

Dalším přínosem této práce je aplikace *in vitro* modelování mikroprostředí v biologii melanomu. Demonstrovali jsme, že mezibuněčné interakce mohou i zde sehrávat významnou úlohu. V našem *in vitro* experimentu jsme prokázali vliv nádorově asociovaných fibroblastů z melanomu na indukci exprese diferenciačních znaků nádorových melanocytů a přiblížili tak jejich fenotyp *in vitro* fenotypu pozorovanému *in vivo*. Dále jsme prokázali vliv nádorových melanocytů na ovlivnění diferenciačního stupně keratinocytů v *in vitro* modelu. Tento mechanismus je pravděpodobně odpovědný za pseudohyperplazii epitelu v okolí melanomu,

kteřá byla známá již dříve, ale námi dokumentována ve velkém rozsahu. Prostřednictvím celogenomové analýzy transkriptomu se podařilo určit růstové faktory zodpovědné za tento efekt, a sice: FGF-2, VEGF a chemokiny/cytokiny IL-8 a CXCL-1.

Epitelově mezenchymové interakce a galektiny hrají tedy v biologii nádorového mikroprostředí významnou úlohu. Porozumění těmto mechanismům může přispět nejen k rozvoji cílené a personalizované onkologické terapie nádorů, ale i ke zpřesnění chirurgických výkonů, které jsou nadále klíčem k úspěšné léčbě těchto nádorů.

Klíčová slova: Epitelově mezenchymové interakce, stroma, nádorově asociované fibroblasty, galektiny, dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku, melanom.

### **Abstract:**

This thesis is focused on the epithelial mesenchymal interactions in tumors derived from squamous epithelium including tumors arising from minor cell population (melanocytes). This study is also reflecting aspects of epithelial glycobiology resp. the study of endogenous lectins, the galectins, in head and neck squamous carcinomas.

Galectins represent, in the current concepts of cell and tumor biology molecules with a remarkable potential. Galectins participate, besides in regulation of pre- and postnatal homeostasis in normal tissues, also in many pathological processes such as autoimmune reactions or malignancies. In this thesis, we demonstrated the presence of galectin-1 and -2 and their glycoligands in interphasic and mitotic nuclei, which may contribute to regulation of the cell cycle. Furthermore, we demonstrated galectin-9 as a sensitive marker of transformation normal to the dysplastic squamous epithelium in head and neck.

The epithelial mesenchymal interactions represent mechanisms, which are responsible for dynamic maintenance of the homeostasis of the organism during prenatal development, postnatal growth and during cyclic renewal of certain tissues. These interactions also participate in wound healing. On the other hand they play a crucial role in the process of tumor transformation, progression and metastasis. These interactions help to shape the specific microenvironment known in developmental and tumor biology as a "*niche*". We showed the effect of tumor-associated fibroblasts on the induction of expression of the stem cell like markers in tumor cell line of hypopharyngeal carcinoma *in vitro*. Furthermore, we also compared the effect of cancer-associated fibroblasts from different tumor types on the breast ductal carcinoma cell line. We demonstrated in this experiment that the biological

function of cancer-associated fibroblasts is almost uniform in this *in vitro* model regardless the type of source tumor.

In another set of proteomic experiments, we detected induction of expression of contractile cytoskeletal proteins in dermal fibroblasts under the influence of tumor cell line of hypopharyngeal carcinoma and so their possible conversion into myofibroblasts.

Novelty of this thesis is also in the application of the *in vitro* model to melanoma biology, where the cell interactions may also play a significant role. We demonstrated the effect of cancer-associated fibroblasts to induce expression of differentiation markers in tumor melanocytes and approximate their phenotype *in vitro* to phenotype observed *in vivo*. In consecutive study, we demonstrated the influence of tumor melanocytes on differentiation of keratinocytes in *in vitro* model. This effect is probably responsible for the pseudohyperplastic epithelium in the vicinity of melanoma. Using whole genome transcriptome analysis we managed to determine growth factors such as FGF-2, VEGF and chemokines/cytokines like IL-8 and CXCL-1 responsible for this effect.

Epithelial mesenchymal interactions as well as the galectins play a crucial role in biology of tumor microenvironment. Understanding these mechanisms may contribute not only to the development of targeted and personalized oncology therapy of the tumors, but also improvement of surgery, which remains the key to successful treatment of the tumors.

Keywords: Epithelial mesenchymal interactions, stroma, cancer-associated fibroblasts, galectins, squamous cell carcinoma of the head and neck, melanoma.

## Poděkování

Tato dizertační práce by nemohla vzniknout bez vynikajícího a příkladného vedení mých školitelů MUDr. Lukáše Laciny, Ph.D. a prof. MUDr. Karla Smetany, Jr., DrSc., za což jim patří mé vřelé poděkování.

Dále bych chtěl touto formou poděkovat spolupracovníkům z Anatomického ústavu 1. LF UK a Kliniky ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FNM a Kliniky čelistní chirurgie 1. LF UK a VFN, a to prof. MUDr. M. Grimovi, DrSc., RNDr. P. Szabovi, Ph.D., Ing. E. Krejčí, Ph.D., MUDr. J. Valachovi, Ph.D., MUDr. Z. Fíkovi a MUDr. M. Chovancovi, Ph.D. Zvláštní poděkování patří paní RNDr. B. Dvořánkové, Ph.D. za vynikající vedení mé práce v laboratoři tkáňových kultur a spolupracovníkům z Ústavu molekulární genetiky, AV ČR, Ing. H. Strnadovi, Ph.D. a Mgr. M. Kolářovi, Ph.D.

Rád bych také poděkoval panu prof. Ing. P. Dvořákovi, CSc. za poskytnutí kondiciovaných medií z kultury lidských embryonálních kmenových buněk, panu prof. MUDr. V. Mandysovi, Csc. za poskytnutí bloku primárního melanomu k linii ASC, RNDr. E. Matouškové, Ph.D. za poskytnutí linie EM-G3, panu doc. MUDr. P. Dundrovi, Ph.D. za pomoc při vyšetření primárního a metastatického nádoru k linii ASC a panu doc. MUDr. J. Vachtenheimovi, CSc., za poskytnutí linie Mel-HP. Děkuji i spolupracovníkům z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově za provedení proteomické studie pod vedením RNDr. H. Kovářové, CSc. Mé poděkování patří také prof. MUDr. R. Kodetovi, CSc. a prim. MUDr. D. Kodetové za umožnění osvojení si techniky peroxidásové imunohistochemie a retrospektivní vyšetření nodulárních melanomů.

Významnou měrou se na naší práci zasloužil též prof. Hans-Joachim Gabius z Ústavu fyziologické chemie při Veterinární fakultě Ludwig-Maximillian Univerzity, Mnichov, díky poskytnutí řady galektinů a jejich glykoligandů.

Mé poděkování patří též prof. MUDr. J. Štorkovi, CSc. a prim. MUDr. I. Krajsové, MBA. za vynikající vedení nejen v postgraduálním vzdělávání v oboru Dermatovenerologie, ale i v oboru dermatohistopatologie a dermatonkologie.

V neposlední řadě bych rád poděkoval za asistenci laboratorním pracovníkům M. Jindrákové, R. Kavkové, I. Burdové, V. Hajdúchovi, M. Šlajsové a také vedoucí sálové sestře I. Bulínové.

## **Seznam zkratek:**

$\alpha$ -SMA: alfa svalový aktin (anglicky: alpha Smooth Muscle Actin)

ALDH1: acetaldehyd dehydrogenáza 1 (anglicky: Acetaldehyde Dehydrogenases 1)

ALM: akrolentiginózní melanom (anglicky: Acrolentiginous Melanoma)

BMP: kostní morfogenetický protein (anglicky: Bone Morphogenetic Protein )

CAFs: nádorově asociované fibroblasty (anglicky: Cancer-associated Fibroblasts)

CRD: sacharidy rozpoznávací doména (anglicky: Carbohydrate Recognition Domain)

CSCs: nádorové kmenové buňky (anglicky: Cancer Stem Cells)

CTLA-4: antigen 4 cytotoxických T-lymfocytů (anglicky: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)

CXCL-1: chemokin motiv C-X-C ligand 1 (anglicky: Chemokine (C-X-C motif) ligand 1)

EGF: epidermový růstový faktor (anglicky: Epidermal Growth Factor)

EMT: epitelově-mezenchymový přechod (anglicky: Epithelial-Mesenchymal Transition)

Erk1/2, 9: extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2 (anglicky: Extracellular signal-regulated kinase 1/2)

FAP: fibroblasty aktivující protein (anglicky: Fibroblasts Activating Protein)

FGF: fibroblastový růstový faktor (anglicky: Fibroblast Growth Factor)

FSP1/ S100A4: fibroblastový specifický protein 1 (anglicky: Fibroblast Specific Protein 1)

HGF: hepatocytární růstový faktor (anglicky: Hepatocyte Growth Factor)

HNSCC: dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku (anglicky: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma)

HPV: lidský papilomavirus, (anglicky: Human Papilloma Virus)

IGF-2: inzulínu podobný růstový faktor (anglicky: Insuline-like Growth Factor 2)

IL-8, IL-6: Interleukin 8, Interleukin 6 (anglicky: Interleukin 8, Interleukin 6 )



MAP: mitogenem aktivovaná kináza (anglicky: Mitogen Activated Kinases)

MMP: matrix metaloproteáza (anglicky: Matrix Metaloprotease)

MSCs: mezenchymální kmenové buňky (anglicky: Mesenchymal Stem Cells)

MITF: mikroftalmie asociovaný transkripční faktor (anglicky: Microphthalmia-associated Transcription Factor)

NCSCs: kmenové buňky neurální lišty (anglicky: Neural Crest Stem Cells)

NM: nodulární melanom (NM: Nodular Melanoma)

PDGF: trombocyty produkovaný růstový faktor (anglicky: Platelet-Derived Growth Factor)

PDGFR: receptor pro trombocyty produkovaný růstový faktor (anglicky: Platelet-Derived Growth Factor Receptor)

RT-PCR: polymerázová řetězová reakce v reálném čase (anglicky: Real-Time Polymerase Chain Reaction)

SDF-1: stromálními buňkami produkovaný faktor 1 (anglicky: Stromal cell-Derived Factor 1)

SLN: sentinelová uzlina (anglicky: Sentinel Lymph Node)

SSM: povrchově se šířící melanom (anglicky: Superficial Spreading Melanoma)

TGF- $\beta$ : transformující růstový faktor beta (anglicky: Transforming Growth Factor beta)

TILs: nádory infiltruující lymfocyty (anglicky: Tumor Infiltrating Lymphocytes)

TNF: nádory nekrotizující faktor (Tumor Necrosis Factor)

UV: ultrafialové záření (anglicky: Ultraviolet Radiation)

VEGF: vaskulární endotelový růstový faktor (anglicky: Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGFR: receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor (anglicky: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)

## Obsah:

<b>Prohlášení.....</b>	<b>ii</b>
<b>Abstrakt.....</b>	<b>iv</b>
<b>Poděkování.....</b>	<b>vii</b>
<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>viii</b>
<b>Obsah.....</b>	<b>x</b>
<b>1. Úvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. Struktura a funkce vrstevnatých dlaždicových epitelů.....	2
1.2. Minoritní buněčné zastoupení ve vrstevnatém dlaždicovém epitelu.....	4
1.3. Struktura a funkce dermis a submukózního vaziva.....	7
<b>2. Epitelově mezenchymové interakce.....</b>	<b>10</b>
2.1. Epitelově mezenchymové interakce při vývoji a hojení.....	10
2.2. Epitelově mezenchymové interakce v nádorech.....	15
<b>3. Glykobiologie a lektinová imunohistochemie.....</b>	<b>18</b>
3.1. Lektiny.....	19
3.2. Galektiny.....	20
3.3. Histochemie glykokonjugátů, imunohistochemie lektinů a lektinová imunohistochemie.....	23
<b>4. Nádory vycházející z dlaždicových epitelů.....</b>	<b>25</b>
4.1. Dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku.....	26
4.1.1. Histogeneze a histologie.....	27
4.1.2. Rizikové faktory.....	29
4.1.3. Léčba a nové přístupy.....	31
4.2. Nádory vycházející z minoritní populace dlaždicových epitelů – Melanom.....	32
4.2.1. Histogeneze.....	33
4.2.2. Histologie a klasifikace.....	35
4.2.3. Rizikové faktory, genetika melanomu.....	40
4.2.4. Léčba melanomu a nové přístupy.....	41
<b>5. Nádorové stroma.....</b>	<b>46</b>
5.1. Složení nádorového stromatu.....	46
5.2. Nádorově asociované fibroblasty.....	48
5.2.1. Původ nádorově asociovaných fibroblastů.....	49
5.2.2. Biologická funkce nádorově asociovaných fibroblastů.....	51
5.2.3. Nádorové stroma melanomu.....	53
<b>6. Cíle práce.....</b>	<b>55</b>
<b>7. Materiál a metody.....</b>	<b>56</b>
<b>8. Výsledky.....</b>	<b>58</b>
8.1. Přehled prací.....	58

8.2. Přehled dosažených výsledků.....	60
8.2.1. Glykobiologie nádorových onemocnění.....	60
8.2.2. Mikroprostředí a kmenovost HNSCC.....	63
8.2.3. Nádorové mikroprostředí melanomu.....	65
8.2.4. Specifita CAFs.....	69
<b>9. Splnění cílů dizertační práce, diskuze.....</b>	<b>72</b>
<b>10. Literatura.....</b>	<b>78</b>
<b>11. Příložené publikace.....</b>	<b>103</b>

## 1. Úvod

Tato dizertační práce je věnována studiu epitelově mezenchymových interakcí v nádorech vycházejících z dlaždicových epitelů a vznikla na půdorysu dlouhodobé spolupráce mezi Anatomickým ústavem 1. LF UK a Dermatovenerologickou klinikou 1. LF UK. Téma epitelové a zejména pak nádorové biologie je na obou pracovištích tradičně silně akcentováno a v minulosti bylo námětem mnoha úspěšně obhájených doktorských prací. Předkládaná práce tematicky na předchozí práce navazuje a dále je rozvíjí, zejména pak v problematice minoritních populací přítomných v dlaždicových epitelech.

Je zřejmé, že určité mechanismy, jejichž podstatou je interakce mezi epitelovými a mezenchymovými buňkami, se uplatňují jak během vývoje tkání a orgánů prenatalně, tak doprovází jejich další vývoj postnatalně. Obdobné interakce nalzáme například při fázi jejich hojení, podobně tak sehrávají významnou roli i při progresi nádorových onemocnění. Tyto mechanismy jsou ve všech uvedených případech principiálně velmi blízké, často vývojově konzervované a na molekulární úrovni používají dokonce identické signální kaskády. Klíčové rozdíly v těchto procesech a jejich výsledcích jsou tak mnohdy dány spíše kontextem než vlastním mechanismem.

S ohledem na nádorovou biologii se navíc zdá být pozoruhodným, že některé tyto mechanismy epitelově mezenchymových interakcí mohou být společné pro řadu zcela rozdílných nádorových onemocnění. Porozumění těmto mechanismům by tedy mohlo vést v budoucnosti ke zlepšení onkologické léčby. Předpokladem studia těchto dějů v nádorech je ale znalost vývoje, struktury a funkce normálních tkání.

Z lingvistického hlediska se předkládaná dizertace obecně přidržuje progresivní pravopisné formy doporučené Ústavem pro jazyk český AV ČR (<http://prirucka.ujc.cas.cz/>). Ve speciální problematice užíváme formy obecně akceptované dermatologickou obcí (tj. zejména uzancí odborného časopisu Československá dermatovenerologie a posledním vydáním monografie Dermatovenerologie, Štok et al.). Dále se terminologicky přidržujeme nomenklatury založené na *Nomina anatomica et histologica* (Feneis), termíny latinské (popřípadě ponechané v anglickém originále) jsou vyznačeny kurzívou. V oblasti patologie je námi akceptována recentní jazyková forma udaná celostátní základní oborovou učebnicí Povýšil et Štainer.

### 1.1. Struktura a funkce vrstevnatých dlaždicových epitelů

Vrstevnatý dlaždicový epitel představuje povrchový krycí epitel. Jeho funkcí je tedy na prvním místě ochrana organismu před nežádoucím působením zevních vlivů. Morfologické vlastnosti epitelu umožňují pro zachování homeostázy organismu s různou mírou efektivitu omezovat jak vlivy fyzikální (například mechanické, termické, radiační), tak chemické i biologické (bakterie, viry, parazité etc.). Dále pak vrstevnaté dlaždicové epitely plní i funkci difúzní bariery, prostřednictvím produkce polárních lipidů a přítomností husté sítě *zonulae occludentes* omezují např. i ztráty tekutin z organismu (Lullmann-Rauch, 2012).

Podle charakteru nejsvrchnější vrstvy a jejího stupně finální diferenciaci rozlišujeme dále rohovějící a nerohovějící variantu dlaždicových epitelů. Rohovějící vrstevnatý dlaždicový epitel (*epidermis*, pokožku) nacházíme v kůži. Na jeho zevním povrchu jsou patrné již odumřelé oploštělé buňky bez jader tvořící jemné šupiny. Vrstevnatý dlaždicový epitel nerohovějící vystýlá tělní dutiny (např. dutinu ústní, jícen, *plicae vocales* laryngu, *anus*, vaginu a ústí močové trubice) a na rozdíl od kůže je povrch tohoto epitelu tvořen plochými buňkami tzv. *stratum superficiale* s pyknotickými jádry (Lullmann-Rauch, 2012).

Vrstevnatost těchto epitelů, tzv. stratifikaci, lze dobře demonstrovat na *epidermis*, kde nejhluběji při bazální membráně uloženou vrstvou je tzv. *stratum basale* tvořené jednou vrstvou palisádovitě uspořádaných cylindrických keratinocytů s velkými jádry a malým množstvím cytoplazmy. Pro tuto vrstvu je typická přítomnost intermediálních filament keratinu-5 a keratinu-14 (Coulombe et al., 1989). Jednotlivé buňky jsou těsně propojeny navzájem pomocí desmozomů a hemidesmozomy k bazální membráně, která odděluje vrstvu epitelovou od hlouběji ležícího vaziva v kůži, tedy od *dermis*.

V další vrstvě, tzv. *stratum spinosum*, nacházíme několik vrstev keratinocytů s typickým polyedrickým tvarem a nápadným množstvím desmozomů, které dávají buňkám v rutinním histologickém obraze ostnitý vzhled. Tyto buňky jsou větší než v oblasti bazální vrstvy, ale směrem k povrchu se postupně oplošťují. S postupem diferenciaci v povrchové vrstvě *stratum spinosum* nastává již konečná diferenciaci a keratin-5 a keratin-14 jsou zde nahrazeny keratiny-1 a -10, typickými intermediálními filamenty terminálně diferencovaných keratinocytů (Luo et al., 2011), a v nejsvrchnější části *stratum spinosum* dále i keratinem-2. V další vrstvě *stratum granulosum* se keratinocyty nadále oplošťují a v cytoplazmě můžeme spatřovat nápadná bazofilní

granula keratohyalinu. *Stratum lucidum* je dobře patrné jen v akrální epidermis dlaní a plosek (tzv. tlustý typ kůže), představuje určitý přechod mezi nezrohovělou epidermis a *stratum corneum* (Lullmann-Rauch, 2012). Tato nejsvrchnější vrstva, *stratum corneum* je již zrohovělá, buňky zde zastoupené, obecně označované jako korneocyty, již nemají ani jádro, jsou oploštělé a jsou seskupeny sloupcovitě v lamely (Stork et al., 2007). Jako znaky konečné diference epidermálních keratinocytů jsou známy filagrin, trichohyalin, loricrin a involucrin, které tvoří síťovitou zrohovatělou obálku terminálně diferenciovaných keratinocytů (Presland et Dale, 2000).

Ne zcela identická nomenklatura je užívána pro popis nerohovějících vrstevnatých dlaždicových epitelů. Analogicky i zde nacházíme *stratum basale* s cylindrickými buňkami s poměrně malou silně bazofilní cytoplazmou. V další vrstvě *stratum parabasale* jsou buňky více polygonální. Následuje vrstva označovaná jako *stratum intermedium*, kde je cytoplazma již eozinofilní a jádra se více kondenzují. Densita jader, resp. až jejich úplná pyknóza, je vystupňována v povrchové vrstvě označované jako *stratum superficiale*. Cytoplazma je v základním histologickém obraze nápadně světlá díky velkému obsahu glykogenu.

Minoritní buněčné populace zastoupené ve struktuře vrstevnatých dlaždicových epitelů jsou podrobněji popsány v následující podkapitole 1.2.

Bazální membrána (lamina) představuje rozhraní mezi epitelem a vazivovou komponentou tkání. Současně se ale jedná i o strukturní element umožňující napojení jednotlivých tkání a jejich vzájemnou komunikaci. Základní složkou bazální membrány je kolagen typu IV a glykoprotein laminin. Dále zde nacházíme protein nidogen (synonymum: entactin), jehož hlavní funkcí je zprostředkování kontaktu jednotlivých komponent bazální membrány a komponent okolní extracelulární matrix (dále jako ECM, anglicky: Extra Cellular Matrix) (Breitkreutz et al., 2013).

Buňky epitelu jsou k bazální membráně ukotveny pomocí transmembránových adhezivních molekul, tzv. integrinů. Integriny se ale mimo této strukturní role účastní i intra- a extracelulární signalizace (Epifano et Perez-Moreno, 2012). Samotné napojení bazální membrány a okolní vazivové tkáně se děje pomocí *lamina fibroreticularis* bohaté především na kolagen typu III (Lullmann-Rauch, 2012). V elektronovém mikroskopu je patrné, že bazální membrána je složena z *lamina lucida*, části bližší epitelu, kterou jemná vlákna (kotvící filamenta tvořená kolagenem typu XVII) spojují s buněčnou membránou buněk bazální vrstvy v místě hemidesmosomů (Castanon et al.,

2013; Powell et al., 2005), a z *lamina densa*, části přiléhající ke korigu (dermis, respektive k podslizničnímu vazivu v případě sliznic), ke kterému je fixována tzv. *kovčícími fibrilami* tvořených kolagenem typu VII (van der Rest et Garrone, 1991). V nádorové biologii je dlouhodobě věnována velká pozornost funkci lamininu. Laminin je glykoprotein, který nacházíme v oblasti *lamina densa*, kde tvoří bohatou vzájemně propletenou síť spolu s kolagenem typu IV. Laminin se pravděpodobně podílí na stimulaci proliferace a navíc aktivuje některé signální kaskády, a tak umožňuje nádorovým buňkám invadovat skrze bazální laminu (Givant-Horwitz et al., 2005). Kolagen typu IV má funkci především mechanickou a stabilizační. Během progresu nádorových onemocnění je štěpen pomocí matrix metaloproteináz-2 a -9 (dále jako MMP, anglicky: Matrix Metaloprotease). Dále je popsáno, že vazba nádorových buněk a např.  $\beta$ 1-integrinů s kolagenem typu IV stimuluje migraci a proliferaci se současnou inhibicí buněčné apoptózy (Ohlund et al., 2013). Bazální membrána umožňuje i výměnu řady signálních molekul (růstových faktorů, cytokinů, chemokinů a hormonů) mezi epitelem a mezenchymem pod ní uloženým. Pro mnoho těchto molekul současně slouží i jako depotní úložiště. Za cirkulaci těchto molekul jsou v oblasti bazální membrány zodpovědné interakce integrinů, růstových faktorů s jejich receptory a interakce s proteiny napomáhající transdukcii signálu, jako jsou dystroglykany. Dystroglykany se váží např. na protein perlekan (synonymum pro proteoglykan 2 heparan sulfát), který v oblasti bazální membrány slouží k propojení komponent ECM a buněčných membránových molekul, a tak se nepřímou podílí na transdukcii signálu v oblasti bazální laminy (Yurchenco, 2011).

## 1.2. Minoritní buněčné zastoupení ve vrstevnatém dlaždicovém epitelu

Kromě keratinocytů, které tvoří majoritní buněčnou populaci epidermis (cca. 80 %) (Prost-Squarcioni, 2006), jsou i za normálních situací přítomny v lidské epidermis tzv. vedlejší, či minoritní, buněčné populace. Těmito dalšími buňkami ve vrstevnatém dlaždicovém epitelu jsou Langerhansovy buňky, Merkelovy buňky, intraepitelové lymfocyty a melanocyty.

Langerhansovy buňky jsou dendritické buňky pocházející z kostní dřeně a jsou tedy histogeneticky naprosto odlišného původu a do epidermis migrují až posléze (nejvíce v prvních týdnech po narození). Langerhansovy buňky jsou derivátem hematopoetické kmenové buňky a řadíme je funkčně do skupiny antigen prezentujících

buněk (Ng-Cheng-Hin et al., 2011). V epidermis rozeznávají a váží antigeny, se kterými posléze migrují do lymfatické uzliny, kde na svém povrchu navázaný antigen prezentují a slouží tedy k indukci specifické T-buněčné (lymfocytární) imunitní odpovědi. Langerhansovy buňky jsou přítomny v epidermis ve vrstvách suprabazálních, ale migrují i do vlasového folikulu (Calonje et al. 2011). V rutinních barveních jsou těžko odlišitelné (Langerhans, 1886), snáze se dají prokázat pomocí specifických protilátek (anti S100 protein, anti CD1a, anti Langerin) nebo pomocí elektronové mikroskopie, kdy jsou v cytoplazmě přítomna charakteristická Birbeckova granula (Ng-Cheng-Hin et al., 2011; Upadhyay et al., 2013).

Merkelovy buňky se nacházejí v bazální vrstvě epidermis a v oblasti vlasového folikulu, vývojově pochází z derivátů neurální lišty. V elektronovém mikroskopu jsou pro ně charakteristická cytoplazmatická neurosekreční granula obklopená membránou. Tyto buňky mají synaptické spojení s volnými nervovými zakončeními a představují nejspíše mechanoreceptory kůže. Nověji se připodobňují k buňkám difuzního neuroendokrinního systému (Halata et al., 2003).

Melanocyty, které jsou jedním z témat této dizertační práce, jsou buňky pocházející vývojově rovněž z neurální lišty. Během uzávěru neurálních valů v 5. týdnu lidského embryonálního vývoje některé neuroektodermnové buňky v dorzolaterální oblasti neurální trubice podstupují epitelově mezenchymový přechod (dále jako EMT, Epithelial Mesenchymal Transition) a aktivně vstupují do okolního mezodermu. Rozhodujícím krokem v delaminaci a následné migraci buněk z neurální trubice je řízená ztráta exprese E-cadherinu pod vlivem transkripčního faktoru snail (Cano et al., 2000; Uong et Zon, 2010). V mezodermu delaminované buňky dále migrují dorzálním směrem, tedy do budoucí dermis a v ní do vyvíjejících se vlasových folikulů, kde následnou diferenciací dávají vzniknout melanocytům (Erickson et Reedy, 1998; Osawa et Fisher, 2008). Jednu z klíčových rolí zde sehrává signalizace Wnt, která indukuje a stabilizuje prekurzory neurální lišty a spolupodílí se na jejich delaminaci a řízení migrace do cílových orgánů (Carmona-Fontaine et al., 2008).

Melanocyty tedy představují buňky neuroektodermového původu. Jejich hlavním výsledným produktem je pigment melanin, který významně přispívá k fotoprotekci epidermis. Melanocyty nacházíme především v kůži a vlasovém folikulu, dále pak v cévnatce a duhovce oka, ale např. i ve vnitřním uchu (viz. Tab. 1) (Borovansky et Riley, 2011; Hirobe, 1995; Takeda et al., 2007; Tobin, 2008).



V samotném vlasovém folikulu se nacházejí přinejmenším dvě rozdílné populace melanocytů. Jedná se o diferencované melanocyty v oblasti matrix vlasového bulbu, které podmiňují barevnost vlasů a ochlupení (Tobin, 2008). Dále jsou zde ale i melanocyty (respektive melanoblasty) s charakteristikami kmenových buněk v oblasti tzv. *bulge* (tj. ztluštění zevní kořenové pochvy) vlasového folikulu. Tyto prekurzorové melanocyty jsou aktivovány během anagenní fáze vlasového cyklu a slouží k obnově diferencovaných melanocytů (Buac et Pavan, 2007; Gola et al., 2012; Tobin, 2008).

Nejlépe se melanocyty dají odlišit v elektronovém mikroskopu, kde jsou identifikovány podle velkého jádra, přítomnosti melanosomů v cytoplazmě a dle typických dendritických výběžků. Melanin je enzymaticky syntetizován v několika krocích ve specializovaných organelách, melanosomech, z tyrozinu za pomoci mj. enzymu tyrozinázy (Hearing, 2011). Tyto organely slouží k hromadění konečného produktu melaninu, který je posléze prostřednictvím dendritických výběžků transportován mezi okolní keratinocyty epidermis a ve vlasovém folikulu keratinocytům matrix vlasového bulbu (Tobin, 2008). Samotný mechanismus předávání melanosomů keratinocytům není zcela objasněn, ale předpokládá se, že keratinocyty mechanismem podobným fagocytóze pohlcují odlomené konce dendritických výběžků s melanosomy, nebo přijímají volné melanosomy vyloučené exocytózou (Schiaffino, 2010; Van Den Bossche et al., 2006). Melanocyt takto zásobuje pigmentem v průměru 36 keratinocytů a tvoří tzv. epidermální melanocytární jednotku (Haass et Herlyn, 2005). Samotný počet melanocytů kolísá podle anatomické lokalizace kůže, ale i mezi různými jedinci a rasami (v průměru asi 1200/mm<sup>2</sup>) (Cichorek et al., 2013). Rasové rozdíly v pigmentaci kůže neodráží jen rozdílné zastoupení melanocytů, ale hlavně jejich různou základní aktivitu v syntéze melaninu. Samotná produkce melaninu a jeho transport do keratinocytů je významný protektivní faktor k ochraně pokožky před ultrafialovým zářením (dále jako UV záření, anglicky: Ultra Violet radiation). Role melanocytů v patogenezi melanomu je popsána v kapitole 4.2.1.

Tab.: 1 Fyziologické rozložení melanocytů v organismu; modifikováno dle Borovansky et Riley, 2011.

<b>Klasické melanocyty</b>	epidermální (interfolikulární; folikulární: <i>bulge, bulbus</i> )
	Dermální
<b>Neklasické melanocyty</b>	oko ( <i>uvea: iris, corpus ciliare; choroidea</i> ); <i>retina</i>
	vnitřní ucho ( <i>cochlea</i> , vestibulární aparát)
	orgánové (meningy, slzná žláza, kosti, gonády)

Pro detekci melanocytů jsou vhodnější rozšířené barvicí techniky, protože jen základní technikou barvení (H&E) se melanocyty od okolních keratinocytů odlišují obtížně. Z rozšířených histologických technik se nejvíce využívá barvení podle Fontana-Massona (metodika popsána v monografii Bancroft, 2012). V imunohistochemickém značení lze použít nejrůznější protilátky. Nejběžněji se používá anti S100 (respektive S100B) patřící mezi proteiny vázící vápník (Gown et al., 1986), jde ale o znak společný pro mnoho buněčných typů pocházejících z neurální lišty. Specifita tohoto znaku je tedy nízká, jakkoli výhodou metody je její vysoká senzitivita. Více specifické protilátky jsou např. HMB-45 protilátka proti glykoproteinu PMEL 17, který je součástí membrány melanosomů, nebo Melan-A vázící se na proteiny matrix melanosomů (označován jako MART-1, melanosomal matrix proteins) (Gown et al., 1986). K běžné detekci lze využít i protilátky proti tyrozináze, klíčovému enzymu v biosyntéze melaninu.

### 1.3. Vazivová komponenta kůže a sliznic

Pod bazální laminou se nachází vazivová vrstva označovaná v kůži jako dermis (*seu corium*, česky škára) a v oblasti sliznic jako podslizniční vazivo (*tela submucosa*). Dermis má podle lokalizace tloušťku 0,6–3 mm. V oblasti epidermálních čepů vybíhá dermis komplementárně v dermální papily a je proto označována jako *pars papillaris*, hlubší část pak jako *pars reticularis corii*. Dermální papily jsou výrazné v místech vystavených tlakovým vlivům a předpokládá se, že zvětšují kontaktní plochu, a tak posilují dermo-epidermální spojení (Lullmann-Rauch, 2012). Jak dermis, tak i podslizniční vazivo tvoří podpůrnou strukturu přirozeného krycího epitelu. Nacházíme zde jak složku buněčnou (tvořenou rezidentními buňkami, tj. převážně fibroblasty,

endoteliemi, histiocyty, mastocyty a zároveň buňkami migrujícími např. při imunologických reakcích), tak i část tvořenou mezibuněčnou hmotou.

Fibroblasty představují nejdůležitější buňky pro syntézu a současně i remodelaci složek ECM, především kolagenu typu I, III, a V, elastických vláken a fibronektinu. Mají vřetenitý tvar a jsou rozptýleny jednotlivě mezi snopci vláken jimi tvořené ECM. Zároveň se podílejí na tvorbě bazální membrány (produkcí např. kolagenu typu IV a lamininu). Fibroblasty vedle kontinuální tvorby a remodelace ECM produkují také řadu růstových faktorů a cytokinů, které mají přímý vliv na proliferaci a diferenciaci epitelových buněk a hrají tak významnou roli při epitelově mezenchymových interakcích (Sorrell et al., 2007; Werner et al., 2007). Podle histologického klíče můžeme zjednodušeně rozdělit kožní fibroblasty na fibroblasty uložené v papilární dermis, fibroblasty uložené v retikulární dermis a funkčně značně odlišné fibroblasty tvořící dermální papilu vlasového folikulu (Sorrell et Caplan, 2004).

Toto rozdělení není čistě jen histologické, ale odráží zejména jejich rozdíly funkční, např. v produkci jednotlivých komponent ECM. Superficiálně uložené fibroblasty v papilách dermis produkují mnohem více kolagenu typu III, než fibroblasty v retikulární dermis a navíc se významně podílejí na produkci komponent bazální laminy (Sorrell et al., 2007; Sorrell et Caplan, 2004).

Další typ fibroblastů je uložen v oblasti vlasového folikulu, resp. v jeho dermální papile. Jedná se o vysoce specializované buněčné populace účastnící se vývoje a cyklické obměny vlasového folikulu pomocí jemně regulovaných epitelově mezenchymových interakcích (podrobněji popsáno v kapitole 2.1.) (Botchkarev et Kishimoto, 2003; Sorrell et Caplan, 2004). Ukazuje se tedy, že fibroblasty nejsou jen buňky tvořící podpurnou tkáň a její ECM, ale jedná se o buňky s řadou rozdílných funkcí účastnících se v rámci epitelově mezenchymových interakcí i dějů regulačních.

ECM dermis a podslizničního vaziva vrstevnatých dlaždicových epitelů se skládá ze složky vláknité a amorfní. Hlavní složkou vláknité komponenty ECM jsou kolagenní vlákna tvořená především kolagenem typu I, který představuje až 80 % veškerého, zde zastoupeného kolagenu. Především právě kolagen typu I probíhá paralelně s kožním povrchem a zodpovídá tak za pevnost kůže. V optickém mikroskopu tato vlákna lze odlišit jednak díky jejich velikosti, ale i dle dobré barvitelnosti eozinem. Dále zde nacházíme kolagen typu III, který je dominantním kolagenem fetální dermis a méně i kolagen typu V. Elastická vlákna jsou v koriu stejně četná jako vlákna

kolagenní, odlišná je jejich biomechanická charakteristika (Sherratt, 2009). Zodpovídají za odolnost a elasticitu kůže a nacházíme je především v retikulární dermis, kde vytváří hustou síť. Z této sítě vystupují vlákna směrem k epitelu, postupně se tenčí, ztrácejí svou amorfní elastickou komponentu a v oblasti úponu k bazální membráně mají již jen složku mikrofibrilární. Ve třetím deceniu života elastických vláken začíná ubývat, což bývá interpretováno jako iniciální známky stárnutí lidské kůže (Sherratt, 2009). Retikulinová vlákna se nejlépe zobrazí v optickém mikroskopu po impregnaci solemi stříbra (Ushiki, 2002). Jsou velmi jemná, v kůži se vyskytují jen v malém množství v oblasti potních žláz, pozorujeme je také kolem cév a bazální membrány.

Z amorfní komponenty jsou v dermis významně zastoupeny především proteoglykany jako dermatan sulfát, chondroitin sulfát a kyselina hyaluronová (Jarvelainen et al., 2009; Lullmann-Rauch, 2012; Trowbridge et Gallo, 2002). Kyselina hyaluronová na sebe váže vodu a podílí se na hydrataci kůže (Lullmann-Rauch, 2012). Velký negativní náboj podmíněný zejména masivní sulfatací umožňuje těmto makromolekulám propůjčovat dermis až gelovitou konzistenci, tedy vytvářet prostředí příhodné pro migraci buněk. Kromě mechanické funkce mají proteoglykany další rozmanité funkce, podílí se na vazbě řady růstových faktorů, cytokinů, adhezivních molekul a účastní se tak na ovlivnění biologické funkce těchto molekul. Dermatan a chondroitin sulfát mají schopnost vázat se na komponenty ECM, a to především na kolagen, dále pak na fibronectin a laminin (Trowbridge et al., 2002).

Kromě výše popsaných fibroblastů a jimi vytvářené a průběžně remodelované ECM jsou v normální dermis přítomny i buňky imunitního systému vykonávající průběžně imunologickou kontrolu (tzv. *surveillance*).

Histiocyty, označované jako tkáňové makrofágy, vznikají z monocytů, které do oblasti vaziva pronikají z krevního řečiště. Jejich aktivní formy jsou makrofágy s bohatou enzymatickou výbavou, které fagocytují antigeny, odpadní produkty metabolismu a produkují řadu chemotaktických mediátorů (Calonje, 2011). Histiocyty společně s dalšími buňkami imunitního systému, žírnými buňkami a endotelovými buňkami spolupracují na koordinaci prezentace antigenů, na indukci buněčné specifické zánětlivé reakce při granulomatózním zánětu.

Mastocyty, neboli žírné buňky, jsou lokalizovány zejména v pojivové tkáni nebo podél krevních kapilár (Galli et Tsai, 2008). Jsou podobné bazofilním granulocytům a ve své cytoplazmě mají metachromatická granula obsahující histamin, heparin,

serotonin a další mediátory. Na svém povrchu mají četné receptory pro IgE a jejich uplatnění je především v zánětlivých a alergických reakcích.

## 2. Epitelově mezenchymové interakce

Epitelové a mezenchymové buňky reprezentují dvojici hlavních živočišných buněčných populací účastnících se na stavbě kůže a sliznic. Dříve byly do jisté míry chápány jako striktně oddělené protipóly, zejména v ohledu na jejich histogenezi, ale i morfologii. Epitelové buňky jsou charakterizovány tvorbou pevných vzájemných vazeb, ale i vazbami ke komponentám ECM. Strukturálně jsou charakterizovány expresí specifických intermediálních filament, keratinů (Schweizer et al., 2006). Naproti tomu mezenchymové buňky nevytváří pevná buněčná spojení jako buňky epitelové. Strukturálně je pro ně typická exprese vimentinu jako intermediálního filamenta cytoskeletu mezenchymových buněk (Jeong et al., 2012). Epitelově mezenchymové interakce tak reprezentují vzájemné ovlivňování dvou rozdílných buněčných populací, které odpovídá za dynamické udržování homeostázy organismu jak v průběhu prenatalního vývoje, postnatalního růstu, tak například během fáze cyklické obměny některých struktur, či fáze hojení.

### 2.1. Epitelově mezenchymové interakce při vývoji a hojení

Vzájemnou a přesně organizovanou interakci buněčných populací je možno sledovat od nejranějších stádií vývoje lidského embrya. Principiálně je možné tyto děje spatřovat například již v průběhu gastrulace, tedy při invaginaci buněk primitivního mezodermu a formování třívrstevného zárodečného terčíku v průběhu třetího embryonálního týdne (Thiery et al., 2009).

I když morfogenetické změny spojené s gastrulací se u jednotlivých živočichů významně liší, jedná se o poměrně univerzální proces, při kterém se zakládá vývojová osa organismu. Právě na tomto procesu byla objasněna například i klíčová role transkripčních faktorů *snail* a *twist*, regulujících jeden z hlavních pochodů, který je důsledkem epitelově mezenchymových interakcí, a to EMT. Jako řídicí růstové faktory se zde účastní kromě fibroblastového růstového faktoru (dále jako FGF, anglicky: Fibroblast Growth Factor) i transformující růstový faktor beta (dále jako TGF- $\beta$ , anglicky: Transforming Growth Factor beta), který odpovídá za ventralizaci ektodermu

při zakládání embrya a reguluje expresi snail, a tedy vstup buněk do procesu EMT (Cho et al., 2013).

Obdobné pochody se poté uplatňují nejen v dalších fázích embryonálního vývoje, a to v lokálně specifických obměnách při vývoji jednotlivých orgánů (včetně kůže) a při vývoji končetin, ale objevují se i postnatálně, například v průběhu cyklické obnovy vlasových folikulů (Fuchs, 2007).

Při vývoji vlasového folikulu dochází k interakci epitelu a mezenchymových buněk základu dermis. Tuto interakci charakterizuje zvýšená signalizace prostřednictvím FGF a současně inhibice signálu zprostředkovaného pomocí kostního morfogenetického proteinu-4 a -7 (dále jako BMP-4 a -7, anglicky: Bone Morphogenetic Protein-4 and -7). Tak dojde nejprve k indukci drobné ploché epiteliální invaginace označované jako vlasová plakoda (Fuchs, 2007; Noramly et Morgan, 1998; Sennett et Rendl, 2012). Následně dalším růstem vlasové plakody a vlivem signalizace sonic hedgehog v epitelovém základu vlasového folikulu dochází k organizaci přilehlých mezenchymových buněk do tzv. dermální papily vlasového folikulu, což je později doprovázeno i změnou konformace plakody v útvar již podobný spíše pohárku. Podobně jsou signalizační dráhy aktivovány i během postnatální cyklické obnovy vlasových folikulů (Botchkarev et Kishimoto, 2003; Fuchs, 2007). V telogenní fázi růstového cyklu vlasového folikulu mezenchymové interakce vytváří inhibiční signály, které udržují vlasový folikul v klidovém stádiu. Během anagenní fáze dochází k aktivaci stimulačních drah jak v epitelu, tak v přilehlém mezenchymu. V následné katagenní fázi dojde k ukončení aktivačních stimulů mezi epitelovou a mezenchymovou komponentou z předchozí fáze, což vede k indukci apoptózy v oblasti epitelové části vlasového bulbu a i dermální papila vstupuje do klidového stavu (Botchkarev et Kishimoto, 2003; Fuchs, 2007). Růstové faktory podílející se na tvorbě molekulární sítě signálů ovlivňující epitelovou a mezenchymovou komponentu vyvíjejícího se vlasového folikulu zahrnují Wnt, TGF- $\beta$ , BMP, sonic hedgehog, FGF, notch, epidermální růstový faktor (dále jako EGF, anglicky: Epidermal Growth Factor) a nádorový nekrotizující faktor (dále jako TNF, anglicky: Tumor Necrosis Factor) (Botchkarev et Kishimoto, 2003; Millar, 2002). Obdobné interakce nalézáme i při vývoji jiných orgánů jako je zub, mléčná žláza či plíce nebo při udržování homeostázy jiných tkání a orgánů v procesu kontinuální obnovy, či při hojení.

Nesporný podíl epitelově mezenchymových interakcí je i při formování bazální membrány. Experimentálně byl doložen efekt, kdy fibroblasty z papilární dermis pod

vlivem keratinocytů produkují TGF- $\beta$ , ten zpětně stimuluje produkci lamininu a kolagenu typu IV a VII keratinocyty (Sorrell et Caplan, 2004). Vedle iniciace produkce komponent bazální membrány tyto vzájemné interakce napomáhají i správnému rozložení jednotlivých funkčních proteinů v oblasti bazální membrány (Sorrell et Caplan, 2004).

Další významný příklad podílu epitelově mezenchymové interakce nalézáme při formování prostředí nezbytného pro kmenové buňky. Takové prostředí je označováno jako „*niche*“. Obecně lze říci, že udržení tohoto „*niche*“ má největší význam ve tkáních s vysokou frekvencí buněčné obměny, jako je kostní dřev, krypty výstelky střevní nebo např. vlasový folikul v kůži (Clavel et al., 2012).

Vlasový folikul je i v tomto případě opět ilustrativním modelem pro studium funkce epitelově mezenchymových interakcí a jejich podíl při formování a udržování komplexního „*niche*“. Epidermové kmenové buňky nacházíme ve vlasovém folikulu v oblasti ztluštění zevní kořenové pochvy, tzv. *bulge*. Jejich dělení, které je potřebné pro vstup folikulu do dalšího růstového cyklu, je aktivováno především během anagenu, kdy pod vlivem Wnt je v těchto buňkách stabilizován  $\beta$ -catenin (Wnt/ $\beta$ -catenin), pravděpodobně jeden z klíčových signálů v aktivaci těchto kmenových buněk (Fuchs, 2007). Fibroblastům dermální papily se v tomto prostředí přisuzuje funkce inhibiční a stabilizační, která je dokumentována při cyklické obnově vlasového folikulu (Botchkarev et Paus, 2003; Fuchs, 2007). Na myším modelu byly i tyto buňky charakterizovány expresí znaku Sox2. Jejich funkce však nebyla objasněna během cyklické obměny vlasových folikulů, ale pouze během vývoje epidermis a vlasového folikulu, kde bez Sox2 pozitivních buněk docházelo k poškození postnatálního vývoje vlasových folikulů, přičemž je nutno podotknout, že aktuální myší model představuje vzhledem k synchronizaci cyklu vlasových folikulů velmi příhodný, avšak poměrům lidské tkáně poněkud vzdálený model (Clavel et al., 2012).

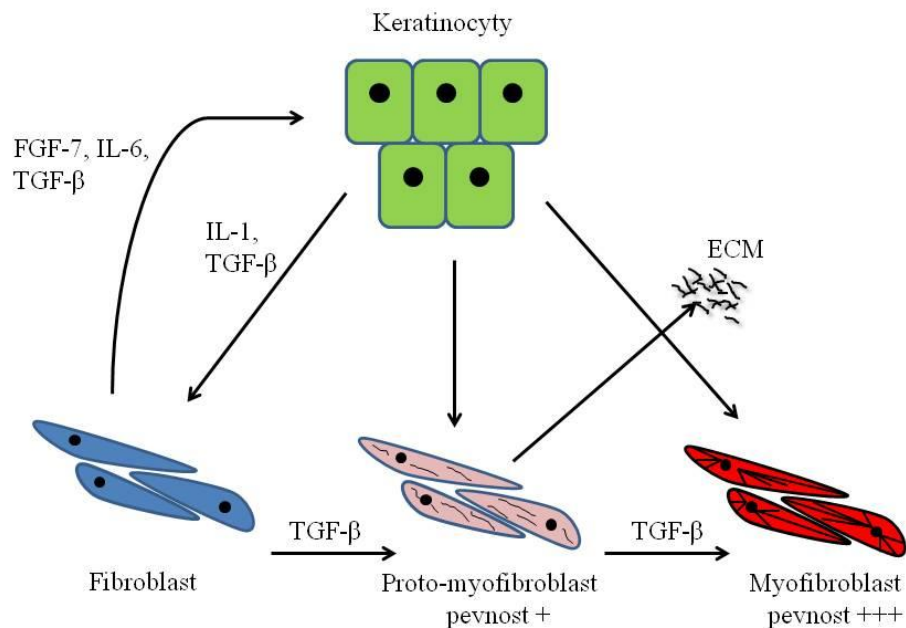
Další ze součástí podílejících se na komplexním „*niche*“ jsou komponenty ECM, neporušená bazální lamina a přítomnost specifických integrinů, které napomáhají vazbě epidermálních kmenových buněk na laminin a kolagen typu IV bazální membrány, a komponenty okolní ECM, jako je fibronectin (Chen et al., 2013). Integriny mají také schopnost vázat jiné povrchové buněčné adhezivní molekuly jako CD 54 (ICAM1), či CD 106 (VCAM1) přítomné v kmenovém prostředí „*niche*“ (Barczyk et al., 2010). Pro epidermální kmenové buňky je typická exprese  $\alpha 6 \beta 1$ -integrinu (Barczyk et al., 2010; Boehnke et al., 2012; Chen et al., 2013).

Význam epitelově mezenchymových interakcí lze pozorovat i během fáze hojení postnatálních tkání. Hojení kůže představuje především rekonstrukci bariérové funkce kůže. K dosažení tohoto cíle je třeba, aby nejprve granulační tkáň v místě poranění byla schopna vytvořit novou pojivovou tkáň a následný epitelový uzávěr obnovil plné fyziologické funkce kůže. Na tomto schématu je patrné, že pro úspěšné hojení je potřeba dokončit obě fáze, ale že je nutné i zachování časové posloupnosti těchto dějů. Je tedy zřejmé, že vzájemné epitelově mezenchymové interakce v tomto procesu hrají nezanedbatelnou úlohu. Samotný proces hojení může být rozdělen do fáze zánětlivé, fáze granulační, fáze syntézy nové pojivové tkáně a fáze reepitelizace, která je následována dlouhou fází postupné remodelace vzniklé jizvy (Viera et al., 2012; Werner et al. 2007;). Ve fázi zánětlivé a fázi granulační dochází k výrazné aktivaci přilehlého mezenchymu, jeho proliferaci a následné tvorbě velkého množství ECM. Ve fázi reepitelizace dochází k proliferaci epitelových buněk a jejich další migraci do oblasti prozatímní tzv. matrice z novotvořené pojivové tkáně (Werner et al. 2007).

Experimentálně je prokázán vliv keratinocytů, které stimulují fibroblasty k syntéze růstových faktorů, což zpětně stimuluje i proliferaci keratinocytů (schéma 1). Jeden z hlavních růstových faktorů produkovaný fibroblasty během hojení je FGF 7. Naopak epitelové buňky odpovídají zvýšenou expresí IL-1 a TGF- $\alpha$  a trombocyty produkovaným růstovým faktorem (dále jako PDGF, anglicky: Platelet-Derived Growth Factor) (Werner et Grose, 2003; Werner et al., 2007). Jak epitelové buňky, tak fibroblasty během hojení produkují TGF- $\beta$ , který je zodpovědný za konverzi fibroblastů v myofibroblasty a ty propůjčují hojící se ráně dostatečnou pevnost a pružnost (myofibroblasty v kontextu nádorového mikroprostředí a hojící se rány jsou podrobněji popsány v kapitole 5.2.). TGF- $\beta$  představuje mimořádně potentní cytokin, jehož výsledné působení je ale variabilní a závislé na koncentraci, délce působení a na kontextu tkáně. Současně dokáže v systému hojící se tkáně zásadně odlišně, či dokonce zcela divergentně, působit na různé buněčné populace. Např. vystupňovaná produkce TGF- $\beta$  fibroblasty hojící se rány je pravděpodobně odpovědná i za tvorbu keloidních jizev, což je spojeno s poruchou remodelace jizvy jako konečné fáze hojení (Viera et al., 2012). Některé práce poukazují i na podobnost aktivovaných, již v předchozí kapitole zmíněných, signálních drah (Wnt/ $\beta$ -catenin, TGF-b, Notch a Hedgehog) během fází vývoje a fáze hojení kůže (Kirsten et al., 2013).



Schéma 1.: Schéma působení růstových faktorů v modelu hojící se rány, modifikováno dle Werner et al., 2007.



V procesech fyziologické odpovědi na poranění dochází také k dějům odpovídajícím svým charakterem EMT. Během hojení kůže podstupují některé vitální keratinocyty, které jsou lokalizovány v okraji rány, zásadní změny fenotypu. Tento proces jim umožní ve výsledku lépe migrovat a tak snadněji reepitelizovat oblast poranění. Tyto aktivované epitelové buňky jsou charakterizovány expresí transkripčního faktoru slug, který je považován za řídicí transkripční faktor (Arnoux et al., 2008). Podobně jako snail i slug se může podílet na inhibici exprese E-cadherinu a přispívat tak k rozvolnění keratinocytů a jejich následné migraci (Come et al., 2006). Exprese slug a snail při hojení je indukována několika intracelulárními signálními cestami, které jsou aktivovány pomocí epidermálního růstového faktoru (dále jako EGF, anglicky: Epidermal Growth Factor), FGF, TGF- $\beta$  a kaskádou Ras. Při aktivaci keratinocytů v průběhu hojení rány se zdá být klíčová signální dráha EGF, na což poukazuje práce Edmeho a spol., která prokázala přítomnost upregulace receptoru pro EGF v hojící se epidermis (Edme et al., 2002). Tyto změny jsou doprovázeny také přestavbou komponent ECM zahájenou pomocí MMP 2 a 9) (Yin et al., 2013).

V případě hojení ran tedy dochází v organismu i postnatálně k indukci epitelově mezenchymových interakcí jako jednoho ze základních mechanismů k obnovení tkáňové homeostázy.

## 2.2. Epitelově mezenchymové interakce v nádorech

Epitelově mezenchymové interakce se uplatňují, v určitých modifikacích, i v mnoha patologických procesech. Pozornost byla tomuto fenoménu věnována např. při plicní fibróze (Horowitz et Thannickal, 2006), ale především při formování nádorového prostředí (Plzak et al., 2010). V analogii ke složení normálních tkání a orgánů je možné i v nádorech odlišit nádorový parenchym a podpůrné tkáně, obecně označované jako nádorové stroma.

Na vzniku nádorů se podílí genetické a regulační změny, na jejichž základě nastává nejen ztráta funkční regulace dělení, ale i přirozeného zániku buněk. Nekontrolované dělení nádorového klonu, který získal nezávislost na kontextu okolní tkáně, vede k enormní akumulaci nádorových buněk (Sulic et al., 2005).

Nádorové buňky například často vykazují odlišnou metabolickou aktivitu v porovnání s jejich mateřskou tkání (Plzak et al., 2010; Sundaram et al., 2013). Díky alternativním metabolickým pochodům jsou tak často mnohem odolnější vůči hypoxii. Právě fyzikální možnosti difuze kyslíku jsou zde ilustrativním, nikoli však jistě jediným z limitujících faktorů pro nezávislý růst maligního klonu (Tatum et al., 2006). Právě proto je pro další úspěšný růst nádoru tak významné permissivní prostředí, které umožňuje (zde například neoangiogenezi) malignímu klonu překročení mezní velikosti. Z tohoto schématu je tedy evidentní, že interakce maligně transformované buněčné populace a okolní tkáně, tvořené jinými maligně netransformovanými buněčnými typy a mezibuněčnou hmotou (souhrnně jde tedy o celé nádorové stroma), je podstatným faktorem v patogenezi nádorových onemocnění. Epitelově mezenchymové interakce zde tedy sehrávají významnou úlohu při tvorbě specifického mikroprostředí, kde dochází k vzájemnému ovlivnění jak nádorového parenchymu, tak nádorového stromatu, a proto, jak jsme již zmínili, i v nádorové biologii je užíváno v analogických situacích termínu „*niche*“ (Fidler, 2003).

Dřívější předpoklad, že nádorové stroma představuje pouze podpůrnou tkáň nádorů, je již překonán a v současné nádorové biologii je mu připisována významná role umožňující přímé ovlivnění biologické funkce nádorového parenchymu (Li et al.,

2007; Lorusso et Ruegg, 2008; Plzak et al., 2010). Již více než před sto lety britský chirurg Stephen Paget formuloval hypotézu, že nádorové buňky potřebují ke svému životu i specifické prostředí, tak jako semeno potřebuje ke svému růstu úrodnou půdu (tzv. *seed and soil hypothesis*) (souhrně kriticky revidováno ve Fidler, 2003). Právě tyto myšlenky vedly ke studiu nádorového mikroprostředí a vzájemného ovlivnění komponent nádorového klonu a nádorového stromatu, a to především pomocí nádorově asociovaných fibroblastů (dále jako CAFs, anglicky: Cancer-Associated Fibroblasts) v podobě epitelově mezenchymových interakcí. Vedle funkce podpůrné a produkce komponent ECM jsou CAFs schopny produkovat řadu růstových faktorů a cytokinů/chemokinů odpovědných za proliferaci a migraci buněk nádorového klonu (De Wever et al., 2008). Složení a funkce nádorového stromatu je podrobněji popsána v kapitole 5.

Epitelově mezenchymové interakce v nádorové biologii dokladuje již řada experimentálních prací. Lacina a spol. demonstrovali vliv CAFs izolovaných z bazocelulárního karcinomu kůže a následně i z dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku (dále jako HNSCC, anglicky Head and Neck Sqamous Cell Carcinoma). Tyto CAFs byly schopny v přímé ko-kultuře ovlivnit diferenciační stav normálních keratinocytů, abnormální nálezy zde byly demonstrovány na úrovni exprese keratinů-19 a -8. Keratin-19 je jedním ze znaků nezralých epidermálních buněk, keratin-8 nalézáme ve vícevrstevném dlaždicovém epitelu pouze během embryonálního vývoje, nikoli však postnatálně a jeho přítomnost v nádorech je ve spojitosti se závažnější prognózou onemocnění (Lacina et al., 2007a; Lacina et al., 2007b; Matthias et al. 2008). Vedle přímých buněčných kontaktů se předpokládá i vliv interakce prostřednictvím parakrinní sekrece. Později Strnad a spol. provedli obdobný experiment, ale za pomoci tzv. nepřímé ko-kultivace a kondiciovaných medií. Keratinocyty a CAFs izolované z HNSCC byly v tomto případě odděleny pomocí mikroporézní membrány. Pomocí analýzy celogenomové transkripce tuto autoři detekovali v CAFs z HNSCC zvýšenou expresi inzulinu podobnému růstovému faktoru-2 (dále jako IGF-2, anglicky: Insulin-like Growth Factor 2) a BMP-4. Tyto růstové faktory (rekombinantního původu) po přidání do kultivačního media byly následně schopny ovlivnit v identickém rozsahu diferenciační stupeň normálních keratinocytů stejně jako CAFs. Tuto fenokopii bylo následně možno úspěšně blokovat pomocí specifických inhibičních monoklonálních protilátek (Strnad et al., 2010).

Jiný aspekt těchto interakcí sledovali v experimentu Kolář a spol., kdy tyto autoři demonstrovali efekt ko-kultivace normálních dermálních fibroblastů a normálních lidských keratinocytů na tvorbu interleukinu-6 a interleukinu-8 (dále jako IL-6 a IL-8, anglicky: Interleukin 8, Interleukin 6) a chemokinového motivu C-X-C ligand 1 (dále jako CXCL-1, anglicky: Chemokine (C-X-C motif) ligand-1). U normálních dermálních fibroblastů bylo zjištěno, že produkce těchto faktorů je patrná v odpovědi na přítomnost keratinocytů v ko-kultuře jen omezenou dobu. Naproti tomu CAFs tyto faktory produkují i po dlouhodobé kultivaci již bez přítomnosti epitelových buněk. Bylo prokázáno, že tyto cytokiny/chemokiny byly následně schopny ovlivnit diferenciaci normálních keratinocytů (Kolar et al., 2012). Tento efekt lze vysvětlit schopností nádorových buněk signalizovat parakrině směrem k formujícímu se stromatu (tzv. *recruitment*), které je následně schopné zpětně stimulovat růst a ovlivnit diferenciální stupeň nádorových buněk. Opět jde o mechanismus podobný například hojení, ale jeho kontext a regulace jsou odlišné.

CAFs mohou ovlivňovat i migrační a metastatické vlastnosti nádorových buněk. Elenbaas a spol. provedli experiment, při kterém implantovali myším jak samotné buňky karcinomu prsu, tak ve směsi s korespondujícími CAFs. Úspěšnost vytvoření nádoru a jeho následný růst byl mnohonásobně vyšší v kombinaci nádorových buněk s permissivní stromální komponentou, tj. s CAFs (Elenbaas et Weinberg, 2001).

I při progresi nádorových buněk skrze bazální membránu dochází k disrupci bazální membrány a usnadnění jejich invaze do okolí. Tomuto procesu napomáhají CAFs produkcí MMP (MMP-2 a -9), jejichž enzymatická degradace okolních komponent ECM a součástí bazální membrány je v procesu delaminace klíčová (Roy et al., 2009). Celý proces lokální invaze a metastazování nádoru je v řadě situací doprovázen EMT nádorových buněk jako důsledek aktivace vysoce specializovaných signálních drah, typických pro epitelově mezenchymové interakce. Tyto buňky, aktivně pronikající z nádoru do okolí, se označují jako tzv. buňky invazivní fronty. Vykazují v některých situacích i expresi znaků kmenovosti jako CD 133, CD 44 a při invazi současně ztrácí, či alespoň snižují expresi E-cadherinu, což je chápáno rovněž jako jeden ze znaků EMT (Satpute et al., 2013; Supernat et al., 2013).

Řada prací poukazuje na určitou vnitřní heterogenitu nádorových buněk v rámci nádoru a tedy na fakt, že poměrně malá část nádorové populace je vysoce tumorigenní, především pro svou výraznou rezistenci na konvenční chemoterapeutika a značnou schopnost sebeobnovy, tedy schopnost repopulace nádorového parenchymu po

například terapeutickém zásahu chemo- či radioterapie. Tyto buňky nyní stojí v popředí zájmu nádorové biologie. Obecně jsou označovány jako nádorové kmenové buňky (dále jako CSCs, anglicky: Cancer Stem Cells) (Clarke et al., 2006). Poslední poznatky navíc ukazují, že při epitelově mezenchymových interakcích mohou CAFs hrát roli ve formování „*niche*“ specifického pro CSCs. CAFs, vedle formování ECM, která se na tvorbě takto specifického mikroprostředí také účastní (Borovski et al., 2011), se mohou podílet produkcí řady růstových faktorů, cytokinů a chemokinů na formování „*niche*“, které je pro CSCs nezbytné (Chen et al., 2014; Liao et al. 2010; Weiland et al., 2012).

Ačkoli procesy zahrnující epitelově mezenchymové interakce a EMT jsou již dobře zdokumentovány v *in vitro* modelech nádorového prostředí, jejich jednoznačný průkaz v oblasti klinických a histopatologických sledování je otázkou řady diskuzí (Thiery, 2009) a praktická aplikace v diagnostické patologii není prozatím součástí doporučených postupů.

### 3. Glykobiologie a lektinová imunohistochemie

Glykobiologie je vědní obor zabývající se strukturou, biologickou syntézou a studiem funkcí sacharidů v biologických systémech. Nověji se toto odvětví intenzivně zabývá i funkcí modifikovaných molekul (např. glykosylovaných), tzv. glykokonjugátů, jejich regulací, ale i mechanismy, které jsou schopny tyto modifikace v organismu rozpoznávat.

Sacharidy byly relativně dlouho opomíjeny molekulárními biology a byly považovány spíše za molekuly podílející se především na metabolických dějích (jako zdroj energie, či například jako substráty biochemických reakcí) nebo za molekuly strukturální (ale převážně u rostlin a bezobratlých). Sacharidy jsou přitom v živé přírodě nejpočetnější skupinou organických molekul a téměř všechny organismy je potřebují ke svému životu.

Molekulární biologie byla spíše zaměřena na sledování základní linie uchování genetické informace mezi nukleovými kyselinami (replikace, transkripce a reverzní transkripce) a realizací této informace při syntéze proteinů (translace) (schéma 2.).

Rozšíření tohoto tzv. základního dogmatu molekulární biologie o aspekt glykobiologický otevřelo cestu pro detailnější porozumění jemným regulačním mechanismům (Gabiuss et al., 2002). Pro vysokou komplexnost struktury jednotlivých

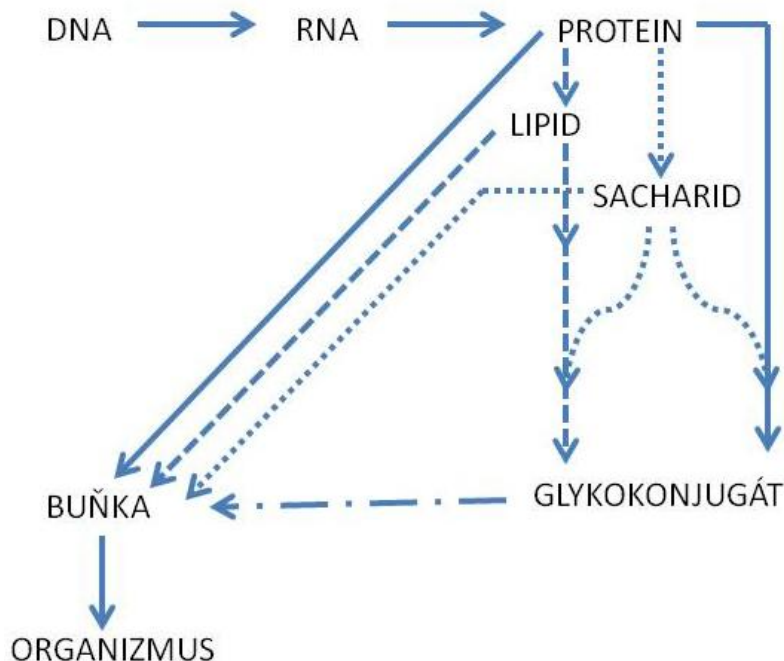
molekul sacharidů a značnou variabilitu interakcí mezi jejich molekulami a skrze možné další stereochemické modifikace představují sacharidy vhodný a vysoce různorodý nástroj jak pro řízení buněčných jevů, tak ale i pro jejich studium.

Heterogenita glykokonjugátů je tedy dána několika jejich charakteristickými vlastnostmi:

- (i) schopností sacharidových reziduí různého typu vytvářet glykosidické vazby s dalšími sacharidy;
- (ii) schopností reagovat i s jinými molekulami (např. proteiny, či lipidy);
- (iii) strukturální charakteristikou molekul;
- (iv) vysokou variabilitou polymerizace i tvorbou variabilních izomerů (Mody et al., 1995).

Uvedené skutečnosti dokazují strukturální heterogenitu sacharidů a tím schopnost uchovávat velký objem informace při buněčných dějích. Takovéto informace nejsou přímo kódovány v genomu, ale jsou genomem podmíněny. Tento informační potenciál sacharidů byl označen jako glykokód (Villalobo et Gabius, 1998).

Schéma 2.: Modifikováno podle Varki et al., 1999.



### 3.1. Lektiny

Lektiny představují skupinu proteinů, které jsou schopny specificky rozpoznávat a vázat molekuly sacharidů, a tak dekodovat biologickou informaci uloženou

v glykokódu. Vazba sacharidů a lektinů je odlišná jak od vazby antigen-protilátka, tak i od vazby enzymatické. Tato specifická vazba lektinů je *in vivo* zacílena na tzv. endogenní ligandy, kterými jsou sacharidové skupiny přítomné na molekulách nejrůznějších glykokonjugátů (např. glykoproteinů).

Vazba lektin-monosacharid je relativně slabá s disociační konstantou v rozmezí  $10^{-3} - 10^{-6}$  mol., zatímco vazba karbohydrátového komplexu na povrchu molekul glykolipidů a hlavně glykoproteinů je mnohem silnější (Rabinovich et al., 2007). Schopnost lektinů rozpoznávat specifické cukerné motivy je dána aminokyselinovou sekvencí v jejich molekule, resp. ve specializované doméně rozpoznávající sacharidy (dále jako CRD, anglicky: Carbohydrate Recognition Domain). CRD domény působí jako morfologické a funkční selekční faktory, neboť neumožňují navázání různých stereoizomerů, i když ty jsou si strukturálně velmi blízké. Například concavalin A se specificky váže s  $\alpha$ -izomerem glukózy a manózy, ale nevytvoří již vazbu s jejich  $\beta$ -izomerem (Mody et al., 1995).

Pionýrské poznatky o lektinologii jsou datovány na konec 19. století, kdy roku 1888 Herrmann Stillmark popsal aglutinaci erytrocytů po přidání skočce (*Ricinus communis*). Později se mu podařilo izolovat i substanci odpovědnou za tento efekt – *ricin*. (Sharon et Lis, 2004). V dalších letech byly izolovány i jiné rostlinné substance se stejným efektem aglutinace erytrocytů, navíc specifickým v rámci AB0 systému. První lektiny byly tedy popsány u rostlin a v rostlinných extraktech a až později se podařilo izolovat i rozmanité lektiny z mikroorganismů a živočichů (Bies et al., 2004).

Role lektinů v molekulární biologii je v současné době předmětem velkého zájmu. V druhé polovině 20. století bylo totiž objeveno velké množství lektinů a následně i objasněna například jejich specifita vůči cukerným motivům a schopnost aglutinovat kromě krvinek i jiné normální či nádorové buňky (Aub et al., 1963). V roce 1975 byl popsán první živočišný lektin vážící galaktosu a galaktosidy, tento typ lektinů byl označen jako endogenní lektin (Teichberg et al., 1975). Zájem o endogenní lektiny a jejich dostupnost vedly například k důkazům, že buněčný povrch obsahuje množství karbohydrátových domén, které napomáhají ke vzájemným buněčným kontaktům a vazbám buněk ke komponentám ECM (Kaltner et Stierstorfer, 1998).

### 3.2. Galektiny

Pojem galektin (méně často je užíváno synonymum galactin) byl zaveden v roce 1994 pro endogenní lektiny dříve označované jako S-lektiny (S pro přítomnost SH-




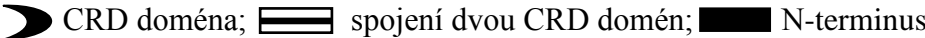
sulfhydrylové skupiny). Pro zařazení mezi galektiny musí molekuly splňovat následující podmínky:

- (i) afinita k  $\beta$ -galaktosidům
- (ii) sekvenční homologie v CRD části, která se váže se sacharidem (Ahmed et Vasta, 1994; Barondes et al., 1994).

Galektiny se mohou vyskytovat jako mono – tak i oligomery a jsou schopny vytvářet mezi glykokonjugáty příčné vazby, což umožní např. na membránách segregaci receptorů do funkčních domén, a tak účinněji regulovat buněčné pochody závislé na transdukcii signálu (Hirabayashi et Kasai, 1993). Hirabayashi také provedl podrobnou strukturální klasifikaci galektinů do tří podskupin, které však neodpovídají sekvenční homologii ani schopnosti vázat specifické motivy:

- (i) „*prototyp*“ – s jednou CRD doménou;
- (ii) „*tandem repeat*“ – obsahuje dvě různé CRD domény na témže polypeptidovém řetězci, které jsou navzájem odlišné a typově unikátní;
- (iii) „*chimera*“ – obsahuje kromě CRD ještě jinou doménu (Tab. 2).

Tab.: 2 Strukturální klasifikace galektinů (Liu et Rabinovich, 2005)

Strukturální typ	Struktura	Typy galektinů
<i>Prototyp</i>		Galektin-1,2,5,7,10,11,13,14,15
<i>Tandem repeat</i>		Galektin-4,6,8,9,12
<i>Chimera</i>		Galektin-3
		

Galektiny jsou navíc charakterizovány N–terminální acetylací. Syntéza galektinů se odehrává na ribozomech v cytosolu, odkud mohou být transportovány do buněčného jádra nebo na buněčný povrch a dále i extracelulárně. Samotný transportní mechanismus není zatím jednoznačně objasněn, ale pravděpodobně se nejedná o transport cestou vezikul Golgiho aparátu. Vzhledem ke svým různorodým lokalizacím se galektiny podílí na různých intra- a extracelulárních pochodech. Galektiny ovlivňují adhezi buněk, signální transdukcii, regulaci apoptózy a buněčného cyklu. Galektiny se účastní, kromě regulace pre- i postnatální homeostázy v normálních tkáních, také na mnoha patologických dějích, jako jsou autoimunitní reakce či nádorové bujení (Fred Brewer, 2002; Nakahara et al., 2005).



Význam galektinů v jádře byl studován na galektinu-1, -2 a -3, u kterých bylo poukázáno na možný vliv při sestřihu pre-mRNA a možný podíl na buněčném dělení (Kodet et al., 2011; Patterson et al., 2004). Galektin-3 interaguje s  $\beta$ -cateninem a je tak zahrnut do Wnt/ $\beta$ -catenin signalizační dráhy (Hirabayashi et al., 2002). V jádře se může vyskytovat také galektin-2, u něhož se podařilo prokázat, že v některých liniích se jeho nukleární akumulace objevuje jako důsledek buněčného stresu vyvolaného např. fyzikálními faktory (UV zářením) (Dvorankova et al., 2008).

Ve vrstevnatých dlaždicových epitelech byly intenzivně studovány zejména galektin-1, -3 a -7. Bylo prokázáno, že postupná diferenciacie epitelových buněk je doprovázena i změnou glykokonjugátových motivů (Smetana et al., 2003). V normální epidermis v buňkách bazální a suprabazální vrstvy jsou exprimovány nejen galektin-1 a -7, ale i jejich reaktivní sacharidové epitopy (tzv. vazebná místa). Naproti tomu galektin-3 a jeho vazebná místa byly detekovány striktně suprabazálně. Další ze skupiny endogenních lektinů, galektin-9, se v kontrastu k ostatním vyskytuje pouze ve vrstvě bazální (Cada et al., 2009; Fik et al., 2013; Plzak et al., 2000). Praktickou aplikaci těchto poznatků přinesla retrospektivní studie hodnotící přežívání pacientů s HNSCC, zaměřená na detekci stavu glykosylace a buněčné diferenciacie, která ukázala, že přítomnost galektinu-3 může sloužit jako ukazatel lepší prognózy u nádorů vycházejících z těchto epitelů (Plzak et al., 2004).

Další poznatky o glykobiologii poukazují na možný význam galektinu-1 jako součásti ECM. Galektin-1 se podílí na formování myofibroblastů v nádorovém stromatu a v hojící se jizvě. Jeho efekt navíc je nezávislý na působení TGF- $\beta$ 1 (Dvorankova et al., 2011). Přítomnost extracelulárně secernovaného galektinu-1 tak byla dána do jasné souvislosti s expresí  $\alpha$ -SMA (nejběžnější marker myofibroblastů) v nádorovém stromatu HNSCC. Tato kolokalizace může být použita jako prognostický znak a je v souvislosti s progresí a horší prognózou těchto nádorů (Valach et al., 2012).

Ukazuje se tedy, že galektiny přispívají ke tvorbě nádorového mikroprostředí a podílejí se na jeho komplexnosti. Stejně tak hrají významnou roli u hojících se ran. Objasnění mechanismů, které se podílí na regulaci a vazbě sacharidových motivů, může přispět k hlubšímu porozumění komplexnosti těchto biologických dějů.

### 3.3. Histochemie glykokonjugátů, imunohistochemie lektinů a lektinová imunohistochemie

Klasické histochemické metody jsou schopny jen zcela hrubého rozpoznání přítomnosti sacharidů v analyzované tkáni (Vacek, 1988; Bancroft, 2012). Používaná je i v současnosti metoda barvení PAS (akronym PerIodic Acid, Schiff reagens) v různých technologických modifikacích, jejíž chemickou podstatou je průkaz volných aldehydových skupin v molekulách sacharidů, nejde tedy o průkaz specifický. Metodu je možno kombinovat s působením enzymů (diastáza, hyaluronidáza etc.) štěpících určité substráty, což umožňuje poněkud bližší určení komponent tkáně.

Pro muciny a velké molekuly proteoglykanů v pojivových tkáních je zavedena řada barvicích technik jako například mucikarmín, alciánová modř (a její modifikace podle pH), Haleova technika za použití koloidního železa a nejrůznější reakce metachromatické. Ani tyto metody nejsou ovšem specifické (Vacek, 1988; Bancroft, 2013).

Za velmi specifické a diskriminace jednotlivých sacharidových entit schopné lze považovat reakce používající například rostlinné lektiny. Techniky užívající značené lektiny označujeme jako lektinovou histochemii. Základní přehled lektinů a jejich afinity ukazuje Tab. 3.

Endogenní lektiny, a to především galektiny, díky své struktuře mohou být použity pro standardní imunizaci a získané polyklonální i monoklonální protilátky mohou být dále využity pro standardní imunohistochemické metody (Gabius et Kayser, 2014; Kayser et al., 1991). Při jejich použití je vzhledem k dosti konzervované struktuře nutná relativní opatrnost při testování protilátek, především pro zkříženou reaktivitu jedné protilátky s ostatními galektiny. Doporučuje se tedy provádění kontrol jak imunohistochemických tak např. s využitím western blottingu (McMahon, et al., 2008). Imunohistochemická detekce galektinů je možná na buněčných kulturách, na tkáních zmrazených a dokonce i na tkáních fixovaných ve formalinu a zalitých do parafinu (Gabius et Kayser, 2014).

Osvojení metod izolace z přírodních zdrojů a později i produkce rekombinantních lidských lektinů otevřelo nové možnosti v detekci (s nadsázkou možno říci „čtení“) rozdílných sacharidových motivů. Právě tato lektinová histochemie tedy umožňuje sledování glykokódu a jeho pochopení. Ke specifické detekci cukerných motivů lze dobře využít biotinylované lektiny včetně galektinů. Naopak vzhledem k tomu, že endogenní lektiny jsou součástí normálních i patologických tkání, k jejich

detekci lze využít právě jejich fyziologickou schopnost vázat značené sacharidy (glykoligandy).

Tab. 3: Přehled základních lektinů a jejich afinity (modifikováno dle Berg et al., 2002 )

Organismus	Lektin	Afinita
<b>Manózu vážící lektiny</b>		
Canavalia ensiformis (Kanaválie)	Concanavalin A (ConA)	Váže $\alpha$ -manosidické struktury
Lens culinaris (Čočka jedlá)	Lentil lektin (LCH)	Fukosylovaných jádro regionu bi-a triantenární komplex typu N-glykanů
Galanthus nivalis (Sněženka podsněžník)	Snowdrop lektin (GNA)	$\alpha$ 1-3 a $\alpha$ 1-6 manózové struktury
<b>Galaktózu/N-acetylgalaktosamin vážící lektiny</b>		
Erythrina cristagalli (Zarděnice hřebenitá)	Coral Tree (ECL)	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R
Arachis hypogaea (Podzemnice olejná)	Peanut Agglutinin (PNA)	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr (T-Antigen)
Artocarpus integrifolia (Chleboň celolistá)	Jacalin (AIL)	(Sia)Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr (T-Antigen)
<b>Sialovou kyselinu/N-acetylglukosamin vážící lektiny</b>		
Triticum vulgarit (Pšenice obecná)	Wheat Germ agglutinin (WGA)	GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc, Neu5Ac (sialová kyselina)
Sambucus nigra (Bez černý)	Elderberry lectin (SNA)	Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal(NAc)-R
Maackia amurensis (Mákie amurská)	Maackia amurensis lectin (MAL)	Neu5Ac/Gc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R

Vždy je ale třeba uvážit, že velikost a trojrozměrná struktura lektinů ovlivňuje jejich dostupnost pro specifické glykoligandy. Např. srovnáme-li rostlinný a živočišný lektin obdobné reaktivity, vazebnost obou lektinů k dané tkáni se může zásadně lišit, což může být způsobeno rozdílem v dostupnosti vlastního a exogenního receptoru pro daný glykoligand (Dvorankova et al., 2002).

Vazebná reaktivita endogenních lektinů přítomných v tkáních a buňkách může být porovnávána pomocí glykokonjugátů. Tyto glykokonjugáty obvykle představují makromolekulu s navázaným specifickým cukerným motivem. Struktura nosiče je významná, protože je známo, že CRD váže lépe cukerný motiv na polymeru (např. albumin s navázanou manózou) než samotný cukerný motiv (Gabijs et al., 1993; Labsky et al., 2003). Pro detekci CRD domén se zdá být výhodnější použití

syntetických sacharidů v podobě dendrimérů. Tyto molekuly lze také připravit v biotinilované formě a tedy i pro metody imunohistochemické (Andre et al., 1999).

Lektinová imunohistochemie představuje poměrně snadný a především citlivý nástroj k objasnění komplexní biologické funkce lektinů včetně galektinů, jejich využití v imunohistochemických metodách se v dnešní době stává již relativně běžnou metodou (Gabiuss et Kayser, 2014).

#### **4. Nádory vycházející z dlaždicových epitelů**

Nádorová onemocnění jsou u dospělých osob druhou nejčastější příčinou úmrtí. Jde o rozsáhlou skupinu onemocnění, jejichž společným znakem je neregulovaný růst buněk. Definicí nádorového bujení rozumíme vytvoření novotvaru – *neoplazma*, kterým je *de novo* vytvořena masa tkáně, jejíž růst přesahuje anatomické i funkční potřeby normální tkáně a pokračuje i poté, co příčiny vyvolávající nádorové onemocnění přestaly působit (Povysil et Stainer, 2011).

Incidence zhoubných nádorů v populaci neustále stoupá a představuje tak závažnou zdravotní, sociální i ekonomickou zátěž. Incidence dlaždicobuněčných karcinomů bez ohledu na lokalizaci se v České republice pohybuje okolo 44/100 000 obyvatel, mortalita ve stejném roce dosáhla přibližně 11/100 000 obyvatel (ÚZIS, 2010) (poznámka: nejsou zde započteny nádory kůže pod diagnózou C44, kde většinu incidence (196/100000) představuje bazocelulární karcinom kůže) (ÚZIS, 2010). Dlaždicobuněčné karcinomy primárně nacházíme v místech, kde vrstevnatý dlaždicový epitel tvoří přirozený povrch, tj.: kůže, dutina ústní, *pharynx*, *larynx*, jícen, *anus*, *vulva*, *vagina* a děložní hrdlo.

Na druhé straně můžeme tyto nádory primárně nacházet i v místech, kde došlo vlivem působících faktorů k metaplazii původního epitelového typu, tedy k ektopické přítomnosti dlaždicového epitelu, ze kterého teprve následně karcinom vychází. Nejčastěji se tak děje v bronchiální sliznici (Davidson et al., 2013).

Nádory studované v této dizertační práci jsou nádory hlavy a krku a nádory kůže, jmenovitě HNSCC a kožní melanom, který ale svou histogenezi a onkologickou charakteristikou představuje problematiku odlišnou, v některých aspektech dokonce kontrastující. Je třeba podotknout, že z pohledu onkologie a onkologické chirurgie

představují i dlaždicobuněčné karcinomy v různých lokalizacích hlavy a krku poměrně různorodou problematiku.

Orientační výčet maligních nádorů hlavy a krku a kůže dělené dle histogeneze znázorňuje následující schéma (Tab. 4 a 5).

Tab. 4: Typy maligních nádorů v oblasti hlavy a krku dle histogeneze; zestručněno a modifikováno podle WHO klasifikace.

<b>Původ tkáně</b>	<b>Příklady nádorů</b>
<b>Epitelové</b>	<b>Dlaždicobuněčný karcinom,</b> adenokarcinomy, mikrocystický adnexální karcinom
Lymfoepitelové	Lymfoepitelový karcinom
Lymfomy	Nehodgkinské lymfomy
Mezenchymové	Sarkomy, fibrosarkom, Kaposiho sarkom
Melanocytární nádory	melanom

Tab.: 5 Typy maligních nádorů kůže dle histogeneze; zestručněno a modifikováno podle WHO klasifikace.

<b>Původ tkáně</b>	<b>Příklady nádorů</b>
Epitelové	bazocelulární karcinom, dlaždicobuněčný karcinom, mikrocystický adnexální karcinom, sebaceózní karcinom
Mezenchymové	dermatofibrosarkom, angiofibrosarkom, angiosarkom, Kaposiho sarkom
<b>Melanocytární nádory</b>	<b>melanom</b>
Kožní lymfomy	<i>mycosis fungoides</i> /Szezariho syndrom, CD30+ lymfomy, folikulární lymfom

#### 4.1. Dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku

HNSCC nepatří podle statistik k absolutně nejčtenějším (ve srovnání s jinými nádory jiných lokalizací), ale v dané lokalitě představují až 90 % všech nádorů (Gregoire et al., 2010). Navíc pro svůj invazivní a destruktivní růst v dané lokalizaci a

vysokou mortalitu představují obrovskou zátěž jak pro pacienta, tak i pro celý zdravotnický systém. Incidence v ČR se pohybuje okolo 12/100 000 obyvatel (souhrnně nádory dutiny ústní, jazyka, tonzil, orofaryngu, hypofaryngu a laryngu). Je však alarmující, že mortalita v roce 2010 v ČR dosáhla v průměru prakticky 52% incidence v daném roce (nejvíce u nádorů hypofaryngu 87% a nejméně u nádorů tonzil 39, 5%) (ÚZIS, 2010). I v dlouhodobých statistikách přežívání jsou značné rozdíly mezi lokalizací jednotlivých nádorů. Např. pětileté přežívání u dlaždicobuněčných karcinomů jazyka činí až 90 %, ale v případě nádorů hypofaryngu pouze 31% (Howlader et al., 2010).

#### 4.1.1. Histogeneze a histologie

Dlaždicobuněčný karcinom je nádor, jehož buňky si typicky ponechávají schopnost diferencovat se do všech vrstev dlaždicových epitelů s převahou *stratum superficiale*. Schopnost diferenciaci těchto nádorů zahrnuje i možnost rohování (úplně nebo jen částečně se zbytky jader v podobě *parakeratózy*). Při invazi karcinomu do podslizničního vaziva dochází k tvorbě nepravidelných čepů, které následně mohou podstupovat rohování. Tyto zrohovělé hmoty se zde díky ztrátě kontaktu s povrchem hromadí a utváří až tzv. rohové koule (tzv. *kankroidové perly*). Na rozdíl např. od normální epidermis se tedy zrohovělé vrstvy na povrch vůbec nedostávají a naopak jsou uloženy hluboko pod povrchem. U méně diferencovaných nádorů dochází k rohování jen v určitém množství ojedinelých buněk, což se označuje jako monocelulární rohování (Povysil et Stainer, 2011). Míra rohování v jednom nádoru může být velmi odlišná a v některých nádorech rohování zcela chybí (Kumar et al, 2009). Proto je pro bližší popis nádoru používáno již od roku 1902 schéma podle von Hansemanna (tento postup, *de facto* předcházel dnes používanému gradingu - von Hasemann, 1902).

Dlaždicobuněčné karcinomy mohou růst exofyticky, endofyticky, či může být růst kombinovaný. Při převaze exofytického růstu dochází k tvorbě až květákovitých útvarů na povrchu postižené oblasti. Existuje i varianta, tzv. *verukózní dlaždicobuněčný karcinom*, nejčastěji laryngu (ale i kůže či penisu), která si ponechává prakticky jen exofytickou růstovou aktivitu (Strojan et al., 2006). Endofytický růst představuje invazi karcinomu do okolní tkáně. Při převaze endofytického růstu často na povrchu nacházíme nekrózu postižené tkáně s následnou tvorbou ulcerace, přičemž v hloubce pokračuje invazivní růst karcinomu. Dlaždicobuněčné karcinomy rostou převážně lokálně invazivně a destruktivně, další šíření je nejčastěji cestou lymfatickou do

regionálních lymfatických uzlin. Teprve až v pozdějších stádiích nacházíme i hematogenní metastatické postižení, které je spojeno s výrazně horší prognózou (Ferlito et al., 2001).

Vzniku dlaždicobuněčných karcinomů často předchází tzv. prekancerózy. Z obligátních prekanceróz v oblasti kůže lze zmínit např. *keratosis actinica*, v oblasti sliznic pak *leukoplakii*. Fakultativní prekancerózy představují chronické zánětlivé procesy vředy, píštěle nebo jizvy různé etiologie. Samotnou podstatou prekancerózních lézí je změna struktury a někdy i proliferace patologicky změněného epitelu, která ale nepřekročí bazální membránu. Morfologické změny patrné v této oblasti označujeme jako *dysplazii* (či dysplastické změny) a dle stupně jejího rozsahu (ve srovnání s normální strukturou) dysplazii hodnotíme tradičně jako mírnou, střední a těžkou. Později se do sledování dysplastických změn epitelů zavedl termín intraepitelová neoplázie, která se hodnotí opět ve třech stupních a podle místa postižení se udává i lokalizace. V oblasti děložního čípku tedy nalézáme cervikální intraepitelovou neoplazii (CIN), dále pak vulvární (VIN) a anální (AIN), či penilní (PIN) (Kumar et al., 2009; Povysil et Stainer, 2011). Tato problematika byla široce rozpracována zejména v rámci klinické prevence nádorů děložního čípku a je třeba upozornit na fakt, že koncept hodnocení těchto nálezů je v současnosti udáván tzv. Bethesda systémem (revize z roku 2001); detaily této problematiky již přesahují rámec předkládané práce.

Dalším stupněm v patologii epitelu je léze označena jako *carcinoma in situ*, kde kromě ztráty diferenciací a polarizace buněk nacházíme i četnější buněčné atypie a mitózy (Cassarino et al., 2006). Diagnostika a léčba již těchto časných změn je z onkologického hlediska velmi významná a v mnoha oblastech je rutinní součástí zdravotnické péče. Příkladem je právě výše zmíněný screening dlaždicobuněčného karcinomu v oblasti krčku děložního. Správná diagnostika a následná terapie prekanceróz a dysplazií epitelu může zabránit invazivním formám karcinomu s jeho následky, proto je nyní této problematice v klinicko-patologické korelaci věnována velká pozornost.

Dlaždicobuněčné karcinomy jsou specifické svým destruktivním invazivním růstem a především lokoregionálním šířením do spádových lymfatických uzlin. Detekce metastatického postižení v oblasti spádové uzliny sama o sobě znamená významné zhoršení prognózy pacienta. Postižení jedné uzliny, tedy stadium N1 podle TNM klasifikace, znamená zhoršení prognózy v pětiletém horizontu přežití pacientů až o 50 %. Hematogenní rozsev je považován za pozdní příznak a je pozorován ve 4-26 %

klinických případů. Jelikož se jedná o pozdní a mnohdy dlouho asymptomatický průběh, jsou tito pacienti většinou indikováni k paliativní léčbě. I v případě poměrně brzké diagnózy jsou pacienti s nálezem dlaždicobuněčného karcinomu zatíženi velkým procentem lokálních i uzlinových recidiv (D'Souza et al., 2003).

#### 4.1.2. Rizikové faktory a prognostické znaky

Mezi rizikové faktory patří bezpochyby kouření a jiné formy užívání tabáku. Dále je nutné zmínit pravidelnou konzumaci alkoholu, a to především destilátů. Z dalších faktorů jsou diskutovány dietní vlivy jako avitaminóza A, případně vliv chronického dráždění při gastroesofageálním reflexu nebo přítomnost chronického zánětu např. slizniční postižení *lichen planus* (Cada et al., 2008; Klozar et al., 2010; Toner et O'Regan, 2009).

Za samostatný a významný rizikový faktor je považována infekce způsobena lidským papilomavirem (dále jako HPV, anglicky: Human Papiloma Virus). Papilomaviry podle míry jejich rizikovosti lze v tomto pohledu dělit na vysoce rizikové (např. sérotypy 16 a 18) a viry s potenciálem nízkým (např. sérotyp 1). Řada retrospektivních studií poukazuje na velké rozdíly v procentu dlaždicobuněčných karcinomů vzniklých v různých anatomických oblastech pravděpodobně na podkladě HPV infekce, resp. procento nádorů, kde HPV infekce byla prokázána. Vzhledem k značné variabilitě HPV a absenci spolehlivého rutinního panHPV markeru je tento průkaz obtížný.

Některé práce ukazují, že se jedná asi o jednu třetinu všech dlaždicobuněčných karcinomů v ORL oblasti, v převážné většině případů vyvolaných sérotypem HPV 16 (Betiol et al., 2013). Jiné práce v téže oblasti však popisují až 60 % HPV pozitivních nádorů, tj. nádorů, kde HPV infekce byla prokázána pomocí molekulárních technik (Koslabova et al., 2013). Obecně ale z těchto prací vyplývá, že nádory s průkazem HPV infekce mají lepší prognózu než HPV negativní nádory v téže oblasti (Klozar et al., 2010).

Při porovnání incidence, dlouhodobého přežívání a rizikových faktorů u jednotlivých lokalizací i v rámci ORL oblasti je zřejmé, že dlaždicobuněčné karcinomy vykazují značnou heterogenitu biologického chování. Toto je ještě markantnější při porovnání s nádory vyskytujícími se na kůži. V současnosti se diagnostická a léčebná schémata odvíjejí od lokalizace primárního nádoru a rozsahu postižení s následnou



histologickou klasifikací včetně stanovení *gradingu* nádoru. I přes neustále se zdokonalující chirurgické přístupy a diagnostické možnosti jsou tyto postupy nedostatečně přesným zdrojem informace pro predikci a v klinické praxi lze pozorovat i naprosto rozdílnou terapeutickou odpověď na konvenční léčebná schémata u pacientů s podobnými nálezy (Cognetti et al., 2008). Tyto poznatky vedou k hledání dalších biomarkerů, které by zpřesnily diagnostické postupy a byly schopny přesněji predikovat další prognózu onemocnění.

Jako takové biomarkery rizikové povahy nádoru lze brát i přítomnost molekul, které se podílí na biologickém chování nádorů. Jejich detekce může být tak předmětem tzv. prediktivní patologie. Role galektinů v prediktivní onkologii u HNSCC byla již naznačena v kapitole 3.2., ve které bylo poukázáno na retrospektivní studii hodnotící přítomnost galektinu-3 jako významného prognostického faktoru (Plzak et al., 2004).

Novější poznatky o glykobiologii upozorňují na možný podíl galektinu-1 (jako součásti ECM) na formování myofibroblastů v nádorovém stromatu. Zvýšená exprese galektinu-1 a  $\alpha$ -SMA může tedy být dalším prognostickým faktorem v těchto nádorech (Valach et al., 2012). Na druhé straně galektin-9 se jeví jako molekula schopná detekovat změnu normálního epitelu, neboť jeho ztráta je spojena s přítomností dysplastických změn epitelu (Fik et al., 2013).

Velká pozornost je v případě těchto nádorů zaměřena na problematiku CSCs. Jak jsme již zmínili, experimentální práce ukazují, že malá populace nádorových buněk je vysoce tumorigenní, protože disponuje mimořádnou schopností sebeobnovy a tedy repopulace nádoru. I v HNSCC byly detekovány buňky, které splňují tato kritéria. Tyto buňky byly charakterizovány expresí CD133 (*seu* Prominin1), CD44 a enzymu acetaldehyd dehydrogenáza 1 (dále jako ALDH1, anglicky: Acetaldehyde Dehydrogenases 1) (Satpute et al., 2013). Některé práce dokazují, že právě CD 133 pozitivní buňky jsou rezistentní vůči radioterapii (Ogawa et al., 2013). Další práce poukazují na chemorezistenci CSCs a vliv např. EMT, který se spolupodílí na udržení kmenového charakteru nádorových buněk i v případě HNSCC (Masui et al., 2013). Role CSCs je nyní předmětem řady studií a pochopení biologie a regulace CSCs se zdá být jedním z klíčů k cílené a personalizované léčebné strategii nádorů (Rahman et al., 2012).

#### 4.1.3. Léčba a nové přístupy

Léčba HNSCC je i přes velké pokroky onkologického výzkumu nadále primárně chirurgická. Rozsah chirurgického výkonu je však často pro pacienta značně zatěžující až mutilující. Onkologická radikalita při obecně špatné prognóze tohoto onemocnění je často poměřována se snahou o zachování následné kvality života pacientů.

Léčebná doporučení u HNSCC se jako u jiných nádorů odvíjí od rozsahu postižení určeného dle TNM klasifikace (Gregoire et al., 2010). Ve stádiu T1 a 2 se nejvíce uplatňuje chirurgické řešení nebo radioterapie a to jak zevní, tak brachyradioterapie. Tyto léčebné možnosti poskytují kontrolu onemocnění, i když zatíženou četnými recidivami (Licitra et al., 2009). V pokročilém stádiu T3 a 4 jsou metodou volby chirurgické výkony včetně následné chirurgické rekonstrukce postižené oblasti. V pooperační fázi následuje zpravidla radioterapie nebo její kombinace s chemoterapií, a to především deriváty platiny nebo v kombinaci s fluorouracilem (Bernier et al., 2004; Forastiere et al., 1992). Samotná chemoterapie případně doplněná o regionální radioterapii je metodou léčby u primárně neoperovatelných lézí či při detekci vzdálených metastáz (Forastiere et al., 2003).

Studium nádorového mikroprostředí umožnilo kombinaci standardních léčebných postupů s léčbou biologickou. V případě HNSCC jsou tyto nové metody ve stádiu klinických studií, ale jejich zavedení do standardní praxe je otázkou času. Asi nejvíce zdokumentován je vliv inhibitoru receptoru pro EGF, tzv. *cetuximab*, který byl studován v kombinaci s chemoterapií a radioterapií (Numico et al., 2013; Vermorken et al., 2008). Přestože jde o teoreticky velmi jednoznačný, silný a dobře dokumentovaný léčebný cíl, je biologická odpověď na léčbu pomocí tohoto inhibitoru v praxi do značné míry omezená. Toto je vysvětlováno mutacemi v kaskádě *K-ras*, ovlivňující expresi tohoto receptoru. Ty jsou pravděpodobně odpovědné za sníženou terapeutickou odpověď na tuto biologickou léčbu (Karapetis et al., 2008). Z dalších nově studovaných biologických léků lze zmínit *bevacizumab*, monoklonální protilátku proti vaskulárnímu endotelovému růstovému faktoru (dále jako VEGF, anglicky: Vascular Endothelial Growth Factor), která slouží k inhibici stromální neoangiogeneze. *Bevacizumab* blokuje vazbu s receptorem pro VEGF (dále jako VEGFR, anglicky: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor). Jeho vliv byl sledován při kombinaci vysokodávkované chemoterapie cysplatinou a cílené radioterapie. Předběžné výsledky této studie poukazují až na 75% úspěšnost remise během 2letého sledování (Fury et al., 2012).

#### 4.2. Nádory vycházející z minoritní buněčné populace dlaždicových epitelů - Melanom

Incidence melanomu, zhoubného kožního nádoru vycházejícího z pigmentových buněk, se v ČR zvýšil v období mezi lety 1970 a 2010 cca 5x (19,5/100 000 obyvatel) (ÚZIS, 2010). Česká republika v incidenci melanomu zaujímá 11. místo ve světovém srovnání, kde první místo zaujímají Austrálie a Nový Zéland s incidencí až 38/100 000 obyvatel (AIHW, 2010). Melanom u nás stále nejčastěji postihuje pacienty v 5. - 7. deceniu, tyto postižení představují z celkové incidence až 45 %. Při porovnání s ostatními nádory je v našich podmínkách melanom pátým nejčastěji diagnostikovaným nádorem u mužů a sedmým u žen. Na rozdíl od incidence mortalita zůstává v posledních 20 ti letech přibližně na stejné úrovni. Hlavní příčinou stabilizace mortality je zvyšující se včasný záchyt nemocných s ranými stadii melanomu, která jsou léčitelná pouhou chirurgickou excizí. Počet zachycených případů v pokročilých stadiích, která jsou již zatížena vysokou mortalitou, zůstává v posledních desetiletích stabilní a představuje v současnosti přibližně čtvrtinu nově diagnostikovaných nádorů. Komplexní přehled přežívání v závislosti na klinickém stadiu dle TNM klasifikace ukazuje následující tabulka (Tab. 6).

Tab.: 6. Procentuální přežití při postižení melanomem v závislosti na klinickém stadiu. Modifikováno dle (Shenenberger, 2012).

<b>Stadium</b>	<b>TNM klasifikace</b>	<b>5leté přežívání</b>	<b>10leté přežívání</b>
<b>0</b>	Melanoma in situ	99%	99%
<b>IA</b>	<b>T1a</b> N0 M0	97%	95%
<b>IB</b>	<b>T1b-T2a</b> N0 M0	92%	86%
<b>IIA</b>	<b>T2b-T3a</b> N0 M0	81%	67%
<b>IIB</b>	<b>T3b-T4a</b> N0 M0	70%	57%
<b>IIC</b>	<b>T4b</b> N0 M0	53%	40%
<b>IIIA</b>	<b>T1a-4b N1a-2a</b> M0	78%	68%
<b>IIIB</b>	<b>T1a-4b N1a-2c</b> M0	59%	43%
<b>IIIC</b>	<b>T1a-4b N1-3</b> M0	40%	24%
<b>IV</b>	<b>T1a-4b N1-3 M1</b>	15-20%	10-15%
<b>Legenda: T(x)a bez ulcerace; T(x)b s ulcerací; N uzlinové metastázy; M vzdálené kožní a orgánové metastázy</b>			

Navzdory pokrokům v diagnostice a léčbě nádorových onemocnění je však prognóza pacientů, a to především u metastazujícího melanomu, velmi špatná. Medián přežití nemocných s metastazujícím melanomem se pohybuje v ČR mezi 2–9 měsíci v závislosti na typu a množství metastáz (Krajsova, 2010). Pokroky ve výzkumu biologie nádorového mikroprostředí naznačují možnosti budoucí a dnes již i schválené personalizované biologické léčby melanomu. Navzdory úspěchům ve zlepšené diagnostice a léčbě je však prognóza pacientů s metastazujícím melanomem stále závažná.

#### 4.2.1. Histogeneze

Melanocyty jsou buňky vývojově pocházející z neurální lišty. Během stádia uzávěru neurálních valů, které je zahájeno již koncem 3. embryonálního týdne, některé neuroektodermové buňky v dorzolaterální oblasti formující se neurální trubice podstupují EMT a aktivně vstupují do okolního mezodermu (Sadler et al., 2011). V mezodermu tyto buněčné populace dále migrují dorzálním směrem, tedy do budoucí dermis a v ní vyvíjejících se vlasových folikulů, kde se následně diferencují v melanocyty (Erickson et Reedy, 1998; Osawa et Fisher, 2008). Je tedy evidentní, že pro správný vývoj melanocytu je naprosto nepostradatelnou podmínkou jeho schopnost alespoň dočasně pozbývat klasických vlastností epitelových buněk a naopak nabývat charakteristik bližších mezenchymovým buňkám, jejichž fenotyp je výhodnějších v procesu migrace. V konečné fázi dochází k procesu opačnému. Tyto procesy musí být velmi precizně řízeny v čase i v prostoru, tedy v kontextu okolních tkání.

Signální dráhou řídící dominantně neurální indukci, vývoj prekurzorů melanocytů a jejich následnou migraci a diferenciaci ve zralé melanocyty je Wnt/ $\beta$ -catenin. Kromě tohoto vývojového aspektu jsou hlavní části této dráhy aktivní i v melanomu a předpokládá se, že jejich patologická aktivace v postnatálním období může být spojena s progresí onemocnění (Uong et Zon, 2010).

Jedinečnou funkční vlastností melanocytů je schopnost reagovat na UV ozáření syntézou melaninu, který následně předávají okolním keratinocytům a tak jim propůjčují vůči UV záření ochranu. Kromě exprese genů spojených s melanogenezí, vykazují melanocyty i zvýšenou schopnost odolávat proapoptotickým signálům, což se zdá být klíčové pro větší rezistenci proti UV záření (Lee et al., 2013b). Další reakcí melanocytů na UV záření je i zvýšení jejich mitotické aktivity. Důsledkem následného zvýšení proliferace melanocytů je podle některých autorů i existence získaných névů

(Kadekaro et al., 2005). Melanocyty pocházejí z buněk s vysokou migrační schopností a mohou i postnatálně reagovat na UV záření či poranění migrací (Lee et al., 2013a). Koordinovaná souhra diferenciac, proliferace a řízené apoptózy je předpokladem pro zachování buněčné homeostázy. Poruchy těchto homeostatických mechanismů mohou vysvětlit vysokou agresivitu nádorových buněk melanomu. Pochopení signálních drah a molekul, které se podílejí na regulaci funkcí melanocytů za vývoje a za normálních postnatálních situací, může pomoci objasnění vývoje melanomu.

V posledních letech je věnována velká pozornost genetickému a molekulárně biologickému kontextu ve vývoji melanomu. Recentně v centru pozornosti je především porucha v regulaci MAP kinázy, která je zodpovědná za buněčnou proliferaci. Její součástí je BRAF, což je serin/treonin proteinová RAF kináza. Mutaci BRAF (například BRAF V600E) lze nalézt asi v polovině melanomů (50-70 %) (Gill et Celebi, 2005). Jiné práce však poukazují na to, že mutace BRAF není nejspíše jedinou příčinou maligního zvratu, jelikož většina benigních melanocytárních lézí (70-82 %) nese také mutaci v BRAF genu, ale proliferační aktivita je po dokončení vývoje těchto lézí zastavena (Kumar et al., 2004).

Další široce sledovaná mutace je v genu N-Ras, který slouží jako intracelulární transduktor signálu. I tyto mutace vznikají v důsledku UV záření, ale výsledky studií zabývající se jejich incidencí se značně liší (5,9 % v benigních melanocytárních lézích, 5,2-28 % v melanomu) (Hocker et Tsao, 2007; Poynter et al., 2006). Jejich význam pro transformaci benigních melanocytárních lézí v maligní melanom je tak nejistý. V névových afekcích se nemutované formy těchto genů mohou podílet na aktivaci rozdílných procesů, jako je inhibice proliferace melanocytů, zástava růstu a podíl na buněčné senescenci.

Samotná buněčná senescence může být výsledkem řady faktorů zahrnujících jak aktivaci onkogenů, tak i oxidativní stres či poruchy DNA v podobě abraze telomer (Serrano et Blasco, 2001). Nejvíce je nyní studována role a mutace ve dvou klíčových faktorech ovlivňující buněčnou senescenci, a to proteinů p16 a p53 (Campisi, 2005). Protein p16 inhibuje buněčný cyklus v reakci na stresové faktory pomocí blokády komplexu cyklinu D1 a jeho kinázy (Cdk4). Buňka je tak zablokována v G1 fázi buněčného cyklu. Tumor supresorový protein p53 je mutován asi v polovině všech lidských nádorů, podílí se na řízení buněčného cyklu, apoptózy a udržování genetické stability (Campisi, 2005; Chin, 2003; Steele et Lane, 2005;). Ukazuje se, že právě poruchy těchto jemných regulačních mechanismů mohou být zásadní i v patogenezi

melanocytárních névů a při jejich progresi v melanom (Gray-Schopfer et al., 2006; Michaloglou et al., 2005). Porozumění těmto molekulárně genetickým poruchám a stejně tak i jejich studium, je nezbytným klíčem k budoucí personalizované onkologické léčbě, která zvláště u melanomu zaznamenala v poslední době dramatický vývoj (podrobněji popsáno v kapitole 4.2.4).

#### 4.2.2. Histologie a klasifikace

Histologické vyšetření tvoří pilíř diagnostiky benigních i maligních melanocytárních lézí. Histologická diagnostika melanomu je mnohdy obtížná vzhledem k mnoha popsaným histologickým variantám melanomu. Nezbytná je komplexnost pohledu, tedy klinicko-patologická korelace. V rámci této korelace mohou být nápomocna tzv. ABCD E kriteria (A – asymetrie léze; B – okraj léze; C – barevná pestrost léze; D – průměr léze; E – vývoj léze).

Historicky byla dlouhodobě diskutována problematika vývoje maligního melanomu, tedy jeho vztahu k melanocytárním névům, či jiným nálezům hodnoceným jako prekancerózy. Podle soudobého názoru čisté prekancerózní léze u melanomu nenacházíme, jakkoli je do současné doby udávána jako prekanceróza tzv. *lentigo maligna*, vyskytující se v kůži s chronickými solárními změnami, nejčastěji v oblasti hlavy a krku. Histologicky však tyto léze splňují kritéria pro melanoma *in situ* a zařazení mezi čisté prekancerózní léze je tedy sporné. *Lentigo maligna* může přecházet v melanom, resp. ve variantu označovanou jako *lentigo maligna melanoma* (Reed et Shea, 2011; Stork et al. 2007b).

Morfologicky v samotném melanomu nacházíme ložiska melanocytů uložených nepravidelně v různých úrovních epidermis s prostupem přes bazální membránu do dermis. V okrajích nádoru mohou být zastiženy i jednotlivé melanocyty, někdy tvořící až melanocytární hnízda. Léze je většinou nepravidelná, často i s nepravidelným rozložením pigmentu. Melanocyty vykazují buněčné atypie, abnormální karyoplazmový poměr, velká jádra s výraznými jádérky a v cytoplazmě mohou být patrna zrnka melaninu (Busam, 2010; Kumar et al., 2009).

V typických případech se melanom vyvíjí postupně a vykazuje několik růstových charakteristik (Busam, 2010) a sice:

- (i) melanom *in situ*
- (ii) radiální růstová fáze
- (iii) vertikální růstová fáze

U melanomu *in situ* nádorové melanocyty nacházíme pouze jen v *epidermis* bez porušení bazální membrány nádorovými strukturami. Tyto léze považujeme za počáteční stav melanomu, nebyla dosud zahájena ani radiální a především ani vertikální růstová fáze. Většinou je lokalizován na vysoce fotoexponované oblasti těla. Přejít do povrchově se šířícího melanomu (dále jako SSM, anglicky: Superficial Spreading Melanoma) je možný (Taylor et al., 2010), i když pozvolný. Vývoj k tomuto stádiu může trvat i roky (Stricklin et al., 2012).

Nejčastější variantou melanomu je SSM, u kterého histologicky prokazujeme hnízda maligních melanocytů v junkční oblasti. V počáteční fázi roste radiálně, teprve později začne pronikat vertikálně do hlubších partií dermis, někdy i s tvorbou nádorových uzlů (tzv. sekundárně nodulární SSM). S růstem melanomu se zhoršuje i prognóza pacientů (Elder, 2011).

Nodulární melanom (dále jako NM, anglicky: Nodular Melanoma) roste vertikálně již od počátku, většinou mu nepředchází *in situ* léze ani SSM, navíc brzy invaduje a zakládá časně metastázy. Jeho prognóza je již v počátcích nejistá. Vyskytuje se častěji u mužů než u žen a to v 5. – 6. dekádě života, nejčastěji bývá lokalizován na trupu (Baumert et al., 2007).

Dalším typem, který je určen spíše na základě klinické manifestace a anatomické lokalizace, je akrolentiginózní melanom (anglicky: Acrolentiginous Melanoma, dále ALM), který je relativně vzácný (nejčastější však u afroamerické a asijské populace). Vyskytuje se asi v 90 % na ploskách, na dlaních 8 % a pod nehty. Na velmi špatné prognóze této varianty se podílí zpravidla i pozdní diagnóza (Vosmik, 1996).

Amelanotický melanom, je další klinická varianta typická tentokrát svým koloritem. Tato varianta vykazuje v různé míře enzymovou blokádu syntézy melaninu, proto makroskopicky nabývá charakteru šedavých, růžových, či až červených útvarů.

Mezi vzácnější varianty melanomu lze zařadit i slizniční melanom, který nejčastěji nalézáme v dutině ústní, v oblasti vulvy či vagíny a v perianální oblasti. Tyto léze jsou zpravidla výrazně pigmentované, často roky rostou horizontálně a až po letech mohou přecházet ve vertikální růst s tvorbou nodulů či ulcerací. Slizniční melanom je považován za prognosticky vysoce závažný, bez jednoznačného diagnostického a terapeutického konsensu (Tacas et al. 2014).

Melanom však primárně může vznikat v jakékoliv lokalizaci a to i v oblasti parenchymatózních orgánů či v centrálním nervovém systému bez jasné souvislosti a

nálezem primárního kožního či slizničního melanomu, samostatnou jednotku (přesahující již rámce této práce je) uveálňí melanom.

Jak již bylo zmíněno výše, je melanom histologicky velmi variabilní. Jako zvláštní (vzácné) histologické typy melanomu jsou označovány varianty desmoplastický melanom, neuroidní a myxoidní melanom. Desmoplastická varianta melanomu je nejčastěji lokalizovaná opět v oblastech vysoké expozice slunečnímu záření, může být vytvořen i na podkladě *in situ* léze, a jak název napovídá, jedná se o spojení maligních melanocytů a desmoplastických změn dermis, která tvoří bohatou stromální komponentu. Jedná se především o lokálně agresivní variantu, ale zakládá i vzdálené metastázy (de Almeida et al., 2008; Lens et al., 2005). Neuroidní varianta vykazuje časně perineurální šíření a může být doprovázená výraznou bolestivostí projevů. Myxoidní melanom je velmi vzácný, histologicky prokazujeme až zarážející objemné myxoidní stroma nádoru obklopené vřetenobuněčnými melanocyty (Lens et al., 2005).

Existuje několik histopatologických prognostických ukazatelů, podle kterých je možné rozdělit melanomy do určitých prognostických skupin (Breslow, 1970; Clark et al., 1969). Svou užitečnost osvědčila nejvíce klasifikace podle Breslowa, která je založena na stanovení hloubky invaze, tj. na metrickém určení vzdálenosti od *stratum granulosum* do místa nejhlubší invaze (měřeno v milimetrech, viz. Tab. 7) (Breslow, 1970). Tato klasifikace je nejpoužívanější pro svou technickou nenáročnost a relativní spolehlivost, neboť 95 % pacientů s hodnotou Breslowa do 0,75 mm přežívá 5 let od diagnózy, kdežto s hodnotou Breslowa nad 4 mm přežívá méně než polovina (Balch et al., 1978; Nagore et al., 2005). Další běžně používanou klasifikací je hloubka invaze stanovená dle Clarka (Clark I. – IV.), která je založena na určení relativní hloubky nádorové infiltrace vzhledem k anatomickým vrstvám kůže (Clark et al., 1969). Protože je tloušťka dermis na různých místech těla značně variabilní (viz kapitola 1.), tak se od této dříve běžně používané klasifikace postupně opouští pro její prognosticky nižší vypovídající hodnotu (v porovnání s měřením podle Breslowa).

Dalším důležitým histologickým parametrem je sledování povrchové ulcerace, která je obvykle doprovázená stromální zánětlivou reakcí a tvorbou granulační tkáně (Homsí et al., 2005; Spatz et al., 2010).



Tab.: 7 Klasifikace podle Breslowa doplněna o dobu přežívání a doporučený chirurgický lem zdravé tkáně/kůže. Převzato dle (Balch et al., 2001; Shenemberger, 2012)

Klinické stádium	Hloubka invaze/Breslow	5-leté přežívání	Doporučený chir. lem
I	≤ 1,0 mm	95-100%	5 mm
II	1,01-2,0 mm	80-96%	15 mm
III	2,01-4,0 mm	60-75%	20 mm
IV	4,01 mm ≤	50%	20 mm

V poslední době bylo do běžného histologického hodnocení podle AJCC (American Joint Committee on Cancer) zařazeno sledování mitotické aktivity nádoru jako průměrný počet mitóz melanocytů na milimetr čtvereční (což však naráží na problémy, jak mikroskopicky v běžné praxi přesně stanovit plochu 1 mm<sup>2</sup>) (Chu et al., 2013; Thompson et al., 2011). Mitotická aktivita, a tedy míra proliferace, může být prognosticky zásadní pro růst nádoru případně zakládání satelitních metastáz (Hale et al., 2013).

Jedním z kontroverzních prognostických faktorů je přítomnost tzv. regrese v melanomu. Klinicky regrese připomíná okrsky depigmentace, dermatoskopicky pozorujeme přítomnost šedomodrých závojů či až růžově bílých oblastí odpovídajících angiogenezi nebo zánětlivé reakci (Pock et al., 2008). Histologicky pod termínem regrese rozumíme ztrátu či chybění melanocytů, které jsou nahrazeny zánětlivým infiltrátem, později i fibrotizací, vaskularizací a přítomností melanofágů (tzv. melanóza).

Jedná se o imunologicky podmíněný jev, který lze pozorovat ale i u běžných melanocytárních névů (Micksche et al., 1975). Buňky névu, či melanomu stimulují imunitní odpověď a u některých pacientů dochází k imunitní odpovědi, která vede k imunitně zprostředkované eliminaci melanocytární léze, tzv. spontánní regresi melanomu. V zánětlivém infiltrátu dominují CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, které jsou odpovědné za indukci regrese produkcí Th<sub>1</sub> cytokinů. Samotný mechanismus regrese je však zatím neznámý (Nagore et al., 2005). Jelikož nelze u takto změněného melanomu jednoznačně zhodnotit realisticky hloubku invaze dle Breslowa, je nutné melanomy s regresí hodnotit obezřetně. Tradičně byla přítomnost klinických, či histologicky verifikovaných známek regrese hodnocena spíše jako negativní prognostická známka. Recentně se však

objevují i studie, které dokazují na souborech přežívání pacientů, že regresi můžeme alespoň za určitých okolností hodnotit jako prognosticky příznivou (Ribero et al., 2013).

Klinicky patrná regrese melanomu a tedy jeho evidentní vnímavost vůči působícím vlivům imunitního systému je na druhé straně chápána jako jedna z cest k cílené léčbě melanomu více popsané v podkapitole 4.2.4.

Při diagnosticky nejednoznačných lézích patří k dobře dostupným patologickým vyšetřením i imunohistochemické vyšetření. Imunohistochemická detekce specifických proteinů může pomoci ke zpřesnění diagnosticky složitějších melanomů, nebo při ozřejmění nejednoznačné metastázy bez patrného primárního ložiska. Problematické ale je, že neexistuje 100% senzitivní a 100% specifický biomarker k diagnostice melanomu, proto se i v běžné praxi používá panel biomarkerů sloužící k přesnější detekci původu dané léze (Carlson et al., 2005b).

Melanocyty za normálních okolností prakticky vždy exprimují vimentin a S100 protein. Tyto znaky jsou však vysoce nespecifické, jsou totiž přítomny i v řadě jiných nádorových i nenádorových buněčných populacích. Další z běžně užívaných markerů jsou již vysoce specifické pro melanocyty, jedná se o proteiny zapojené do syntézy melaninu jako je například tyrozinaza a transkripční faktor MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor), či markery HMB-45 a Melan-A/MART-1. Ani tyto znaky však jednoznačně neodliší maligní a benigní melanocyt (Mangini et al., 2002).

Melanom může mít na histologické úrovni různé fenotypové varianty, které se mohou lišit do určité míry i přítomností specifických markerů. Absence znaku nutí pak patologa diferenciálně diagnosticky odlišovat i morfologicky blízké nádory odlišné histogeneze. Např. melanomy s vřetonobuněčnou morfologií (rys častý u desmoplastických melanomů) jsou HMB-45 a Melan-A/MART-1 často negativní, ale pozitivita S100 umožní jejich odlišení od vřetonobuněčné varianty dlaždicobuněčného karcinomu a atypického fibroxanthomu kůže. Naopak ani S100 protein, patrně nejstabilněji přítomný znak melanomu, neodliší tento desmoplastický melanom od jiných nádorů vycházejících z buněk neurální lišty (Carlson et al., 2005a). Navíc jsou práce, které poukazují i na možnou ztrátu S100 proteinu v metastatické lézi melanomu (Aisner et al., 2005). Imunohistochemické vyšetření jednoho či jednotlivých markerů u melanomu tedy nelze použít jako paušální metodu, ale v rámci diferenciálně diagnostické rozvahy vždy v kontextu se základním morfologickým nálezem a v kombinaci s více znaky.

Při histologickém vyšetření primárního tumoru mohou být patrné i známky invaze v podobě lymfatického a cévního šíření, případně šíření perineurálního. V této situaci může být imunohistochemické potvrzení melanocytární identity invadujících buněk cenné. Platí ale, že toto šíření je průkazné, pakliže jsou patrna depozita nádorových buněk intravaskulárně, která nemohou být způsobena arteficiálně při zpracování tkáně (Busam et al., 2010).

Obdobně cenná je i imunohistochemická detekce v uzlinách při vyšetření tzv. sentinelové uzliny (dále jako SLN, anglicky: Sentinel Lymph Node), kde pro další prognózu onemocnění je cenná detekce i tzv. mikrometastáz, což vedlo k zavedení určitého standardu ve zpracování SLN (Mocellin et al., 2011; Murali et al., 2012).

#### 4.2.3. Rizikové faktory, genetika melanomu

Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.2.1. o histogenezi melanomu, je UV záření bezpochyby nejvýznamnější rizikový faktor (Erdei et Torres, 2010; Pfeifer et Besaratinia, 2012). Jako riziková se již považuje i práce ve venkovním prostředí či dovolená strávená v zemích s vyšším slunečním svitem v délce trvání delší než dva týdny bez dostatečné fotoprotekce. Zejména se zdůrazňuje opakované spálení sluncem, spálení v dětském věku nejčastěji až do stadia vzniku bolestivých puchýřů a spálení kůže u osob s nízkým fototypem (Atzeni et al., 2009). Za jeden z vysoce rizikových faktorů se považuje opakovaná aplikace umělého UV záření (solária s aplikací UVA), tak i aplikovaná kombinace UV záření a psoralenů při terapii psoriázy (PUVA terapie) (Archier et al., 2012; Veierod et al., 2010). Vzhledem k tomu, že UV záření je jedním z hlavních rizikových faktorů u melanomu, měl by tedy být největší výskyt melanomu u lidí profesně pravidelně vystavených slunečnímu záření, jako jsou např. zemědělci. Opakovaně provedené studie však ukazují, že intermitentní vysoká dávka slunečního záření zvyšuje riziko vzniku melanomu daleko více než kumulativní dávka slunečního záření (Vuong et al., 2013).

Rodinná predispozice je jedním z dalších významných rizikových faktorů. Pacienti s melanomem v rodinné anamnéze mají přibližně 2x větší riziko vzniku melanomu u nich samých, než je v běžné populaci (Olsen et al., 2010). Syndromy, u kterých se vyskytuje familiární výskyt melanomu, představují jasný příklad autozomálně dominantní dědičnosti. Nejčastěji se jedná o mutace genů *CDKN2A* a *p16*, méně pak mutace v genu *CDK4*. *De novo* mutace v těchto genech (především *CDKN2A* a *CDK4*) jsou nalézány i u pacientů bez pozitivní rodinné anamnézy (Foretova et al.,

2009; Piepkorn, 2000). Zvýšený výskyt melanomu (ale i ostatních nemelanomových nádorů) je i součástí geneticky podmíněných syndromů, jako je např. autozomálně recesivně dědičná *xeroderma pigmentosum* (Gerstenblith et al., 2010).

Imunosuprese je obecně spojena s rizikem vzniku nádorových onemocnění, což platí i pro melanom. Větší incidence byla pozorována u pacientů s HIV, u osob s hematologickými malignitami a u pacientů léčených imunosupresivní léčbou po transplantacích orgánů (Markovic et al., 2007).

Rizikem pro vznik melanomu může být i výskyt většího množství získaných pigmentových névů (> 50) či přítomnost více tzv. atypických nebo dysplastických névů (> 5) (Markovic et al., 2007; Veierod et al., 2010).

#### 4.2.4. Léčba melanomu a nové přístupy

I přes velké pokroky v poznání nádorové biologie melanomu je základní léčba primárního kožního melanomu nadále chirurgická. Znalosti biologie a řady klinických sledování v posledních letech ale změnilly i chirurgické postupy. Původně doporučované vysoce radikální a často mutilující zákroky byly nahrazeny excizemi s užším lem zdravé tkáně, jejichž šířka odpovídá předpokládané tloušťce/typu nádoru, nebo již stanovené histologické hloubce invaze dle klasifikace Breslowa (Tab. 7) (Balch et al., 2001; Breslow, 1970; Shenberger, 2012). Některé lokalizace vyžadují specifické postupy. Při excizích SSM na obličeji je za dostatečný považován 1 cm široký lem. Naopak u ALM jsou relativně časté lokální recidivy, a tak jsou doporučovány lemy v průměru 1 cm a větší, u subunguálních melanomů zajišťuje radikalitu amputace distálních článků postižených prstů.

Kromě odstranění primárního nádoru byl do chirurgické léčby melanomu zaveden v osmdesátých letech další vyšetřovací postup, mapování a biopsie takzvané sentinelové (strážní) uzliny (dále jako SLN, anglicky: Sentinel Lymph Node). Některými klinickými studiemi bylo dokladováno, že průběh onemocnění, období do relapsu i celkové přežívání nemocných velmi úzce koreluje se stavem SLN (Medalie et Ackerman, 2003; Mocellin et al., 2011; Murali et al., 2012). Mapování a biopsie SLN byly do standardní péče o nemocné s melanomem zavedeny koncem minulého století a v současné době je provádí většina pracovišť specializujících se na tuto problematiku u pacientů se stádiem IB a II (TNM klasifikace) (Krajsova et al., 2005; Thompson et Shaw, 2007). Pokud díky mapování SLN je detekována pozitivita SLN, byť i v podobě jen mikrometastáz, je indikována radikální exenterace spádové oblasti (Krajsova et al.,

2005). Mapování SLN je určeno pro pacienty, kteří nemají klinické ani sonografické známky makroskopického postižení lymfatických uzlin. Standardně se neprovádí ani u stadia IA (TNM klasifikace) (Krajsova et al., 2005).

V poslední době se více diskutuje význam mapování SLN a jsou publikovány práce, které vyznívají protichůdně oproti výše zmíněným starším studiím. Např. výsledky studie MSLT-I ukázaly, že pacienti se střední tloušťkou melanomu (zde definována jako Breslow 1,2-3,5 mm), kteří podstoupili širokou excizi a mapování SLN a v případě její pozitivity i radikální exenteraci, neměli signifikantní prodloužení intervalu přežití oproti pacientům, kteří podstoupili pouze širokou excizi primárního ložiska a teprve při klinickém manifestování postižení uzlin radikální exenteraci (Morton et al., 2005).

Prognóza metastazujícího melanomu zůstává stále velmi nepříznivá, medián přežití se pohybuje na úrovni 2–9 měsíců; 5 let od vzniku prvních vzdálených metastáz přežívá méně než 5 % nemocných. Zvolený léčebný postup je závislý na typu metastáz. Uvádí se, že pokud je možné chirurgické řešení, má se vždy provést (McLoughlin et al., 2008). Na druhou stranu i solitární orgánové metastázy melanomu znamenají hematogenní rozsev nádoru a vysokou pravděpodobnost drobných, běžným vyšetřením zatím nedetekovatelných metastáz.

Adjuvantní léčba melanomu je indikována u nemocných, kteří jsou po operaci pokročilého, vysoce rizikového primárního nádoru a nemají prokazatelné metastázy. Cílem této léčby je částečná nebo kompletní likvidace případných nedetekovatelných mikrometastáz.

Adjuvantní chemoterapie není v léčbě melanomu indikována, žádná z provedených kontrolovaných randomizovaných studií neprokázala její účinnost v adjuvantním podávání (Barth et Morton, 1995; Verma et al., 2006). Radioterapie se v adjuvantní léčbě melanomu také nepoužívá, v současnosti není doporučována ani profylaktická aktinoterapie regionálních lymfatických uzlin po excizi pokročilého melanomu.

Adjuvantní imunoterapie je léčebná metoda, o které se u melanomu začalo uvažovat již před desítkami let. Kvůli často popisovaným spontánním regresím a výraznému lymfocytárnímu infiltrátu v okolí primárních melanomů lze předpokládat, že imunitní odpověď nositele hraje významnou roli v celkovém průběhu onemocnění. U mnoha nemocných s agresivním průběhem melanomu je však naopak možné pozorovat

nádorovou toleranci (Davar et al., 2012). Přesné pochopení a poznání dynamiky reakcí mezi nádorem a imunitním systémem jeho nositele by mělo vést k identifikaci nových cílů léčby i vývoji nových léčebných preparátů. V současné době je hlavním cílem adjuvantní imunoterapie u melanomu odkrýt nádorové antigeny, usnadnit jejich rozpoznání, porušit nádorovou toleranci a posílit imunitní odpověď.

Interferon alfa je první exogenní cytokin, u kterého bylo v adjuvantní léčbě melanomu prokázáno statisticky významné prodloužení období do relapsu a v Kirkwoodově ECOG 1684 studii i celkové přežití nemocných. V dalších studiích ECOG 1690 a 1694 se však již přesvědčivé prodloužení OS prokázat nepodařilo (Tarhini et al., 2012). Modifikovaný, polyethylen glykolem stabilizovaný (tzv. pegylovaný) interferon alfa, byl podáván v rámci studie EORTC 18991. I v této studii bylo prokázáno statisticky významné prodloužení období do relapsu onemocnění, ale bez statisticky významného prodloužení přežití (Eggermont et al., 2005). V současné době neexistuje všeobecně přijatý konsenzus týkající se výše dávky interferonu alfa ani způsobu, intervalu a celkové doby jeho podávání. Liší se i stadia onemocnění, při kterých je adjuvantní léčba indikována. Je zřejmé, že existuje skupina nemocných, kteří z podávání interferonu alfa profitují, ale v současné době nejsme schopni předem tyto pacienty vytipovat. Je proto nutné pokračovat v prospektivních randomizovaných studiích s adjuvantní léčbou interferonem alfa a v hledání odpovídajících prognostických markerů (Tarhini et al., 2012).

Chemoterapie melanomu je indikována u inoperabilních a vzdálených orgánových metastáz. Vzhledem k obecně malému počtu léčebných odpovědí a krátké době jejich trvání je považována za paliativní. Hlavním cílem chemoterapie melanomu je tak redukce objemu nádorových metastáz se zlepšením kvality života a zmírněním obtíží, které jsou metastázami vyvolány. Současně je při této léčbě snahou alespoň omezeně prodloužit přežití nemocných. Existuje mnoho léčebných schémat od monoterapie (Dakarbazin) přes kombinovanou chemoterapii (Vinblastin, Dakarbazin, Cykloplatina, Temozolomid) po kombinovanou chemoimunoterapii (chemoterapeutika v kombinaci s interferonem alfa nebo interleukinem-2). Celková doba přežití nebývá chemoterapií ani chemoimunoterapií významně prodloužena (Pflugfelder et al., 2013). Určitého efektu chemoterapie lze dosáhnout u končetinově lokalizovaného melanomu za využití izolované končetinové hypertermické perfúze (Spacek et al., 2011), kde při této kombinaci, resp. posílení cytostatického efektu termickým působením, bylo

pozorováno odpovědi okolo 60% a 5leté přežití pacientů až u 30% ve stadiu IIIB (Knorr et al., 2010).

Radioterapie bývá léčbou volby u uveálního melanomu či u kostních metastáz, kde má zejména analgetické účinky a snižuje riziko fraktur (Testori et al., 2009). Další indikací aktinoterapie jsou mnohočetné mozkové metastázy (Testori et al., 2009). U více než poloviny nemocných dochází k dočasnému zlepšení neurologických příznaků i zmírnění bolestí hlavy. Nutná je kombinace s podáváním antiedematózní terapie. V případě solitárního drobného ložiska je léčbou volby ošetření gama-nožem (Sloan et al., 2009).

Nový směr v terapeutické strategii léčby melanomu představovaly nádorové vakcíny. Tyto vakcíny jsou vyráběny s cílem zvýšit rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem a posílit protinádorovou odpověď aktivací lymfocytů. Využívají se buď směsi nádorových antigenů, nebo pouze jednoho antigenu specifického pro nádor (Fang et al., 2008). Přirozená imunitní reakce na melanomové antigeny je velmi slabá, proto se při výrobě nádorových vakcín využívají ještě adjuvantní látky, které imunitní odpověď zesilují. Přes dílčí slibné výsledky některých studií dosud neexistuje žádná melanomová vakcína, která by dokázala významně ovlivnit průběh onemocnění (Davar et al., 2012).

Studium vlivu imunologických faktorů u metastazujícího melanomu umožnilo v poslední době zavedení i nových imunoterapeutik v podobě cílené biologické léčby. Pro klinické použití při imunoterapii metastazujícího melanomu byl zaveden po řadě klinických studií *ipilimumab*, což je lidská IgG<sub>1</sub> monoklonální protilátka proti antigenu 4 cytotoxických T-lymfocytů (dále jako CTLA-4, anglicky: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4). Přesný mechanismus, jakým dochází při zablokování CTLA-4 k nádorové regresi, není znám, ale předpokládá se aktivace CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů s indukcí imunitní protinádorové odpovědi. Výsledky studií naznačují léčebné odpovědi na úrovni 10–20 %, tedy přibližně stejné jako u chemoterapie. Překvapivé je však jejich dlouhodobé přetrvání, stejně jako častá dlouhodobá stabilita metastatického onemocnění bez další progresu (Hodi et al., 2010). V současné době probíhají studie s *ipilimumabem* v adjuvantní terapii melanomu. Již dříve zmíněným biologikem s angiostatickým efektem je *bevacizumab*, který se v léčbě metastazujícího melanomu zkouší v monoterapii či v kombinaci s interferonem alfa nebo chemoterapií (Mansfield et al., 2013).

Dalším lékem je *sorafenib*, multikinázový inhibitor, který potlačuje nádorový růst inhibicí MAP kináz, výrazně inhibuje také receptor pro VEGFR 1, 2, 3 a receptor pro destičkový růstový faktor (dále jako PDGFR, anglicky: Platelet-Derived Growth Factor Receptor). Jeho účinnost byla ověřována v kombinaci s chemoterapií (dakarbazin, cycloplatina, paclitaxel) u pacientů, u kterých již selhala předchozí léčba metastazujícího melanomu (Bhatia et al., 2012).

Inhibitory MEK (jeden z inhibitorů MAP kináz) mají velký význam pro potlačení nádorového růstu, mimo jiné snižují rezistenci melanomových buněk k apoptóze (Park et al., 2013). Další z možností je biologická terapie za využití BRAF inhibitoru *vemurafenibu*. Tato molekula, patřící do skupiny kinázových inhibitorů, je používána při léčbě metastazujícího melanomu, ve kterém se podaří prokázat mutaci V600E genu BRAF (nověji i V600K, či V600D). BRAF protein je klíčovou složkou intracelulární cesty Ras-Raf, která se podílí na proliferaci buněk a blokuje apoptózu. Problematické je, že BRAF mutace je detekována asi jen u poloviny pacientů s melanomem a při zahájení celkové léčby dochází k častým nežádoucím účinkům, mezi které patří paradoxně i indukce dlaždicobuněčných karcinomů a jiných nemelanomových nádorů kůže či sliznic (Chapman et al., 2011). Ve srovnání s monoterapií dakarbazinem se podařilo dosáhnout o 20 % většího přežití pacientů v půl ročním sledování a odpověď na léčbu dokonce o 43 % lepší (Chapman et al., 2011). V dlouhodobějším horizontu sledování dochází však k selhání terapie *vemurafenibem*, proto nyní probíhají klinické studie kombinací *vemurafenibu* a jiných preparátů, jako jsou i jiné MEK inhibitory. Mechanizmy rezistence nádorových buněk na tuto léčbu jsou předmětem mnoha probíhajících diskuzí (Wang et al., 2013).

Dle zmíněných léčebných možností je patrné, že léčba melanomu prodělala v posledním desetiletí dramatický vývoj. Z výše uvedeného přehledu vyplývá, že řada moderních terapeutických postupů je *de facto* zaměřena i na stromální komponentu nádoru (např. inhibice neoangiogeneze) nebo na imunitní děje, které probíhají ve stromálním mikroprostředí melanomu. Přesto je naše porozumění těmto dějům jen okrajové, a proto dosahovaný efekt může být problematický. Řada zmíněných preparátů, případně jejich kombinace s dalšími prostředky, je předmětem právě probíhajících studií. Léčebný efekt nadále zůstává omezen a dlouhodobé přežívání pacientů s metastazujícím melanomem je prognosticky nejisté. Nejspolehlivější léčbou melanomu tedy nadále zůstává včasná diagnóza a následné chirurgické odstranění nádoru.



## 5. Nádorové stroma

Nádorové stroma, které tvoří hlavní předmět zájmu předkládané dizertační práce, představuje velmi komplexní, ale současně i značně heterogenní tkáň. Žádný z typů buněk nádorového stromatu není sám o sobě maligním ve smyslu geneticky determinované mutace. V minulosti byla věnována velká pozornost možnosti, že nádorové stroma vzniká EMT alespoň části buněk maligně transformovaného nádorového klonu. V takovém případě by ovšem jak nádorový parenchym, tak i nádorové stroma musely vykazovat alespoň v určitém rozsahu identické zásadní mutace (tzv. „*drivers mutations*“), což u většiny nádorů nebylo potvrzeno (Kurose et al., 2002; Moinfar et al., 2000). Blíže jsou teorie o původu CAFs diskutovány v podkapitole 5.2.1.

Přesto ale buňky stromatu díky vzájemným interakcím s vlastními buňkami nádorového parenchymu i vzájemnými interakcemi mezi různými buněčnými subpopulacemi uvnitř stromatu získávají funkce odlišné od funkcí analogických buněk v normálních tkáních. Tato odlišnost z nich ale činí významné hráče v kontextu maligního onemocnění.

Jak bylo ilustrováno v publikovaných xenotransplantačních modelech, zvyšuje přítomnost stromálních buněk potenciál nádoru k založení nádorového ložiska v těle hostitele (viz kapitola 2.2) (Elenbaas et Weinberg, 2001). Obecně akceptovaná současná představa považuje za podklad těchto funkčních změn modifikace na úrovni epigenetické, ačkoli detailnímu porozumění těmto regulacím jsme i nadále značně vzdáleni (Dey, 2011). Produkce růstových faktorů, cytokinů a chemokinů stromálními fibroblasty a buňkami imunitního systému působí ve prospěch stimulace růstu nádorových buněk, které odpovídají dalšími změnami genové exprese (Li et al., 2007). Současné poznatky navíc ukazují, že stroma ovlivňuje biologické vlastnosti nádorů, jako je jejich lokální agresivita a schopnost metastazování (Lorusso et Rugg, 2008).

### 5.1. Složení nádorového stromatu

Nádorové stroma se skládá ze složky buněčné (CAFs, buňky endotelové a buňky imunitního systému) a složky nebuněčné reprezentované ECM, ale i přítomnými cytokiny, chemokiny, hormony a dalšími bioaktivními molekulami. Za stěžejní komponentu buněčné složky nádorového stromatu jsou tradičně považovány CAFs (Li et al., 2007). Je však nutno kriticky podotknout, že tento fibroblasto-centrický pohled na

problematiku stromatu je opodstatněný sumou do současnosti nashromážděných poznatků a vychází zejména z relativní jednoduchosti izolace CAFs a jejich studia na nejrůznějších *in vitro* modelech.

Cévy a tedy i buňky endotelové zajišťují nejenom přísun nutrientů a odvod metabolitů, ale zároveň mohou touto cestou přicházet či odcházet významné biologicky aktivní působky, jako například hormony a růstové faktory, pro které stroma může fungovat jako rezervoár (Kulbe et al., 2004). Cévy v oblasti nádoru představují, zejména díky morfologickým odlišnostem ve své stavbě (především nedokonalé vzájemné propojení endotelových buněk a jejich odlišná vazba na pericyty), rovněž velmi významnou cestu, kterou dochází k prostupu např. buněk imunitního systému hostitele, ale také slouží k zakládání vzdálených metastáz (Dvorak, 2003). Pro svůj nesporný význam je právě neoangiogeneze dlouho předmětem terapeutických pokusů o její cílenou blokádu u nejrůznějších nádorových onemocnění (Amit et al., 2013; Fang et al., 2012; Guo et al., 2012; Miyake et al., 2013; Pavlidis et Pavlidis, 2013; Rikiishi, 2012; Soria et al., 2013). Stejně tak strukturální odlišnosti nádorových cév otevírají potenciálně další terapeutické možnosti. Zvýšená propustnost nádorových cév může sloužit k použití polymerních nosičů s léčivou k cílenému zasažení pouze nádorové tkáně (Rihova et al., 2005).

Buňky imunitního systému představují další významnou komponentu nádorového stromatu, jedná se především o makrofágy, lymfocyty a žírné buňky. Tyto buňky často tvoří nejen infiltrující populaci, ale mají přímo i charakter reaktivní zánětlivé populace. Makrofágy lze obecně rozdělit do dvou fenotypových kategorií, klasicky aktivované M1 makrofágy a alternativně aktivované M2 makrofágy. Makrofágy přítomné v nádorovém stromatu (nádorově asociované makrofágy) vznikají z monocytů, které jsou atrahovány chemotaktickými látkami a jedná se především o M2 makrofágy. Díky produkci řady cytokinů, chemokinů a růstových faktorů M2 makrofágy poskytují imunosupresivní mikroprostředí pro růst nádoru (Hao et al., 2012). Dostávají se preferenčně do míst, kde dochází k hypoxii a nekrotickým. Zde se aktivují a uvolňují řadu faktorů působících na buňky endotelu, například VEGF, hepatocytární růstový faktor (dále jako HGF, anglicky: Hepatocyte Growth Factor) MMP2 a IL-8 (Li et al., 2007). Neutrofilové také v nádoru stimulují angiogenezi, navíc prakticky identickým spektrem růstových faktorů (Talmadge et al., 2007).

Nádory infiltrující lymfocyty (dále jako TILs, anglicky: Tumor Infiltrating Lymphocytes) představují poměrně heterogenní populaci imunitních buněk schopných

pronikat do nádorového mikroprostředí, obecně považovanou jako velice prognosticky významnou. CD<sub>4</sub> Th<sub>1</sub> pomocné lymfocyty produkují řadu cytokinů a mají přímý efekt na aktivaci CD<sub>8</sub> T lymfocytů, které jsou schopny napadat nádorové buňky. CD<sub>4</sub> Th<sub>2</sub> stimulují především humorální imunitu a v nádorové imunologii se jejich efekt považuje jako méně efektivní než aktivace pomocí Th<sub>1</sub> lymfocyty (Gooden et al., 2011; Mlecnik et al., 2011). Nádorové buňky jsou schopny díky produkci řady chemotaktických mediátorů ovlivnit imunologickou odpověď a to skrze stimulaci CD<sub>4</sub> regulačních lymfocytů, které snižují odpověď CD<sub>4</sub> Th<sub>1</sub> a Th<sub>2</sub> lymfocytů (Gooden et al., 2011). Příkladem možná i nejvíce imunitně aktivního nádoru je melanom, kde ovlivnění imunitní reakce a TILs je předmětem cílené nádorové terapie (Hodi et al., 2010; Tarhini et al., 2012).

Role dalších buněk imunitního systému v nádorovém mikroprostředí není tak dobře prostudována, navíc se vyskytují jen v některých typech nádorů. Příkladem mohou být žírné buňky, které se také podílejí na angiogenezi (Ribatti et Crivellato, 2012).

Kromě buněčných komponent se na formování nádorového stromatu významně podílí i složky ECM, ke kterým se buňky nádorového stromatu, ale i nádorového parenchymu pojí pomocí adhezivních molekul (především pomocí integrinů). Ze složek ECM jsou v nádorovém stromatu nejvíce zastoupeny proteoglykany, fibrily tvořené kolagenem a rozpustné multiadhezivní proteiny (např. fibronectin a tenascin) (Van Obberghen-Schilling et al., 2011). Obecně lze říci, že ECM nemá v nádorovém stromatu jen podpůrnou a mechanickou funkci, ale představuje i velice dynamickou složku, podstupující permanentní remodelaci a navíc je zapojena do četných extracelulárních signalizačních drah (Jinka et al., 2012).

## 5.2. Nádorově asociované fibroblasty

CAFs představují morfologicky vřetenité buňky, jejich nejběžněji používaným znakem pro odlišení od buněk epitelových je přítomnost vimentinu a současně absence keratinů. Nejde ale tedy rozhodně o znak specificky determinující CAFs. Zvláštním typem CAFs hojně zastoupeným ve stromatu jsou tzv. myofibroblasty. Tyto myofibroblasty se blíží aktivovaným fibroblastům v hojící se ráně, které rovněž exprimují  $\alpha$ -SMA (Chatzistamou et al., 2010). Aktivované normální fibroblasty v hojící se ráně nejsou ale aktivované permanentně, vracejí se po určité době do původního

stavu (tzn., změny se jejich transkripční profil) (Kolar et al., 2012), nebo podléhají eliminaci následnou apoptózou (Li et Wang, 2011). Naproti tomu CAFs této regulaci nepodléhají (Li et al., 2007).

Vedle exprese vimentinu a  $\alpha$ -SMA jsou CAFs charakterizovány podle některých prací např. expresí fibroblastového specifického proteinu-1 (dále jako: FSP-1, anglicky: Fibroblast Specific Protein-1), receptorem  $\beta$  pro destičkový růstový faktor (dále jako PDGF, anglicky: Platelet-Derived Growth Factor) a fibroblasty aktivujícího proteinu (dále jako FAP, anglicky: Fibroblasts Activating Protein) (Cirri et Chiarugi, 2011; Karagiannis et al., 2012; Xing et al., 2010). Bohužel ale do současnosti neexistuje žádný univerzálně akceptovaný morfologický znak, který by umožňoval jasné odlišení nádorového stromatu od normální, nádorem neovlivněné tkáně. Vzhledem k již naznačenému funkčnímu významu stromatu pro biologii nádorového onemocnění lze předpokládat, že by taková morfologicky jasné determinovaná hranice mohla sehrávat i svou roli při posuzování radikality resekce, respektive posuzování rizika recidivy. V současné době tedy musíme spoléhat na informace plynoucí z funkční analýzy CAFs, která bude probrána dále.

### 5.2.1. Původ nádorově asociovaných fibroblastů

Původ CAFs je předmětem mnoha hypotéz a diskuzí. Tyto teorie, opřené o různé nádorové modely, se navzájem nevylučují, naopak v současnosti převládá názor, že mechanismů podílejících se na vzniku CAFs může být více i v rámci jednoho nádorového typu i dokonce nádoru. Heterogenita a diverzita funkce s nedostatkem morfologických markerů CAFs do určité míry ztěžují studium jejich biologické aktivity. Zatím není ani jasné zda všechny CAFs zastoupené v daném nádoru mají stejnou funkci CAFs (Haviv et al., 2009).

O původu CAFs existují různé teorie, zahrnující zejména:

- (i) vznik přeměnou nádorových buněk pomocí EMT
- (ii) aktivaci fibroblastů z lokálního mezenchymu,
- (iii) migraci a aktivaci buněk odvozených z kostní dřeně (Li et al., 2007).

V minulosti byla věnována velká pozornost možnosti, že nádorové stroma vzniká EMT alespoň části buněk maligně transformovaného nádorového klonu. Tato

teorie se opírá o fakt, že buňky invazivní fronty nádoru jsou schopny uvolnit se z mezibuněčných kontaktů a nabýt tak invazivních a migračních vlastností (Plzak et al., 2010). Byly publikovány i experimentální *in vitro* modely, kde CAFs byly schopny navodit EMT v normálních keratinocytech (Lacina et al., 2007a). Navození EMT zde bylo demonstrováno ko-expresí vimentinu současně s keratiny, tyto buňky současně vykazovaly pozitivitu i zodpovědných transkripčních faktorů, např. snail. Podle některých autorů tedy lze spekulovat, že buňky invazivní fronty, které podstoupí EMT, mohou následně vytvářet nejen metastatická vzdálená ložiska, ale přispívat i k formování CAFs (Moustakas et Heldin, 2007). Jak jsme již zmínili v úvodu této kapitoly, v takovém případě by jak nádorový parenchym, tak i nádorové stroma musely vykazovat alespoň v určitém rozsahu identické zásadní mutace (tzv. „*drivers mutations*“), což u většiny nádorů ve větším rozsahu nebylo potvrzeno (Kurose et al., 2002; Moinfar et al., 2000). Genetické mutace CAFs i nádorového klonu reprezentují nejspíše následek plošného působení mutagenních agens (tzv. *field cancerization*), vznik mutací však může být následkem vyšší proliferace CAFs v průběhu utváření nádorového prostředí. Z tohoto dle našeho názoru vyplývá, že EMT může představovat, patrně vedle jiného, či spíše hlavního zdroje, určitý dílčí mechanismus vzniku CAFs (Li et al., 2007).

Druhá z hypotéz poukazuje na roli lokálního mezenchymu, který již v iniciálním stadiu obklopuje proliferující maligní klon. Zdá se, že význam interakce mezi nádorovými buňkami a okolním mezenchymem má klíčovou roli pro určení dalšího osudu buněk, u nichž již došlo k iniciaci nádorového procesu, podobně jako interakce v normální tkáni během embryogeneze a fyziologické reparace (Fuchs, 2007). Mechanismus vzniku CAFs z lokálního mezenchymu není doposud zcela objasněn, a to především způsob aktivace signalizačních kaskád, které jsou nutné k této přeměně. Předpokládá se, že faktory produkované nádorovým parenchymem mohou přímo indukovat fenotypové a funkční změny v lokálně přítomných fibroblastech (Haviv et al., 2009). Nejvíce je udáván vliv TGF- $\beta$ , u kterého je experimentálně ověřen podíl na transformaci normálních fibroblastů v myofibroblasty s typickou přítomností  $\alpha$ -SMA (Casey et al., 2008; Dvorankova et al., 2011). Dále lze zmínit i vliv galektinu-1, který se hojně nachází ve stromatu dlaždicobuněčných karcinomů (Valach et al., 2012) a významně zde ovlivňuje expresi  $\alpha$ -SMA fibroblasty, a tak jejich konverzi v myofibroblasty. Navíc je experimentálně ověřeno, že synergicky působí s TGF- $\beta$  (Dvorankova et al., 2011).

Histopatologické studie v některých případech (např. u dediferencovaných karcinomů plic se špatnou prognózou) poukazují na přítomnost ektopické kostěné či chrupavčité tkáně ve stromatu těchto nádorů (Yoichi et al., 2009). Tato pozorování vedla k hypotéze, že na původu CAFs se mohou podílet i buňky s charakterem mezenchymových kmenových buněk (Yoichi et al., 2009). Tyto buňky mohou mít původ lokální, ale i v cirkulujících kmenových mezenchymových buňkách (dále jako MSCs, anglicky Mesenchymal Stem Cells) pocházejících z kostní dřeně. Experimenty s MSCs v kombinaci s nádorovými buňkami poukazují na jejich možný vliv při tvorbě nádorového prostředí. Weinberg a spol. implantovali na myším modelu MSCs ve směsi s nádorovými buňkami a nádorové buňky samotné. Výsledkem byl signifikantní nárůst schopnosti nádorových buněk podaných ve směsi s MSCs vytvářet v hostiteli následně nádorová ložiska (Karnoub et al., 2007). V jiném experimentu byl navíc dokumentován efekt kondicionovaného média z buněk karcinomu prsu na MSCs. Kondicované médium použité poté pro kultivaci MSCs v průběhu 30 dní vyvolalo expresi  $\alpha$ -SMA, PDGF a vimentinu. Tento výsledek lze interpretovat jako diferenciaci MSCs v myofibroblasty (Mishra et al., 2008). Tyto studie tedy potvrzují možné teorie vzniku CAFs právě z cirkulujících MSCs.

### 5.2.2. Biologická funkce nádorově asociovaných fibroblastů

V porovnání s maligně transformovaným nádorovým klonem byla stromální složce nádorů včetně CAFs dlouhodobě věnována menší pozornost. V současné době je ale zřejmé, že právě CAFs hrají v komplexnosti nádorového prostředí významnou roli.

CAFy se podílí na přímém ovlivnění stimulace nádorového klonu například tím, že produkují řadu růstových faktorů, hormonů a cytokinů. Klasické mitogeny produkované CAFy jsou např. HGF, EGF, FGF, ale i cytokiny jako je stromálními buňkami produkovaný faktor 1 (dále jako SDF-1, anglicky: Stromal cell-Derived Factor 1), IL-6, IL-8 a CXCL-1 (Cirri et Chiarugi, 2011; Li et al., 2007; Szabo et al., 2013). Důležitost produkce těchto mitogenních faktorů dokládají studie např. u nádorů plic, kde produkce HGF v CAFy vede k rezistenci nádorových buněk karcinomu plic vůči konvenčním inhibitorům receptoru pro EGF. Kombinací s blokační protilátkou proti HGF ale lze tuto rezistenci obejít (Wang et al., 2009). Také nádorové buňky produkují řadu růstových faktorů a cytokinů, navíc pravděpodobně dovedou určitým způsobem regulovat sekreci některých faktorů či složek ECM produkovaných CAFy (Hakelius et al., 2013; van Rooyen et al., 2013).

Vedle růstových faktorů a cytokinů CAFs produkují i proteiny s enzymatickou aktivitou jako MMP, podílející se na degradaci komponent ECM a proteinů bazální laminy, a tak nepřímo napomáhají nádorovým buňkám snadněji pronikat do svého okolí. Jako nejčastěji popisované MMP účastníci se nádorové progresi jsou MMP-2 a -9, dále je popisovaný efekt i MMP-13 v dlaždicobuněčném karcinomu a melanomu, kde pravděpodobně hraje roli při neoangiogenezi nádorů (Lederle et al., 2010; Roy et al., 2009).

Další studie se zabývají podílem CAFs na formování „*niche*“ nádoru a jeho význam pro udržení fenotypu tzv. nádorových kmenových buněk, CSCs. Jak jsme již zmínili v kapitole 2.2., je problematice CSCs věnována v současné nádorové biologii velká pozornost. Je známo, že normální kmenové buňky potřebují specifické mikroprostředí „*niche*“, které sehraje zásadní roli při udržování jejich kmenovosti v průběhu života jedince. Lze tedy předpokládat *per analogiam*, že specifické prostředí k udržení svého fenotypu budou vyžadovat i CSCs (Ailles et Weissman, 2007; Li et Neaves, 2006). Na udržení tohoto mikroprostředí se mohou podílet právě CAFs, i když jejich přesná funkce při formování tohoto specifického mikroprostředí není ještě zcela podrobně zdokumentována. Podle posledních prací se však ukazuje, že i zde CAFs mohou hrát významnou úlohu (Chen et al., 2014; Liao et al. 2010; Weiland et al., 2012). Těmto novějším pracím odpovídají i naše předchozí pozorování, kdy Lacina a spol. popisují *in vitro* efekt CAFs izolovaných z bazocelulárního a dlaždicobuněčného karcinomu na normální keratinocyty. Vedle indukce EMT (popsáno v kapitole 5.2.1.) se podařilo při ko-kultivaci s CAFs navodit v normálních lidských keratinocytech expresi specifických keratinů (keratin-8 a -19) charakteristických pro dané nádory, ale navíc tento fenotyp je přítomen jen v jednoduchých epitelech (a to zejména embryonálně), ne však již v epitelech stratifikovaných, což poukazuje na nečekaně nízkou úroveň navozené diferenciaci (Lacina et al., 2007a; Lacina et al., 2007b). V jiné práci je popsán vliv CAFs z bazocelulárního karcinomu na myší fetální fibroblasty, které při kultivaci pod vlivem CAFs získaly expresi právě znaků multipotentních kmenových buněk, Oct4 a Nanog. Tyto fibroblasty byly následně schopny diferenciaci jak adipogenní, tak chondrogenní i osteogenní (Szabo et al., 2011). Tyto poznatky mohou také přispět k vysvětlení přítomnosti chrupavčité či kostěné tkáně v některých vysoce dediferencovaných nádorech, kde lze předpokládat, že vznik morfologicky odlišné tkáně je výsledkem deregulačních mechanismů právě nádorových kmenových buněk (Yoichi et al., 2009).

CAFs představují jednu z mnoha komponent nádorového stromatu. Vzhledem k popsaným skutečnostem je zřejmé, že jejich podíl na formování komplexního nádorového mikroprostředí je značný. Navíc díky znalostem z neustále se vyvíjejících modelů nádorového prostředí se ukazuje, že cílená personalizovaná a komplexní léčba nádorů bude muset být zaměřena i na komponenty nádorového stromatu, a to i na funkci CAFs.

### 5.2.3. Nádorové stroma melanomu

V posledních letech se paralelně s nárůstem zájmu o nádorové stroma obecně objevují i práce, které poukazují na biologickou funkci stromatu v melanomu. Nádorové melanocyty (stejně jako nádorové buňky jiných nádorů) interagují se zdánlivě normálními buňkami ve svém okolí a všechny tyto populace se vzájemně ovlivňují. Obecně platí (jako i v jiných nádorech), že můžeme pozorovat několik paralelních interakcí nádorových melanocytů s jejich mikroprostředím. Jedná se o multilaterální komunikaci mezi nádorovými melanocyty a buňkami stromatu, které zahrnují CAFs, endotelové buňky, buňky imunitního systému, solubilní faktory a komponenty ECM. Ke komplexnosti nádorového mikroprostředí melanomu přispívá také jako další aspekt přítomnost normálních (tj. nenádorových) keratinocytů, kterým jsme v předchozích modelech nádorů vycházejících z dlaždicových epitelů převážně nevěnovali pozornost. Kideryová a spol. při studiu interakcí na benigním fibrózním histiocytomu popsali molekulární podklad změn epidermis u tohoto tumoru (Kideryova et al., 2009). Tyto morfologické změny (dosahující až pseudoepiteliomatózní hyperplazie) odráží totiž biologickou aktivitu fibroblastů izolovaných z histiocytomu. Vlastní keratinocyty jsou v tomto případě nádorově nezměněné. U melanomu je experimentálně prokázáno, že především ve fázi radiálního růstu je melanom závislý na růstových faktorech produkovaných okolními keratinocyty, které napomáhají překročení bazální membrány (Van Kilsdonk et al., 2010). Ve fázi vertikálního růstu jsou již buňky melanomu na této podpoře nezávislé. Nutně ale platí v mutuální interakci, že nádorové melanocyty se podílejí také na regulaci okolní epidermis (viz. kapitola 8.2.3.).

Některé součásti nádorového stromatu u melanomu (například nádorová neovaskularizace) jsou v současné době již předmětem klinických studií v rámci personalizované biologické terapie (podrobněji popsáno v kapitole 4.2.4). Naopak jiným složkám stromatu melanomu, jako jsou CAFs, se teprve nyní dostává větší pozornosti. Kožní melanom je již v počátku radiální růstové fáze a zakládání



mikrosatelitních metastáz v těsném kontaktu se složkami okolní dermis a tedy *de facto* s komponentami svého budoucího stromatu. Funkce CAFs se v melanomu předpokládala podobná jako v jiných nádorech (Smolle et al., 1996). Tyto předpoklady nyní potvrzuje i práce, která popisuje srovnatelný biologický efekt CAFs izolovaných z nádorů s rozdílnou histogenezí, včetně melanomu, na linii duktálního karcinomu prsu (Dvorankova et al., 2012). Další práce dokazuje vliv CAFs z melanomu na indukci proliferace a inhibici apoptózy nádorových melanocytů v *in vitro* podmínkách (Abety et al., 2012). Byl popsán podíl CAFs z melanomu na ovlivnění exprese znaků spojených s melanogenezí a tedy ovlivnění diferenciačního fenotypu nádorových melanocytů (Kodet et al., 2013). Významná je i práce popisující schopnost CAFs ovlivnit expresi povrchových molekul NK-buněk, zodpovědných za jejich buněčnou cytotoxicitu, a tak nepřímou ovlivnit protinádorovou imunitní odpověď (Balsamo et al., 2009). V neposlední řadě lze zmínit práci, kde v *in vitro* modelu nádorového mikroprostředí získaly invazivní nádorové melanocyty větší rezistenci proti chemoterapeutiku (doxorubicin) právě pod vlivem fibroblastů v organotypické kultuře (Tiago et al., 2014).

Při hledání nových prognostických molekul, odpovědných za rezistenci melanomu na nová léčebná schémata se objevují práce zaměřené na komponenty ECM, které mohou významně ovlivňovat nádorové mikroprostředí melanomu. Jako slibná molekula se při studiu těchto mechanismů zdá být periostin, který lze detekovat ve stromatu vysoce invazivních melanomů a uzlinových metastázách. V *in vitro* modelu periostin podporuje proliferaci nádorových melanocytů cestou aktivace MAP kinázové signalizace (Kotobuki et al. 2014). Další molekulou ECM, která se účastní při invazivním růstu nádorových melanocytů především při vertikální růstové fázi, je např. osteopontin, který ovlivňuje expresi  $\alpha\beta3$  a  $\alpha\beta5$  integrinů (Yin et al., 2014).

Z těchto popsaných schopností lze tedy usuzovat, že i nádorové stroma melanomu může hrát při progresi melanomu významnou úlohu. Detailní znalosti nádorového mikroprostředí a epitelově mezenchymových interakcí v nádorech nám, vedle poskytnutí prognostických a prediktivních informací, mohou pomoci při hledání nových molekul v budoucí cílené a personalizované biologické léčbě nádorů.

## 6. Cíle dizertační práce

Tato dizertační práce je zaměřena na studium epitelově mezenchymových interakcí v nádorech vycházejících z dlaždicových epitelů a aplikování těchto poznatků i na nádory vycházející z minoritní populace dlaždicových epitelů. Práce je založena především na *in vitro* modelování nádorového mikroprostředí a dále i na imunohistochemické analýze vzorků nádorových tkání a jejich porovnání s vytvářenými modely. Tematicky lze předkládanou práci rozdělit do čtyř na sebe navazujících okruhů.

- 1. Glykobiologie nádorových onemocnění** – cílem je prohloubení poznatků o expresi galektinů a jejich vazebných míst u nádorových onemocnění a na *in vitro* modelech.
- 2. Mikroprostředí a kmenovost HNSCC** – zde se zaměříme na hlubší pochopení významu mikroprostředí pro udržení znaků kmenovosti a dále na vytvoření standardizovaného reprodučibilního *in vitro* modelu pro navazující projekty.
- 3. Nádorové mikroprostředí melanomu** – cílem v tomto okruhu je izolace CAFs z melanomu, jejich imunocytochemická charakterizace a transkriptomická analýza. Dále chceme ověřit jejich biologickou aktivitu podle metodiky zavedené pro *in vitro* modely mikroprostředí v laboratoři při studiu nádorových onemocnění v předchozích letech (Kideryová et al., 2009; Lacina et al., 2007a; Lacina et al., 2007b; Strnad et al., 2009).
- 4. Specificita CAFs** – na základě výsledků výše uvedených studií chceme provést analýzu funkční specificity nádorových fibroblastů z rozdílných nádorů. Dále se chceme věnovat i studium vlivu normálních a nádorových buněk na *in vitro* indukci  $\alpha$ -SMA pozitivních fibroblastů jako základ modelu geneze stromatu z lokálního mezenchymu.

## 7. Materiál a metodika

V této části jsou shrnuty pouze hlavní metodické principy využití při řešení vytyčených úkolů, detailní popis metodik je uveden v jednotlivých publikacích, které tvoří součást této dizertační práce.

V předložené disertační práci byly analyzovány vzorky reprezentující dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku odebrané na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole a Klinice ústní, obličejové a čelistní chirurgie 1. LF UK a VFN. Dále byly vyšetřeny melanomy a jejich kožní metastázy získané jak na Dermatovenerologické klinice 1. LF UK a VFN, tak retrospektivně na Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FNM. Nádorově asociované fibroblasty z dlaždicobuněčného karcinomu byly izolovány z nádorů hlavy a krku pocházejících od pacientů z Kliniky otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole a Kliniky ústní, obličejové a čelistní chirurgie 1. LF UK a VFN. Nádorově asociované fibroblasty z melanomu a karcinomu prsu byly izolovány z kožních metastáz melanomu a kožních metastáz karcinomu prsu od pacientů léčených na Dermatovenerologické klinice 1. LF UK a VFN. Izolace nádorově asociovaných fibroblastů byla provedena dle modifikovaného protokolu původně použitého v práci Lacina et al., 2007 (Lacina et al., 2007b). Normální lidské dermální fibroblasty a normální lidské keratinocyty byly izolovány ze zdravé kůže poskytnuté z Kliniky plastické chirurgie 3. LF UK (Lacina et al., 2007b). Z epitelových nádorových linií byla použita linie FaDu pocházející z dlaždicobuněčného karcinomu hypofaryngu (ATCC<sup>®</sup> HTB-43<sup>™</sup>) a linie EM-G3, nádorová linie invazivního duktálního karcinomu prsu (laskavě poskytnuta Dr. Matouškovou z Ústavu molekulární genetiky, AV ČR). Z linií maligních melanocytů byla použita linie BLM, kterou jsme dostali jako kolegiální dar od L. van Kempena and H. van Kriekena, Ústav patologie, UMC St. Radoud Nijmegen, Nizozemí. Dále pak byla použita linie ASC izolovaná z nádorového ascitu pacienta s generalizovaným melanomem na Dermatovenerologické klinice 1. LF UK a VFN. Melanomová linie A2058 byla pro účely *in vitro* modelování zakoupena (ATCC<sup>®</sup> HTB-43<sup>™</sup>). Jako kontrolní zdravé melanocyty byla použita linie Mel-HP, kterou jsme získali také jako kolegiální dar od doc. J. Vachtenheima z ÚKB LD 1. LF UK a VFN. V experimentu jsme použili i kmenové buňky neurální lišty izolované z vlasového folikulu (anglicky: Neural Crest Stem Cells, dále NCSCs) (Krejci et Grim, 2010). Jako

podpůrné buňky pro kultivaci keratinocytů byla použita linie 3T3 myších fibroblastů (ATCC® CCL-92™). Veškerý biologický materiál byl získán na základě informovaného souhlasu pacienta, jehož text byl revidován příslušnou etickou komisí spolupracujícího zdravotnického zařízení (VFN a FNM, Praha) v souladu s principy bioetiky ve smyslu Helsinské konvence.

Tkáně a buněčné kultury byly vyšetřeny pomocí nepřímé fluorescenční imunohistochemie, cytochemie a za použití lektinové imunohistochemie. Dále byla použita metoda peroxidásové imunohistochemie. Použité protilátky byly buď komerčně dostupné, nebo byly připraveny v laboratoři spolupracujícího pracoviště (Hans-Joachim Gabius, Universita Ludwiga Maximiliana, Mnichov). Kontrolní značení pro ověření specifity použitých protilátek byla provedena nahrazením isotypovou protilátkou proti antigenu, který se v příslušných tkáních či buňkách nevyskytuje, čímž bylo vyloučeno riziko falešně pozitivní reakce podmíněné interakcí Fc fragmentu protilátky s Fc receptorem. Kromě toho bylo jako kontroly použito jen sekundární protilátky. Vazebná místa pro galektiny byla znázorněna pomocí biotinylovaných rekombinantních galektinů rovněž připravených v laboratoři H.-J. Gabiuse.

Analýza transkriptomu byla provedena pomocí mikročipové analýzy (Costa et al. 2006) a výsledky byly ověřovány pomocí RT-PCR na spolupracujícím pracovišti Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Proteomická analýza byla provedena na spolupracujícím pracovišti Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově. Jednotlivé statistické metody jsou detailně popsány v příložených studiích.

## 8. Výsledky

### 8.1. Přehled publikací v souvislosti s tématem

Výsledky jsou detailně uvedeny a diskutovány v následujících publikacích, které tvoří nedílnou součást této dizertační práce:

- 1) **Kodet O.**, Dvorankova B., Lacina L., Andre S., Kaltner H., Gabius H.-J., Smetana K. Jr. Comparative analysis of the nuclear presence of adhesion/growth-regulatory galectins and reactivity in the nuclei of interphasic and mitotic cells. *Folia Biologica*. 2011; 57(3): 125-132. **(IF 0,729)**
- 2) Dvorankova B., Szabo P., Lacina L., **Kodet O.**, Matouskova E., Smetana K. Jr. Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. *Histochem Cell Biol*. 2012; 137: 679-85. **(IF 2,588)**
- 3) Fik Z., Valach J., Chovanec M., Mazanek J., Kodet R., **Kodet O.**, Tachezy R., Foltynova E., Andre 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*. 2013; 42: 166-73. **(IF 2,055)**
- 4) **Kodet O.**, Dvorankova B., Krejci E., Szabo P., Dvorak P., Stork J., Krajsova I., Dundr P., Smetana K. Jr., Lacina L. Cultivation-dependent plasticity of melanoma phenotype. *Tumour Biol*. 2013 Dec;34(6):3345-55. **(IF 2,518)**
- 5) Fik Z., Dvorankova B., **Kodet O.**, Boucek J., Betka J., Betka J., Andre S., Gabius H.-J., Snajdr P., Smetana K., Jr., Chovanec M. Towards dissecting molecular routes of intercellular communication in the tumour microenvironment: phenotypic plasticity of stem cell-associated markers in coculture (carcinoma cell/fibroblast) systems. *Přijato do tisku Folia Biologica* **(IF 1,219)**
- 6) Jarkovska K., Dvorankova B., Halada P., **Kodet O.**, Gadher S. J., Szabo P., Motlik J., Smetana Jr. K., Kovarova H. Revelation of fibroblast protein commonalities and differences and their possible roles in wound healing and tumorigenesis using co-culture models of cells. *Biol Cell*. 2014 Apr 2. doi: 10.1111/boc.201400014. **(IF 3,488)**

**Kodet, O.**, Lacina, L., Krejci, E., Dvorankova, B., Grim, M., Stork, J., Kodetova, D., Vlcek, C., Sachova, J., Kolar, M., Smetana, K., Jr., Strnad H. Melanoma cells influence the differentiation pattern of normal human keratinocytes.

V recenzním řízení Pigment Cell & Melanoma Research

## **8.2. Souhrn dosažených výsledků**

### **8.2.1. Glykobiologie nádorových onemocnění**

#### **Srovnání jaderné exprese galektinů a jejich vazebných míst v interfazických a mitotických buňkách CAFs, buňkách karcinomu hypofaryngu a nádorových melanocytech *in vitro***

V kapitole 3.2. byla ve výčtu funkcí galektinů zmíněna mimo jiné i dříve popsaná role galektinu-1 a -3 při sestřihu pre-mRNA (Patterson et al., 2004). Do současné doby ale porozumění funkcím galektinů v buněčném jádře a jadérku zůstává omezené, ačkoli jaderná exprese galektinů a jejich glykoligandů byla detekována již v předchozích pracích (Smetana et al., 2006). Získané poznatky se zaměřují zejména na galektin-1 a galektin-3, méně pak na ostatní galektiny. Některé práce poukazují i na vztah mezi expozicí environmentálnímu stresu a přítomností například galektinu-2 v jádře (Dvorankova et al., 2002). Při studiu této problematiky jsme si na imunocytochemické úrovni u buněk kultivovaných za standardních podmínek povšimli jednak určitých rozdílů mezi jednotlivými studovanými buněčnými typy a dále i rozdílů vyplývajících z fází buněčného cyklu. Rozhodli jsme se proto v této studii komparativně sledovat expresi galektinu-1, -2, -3 a -7 a dále pak jejich vazbu a vazbu jejich glykoligandů v interfazických a mitotických buňkách. Toto temporospeciální porovnání je důležitým předpokladem pro hlubší porozumění mechanismům, kterých se galektiny účastní.

Pro porovnání jsme použili tři rozdílné buněčné populace, tedy CAFs izolované z dlaždicobuněčného karcinomu, nádorovou linii FaDu (nádorové keratinocyty z karcinomu hypofaryngu) a melanocytární nádorovou linii A2058 izolovanou z uzlinové metastázy.

Výsledek této studie ukázal, že jaderná exprese galektinů a jejich glykoligandů je závislá na buněčném typu. Ze čtyř porovnávaných galektinů byl v jádrech všech linií zaznamenán pouze galektin-1. Druhým uniformním znakem byla vazebná místa pro galektin-2, která byla přítomna rovněž ve všech typech porovnávaných buněk bez závislosti na buněčném cyklu. Galektin-3 byl detekován v jádrech pouze u linie FaDu. Vazebná místa pro galektin-7 naopak pouze v jádrech CAFs. Novým poznatkem vyplývajícím z této studie je přítomnost galektinů a jejich vazebných míst

v mitotických buňkách. Vazebná místa pro galektin-1 a -2 byla pozorována jednak v oblastech kondenzovaných chromozomů jako jakási perichromozomální obálka a v případě vazebných míst pro galektin-1 také v oblasti dělicího vřetenka a kontraktálního prstence rozdělujícího dceřiné buňky. Navíc v oblastech kondenzovaných chromozomů dochází k velmi přesné kolokalizaci s Ki67, jaderným markerem proliferujících buněk.

V této práci jsme tedy poukázali na možný podíl galektinů a jejich glykoligandů na buněčném cyklu a dělení buněk. Objasnění přesné role těchto molekul v průběhu mitózy a přesnější popis interakce s nukleovými kyselinami, či s DNA asociovanými proteiny bude však předmětem podrobnější studie na ultrastrukturální úrovni.

### **Ztráta exprese galektinu-9 v dysplastickém dlaždicovém epitelu hlavy a krku**

Galektin-9 patří mezi galektiny typu „*tandem repeat*“ a podílí se na buněčné adhezi, proliferaci a dále i na apoptóze. V literatuře věnované nádorové glykobiologii byla jeho přítomnost popsána ve vztahu k lepší prognóze u maligního melanomu a karcinomu prsu (Kageshita et al., 2002; Yamauchi et al., 2006). V této práci jsme se zaměřili na pozorování exprese galektinu-9 v HNSCC, u těchto nádorů nebyla data literárně doposud dostupná.

Expres galektinu-9 byla porovnávána s expresí keratinů (keratin-14 a -19) jako standardních znaků diferenciaci dlaždicového epitelu (Lacina et al., 2007a; Takeda et al., 2006).

V této práci se podařilo prostudovat 62 nádorových vzorků odebraných z HNSCC, dále 20 tkání z chirurgického okraje resektátu a 32 vzorků morfologicky normální tkáně epitelu dutiny ústní (tj. kontralaterální bukální sliznice operovaných pacientů). S ohledem na pravděpodobné plošné působení karcinogenních substancí v dutině ústní bylo jako kontroly použito tkání, které byly odebrány od pacientů bez nádorového onemocnění při elektivní extrakci třetího moláru (N= 4).

Výsledky vyšetření sledovaných znaků poukázaly na normálních tkáních, že galektin-9 je přítomen v celém rozsahu bazální vrstvy. Navíc zde byla potvrzena i přítomnost fyziologické distribuce sledovaných keratinů-14 a -19.

Ve vzorcích z kontralaterální sliznice získané od pacientů operovaných pro HNSCC nebyl identický stav zaznamenán ve všech případech (tj. pouze 20/32). Ve zbylých případech (tj. 12/32) tyto epitely sice exprimovaly galektin-9, ale jeho rozložení



v oblasti bazální vrstvy bylo značně nepravidelné. Současně byla v těchto epitelech zastižena i aberantní exprese keratinu-14 a -19, i když epitel byl v základním histologickém obraze morfologicky prakticky nezměněn.

V oblasti resekčního okraje (N=20) byla opět detekována aberantní exprese keratinu-14 a -19. Nepravidelná exprese galektinu-9 bazální vrstvy byla nalezena jen v 7 případech. Ostatní vyšetřené vzorky (tj. 13/20) byly pro galektin-9 negativní. Pouze v jediném vzorku této podskupiny byla zastižena exprese jak galektinu-9, tak exprese keratinů srovnatelná s nálezem v kontrolní skupině (tj. normální epitel od neoplasmiologických pacientů).

V žádném z vyšetřovaných karcinomů se nepodařilo prokázat expresi galektinu-9, který zde byl patrný jen v TILs, což bylo ověřeno kolokalizací exprese galektinu-9 a CD45.

V retrospektivním porovnání dostupných klinických údajů nebyl potvrzen statisticky signifikantní vztah exprese galektinu-9 k užívání tabáku ani přítomnosti HPV infekce.

Výsledky dosažené v této práci poskytují nové informace nejen o galektinu-9 a jeho přítomnosti v oblasti normálních dlaždicových epitelech hlavy a krku, ale poukazují zejména na problematiku exprese galektinů epitelem dysplastickým či epitelem vystaveným chronickému environmentálnímu stresu. Tato problematika se dotýká zejména definice morfologické normality resekčního okraje, tedy parametru, který je v současné době nedílnou součástí formulace patologickoanatomického popisu vyšetřovaných tkání. Snižující se exprese galektinu-9 je doprovázena i odlišnou expresí specifických keratinů a může tedy posloužit jako poměrně citlivý znak dysplastických dlaždicových epitelů. Zde se tedy naskýtá prakticky významná aplikace, která by umožnila zlepšení onkologické stratifikace pacientů podle chirurgické radikality provedeného výkonu, míry onkologického rizika a tak i zlepšení výsledků onkologické predikce. Výsledky této studie budou proto v budoucnosti doplněny o data analyzující i klinicko-onkologické parametry (např. přežívání, četnost lokální recidivy či dobu do relapsu) ve vztahu k expresi galektinu-9 zejména v okraji chirurgického resektátu.

## 8.2.2. Mikroprostředí a kmenovost HNSCC

### Ovlivnění diferenciačního stupně nádorové linie hypofaryngu FaDu pomocí CAFs z HNSCC *in vitro*.

Jak jsme již zmínili v kapitole 3.2., CSCs představují v absolutních i relativních číslech jen sice poměrně malou část nádorové populace, ale zato vysoce významnou, a to především pro jejich rezistenci vůči konvenční chemoterapii a dále i pro následnou schopnost sebeobnovy (tj. kompletní klonální obnovy nádoru)(Clarke et al., 2006; Costea et al., 2006). Unikátní vlastnosti nádorových kmenových buněk jsou stejně jako u jejich normálních tkáňových protějšků uchovány pouze ve vhodném mikroprostředí. Je tedy evidentní, že epitelově mezenchymové interakce, které se podílejí na tvorbě a kontinuálním udržování vhodného „*niche*“, jsou předmětem eminentního zájmu experimentální onkologie. Narušení nádorového mikroprostředí či jeho řízená manipulace opět skýtá určitý terapeutický potenciál.

V této studii jsme sledovali linii FaDu (nádorové buňky hypofaryngu) a zaměřili jsme se na expresi potenciálních znaků CSCs a znaků nízké buněčné diferenciace (CD29, CD44, CD133, keratin-8, keratin-19, přítomnost vazebných míst pro galektin-1 v jádře) v závislosti na mikroprostředí. Na tomto modelu jsme tedy sledovali vliv CAFs izolovaných z HNSCC na linii FaDu a to jak v přímé ko-kultuře, tak i v nepřímé ko-kultuře, kde jednotlivé buněčné populace byly odděleny pomocí mikroporézní membrány. Pro srovnání jsme použili ve všech experimentech i normální dermální fibroblasty. Ko-kultivace ve všech modifikacích byly provedeny ve třech časových intervalech tj. 2, 7 a 9 dnů. Výše jmenované znaky jsme hodnotili jak na konvenčních kulturách, tak byly sledovány buňky tzv. „*side population*“ linie FaDu, izolované pomocí buněčného sorteru. Vliv fibroblastů byl posuzován jednak s ohledem na rozsah navozených morfologických změn buněk FaDu a jejich kolonií, ale i funkčně tj. ovlivnění růstu kolonií.

Na morfologické úrovni jsme pozorovali, že při použití CAFs byly kolonie FaDu mírně větší a buněčnější než při použití dermálních fibroblastů. Při periférii kolonií rostoucích pod vlivem CAFs byly navíc častěji pozorovány epitelové buňky s protáhle vřetenovitou morfologií. Výše uvedené rozdíly byly v linii FaDu patrné zejména při 2

denní kultivaci, kde kolonie byly poměrně malé a s rostoucí mírou konfluencie exprese studovaných znaků postupně slábla. Stěžejní výsledky shrnuje Tab. 8.

Tab.: 8 Přehled profilů exprese studovaných znaků v závislosti na délce kultivace a prostředí.

	<b>FaDu</b>			<b>FaDu+SCCF/HF</b>			<i>side pupolation</i>
	2 dny	7 dní	9 dní	2 dny	7 dní	9 dní	1 den
<b>CD29</b>	+++	++	+	+++	+++	+++	+++
<b>K8</b>	+++	++	-	+++	+++	+++	+++
<b>K19</b>	+++	+	-	+++	+++	+++	+++
<b>Gal-1BS- N</b>	+++	-	-	+++	+++	++	+++
<b>Gal-1BS- C</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

Legenda: SCCF = CAFs z HNSCC; HF = dermální fibroblasty; +++ silná pozitivita; ++ střední pozitivita; + slabá, ale ještě specifická pozitivita; - negativní nález.

Přímá ko-kultivace ovlivnila jak intenzitu exprese sledovaných znaků, tak i počet pozitivních buněk. Přítomnost pozitivních buněk v 7. a především 9. dnu přímé ko-kultivace byla také významně větší, ale silně pozitivní buňky byly patrné především na periférii kolonií a směrem do centra kolonie se vytrácely. Při použití nepřímé ko-kultivace jsme nepozorovali zásadní rozdíl v expresi sledovaných znaků, jen jejich distribuce byla patrná i v centru kolonií. Buňky charakteru „*side population*“ v nultém dni existence konstantně exprimovaly keratin-8, keratin-19, CD29 a vykazovaly přítomnost vazebných míst pro galektin-1 v jádře.

Tato práce sleduje na *in vitro* modelu možnou roli CAFs při vytváření mikroprostředí, na které nádorové buňky reagují, což je možno posoudit podle stupně diferenciaci nádorových buněk. Vliv dermálních fibroblastů na linii FaDu (kde byl pozorován podobný efekt jako při použití CAFs) lze vysvětlit schopností nádorových buněk indukovat i v normálních fibroblastech změny podobné fenotypu CAFs (Kolar et al., 2012).

I v tomto případě tedy epitelově mezenchymové interakce hrají významnou roli. Díky podobným změnám vyvolaným pomocí přímé i nepřímé ko-kultivace se můžeme domnívat, že zásadní roli v ovlivnění buněčné diferenciaci a expresi až CSCs znaků hraje produkce solubilních a růstových faktorů CAFs.

### 8.2.3. Nádorové mikroprostředí melanomu

#### Diferenciace nádorových melanocytů pomocí CAFs z melanomu a kondiciovaných médií

Existuje řada dokladů neobyčejné plasticity fenotypu nádorových melanocytů. Tato plasticita nespočívá jen ve strukturálních změnách, ale byla doložena i možností „reprogramování“ nádorových melanocytů v kontextu mikroprostředí embryonálního modelu. Po injekci nádorových melanocytů do oblasti formující se neurální lišty kuřecího embrya, dojde nejen k dokončení neurulace, ale i k jejich migraci a následnému zabudování do cílových lokalizací derivátů neurální lišty a celkově většinou i ztrátě maligního potenciálu melanomových buněk (Diez-Torre et al., 2009; Kulesa et al., 2006). Tyto transplantační metody prokazují na značný vliv, který má mikroprostředí na buňky melanomu. Současné jsou ale zatíženy značnou pracností, což limituje jejich širší, či dokonce masovou aplikaci v onkologickém výzkumu.

V této práci jsme se proto zaměřili na možnost ovlivnění nádorových linií maligních melanocytů (linie BLM, ASC) pomocí kondiciovaného media získaného z lidských embryonálních kmenových buněk, média obohaceného o kuřecí embryonální extrakt (dříve úspěšně používaného ke kultivaci NCSCs) a ko-kultivační systém s CAFs izolovanými z kožní metastázy melanomu. Společnou vlastností všech těchto modelů je jejich snadné získávání ve větších kvantitách a možnost snadné standardizace.

V pokusu jsme použili nádorové melanocyty, které za normálních kultivačních podmínek nevykazovaly *in vitro* přítomnost žádného z diferenciačních znaků specifických pro melanocyty jako je HMB45, melan-A/MART-1 a tyrozináza, i když nádory, ze kterých tyto buňky byly izolovány, byly pro tyto znaky pozitivní. I v tomto případě považujeme disociaci fenotypu pozorovaného *in vivo* a *in vitro* za výhodu a současně i za další doklad významu specifického mikroprostředí, jak bude dále ještě diskutováno u buněčné linie EM-G3. Ke kontrolnímu porovnání jsme použili normální neonatální lidské melanocyty (Mel-HP), které za normálních kultivačních podmínek byly pozitivní pro studované diferenciační znaky melanocytů (HMB45, melan-A/MART-1 a tyrozináza). Přehled expresních profilů shrnuje Tab. 9.

Tab.: 9 Profil exprese studovaných nádorových melanocytů *in vivo (in situ)* a *in vitro*.

	<b>HMB45</b>	<b>Melan-A</b>	<b>Tyrosináza</b>	<b>S100</b>
<b>Epidermální melanocyty</b>	-	-	+	+
<b>Mel-HP– <i>in vitro</i></b>	+	+	+	+
<b>ASC – primární melanom kůže</b>	+	+	+	+
<b>ASC – jaterní metastáza</b>	+	+	+	+
<b>ASC – po izolaci <i>in vitro</i> (kontrola)</b>	-	-	-	+
<b>BLM – <i>in vitro</i> (kontrola)</b>	-	-	-	+
<b>ASC – <i>in vitro</i> pod vlivem CAFs (experiment - 3 dny)</b>	+	+	+	+
<b>BLM – <i>in vitro</i> pod vlivem CAFs (experiment - 3 dny)</b>	+	+	+	+
Legenda: + pozitivní nález; - negativní nález				

Výsledek experimentu demonstroval změnou imunofenotypu melanomových buněk efekt kondiciovaných médií či CAFs v krátkodobé kultuře (po dobu 3 dnů). Podařilo se tedy navodit expresi výše zmíněných znaků v původně negativních melanomových buňkách. Při kombinaci kondiciovaných médií a CAFs současně jsme byli schopni prokázat synergický efekt, tj. i v dlouhodobém experimentu (14 dní) byla navozená pozitivita znaků zachována. Vliv média s kuřecím embryonálním extraktem byl naopak patrný až v pozdějším časovém horizontu (od 9. dne), ale o to byla exprese studovaných znaků silnější a efekt byl patrný i po dlouhodobé kultivaci až 3 týdnů. Tato studie tedy poukazuje na možnou plasticitu nádorových melanocytů závislou na kultivačních podmínkách.

Za stěžejní považujeme s ohledem na téma předkládané dizertační práce pozorování, že při ko-kultivaci nádorových melanocytů s CAFs izolovaných z melanomu dochází ke změnám, v jejichž výsledku se přibližuje fenotyp sledovaných linií v *in vitro* k fenotypu nádorů *in vivo*, respektive *in situ* ve tkáni. Tyto výsledky opět poukazují na složitost a význam nádorového mikroprostředí, které se ve velké míře může podílet na rozvoji a udržení nádorového klonu (Kim et al., 2011).

## **Ovlivnění diferenciačního stupně normálních keratinocytů v melanomu *in vivo* a pomocí nádorových melanocytů *in vitro*.**

V předchozích *in vitro* modelech epitelových nádorů jsme v naší laboratoři používali pro simulaci mikroprostředí převážně přítomnost CAFs. Tento model je jistě rovněž aplikovatelný na melanom, jak bylo demonstrováno v předešlé studii. Biologická podstata mikroprostředí nádorů vycházejících z minoritních populací stratifikovaných epitelů je ale jiná. V těchto modelech je nejspíše třeba zohlednit právě přítomnost normálních keratinocytů v okolí formujícího se maligního melanocytárního klonu, což zvyšuje komplexitu modelu a znesnadňuje analýzu. Biologická relevance tohoto modelu je ale podtržena známým faktem, že ve fázi radiálního růstu je melanom na okolních keratinocytech závislý, zatímco fáze vertikálního růstu je spojena s větší nezávislostí maligního klonu (Van Kilsdonk et al., 2010).

Tato práce byla zaměřena jak na vliv nádorových melanocytů na keratinocyty přítomné v okolí nádoru *in vivo*, tak i na ovlivnění exprese specifických keratinů a tedy stupeň diferenciace zdravých keratinocytů prostřednictvím nádorových melanocytů v *in vitro* modelu. Bioptické vzorky nodulárních melanomů (NM) jsme nejprve histochemicky analyzovali se zaměřením na diferenciační znaky keratinocytů v okolí NM a získaná data jsme porovnali s *in vitro* modelem, kde lidské normální keratinocyty byly ko-kultivovány s linií BLM nádorových melanocytů, linií Mel-HP neonatálních melanocytů a buňkami NCSCs.

Na studovaných NM (N=100) byla provedena morfometrická analýza vlastností epidermis, která nádory obklopuje. Kromě dobře patrné hyperplazie epitelu, která v některých případech dosahovala až pseudoepiteliomatózního charakteru, byla sledována přítomnost proliferačních znaků (Ki-67) a keratinu-8, -14, -19. Hyperplastický epitel v okolí nádoru vykazoval silnou pozitivitu keratinu-14 a aberantní expresi keratinu-10 jako znaku diferencovaných epitelových buněk. Bylo pozoruhodné, že odlišná exprese keratinů byla pozorována i v epitelu při resekcčním okraji léze (v průměru okolo 1 cm), který byl jinak hodnocen ve všech případech jako tkáň již morfologicky normální, prostá nádorových struktur. Shrnutí expresních profilů *in vivo* a *in vitro* ukazuje Tab. 10.

Práce na zjednodušených modelech *in vitro* poukazuje na schopnost nádorových melanocytů i normálních buněk NCSCs indukovat expresi keratinu-8, -14, -19 a expresi vimentinu v ko-kultivovaných keratinocytech, a tedy indukovat v těchto

buňkách až fenotyp epidermálních kmenových buněk a dále i znaky EMT. Na základě molekulárně genetických analýz byla v linii BLM a NCSCs detekována zvýšená exprese mRNA cytokinů IL-8 a CXCL-1 a růstových faktorů FGF-2 a VEGF-A, které se na těchto změnách mohou podílet.

Hlavní přínos této práce spočívá ve srovnání efektu nádorových melanocytů BLM a jejich prekurzorů NCSCs. Obě buněčné linie dle našich pozorování mají prakticky uniformní schopnost ovlivnit diferenciační vzor keratinocytů. Práce poukazuje na možnou podobnost mezi regulací „*niche*“ v oblasti „*bulge*“ vlasového folikulu (tj. sídlo kmenových buněk nejen epidermis, ale i NCSC a melanocytů) a regulací nádorového mikroprostředí (Chang et al., 2013).

Naše pozorování podporují představu o významu mezibuněčných interakcí v biologii melanomu a dokládají komplexnost nádorového mikroprostředí. V melanomu tedy dochází nejen k vzájemnému ovlivnění nádorového klonu a stromálních buněk v dermis, ale současně nádorové buňky pomocí produkce námi určených růstových faktorů a cytokinů/chemokinů mohou být zodpovědné za pseudohyperplastický epitel v okrajích nodulárních melanomů. Význam mutuálních interakcí jednotlivých větví této komplexní interakce zůstává nadále v centru naší pozornosti a do budoucna se budeme snažit model rozšiřovat i o aspekty plynoucí z přítomnosti různých infiltrujících buněčných typů patřících k imunitnímu systému.

Tab. 10: Shrnutí profilů exprese keratinů u keratinocytů *in vivo (in situ)* a *in vitro*

	<b>K-8</b>	<b>K-14</b>	<b>K-19</b>	<b>K/Vim</b>
<b><i>In vivo</i></b>				
Normální kůže	-	bazálně +	-	-
V okolí névu	-	suprabazálně +	-	-
NM	-	suprabazálně + + +	-	-
Kožní metastáza	-	suprabazálně + + +	-	-
<b><i>In vitro</i></b>				
Mel-HP	-	+	-	-
BLM	++	++	+	++
NCSCs	+	+++	+++	+++
Legenda: K = keratin; Vim = vimentin; + + + největší pozitivita; + + střední pozitivita; + slabá, ale ještě specifická pozitivita; - negativní nález				

## 8.2.4. Specificita CAFs

**Porovnání vlivu CAFs z dlaždicobuněčného karcinomu, bazaliomu, z kožní metastázy melanomu a kožní metastázy karcinomu prsu na linii nádorových epitelových buněk karcinomu prsu EM-G3 v *in vitro* podmínkách.**

Funkce nádorového stromatu, resp. CAFs, jsou v poslední době intenzivně studovány a objasnění mechanismů fungování nádorového mikroprostředí představuje velmi slibnou oblast s předpokládaným velkým onkologicko-terapeutickým potenciálem. CAFs významně ovlivňují biologické vlastnosti řady nádorů a jejich biologické vlastnosti jsou již dobře popsány u HNSCC a bazocelulárního karcinomu kůže (Lacina et al., 2007a; Lacina et al., 2007b; Strnad et al., 2010). Klíčovou otázkou zůstává míra univerzality funkcí stromatu, či naopak specificita pro jednotlivé nádorové typy. Problematikou řešenou v této práci tedy bylo srovnání CAFs z rozdílných nádorů prostřednictvím studia jejich vlivu na linii nádorových epitelových buněk.

V experimentu jsme testovali vliv CAFs izolovaných z různých typů nádorů (resp. z HNSCC, z bazocelulárního karcinomu kůže, kožní metastázy melanomu a kožní metastázy karcinomu prsu) na linii EM-G3.

Mateřský nádor linie EM-G3 byl klasifikován jako invazivní duktální karcinomu prsu a imunohistochemicky „*in vivo*“ vykazoval pozitivitu keratinu-8, -14 a -19. Po izolaci „*in vitro*“ tato linie ztratila schopnost exprese keratinu-19 a jen velice omezeně si ponechala pozitivitu keratinu-8 a -14 (Mladkova et al., 2010).

Zásadní rozpor v imunohistochemickém profilu stanoveném ve tkáni (tedy v rámci pro nádorové buňky přirozeného mikroprostředí) a imunocytochemickém profilu stanovenému „*in vitro*“ (tedy v naprosto arteficiálním prostředí) dovoluje vyslovit hypotézu o vlivu těchto environmentálních faktorů na imunofenotyp nádorové populace. Proto představuje tato buněčná linie velmi vhodný model pro studium epitelově mezenchymových interakcí.

Takto fenotypově charakterizovanou linii jsme tedy vystavili vlivu CAFs v kulturačním experimentu s cílem sledovat změny na úrovni profilu intermediárních filamentů (tj. výše zmíněných keratinů). K porovnání jsme použili kontrolní skupinou fibroblastů (normální lidské dermální fibroblasty, NIH 3T3 myší embryonální fibroblasty, 3T3 fibroblasty s kulturačně indukovanými znaky kmenovosti).



Výsledek této studie ukázal, že všechny použité fibroblasty jsou ve sledované linii schopny zvýšit expresi markeru bazální myoepitelové vrstvy, keratinu-14. Klíčové ovlivnění exprese luminárního markeru keratinu-8, specifického právě pro karcinom prsu, bylo dosaženo pouze při použití CAFs (bez rozdílu původu). Navíc při použití CAFs jsme detekovali i větší zastoupení buněk, které byly pro oba tyto znaky pozitivní současně. Naopak se nepodařilo prokázat vliv na ovlivnění exprese keratinu-19. Tento znak, jeden z možných znaků kmenových buněk epidermis, byl v předchozích experimentech úspěšně indukován *in vitro* v normálních lidských interfolikulárních keratinocytech, pokud byly v ko-kultuře s nimi použity fibroblasty izolované z keratin-19 pozitivního bazocelulárního karcinomu kůže (Lacina et al., 2007b). Další sledovaný marker Ki67, jaderný marker proliferace, nebyl ovlivněn při použití žádné ze sledovaných linií CAFs ani normálních fibroblastů.

Tento experiment dokazuje, že všechny fibroblasty vykazují v ko-kultuře výrazný vliv na fenotyp linie EM-G3, což podtrhuje význam epitelově mezenchymové interakce pro experimentální onkologii. Existují však rozdíly mezi efektem normálních a CAFs fibroblastů doložený rozdílnou expresí specifických keratinů. Biologický vliv CAFs na linii EM-G3 byl navíc *in vitro* prakticky uniformní bez ohledu na histogenezi původních nádorů. Tato biologická aktivita tedy může být obecným principem a vlastností CAFs a může se velkou měrou podílet na udržení a další progresi nádorového klonu. Na druhou stranu je nutné zmínit, že ani po zavedení CAFs do ko-kultury nebylo dosaženo naprosto přesné shody mezi imunofenotypem nádorových buněk určeným ve tkáni a v kultuře, což nejspíše svědčí i pro další mechanismy (například specifické složení extracelulární matrix), které nebyly v naší studii sledovány.

### **Změny exprese kontraktálních proteinů cytoskeletu dermálních fibroblastů jako výsledek epitelově mezenchymových interakcí v modelu prostředí hojící se rány a nádorů.**

Fibroblasty hojící se rány, podobně jako CAFs, jsou tradičně chápány především jako myofibroblasty. Zatímco v hojící se ráně po dokončení hojení dochází k jejich zániku (Li et Wang, 2011), v nádorovém stromatu tyto buňky perzistují a jsou producenty i řady specifických růstových faktorů a cytokinů/chemokinů, které významně ovlivňují biologické chování nádorů (Kolar et al., 2012; Li et al., 2007).

V této studii jsme se zaměřili na model, ve kterém jsou dermální fibroblasty a CAFs z HNSCC ovlivněny přítomností jednak normálních lidských keratinocytů a dále pak maligními buňkami linie FaDu. Naším cílem byla detekce kontraktilních proteinů cytoskeletu pomocí proteomické analýzy. Analyzovány byly buňky rostoucí v nepřímých ko-kulturách po dobu 21 dní. (Tento postup umožňuje analyzovat populace homogenního složení, časový horizont vycházel ze zkušeností získaných v naší laboratoři při práci na patentu číslo CZ 2011-222). Jako kontrolu jsme zvolili samostatnou kultivaci dermálních fibroblastů a CAFs. Studované dermální fibroblasty byly následně lyzovány pro potřeby 2D elektroforézy a pro metodu western blot.

Pomocí 2D elektroforézy se podařilo detekovat zvýšenou přítomnost kontraktilních proteinů v dermálních fibroblastech jak pod vlivem normálních keratinocytů, tak i pod vlivem linie FaDu. Detekovanými proteiny byly: caldesmon (jednotka 115); cofilin-1; t-komplex protein 1, podjednotka beta; a lehký řetězec 12A regulující myosin. Naopak se podařilo určit i proteiny, jejichž přítomnost byla snížena pod vlivem obou typů epitelových buněk, tj. caldesmon (jednotka 297 a 110); endoplazmin; calponin-2.

Dále se podařilo určit skupinu proteinů, které byly přítomny pouze v dermálních fibroblastech pod vlivem normálních keratinocytů (jako například alfa-enoláza, reticulocalbin-3 a nebo specifické podjednotky endoplazminu v podobě fragmentů. Jako proteiny snížené při ko-kultivaci dermálních fibroblastů a normálních keratinocytů (oproti použité nádorové linii FaDu) byly určeny vimentin, cofilin-2.

Přítomnost takto určených proteinů byla vždy verifikována pomocí metody western blot. Tato metoda potvrdila sníženou hodnotu celkového caldesmonu v dermálních fibroblastech oproti jeho fosforylované formě pod vlivem obou epitelových buněk (normálních i nádorových). Naopak přítomnost např. calponinu-2, jehož hodnota byla v dermálních fibroblastech snížena jen pod vlivem linie FaDu, vykazovala rozdíl oproti předchozí metodě. Detekované proteiny byly následně zpracovány za použití počítačového modelování (NAVIGaTOR software) pro účely a představu tvorby možných regulačních sítí v dermálních fibroblastech pod vlivem normálních a nádorových epitelových buněk.

Výsledek těchto pozorování poukázal na jemnou regulaci formování kontraktilního cytoskeletu (caldesmon, calponin-2, lehký řetězec 12A regulující myosin a cofilin-1) v důsledku epitelově mezenchymové interakce. Změny byly detekovány poměrně uniformně jak pod vlivem normálních keratinocytů, tak i pod vlivem nádorové

linie FaDu, což znovu potvrzuje hypotézu podobných regulačních mechanismů, jak v modelu hojící se rány, tak i v nádorovém mikroprostředí.

## 9. Splnění cílů dizertační práce, diskuze

V prvním tematickém okruhu předkládané dizertační práce bylo vytyčeným cílem prohloubení poznatků glykobiologie u nádorových onemocnění. Galektiny reprezentují v současném pojetí buněčné a nádorové biologie molekuly s nezanedbatelným potenciálem účastníci se kromě regulace pre- i postnatální homeostázy v normálních tkáních také mnoha dějů patologických, jako jsou autoimunitní reakce či maligní bujení (Fred Brewer, 2002; Nakahara et al., 2005).

Protože galektin-9 byl již dříve studován v nádorové problematice melanomu a karcinomu prsu (Kageshita et al., 2002; Yamauchi et al., 2006), rozhodli jsme se porovnat tyto poznatky s HNSCC. Jak jsme již zmínili v obecném úvodu této práce (kapitola 3.2.), změny glykokonjugátových motivů epitelových buněk neodráží jen stupeň buněčné diferenciaci (Smetana et al., 2003), ale pravděpodobně mohou být významně ovlivněny okolním prostředím (Lacina et al., 2007a). Podařilo se nám prokázat, že galektin-9 tak představuje poměrně citlivý znak pro posuzování stavu epitelu v kontextu jeho mikroprostředí. Předpokládáme, že tyto poznatky by mohly vést i ke zpřesnění diagnostiky a radikality chirurgického výkonu, který je u HNSCC klíčový pro úspěšnou léčbu pacientů.

Studium aspektů glykobiologie nás přivedlo i k obecně biologickým tématům, jako je mitóza. Zjistili jsme, že přítomnost jednotlivých galektinů v jádře není zcela uniformní, je závislá jak na fázi buněčného cyklu, tak i na buněčném typu. Asi nejdůležitější galektiny, právě pro možný vliv na regulaci buněčného cyklu, jsou galektin-1 a -2 nebo jejich glykoligandy, které lze detekovat jak v interfázických jádrech, tak i jádrech mitotických bez ohledu na buněčný typ. V mitotických jádrech lze jejich vazebná místa detekovat v oblasti kondenzovaných chromozomů a galektin-1 i v oblasti dělicího vřeténka a kontraktilního prstence rozdělujícího dceřiné buňky.

**Poznatky získané při studiu tohoto tematického okruhu byly shrnuty a publikovány jako:**

Kodet O., Dvorankova B., Lacina L., Andre S., Kaltner H., Gabius H.-J., Smetana K. Jr. Comparative analysis of the nuclear presence of adhesion/growth-

regulatory galectins and reactivity in the nuclei of interphasic and mitotic cells. *Folia Biologica*. 2011; 57(3): 125-132. (IF 0,729)

Fik Z., Valach J., Chovanec M., Mazanek J., Kodet R., Kodet O., Tachezy R., Foltynova E., Andre 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*. 2013; 42: 166-73. (IF 2,055)

#### **Cíle tohoto okruhu považujeme proto za splněné.**

Druhým tematickým okruhem bylo studium vztahu mikroprostředí a kmenovosti HNSCC a vytvoření *in vitro* modelu zahrnujícího CAFs. V kapitole (5.2.2.) o biologické funkci CAFs jsme zmínili jejich podíl na utváření komplexního nádorového mikroprostředí označovaného jako „*niche*“. Toto nádorové mikroprostředí je nezbytné pro udržení přítomnosti buněk s charakteristikami CSCs (Ailles et Weissman, 2007; Li et Neaves, 2006). CSCs sice představují poměrně malou část nádorového parenchymu, ale pro své biologické chování reprezentují buněčné populace, které mohou být zodpovědné za tzv. minimální reziduální nemoc a následnou recidivu nádorového onemocnění (Clarke et al., 2006; Dave et al., 2012). Bohužel, konvenční techniky buněčné kultivace jen v omezené míře dovedou modelovat tyto nezbytné mikroenvironmentální vlivy. Takové opomíjení aspektu co největší podobnosti s přirozeným prostředím vede často k irelevantním nálezům, tedy *in vitro* artefaktům. Na druhou stranu je v zájmu vědeckého přístupu a reproducibility výsledků nutno se vyhnout obtížně definovatelným směsím, či extraktům v podobě kultivačních systémů.

CAFy představují klíčovou buněčnou populaci stromatu během epitelově mezenchymových interakcí v nádorech. V *in vitro* modelu nádorového „*niche*“ jsme proto použili CAFy z HNSCC a následně prokázali jejich vliv na indukci kmenových znaků v nádorové linii FaDu. Navržený model zapojující CAFy do studia vlivu „*niche*“ na CSCs je sice redukcionistický, ale v porovnání s konvenčními technikami nabízí při snadné reproducibilitě rozšíření stávajících modelů o mnohé cenné aspekty nezbytné pro lepší studium nádorové biologie (Chen et al., 2014; Liao et al., 2010; Weiland et al., 2012).

#### **Poznatky získané při studiu tohoto okruhu jsou shrnuty v publikaci:**

Fik Z., Dvorankova B., Kodet O., Boucek J., Betka J., Betka J., Andre S., Gabius H.-J., Snajdr P., Smetana K., Jr., Chovanec M. Towards dissecting molecular routes of intercellular communication in the tumour microenvironment: phenotypic

plasticity of stem cell-associated markers in coculture (carcinoma cell/fibroblast) systems. Přijato do tisku Folia Biologica (IF 1.219)

### **Cíle tohoto okruhu považujeme za proto za splněné.**

Ve třetím tematickém okruhu jsme se zaměřili na studium nádorového mikroprostředí maligního melanomu, tedy na nádor vycházející z minoritní populace dlaždicových epitelů. Biologické funkci CAFs v melanomu nebyla v literatuře doposud věnována taková pozornost jako v případě jiných nádorů. Vycházeli jsme tedy z našeho zavedeného biologického modelu, kterým studujeme vliv CAFs na diferenciační stupeň normálních i nádorových keratinocytů (Lacina et al., 2007a; Lacina et al., 2007b).

Po iniciální izolaci CAFs z kožní metastázy melanomu byla na úrovni imunocytochemie potvrzena jejich identita (tj. imunocytochemický profil typický pro CAFs). V samotném experimentu jsme prokázali, že agresivní linie melanomu, které nevykazovaly žádný z diferenciačních znaků melanocytů (HMB45, Melan-A/MART-1 a tyrozináza), pod vlivem mikroprostředí reprezentovaným CAFs tyto znaky exprimují a získávají tedy vyšší diferenciační stav. To ukazuje na fenotypickou plasticitu nádorových melanocytů a její možnou regulaci okolním prostředím, a tedy i na možnou roli CAFs při mezibuněčných interakcích v melanomu. Současně se dotýká i obtížnosti definice fenotypu nádorové buňky mimo běžný tkáňový kontext. Tyto naše poznatky považujeme za prokázané pro *in vitro* modely, ale do budoucna bychom se rádi pokusili tento poznatek rozšířit i např. o cirkulující nádorové buňky v průběhu metastatické rozsevu.

Neodmyslitelnou součástí terénu, ve kterém vzniká a vyvíjí se melanom, jsou keratinocyty formující většinu epidermis. V tomto okruhu jsme rovněž provedli morfometrickou analýzu epidermis přilehlé k ložisku melanomu. V oblasti nodulárního melanomu (hlavně v okrajích NM) se zpravidla dá pozorovat výrazně hyperplastická epidermis. V těchto oblastech jsme prokázali aberantní expresi specifických keratinů (keratinu-14 a -10). Tento náález opodstatňuje radikální přístup operátora k chirurgické léčbě melanomu, excizí zasahující široce až do zdravé tkáně, protože tyto aberantní změny diferenciačního profilu keratinů v epidermis byly patrné i v poměrně velké vzdálenosti od samotného nádoru.

Tato pozorování nás vedla k vytvoření *in vitro* modelu, ve kterém normální keratinocyty byly vystaveny vlivu neonatálních melanocytů, nádorových melanocytů a buněk NCSCs izolovaných z vlasového folikulu (Krejci et Grim, 2010). Zde se podařilo

pomocí nádorových melanocytů a NCSCs analogicky indukovat expresi keratinu-14, navíc i -8 a -19, ale i např. vimentinu, a tedy indukovat EMT v normálních keratinocytech.

Následně analýzou transkriptomu studovaných linií melanocytů jsme určili signální molekuly pravděpodobně odpovědné za tento efekt (IL-8, CXCL-1, FGF-2 a VEGF-A). Určení například IL-8 a CXCL-1 jako působků produkovaných nádorovými melanocyty zodpovědných za ovlivnění diferenciaci keratinocytů je zcela ve shodě s předchozím pozorováním, kde produkce IL-6, IL-8 a CXCL-1 CAFs dokáže ovlivnit diferenciační stupeň normálních keratinocytů (Kolar et al., 2012; Szabo et al., 2013)

**Poznatky získané v tomto tematickém okruhu byly publikovány jako:**

Kodet O., Dvorankova B., Krejci E., Szabo P., Dvorak P., Stork J., Krajsova I., Dundr P., Smetana K. Jr., Lacina L. Cultivation-dependent plasticity of melanoma phenotype. *Tumour Biol.* 2013 Dec;34(6):3345-55. (IF 2,518)

Publikace: „Kodet, O., Lacina, L., Krejci, E., Dvorankova, B., Grim, M., Stork, J., Kodetova, D., Vlček, C., Sachová, J., Kolár, M., Smetana, K., Jr., Strnad H. Melanoma cells influence the differentiation pattern of normal human keratinocytes.“ Je v době podání dizertační práce v recenzním řízení v časopise *Pigment Cell & Melanoma Research* (IF 5,839).

**Cíle tohoto okruhu považujeme proto za splněné.**

Ve čtvrtém, posledním, tematickém okruhu jsme se snažili ozřejmit, zda CAFs z odlišných typů nádorů vykazují funkční charakteristiky specifické pro daný typ nádoru, či zda je možno stanovit určité obecné rysy, které CAFs z různých typů nádorů sdílejí. V samotném experimentu jsme použili CAFs izolované z bazocelulárního karcinomu kůže, HNSCC, z kožních metastáz karcinomu prsu a melanomu, na ovlivnění diferenciačního stupně nádorové linie EM-G3 (původní nádor keratin-8, -14, -19 pozitivní). Působením CAFs z rozdílných nádorů vyvolalo nárůst počtu buněk EM-G3, které současně exprimovaly jak keratin-14, tak keratin-8. Skutečnost, že se nepodařilo navodit expresi keratinu-19, a tedy dosáhnout plné reprodukce nádorového fenotypu, ukazuje na fakt, že k obnovení plného fenotypu původní linie EM-G3 je zapotřebí komplexnějšího modelu. Poměrně uniformní efekt CAFs na studovanou linii EM-G3 ale svědčí o společných rysech, či mechanismech v pozadí biologické aktivity CAFs (bez ohledu na histogenezi nádoru).

Z experimentů provedených v naší laboratoři je zjevné, že CAFs jsou schopny zásadně ovlivnit fenotypové charakteristiky normálních i nádorových keratinocytů. Opačný směr této epitelově mezenchymové interakce je ale do současné doby stále poměrně enigmatický. Rozhodli jsme se tedy v tomto tematickém okruhu analyzovat reakci fibroblastů vystavených působení normálních a nádorových epitelových buněk. Tento směr je biologicky rovněž vysoce relevantní, protože je známo, že v oblasti hojící se rány dochází z lokálního mezenchymu ke vzniku  $\alpha$ -SMA pozitivních myofibroblastů, u kterých se předpokládá role při facilitaci hojení. V případě hojení je ale jejich přítomnost časově omezena a posléze podléhají apoptóze. Obdobné myofibroblasty ale v nádorech nacházíme ve stromatu konstantně (Radinsky et al., 2007; Li et al., 2007).

Předchozí experiment naší skupiny, ve kterém dermální fibroblasty a CAFs pod vlivem normálních a nádorových keratinocytů (linie FaDu) vykazovaly upregulaci IL-6, IL-8 a CXCL-1, podporuje představu o podobnosti aktivovaných fibroblastů/myofibroblastů v prostředí hojící se rány a nádoru (Kolar et al., 2012). Rozdíl mezi oběma typy fibroblastů však spočívá v tom, že dermální fibroblasty si tuto upregulaci ponechávají jen po omezenou dobu, zatímco CAFs vykazují tuto upregulaci i po dlouhodobé kultivaci již bez přítomnosti epitelových buněk v systému. Tato pozorování odpovídají představě, že aktivované fibroblasty hojící se rány po dokončení hojení (zastavení přísunu aktivačních působků) pravděpodobně podléhají inaktivaci, či apoptóze (Li et Wang, 2011).

Během předchozích experimentů jsme se potýkali s obtížemi plynoucími z definice fenotypu myofibroblastu, protože se nepodařilo prokázat přítomnost  $\alpha$ -SMA ve fibroblastech pod vlivem normálních keratinocytů *in vitro*, resp. jednoznačnou fenotypovou shodu s CAFs. Při vědomí metodologických limitů imunocytochemie jsme proto přistoupili k provedení proteomické analýzy lyzovaných dermálních fibroblastů vystavených shodnému prostředí normálních a nádorových keratinocytů. V této analýze jsme detekovali proteiny účastníci se regulace kontraktilní buněčné aktivity a formování kontraktilního cytoskeletu (caldesmon, calponin-2, lehký řetězec 12A regulující myosin a cofilin-1). Tyto výsledky tedy ukazují na další podobnost aktivace fibroblastů a to především jejich funkční transformaci do myofibroblastů v *in vitro* modelu hojící se rány a nádorového mikroprostředí.

**Výsledky práce na tomto tematickém okruhu byly publikovány jako:**

Dvorankova B., Szabo P., Lacina L., Kodet O., Matouskova E., Smetana K. Jr. Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. *Histochem Cell Biol.* 2012; 137: 679-85. (IF 2,588)

Publikace: Jarkovska K., Dvorankova B., Halada P., Kodet O., Gadher S. J., Szabo P., Motlik J., Smetana Jr. K., Kovarova H. Revelation of fibroblast protein commonalities and differences and their possible roles in wound healing and tumorigenesis using co-culture models of cells. *Biol Cell.* 2014 Apr 2. doi: 10.1111/boc.201400014.

**Cíle tohoto okruhu proto považujeme za rovněž splněné.**

Souhrnně lze ke splnění cílů tedy říci, že poznatky získané při studiu všech čtyř tematických okruhů v rámci této dizertační práce tvoří podklad pro šest prací již publikovaných v zahraničních odborných časopisech s Impact Faktorem. Souhrnný IF těchto publikací je roven 12,597. Jedna publikace je v současné době v recenzním řízení v časopise s IF.

Průběžné výsledky práce byly dále prezentovány na tuzemských a mezinárodních konferencích v podobě přednášek a posterů, dále byly výsledky pravidelně prezentovány na studentské vědecké konferenci 1. LF UK, kde byly i oceněny mimořádnou cenou v roce 2011 a 2012. Dále lze zmínit podíl na vedení projektu „Indukce kmenových znaků u melanomových linií in vitro“, za který byla v roce 2013 studentka Přírodovědecké fakulty UK Bc. Tereza Nedvědová oceněna prvním místem na 14. Studentské vědecké konferenci 1. LF UK (pregraduální sekce) a druhým místem na celonárodním studentské vědecké konferenci lékařských fakult (2013).

Publikace Kodet O., Dvorankova B., Krejci E., Szabo P., Dvorak P., Stork J., Krajsova I., Dunder P., Smetana K. Jr., Lacina L. Cultivation-dependent plasticity of melanoma phenotype. *Tumour Biol.* 2013 Dec;34(6):3345-55. (IF 2,518) byla oceněna v roce 2013 cenou profesora Trýba pro dermatologa do 35-let za úspěšnou vědeckou práci, kterou udílí vědecká rada České akademie dermatovenerologie.

**Závěrem lze tedy shrnout, že cíle vytčené (v kapitole 6) pro úspěšné naplnění tématu doktorského studia považujeme za úspěšně dosažené.**



## 10. Seznam literatury

Abety, A.N., Fox, J.W., Schonefuss, A., Zamek, J., Landsberg, J., Krieg, T., Blobel, C., Mauch, C., Zigrino, P. (2012). Stromal fibroblast-specific expression of ADAM-9 modulates proliferation and apoptosis in melanoma cells in vitro and in vivo. *The Journal of investigative dermatology* 132, 2451-2458.

Ahmed, H., et Vasta, G.R. (1994). Galectins: conservation of functionally and structurally relevant amino acid residues defines two types of carbohydrate recognition domains. *Glycobiology* 4, 545-548.

AIHV. (2010). Australian Institute of Health and Welfare. Australian Cancer Incidence and Mortality (ACIM). 1-9.

Ailles, L.E., et Weissman, I.L. (2007). Cancer stem cells in solid tumors. *Current opinion in biotechnology* 18, 460-466.

Aisner, D.L., Maker, A., Rosenberg, S.A., et Berman, D.M. (2005). Loss of S100 antigenicity in metastatic melanoma. *Human pathology* 36, 1016-1019.

Amit, L., Ben-Aharon, I., Vidal, L., Leibovici, L., et Stemmer, S. (2013). The impact of Bevacizumab (Avastin) on survival in metastatic solid tumors--a meta-analysis and systematic review. *PloS one* 8, 51780.

Andre, S., Ortega, P.J., Perez, M.A., Roy, R., Gabius, H.J. (1999). Lactose-containing starburst dendrimers: influence of dendrimer generation and binding-site orientation of receptors (plant/animal lectins and immunoglobulins) on binding properties. *Glycobiology* 9, 1253-1261.

Archier, E., Devaux, S., Castela, E., Gallini, A., Aubin, F., Le Maitre, M., Aractingi, S., Bachelez, H., Cribier, B., Joly, P., et al. (2012). Carcinogenic risks of psoralen UV-A therapy and narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 26, 22-31.

Atzeni, M., Serratore, F., Zaccheddu, F., Buosi, M., Nemolato, S., Ribuffo, D. (2009). Multiple melanoma arising on a burn scar and extensive sunburn: a case report and a review of the literature. *Melanoma research* 19, 195-198.

Aub, J.C., Tieslau, C., Lankester, A. (1963). Reactions of Normal and Tumor Cell Surfaces to Enzymes. I. Wheat-Germ Lipase and Associated Mucopolysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 50, 613-619.

Balch, C.M., Murad, T.M., Soong, S.J., Ingalls, A.L., Halpern, N.B., Maddox, W.A. (1978). A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods. *Annals of surgery* 188, 732-742.

Balch, C.M., Soong, S.J., Gershenwald, J.E., Thompson, J.F., Reintgen, D.S., Cascinelli, N., Urist, M., McMasters, K.M., Ross, M.I., Kirkwood, J.M., et al. (2001). Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American

Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19, 3622-3634.

Balsamo, M., Scordamaglia, F., Pietra, G., Manzini, C., Cantoni, C., Boitano, M., Queirolo, P., Vermi, W., Facchetti, F., Moretta, A., et al. (2009). Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20847-20852.

Bancroft, J.D., Suvarna, K.S., Christopher, L. (2012). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 7.

Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and tissue research* 339, 269-280.

Barondes, S.H., Castronovo, V., Cooper, D.N., Cummings, R.D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M.A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K., et al. (1994). Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76, 597-598.

Barth, A., et Morton, D.L. (1995). The role of adjuvant therapy in melanoma management. *Cancer* 75, 726-734.

Baumert, J., Plewig, G., Volkenandt, M., and Schmid-Wendtner, M.H. (2007). Factors associated with a high tumour thickness in patients with melanoma. *The British journal of dermatology* 156, 938-944.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. 5, New York: W H Freeman.

Bernier, J., Domenge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefebvre, J.L., Greiner, R.H., Giralt, J., Maingon, P., Rolland, F., Bolla, M., et al. (2004). Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 350, 1945-1952.

Betioli, J., Villa, L.L., and Sichero, L. (2013). Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res*. 46, 217-226.

Bhatia, S., Moon, J., Margolin, K.A., Weber, J.S., Lao, C.D., Othus, M., Aparicio, A.M., Ribas, A., and Sondak, V.K. (2012). Phase II trial of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with metastatic uveal melanoma: SWOG S0512. *PloS one* 7, e48787.

Bies, C., Lehr, C.M., Woodley, J.F. (2004). Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced drug delivery reviews* 56, 425-435.

Boehnke, K., Falkowska-Hansen, B., Stark, H.J., and Boukamp, P. (2012). Stem cells of the human epidermis and their niche: composition and function in epidermal regeneration and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 33, 1247-1258.

Borovansky, J., Riley, P.A. (2011). *Melanins and Melanosomes* 1, 21-37.

Borovski, T., De Sousa, E, Melo, F., Vermeulen, L., Medema, J.P. (2011) Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.* 71, 634-9.

Botchkarev, V.A., et Kishimoto, J. (2003). Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* 8, 46-55.

Botchkarev, V.A., et Paus, R. (2003). Molecular biology of hair morphogenesis: development and cycling. *Journal of experimental zoology Part B, Molecular and developmental evolution* 298, 164-180.

Brandner, J.M., et Haass, N.K. (2013). Melanoma's connections to the tumour microenvironment. *Pathology* 45, 443-452.

Breitkreutz, D., Koxholt, I., Thiemann, K., Nischt, R. (2013). Skin basement membrane: the foundation of epidermal integrity--BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan. *BioMed research international* 2013, 179784.

Breslow, A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of surgery* 172, 902-908.

Buac, K., et Pavan, W.J. (2007). Stem cells of the melanocyte lineage. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 3, 203-209.

Busam, J.K. (2010). *Dermatopathology* 1, 465-476.

Cada, Z., Chovanec, M., Smetana, K., Betka, J., Lacina, L., Plzak, J., Kodet, R., Stork, J., Lensch, M., Kaltner, H., et al. (2009). Galectin-7: will the lectin's activity establish clinical correlations in head and neck squamous cell and basal cell carcinomas? *Histology and histopathology* 24, 41-48.

Cada, Z., Plzak, J., Chovanec, M., Dvorankova, B., Lacina, L., Szabo, P., Smetana, K., Jr., and Betka, J. (2008). [Galectins in squamous cell carcinomas of the head and neck cancers]. *Casopis lekaru ceskych* 147, 559-563.

Calonje, E.J., Brenn, T., Lazar., McKee, P. (2011). *McKee's Pathology of the Skin.* Saunders, 4.

Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513-522.

Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology* 2, 76-83.

Carlson, J.A., Ross, J., Murphy, M. (2005a). Markers of high-risk cutaneous melanoma: is there a winning combination for individualized prognosis? *Journal of cutaneous pathology* 32, 700-703.

- Carlson, J.A., Ross, J.S., Slominski, A., Linette, G., Mysliborski, J., Hill, J., Mihm, M., Jr. (2005b). Molecular diagnostics in melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* 52, 743-775; quiz 775-748.
- Carmona-Fontaine, C., Matthews, H.K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G.A., Parsons, M., Stern, C.D., Mayor, R. (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature* 456, 957-961.
- Casey, T.M., Eneman, J., Crocker, A., White, J., Tessitore, J., Stanley, M., Harlow, S., Bunn, J.Y., Weaver, D., Muss, H., et al. (2008). Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF-beta 1) increase invasion rate of tumor cells: a population study. *Breast cancer research and treatment* 110, 39-49.
- Cassarino, D.S., Derienzo, D.P., Barr, R.J. (2006). Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification. Part one. *Journal of cutaneous pathology* 33, 191-206.
- Castanon, M.J., Walko, G., Winter, L., Wiche, G. (2013). Plectin-intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve. *Histochemistry and cell biology* 140, 33-53.
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., Tyminska, A. (2013). Skin melanocytes: biology and development. *Postepy dermatologii i alergologii* 30, 30-41.
- Cirri, P., and Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* 1, 482-497.
- Clark, W.H., Jr., From, L., Bernardino, E.A., Mihm, M.C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer research* 29, 705-727.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research* 66, 9339-9344.
- Clavel, C., Grisanti, L., Zemla, R., Rezza, A., Barros, R., Sennett, R., Mazloom, A.R., Chung, C.Y., Cai, X., Cai, C.L., (2012). Sox2 in the dermal papilla niche controls hair growth by fine-tuning BMP signaling in differentiating hair shaft progenitors. *Developmental cell* 23, 981-994.
- Cognetti, D.M., Weber, R.S., Lai, S.Y. (2008). Head and neck cancer: an evolving treatment paradigm. *Cancer* 113, 1911-1932.
- Costa, R.A., Williams, G.A., and Two-fold Illumination Scheme for Photodynamic Therapy Study, G. (2006). Twofold illumination photodynamic therapy scheme for subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia: results from a randomized pilot study. *Retina* 26, 757-764.

Costea, D.E., Tsinkalovsky, O., Vintermyr, O.K., Johannessen, A.C., Mackenzie, I.C. (2006). Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma (vol 12, pg 443, 2006). *Oral diseases* 12, 584-584.

Coulombe, P.A., Kopan, R., Fuchs, E. (1989). Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: insights into complex programs of differentiation. *The Journal of cell biology* 109, 2295-2312.

Curiel, L., Chavier, F., Gignoux, B., Pichardo, S., Chesnais, S., Chapelon, J.Y. (2004). Experimental evaluation of lesion prediction modelling in the presence of cavitation bubbles: intended for high-intensity focused ultrasound prostate treatment. *Medical & biological engineering & computing* 42, 44-54.

D'Souza, O., Hasan, S., Chary, G., Hoisala, V.R., Correa, M. (2003). Cervical lymph node metastases in head & neck malignancy - A Clinical /ultrasonographic/ Histopathological comparative study. *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India* 55, 90-93.

Daimon, E., Shibukawa, Y., Wada, Y. (2013). Calponin 3 regulates stress fiber formation in dermal fibroblasts during wound healing. *Archives of dermatological research* 305, 571-584.

Davar, D., Tarhini, A.A., Kirkwood, J.M. (2012). Adjuvant therapy for melanoma. *Cancer journal* 18, 192-202.

Dave, B., Mittal, V., Tan, N.M., Chang, J.C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast cancer research: BCR* 14, 202.

Davidson, M.R., Gazdar, A.F., Clarke, B.E. (2013). The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *Journal of thoracic disease* 5, S463-S478.

de Almeida, L.S., Requena, L., Rutten, A., Kutzner, H., Garbe, C., Pestana, D., Gomes, M.M. (2008). Desmoplastic malignant melanoma: a clinicopathologic analysis of 113 cases. *Am J Dermatopathol.* 30, 207-215.

De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M., Bracke, M. (2008). Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *International journal of cancer Journal international du cancer* 123, 2229-2238.

Dey, P. (2011). Epigenetic changes in tumor microenvironment. *Indian journal of cancer* 48, 507-512.

Diez-Torre, A., Andrade, R., Eguizabal, C., Lopez, E., Arluzea, J., Silio, M., Arechaga, J. (2009). Reprogramming of melanoma cells by embryonic microenvironments. *The International journal of developmental biology* 53, 1563-1568.

Dvorak, H.F. (2003). Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. *The American journal of pathology* 162, 1747-1757.

Dvorankova, B., Lacina, L., Smetana, K., Jr., Lensch, M., Manning, J.C., Andre, S., Gabius, H.J. (2008). Human galectin-2: nuclear presence in vitro and its modulation by quiescence/stress factors. *Histology and histopathology* 23, 167-178.

Dvorankova, B., Motlik, J., Holikova, Z., Vacik, J., Smetana, K., Jr. (2002). Dolichos biflorus agglutinin-binding site expression in basal keratinocytes is associated with cell differentiation. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 94, 365-373.

Dvorankova, B., Szabo, P., Lacina, L., Gal, P., Uhrova, J., Zima, T., Kaltner, H., Andre, S., Gabius, H.J., Sykova, E., et al. (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, 469-480.

Dvorankova, B., Szabo, P., Lacina, L., Kodet, O., Matouskova, E., Smetana, K., Jr. (2012). Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. *Histochemistry and cell biology* 137, 679-685.

Eggermont, A.M., Suci, S., MacKie, R., Ruka, W., Testori, A., Kruit, W., Punt, C.J., Delauney, M., Sales, F., Groenewegen, G. (2005). Post-surgery adjuvant therapy with intermediate doses of interferon alfa 2b versus observation in patients with stage IIb/III melanoma (EORTC 18952): randomised controlled trial. *Lancet* 366, 1189-1196.

Elder, D.E. (2011). Thin melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 135, 342-346.

Elenbaas, B., et Weinberg, R.A. (2001). Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Experimental cell research* 264, 169-184.

Epifano, C., et Perez-Moreno, M. (2012). Crossroads of integrins and cadherins in epithelia and stroma remodeling. *Cell adhesion & migration* 6, 261-273.

Erdei, E., et Torres, S.M. (2010). A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert review of anticancer therapy* 10, 1811-1823.

Erickson, C.A., et Reedy, M.V. (1998). Neural crest development: the interplay between morphogenesis and cell differentiation. *Current topics in developmental biology* 40, 177-209.

Fang, L., Lonsdorf, A.S., Hwang, S.T. (2008). Immunotherapy for advanced melanoma. *The Journal of investigative dermatology* 128, 2596-2605.

Fang, P., Hu, J.H., Cheng, Z.G., Liu, Z.F., Wang, J.L., Jiao, S.C. (2012). Efficacy and safety of bevacizumab for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a systematic review of phase II trials. *PloS one* 7, e49717.

Ferlito, A., Buckley, J.G., Rinaldo, A., Mondin, V. (2001). Screening tests to evaluate distant metastases in head and neck cancer. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties* 63, 208-211.

Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews Cancer* 3, 453-458.

Fik, Z., Valach, J., Chovanec, M., Mazanek, J., Kodet, R., Kodet, O., Tachezy, R., Foltynova, E., Andre, S., Kaltner, H., Gabius, H.J., Smetana, K., Jr. (2013). Loss of adhesion/growth-regulatory galectin-9 from squamous cell epithelium in head and neck carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 42, 166-173.

Forastiere, A.A., Goepfert, H., Maor, M., Pajak, T.F., Weber, R., Morrison, W., Glisson, B., Trotti, A., Ridge, J.A., Chao, C., et al. (2003). Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *The New England journal of medicine* 349, 2091-2098.

Forastiere, A.A., Metch, B., Schuller, D.E., Ensley, J.F., Hutchins, L.F., Triozzi, P., Kish, J.A., McClure, S., VonFeldt, E., Williamson, S.K. (1992). Randomized comparison of cisplatin plus fluorouracil and carboplatin plus fluorouracil versus methotrexate in advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck: a Southwest Oncology Group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 10, 1245-1251.

Foretova, L., Machakova, E., Sachlova, M., Petrakova, K., and Palacova, M. (2009). [Familial atypical multiple mole melanoma syndrome--FAMMM]. *Klinicka onkologie : casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti* 22 Suppl, S32-33.

Fred Brewer, C. (2002). Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochimica et biophysica acta* 1572, 255-262.

Fuchs, E. (2007). Scratching the surface of skin development. *Nature* 445, 834-842.

Fury, M.G., Lee, N.Y., Sherman, E., Lisa, D., Kelly, K., Lipson, B., Carlson, D., Stambuk, H., Haque, S., Shen, R., (2012). A phase 2 study of bevacizumab with cisplatin plus intensity-modulated radiation therapy for stage III/IVB head and neck squamous cell cancer. *Cancer* 118, 5008-5014.

Gabius, H.J., Andre, S., Kaltner, H., and Siebert, H.C. (2002). The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica et biophysica acta* 1572, 165-177.

Gabius, H.J., Gabius, S., Zemlyanukhina, T.V., Bovin, N.V., Brinck, U., Danguy, A., Joshi, S.S., Kayser, K., Schottelius, J., Sinowatz, F., (1993). Reverse lectin histochemistry: design and application of glycoligands for detection of cell and tissue lectins. *Histology and histopathology* 8, 369-383.

Gabius, H.J., et Kayser, K. (2014). Introduction to glycopathology: the concept, the tools and the perspectives. *Diagnostic pathology* 9, 4.

Galli, S.J., et Tsai, M. (2008). Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *Journal of dermatological science* 49, 7-19.

- Gerstenblith, M.R., Goldstein, A.M., et Tucker, M.A. (2010). Hereditary genodermatoses with cancer predisposition. *Hematology/oncology clinics of North America* 24, 885-906.
- Gill, M., et Celebi, J.T. (2005). B-RAF and melanocytic neoplasia. *Journal of the American Academy of Dermatology* 53, 108-114.
- Givant-Horwitz, V., Davidson, B., Reich, R. (2005). Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer letters* 223, 1-10.
- Gola, M., Czajkowski, R., Bajek, A., Dura, A., Drewa, T. (2012). Melanocyte stem cells: biology and current aspects. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 18, RA155-159.
- Gooden, M.J., de Bock, G.H., Leffers, N., Daemen, T., Nijman, H.W. (2011). The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *British journal of cancer* 105, 93-103.
- Gown, A.M., Vogel, A.M., Hoak, D., Gough, F., McNutt, M.A. (1986). Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *The American journal of pathology* 123, 195-203.
- Gray-Schopfer, V.C., Cheong, S.C., Chong, H., Chow, J., Moss, T., Abdel-Malek, Z.A., Marais, R., Wynford-Thomas, D., Bennett, D.C. (2006). Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *British journal of cancer* 95, 496-505.
- Gregoire, V., Lefebvre, J.L., Licitra, L., Felip, E., Group, E.-E.-E.G.W. (2010). Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21 Suppl 5, v184-186.
- Guo, Y., Ding, L., Li, T. (2012). [Application of bevacizumab on metastatic breast cancer]. *Beijing da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Peking University Health sciences* 44, 708-714.
- Haass, N.K., et Herlyn, M. (2005). Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* 10, 153-163.
- Hai, C.M., et Gu, Z. (2006). Caldesmon phosphorylation in actin cytoskeletal remodeling. *European journal of cell biology* 85, 305-309.
- Hakelius, M., Koskela, A., Ivarsson, M., Grenman, R., Rubin, K., Gerdin, B., Nowinski, D. (2013). Keratinocytes and head and neck squamous cell carcinoma cells regulate urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in fibroblasts. *Anticancer research* 33, 3113-3118.



- Halata, Z., Grim, M., Bauman, K.I. (2003). Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 271, 225-239.
- Hale, C.S., Qian, M., Ma, M.W., Scanlon, P., Berman, R.S., Shapiro, R.L., Pavlick, A.C., Shao, Y., Polsky, D., Osman, I. (2013). Mitotic rate in melanoma: prognostic value of immunostaining and computer-assisted image analysis. *Am J Surg Pathol.* 37, 882-889.
- Hao, N.B., Lü, M.H., Fan, Y.H., Cao, Y.L., Zhang, Z.R., Yang, S.M. (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012:948098.
- Haviv, I., Polyak, K., Qiu, W., Hu, M., Campbell, I. (2009). Origin of carcinoma associated fibroblasts. *Cell cycle* 8, 589-595.
- Hearing, V.J. (2011). Determination of melanin synthetic pathways. *The Journal of investigative dermatology* 131, E8-E11.
- Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W.E. (2002). Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et biophysica acta* 1572, 232-254.
- Hirabayashi, J. et Kasai, K. (1993). The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 3, 297-304.
- Hirobe, T. (1995). Structure and function of melanocytes: microscopic morphology and cell biology of mouse melanocytes in the epidermis and hair follicle. *Histology and histopathology* 10, 223-237.
- Hocker, T., et Tsao, H. (2007). Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Human mutation* 28, 578-588.
- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363, 711-723.
- Homsi, J., Kashani-Sabet, M., Messina, J.L., Daud, A. (2005). Cutaneous melanoma: prognostic factors. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 12, 223-229.
- Horowitz, J.C., et Thannickal, V.J. (2006). Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 27, 600-612.
- Howlander, N., Ries, L.A., Mariotto, A.B., Reichman, M.E., Ruhl, J., Cronin, K.A. (2010). Improved estimates of cancer-specific survival rates from population-based data. *Journal of the National Cancer Institute* 102, 1584-1598.

Chang, C.Y., Pasolli, H.A., Giannopoulou, E.G., Guasch, G., Gronostajski, R.M., Elemento, O., Fuchs, E. (2013). NFIB is a governor of epithelial-melanocyte stem cell behaviour in a shared niche. *Nature* 495, 98-102.

Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., et al. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine* 364, 2507-2516.

Chatzistamou, I., Dioufa, N., Trimis, G., Sklavounou, A., Kittas, C., Kiaris, H., Papavassiliou, A.G. (2010). p21/waf1 and smooth-muscle actin alpha expression in stromal fibroblasts of oral cancers. *Analytical cellular pathology* 33, 19-26.

Chen, S., Lewallen, M., Xie, T. (2013). Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development* 140, 255-265.

Chen, W.J., Ho, C.C., Chang, Y.L., Chen, H.Y., Lin, C.A., Ling, T.Y., Yu, S.L., Yuan, S.S., Chen, Y.J., Lin, C.Y., Pan, S.H., Chou, H.Y., Chen, Y.J., Chang, G.C., Chu, W.C., Lee, Y.M., Lee, J.Y., Lee, P.J., Li, K.C., Chen, H.W., Yang, P.C. (2014). Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling. *Nat Commun.* 25, 3472.

Chin, L. (2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* 3, 559-70.

Cho, G.S., Choi, S.C., Han, J.K. (2013). BMP signal attenuates FGF pathway in anteroposterior neural patterning. *Biochemical and biophysical research communications* 434, 509-515.

Chu, V.H., Tetzlaff, M.T., Torres-Cabala, C.A., Prieto, V.G., Bassett, R., Jr., Gershenwald, J.E., McLemore, M.S., Ivan, D., Wang, W.L., Ross, M.I., et al. (2013). Impact of the 2009 AJCC melanoma staging system in the classification of thin cutaneous melanomas. *BioMed research international* 7, 898719.

Jarvelainen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N., Penttinen, R. (2009). Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacological reviews* 61, 198-223.

Jeong, H., Ryu, Y.J., An, J., Lee, Y., Kim, A. (2012). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype. *Histopathology* 60, E87-95.

Jinka, R., Kapoor, R., Sistla, P.G., Raj, T.A., Pande, G. (2012). Alterations in Cell-Extracellular Matrix Interactions during Progression of Cancers. *International journal of cell biology* 2012, 219196.

Kadearo, A.L., Kavanagh, R., Kanto, H., Terzieva, S., Hauser, J., Kobayashi, N., Schwemberger, S., Cornelius, J., Babcock, G., Shertzer, H.G., et al. (2005). alpha-

Melanocortin and endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes. *Cancer research* 65, 4292-4299.

Kageshita, T., Kashio, Y., Yamauchi, A., Seki, M., Abedin, M.J., Nishi, N., Shoji, H., Nakamura, T., Ono, T., Hirashima, M. (2002). Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *International journal of cancer Journal international du cancer* 99, 809-816.

Kalekou, H., Kostopoulos, I., Miliadis, S., Papadimitriou, C.S. (2005). Comparative study of CD34, alpha-SMA and h-caldesmon expression in the stroma of gynaecomastia and male breast carcinoma. *Histopathology* 47, 74-81.

Kaltner, H., et Stierstorfer, B. (1998). Animal lectins as cell adhesion molecules. *Acta anatomica* 161, 162-179.

Karagiannis, G.S., Poutahidis, T., Erdman, S.E., Kirsch, R., Riddell, R.H., Diamandis, E.P. (2012). Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Molecular cancer research : MCR.* 10, 1403-1418.

Karapetis, C.S., Khambata-Ford, S., Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Tu, D., Tebbutt, N.C., Simes, R.J., Chalchal, H., Shapiro, J.D., Robitaille, S., et al. (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 359, 1757-1765.

Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557-563.

Katsambas, A., et Nicolaidou, E. (1996). Cutaneous malignant melanoma and sun exposure. Recent developments in epidemiology. *Archives of dermatology* 132, 444-450.

Kawaguchi, Y., Jinnai, I., Nagai, K., Yagasaki, F., Yakata, Y., Matsuo, T., Kuriyama, K., Tomonaga, M. (2001). Effect of a selective Abl tyrosine kinase inhibitor, STI571, on in vitro growth of BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 15, 590-594.

Kayser, K., Gabius, H.J., Gabius, S. (1991). [Biotinylated ligands for receptor localization. An alternative for immunohistochemistry]. *Zentralblatt fur Pathologie* 137, 473-478.

Kideryova, L., Lacina, L., Dvorankova, B., Stork, J., Cada, Z., Szabo, P., Andre, S., Kaltner, H., Gabius, H.J., Smetana, K., Jr. (2009). Phenotypic characterization of human keratinocytes in coculture reveals differential effects of fibroblasts from benign fibrous histiocytoma (dermatofibroma) as compared to cells from its malignant form and to normal fibroblasts. *Journal of dermatological science* 55, 18-26.

Kim, M.O., Kim, S.H., Oi, N., Lee, M.H., Yu, D.H., Kim, D.J., Cho, E.J., Bode, A.M., Cho, Y.Y., Bowden, T.G., et al. (2011). Embryonic stem-cell-preconditioned

microenvironment induces loss of cancer cell properties in human melanoma cells. *Pigment cell & melanoma research* 24, 922-931.

Klozar, J., Tachezy, R., Rotnáglová, E., Koslabová, E., Saláková, M., Hamsíková, E. (2010). Human papillomavirus in head and neck tumors: epidemiological, molecular and clinical aspects. *Wien Med Wochenschr.* 160, 305-309.

Knorr, C., Pelz, J.O., Gohl, J., Hohenberger, W., Meyer, T. (2010). Expression of chemoresistance-related genes and heat shock protein 72 in hyperthermic isolated limb perfusion of malignant melanoma: an experimental study. *J Oncol* 2010, 138758.

Kodet, O., Dvorankova, B., Krejci, E., Szabo, P., Dvorak, P., Stork, J., Krajsova, I., Dundr, P., Smetana, K., Jr., Lacina, L. (2013). Cultivation-dependent plasticity of melanoma phenotype. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34, 3345-3355.

Kodet, O., Dvorankova, B., Lacina, L., Andre, S., Kaltner, H., Gabius, H.J., Smetana, K., Jr. (2011). Comparative analysis of the nuclear presence of adhesion/growth-regulatory galectins and reactivity in the nuclei of interphasic and mitotic cells. *Folia biologica* 57, 125-132.

Kolar, M., Szabo, P., Dvorankova, B., Lacina, L., Gabius, H.J., Strnad, H., Sachova, J., Vlcek, C., Plzak, J., Chovanec, M., et al. (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. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 104, 738-751.

Koslabova, E., Hamsikova, E., Salakova, M., Klozar, J., Foltynova, E., Salkova, E., Rotnaglova, E., Ludvikova, V., Tachezy, R. (2013). Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *International journal of cancer Journal international du cancer* 133, 1832-1839.

Kotobuki, Y., Yang, L., Serada, S., Tanemura, A., Yang, F., Nomura, S., Kudo, A., Izuhara, K., Murota, H., Fujimoto, M., Katayama, I., Naka, T. (2014). Periostin Accelerates Human Malignant Melanoma Progression by Modifying the Melanoma Microenvironment. *Pigment Cell Melanoma Res.* doi: 10.1111/pcmr.12245. [Epub ahead of print].

Krajsova, I. (2010). Současné trendy a nové možnosti v léčbě melanomu. *Čes-slo Derm.* 85, 189-195.

Krajsova, I., Vitkova, I., Suk, J., Prochazkova, I., Sukova, T., Vokacova, A. (2005). Význam vyšetření sentinelových uzlin u melanomu: II. Výsledky vyšetření SLN u souboru 177 nemocných kožní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice. *Čes-slov Derm.* 80, 147-155.

Krejci, E., et Grim, M. (2010). Isolation and characterization of neural crest stem cells from adult human hair follicles. *Folia biologica* 56, 149-157.

- Kulbe, H., Levinson, N.R., Balkwill, F., Wilson, J.L. (2004). The chemokine network in cancer--much more than directing cell movement. *The International journal of developmental biology* 48, 489-496.
- Kulesa, P.M., Kasemeier-Kulesa, J.C., Teddy, J.M., Margaryan, N.V., Seftor, E.A., Seftor, R.E., Hendrix, M.J. (2006). Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3752-3757.
- Kumar, R., Angelini, S., Snellman, E., Hemminki, K. (2004). BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *The Journal of investigative dermatology* 122, 342-348.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Aster J.C., Nelson Fausto, N. (2009). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. Saunders 8, 259-330.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Aster J.C., Nelson Fausto, N. (2009). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. Saunders 8, 745-748.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Aster J.C., Nelson Fausto, N. (2009). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. Saunders 8, 1171-1174.
- Kurose, K., Gilley, K., Matsumoto, S., Watson, P.H., Zhou, X.P., Eng, C. (2002). Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nature genetics* 32, 355-357.
- Labsky, J., Dvorankova, B., Smetana, K., Holikova, Z., Broz, L., Gabius, H.J. (2003). Mannosides as crucial part of bioactive supports for cultivation of human epidermal keratinocytes without feeder cells. *Biomaterials* 24, 863-72.
- Lacina, L., Dvorankova, B., Smetana, K., Jr., Chovanec, M., Plzak, J., Tachezy, R., Kideryova, L., Kucerova, L., Cada, Z., Boucek, J., et al. (2007a). Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture. *International journal of radiation biology* 83, 837-848.
- Lacina, L., Smetana, K., Jr., Dvorankova, B., Pytlik, R., Kideryova, L., Kucerova, L., Plzakova, Z., Stork, J., Gabius, H.J., Andre, S. (2007b). Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *The British journal of dermatology* 156, 819-829.
- Langerhans, P. (1868). "Ueber die Nerven der menschlichen Haut" [On the nerves of the human skin]. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin* 44, 325-37.
- Lederle, W., Hartenstein, B., Meides, A., Kunzelmann, H., Werb, Z., Angel, P., and Mueller, M.M. (2010). MMP13 as a stromal mediator in controlling persistent angiogenesis in skin carcinoma. *Carcinogenesis* 31, 1175-1184.

- Lee, E., Han, J., Kim, K., Choi, H., Cho, E.G., Lee, T.R. (2013a). CXCR7 mediates SDF1-induced melanocyte migration. *Pigment cell & melanoma research* 26, 58-66.
- Lee, C.H., Wu, S.B., Hong, C.H., Yu, H.S., Wei, Y.H. (2013b). Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. *International journal of molecular sciences* 14, 6414-6435.
- Lens, M.B., Newton-Bishop, J.A., Boon, A.P. (2005). Desmoplastic malignant melanoma: a systematic review. *The British journal of dermatology* 152, 673-678.
- Li, B., et Wang, J.H. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *Journal of tissue viability* 20, 108-120.
- Li, H., Fan, X., Houghton, J. (2007). Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *Journal of cellular biochemistry* 101, 805-815.
- Li, L., et Neves, W.B. (2006). Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer research* 66, 4553-4557.
- Li, L.O., Mashek, D.G., An, J., Doughman, S.D., Newgard, C.B., Coleman, R.A. (2006). Overexpression of rat long chain acyl-coa synthetase 1 alters fatty acid metabolism in rat primary hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 281, 37246-37255.
- Liao, C.P., Adisetiyo, H., Liang, M., Roy-Burman, P. (2010). Cancer-associated fibroblasts enhance the gland-forming capability of prostate cancer stem cells. *Cancer research* 70, 7294-7303.
- Licitra, L., Felip, E., Group, E.G.W. (2009). Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 20 Suppl. 4, 121-122.
- Liu, F.T., et Rabinovich, G.A. (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews Cancer* 5, 29-41.
- Lorusso, G., et Ruegg, C. (2008). The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochemistry and cell biology* 130, 1091-1103.
- Lullmann-Rauch, R. (2012). *Histologie, překlad 3. vydání. Grada* 1, 86-90.
- Lullmann-Rauch, R. (2012). *Histologie, překlad 3. vydání. Grada* 1, 453-460.
- Luo, S., Yufit, T., Carson, P., Fiore, D., Falanga, J., Lin, X., Mamakos, L., Falanga, V. (2011). Differential keratin expression during epiboly in a wound model of bioengineered skin and in human chronic wounds. *The international journal of lower extremity wounds* 10, 122-129.
- Mangini, J., Li, N., Bhawan, J. (2002). Immunohistochemical markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. *Am J Dermatopathol* 24, 270-281.

- Mansfield, A.S., Nevala, W.K., Lieser, E.A., Leontovich, A.A., Markovic, S.N. (2013). The immunomodulatory effects of bevacizumab on systemic immunity in patients with metastatic melanoma. *Oncoimmunology* 2, e24436.
- Markovic, S.N., Erickson, L.A., Rao, R.D., Weenig, R.H., Pockaj, B.A., Bardia, A., Vachon, C.M., Schild, S.E., McWilliams, R.R., Hand, J.L., et al. (2007). Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 82, 364-380.
- Masui, T., Ota, I., Yook, J.I., Mikami, S., Yane, K., Yamanaka, T., Hosoi, H. (2013). Snail-induced epithelial-mesenchymal transition promotes cancer stem cell-like phenotype in head and neck cancer cells. *Int J Oncol.* 44, 693-9.
- Matthias, C., Mack, B., Berghaus, A., Gires, O. (2008). Keratin 8 expression in head and neck epithelia. *BMC Cancer* 22, 8:267.
- McLoughlin, J.M., Zager, J.S., Sondak, V.K., Berk, L.B. (2008). Treatment options for limited or symptomatic metastatic melanoma. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 15, 239-247.
- Medalie, N.S., et Ackerman, A.B. (2003). Sentinel lymph node biopsy has no benefit for patients with primary cutaneous melanoma metastatic to a lymph node: an assertion based on comprehensive, critical analysis: part I. *The American Journal of dermatopathology* 25, 399-417.
- Micksche, M., Cerni, C., Gebhart, W., Kokoschka, E.M. (1975). [Halo Nevus (Morbus Sutton): model of an immunological tumor regression]. *Osterr Z Onkol.* 2, 73-81.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., Peeper, D.S. (2005). BRAF<sup>V600E</sup>-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724.
- Millar, S.E. (2002). Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *The Journal of investigative dermatology* 118, 216-225.
- Mishra, P.J., Mishra, P.J., Humeniuk, R., Medina, D.J., Alexe, G., Mesirov, J.P., Ganesan, S., Glod, J.W., Banerjee, D. (2008). Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer research* 68, 4331-4339.
- Miyake, T.M., Sood, A.K., Coleman, R.L. (2013). Contemporary use of bevacizumab in ovarian cancer. *Expert opinion on biological therapy* 13, 283-294.
- Mladkova, J., Sanda, M., Matouskova, E., Selicharova, I. (2010). Phenotyping breast cancer cell lines EM-G3, HCC1937, MCF7 and MDA-MB-231 using 2-D electrophoresis and affinity chromatography for glutathione-binding proteins. *BMC cancer* 10, 449.
- Mlecnik, B., Bindea, G., Pages, F., Galon, J. (2011). Tumor immunosurveillance in human cancers. *Cancer metastasis reviews* 30, 5-12.

- Mocellin, S., Pasquali, S., Rossi, C.R., Nitti, D. (2011). Validation of the prognostic value of lymph node ratio in patients with cutaneous melanoma: a population-based study of 8,177 cases. *Surgery* 150, 83-90.
- Mody, R., Joshi, S., Chaney, W. (1995). Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 33, 1-10.
- Moinfar, F., Man, Y.G., Arnould, L., Bratthauer, G.L., Ratschek, M., Tavassoli, F.A. (2000). Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer research* 60, 2562-2566.
- Morton, D.L., Cochran, A.J., Thompson, J.F., Elashoff, R., Essner, R., Glass, E.C., Mozzillo, N., Nieweg, O.E., Roses, D.F., Hoekstra, H.J., et al. (2005). Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Annals of surgery* 242, 302-311.
- Moustakas, A., et Heldin, C.H. (2007). Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer science* 98, 1512-1520.
- Murali, R., DeSilva, C., McCarthy, S.W., Thompson, J.F., Scolyer, R.A. (2012). Sentinel lymph nodes containing very small (<0.1 mm) deposits of metastatic melanoma cannot be safely regarded as tumor-negative. *Annals of surgical oncology* 19, 1089-1099.
- Nagore, E., Oliver, V., Botella-Estrada, R., Moreno-Picot, S., Insa, A., Fortea, J.M. (2005). Prognostic factors in localized invasive cutaneous melanoma: high value of mitotic rate, vascular invasion and microscopic satellitosis. *Melanoma research* 15, 169-177.
- Nakahara, S., Oka, N., Raz, A. (2005). On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 10, 267-275.
- Nakamura, M., et Tokura, Y. (2011). Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *Journal of dermatological science* 61, 7-13.
- Ng-Cheng-Hin, B., O'Hanlon-Brown, C., Alifrangis, C., Waxman, J. (2011). Langerhans cell histiocytosis: old disease new treatment. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 104, 89-96.
- Noramly, S., et Morgan, B.A. (1998). BMPs mediate lateral inhibition at successive stages in feather tract development. *Development* 125, 3775-3787.
- Numico, G., Franco, P., Cristofano, A., Migliaccio, F., Spinazze, S., Silvestris, N., Cante, D., Sciacero, P., La Porta, M.R., Girelli, F., et al. (2013). Is the combination of Cetuximab with chemo-radiotherapy regimens worthwhile in the treatment of locally advanced head and neck cancer? A review of current evidence. *Critical reviews in oncology/hematology* 85, 112-120.



- Ogawa, K., Yoshioka, Y., Isohashi, F., Seo, Y., Yoshida, K., Yamazaki, H. (2013). Radiotherapy targeting cancer stem cells: current views and future perspectives. *Anticancer research* 33, 747-754.
- Ohlund, D., Franklin, O., Lundberg, E., Lundin, C., Sund, M. (2013). Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC cancer* 13, 154.
- Olsen, C.M., Carroll, H.J., Whiteman, D.C. (2010). Familial melanoma: a meta-analysis and estimates of attributable fraction. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19, 65-73.
- Osawa, M., et Fisher, D.E. (2008). Notch and melanocytes: diverse outcomes from a single signal. *The Journal of investigative dermatology* 128, 2571-2574.
- Park, S.J., Hong, S.W., Moon, J.H., Jin, D.H., Kim, J.S., Lee, C.K., Kim, K.P., Hong, Y.S., Choi, E.K., Lee, J.S., et al. (2013). The MEK1/2 Inhibitor AS703026 Circumvents Resistance to the BRAF Inhibitor PLX4032 in Human Malignant Melanoma Cells. *Am J Med Sci.* 346, 494-498.
- Patterson, R.J., Wang, W., Wang, J.L. (2004). Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. *Glycoconjugate journal* 19, 499-506.
- Pavlidis, E.T., et Pavlidis, T.E. (2013). Role of bevacizumab in colorectal cancer growth and its adverse effects: a review. *World journal of gastroenterology* 19, 5051-5060.
- Pfeifer, G.P., et Besaratinia, A. (2012). UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 11, 90-97.
- Pflugfelder, A., Kochs, C., Blum, A., Capellaro, M., Czeschik, C., Dettenborn, T., Dill, D., Dippel, E., Eigentler, T., Feyer, P., et al. (2013). Malignant melanoma S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma". *J Dtsch Dermatol Ges* 11 Suppl. 6, 1-116, 111-126.
- Piepkorn, M. (2000). The expression of p16(INK4a), the product of a tumor suppressor gene for melanoma, is upregulated in human melanocytes by UVB irradiation. *Journal of the American Academy of Dermatology* 42, 741-745.
- Plzak, J., Betka, J., Smetana, K., Jr., Chovanec, M., Kaltner, H., Andre, S., Kodet, R., Gabius, H.J. (2004). Galectin-3 - an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *European journal of cancer* 40, 2324-2330.
- Plzak, J., Lacina, L., Chovanec, M., Dvorankova, 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 research* 30, 455-462.

Plzak, J., Smetana, K., Jr., Betka, J., Kodet, R., Kaltner, H., Gabius, H.J. (2000). Endogenous lectins (galectins-1 and -3) as probes to detect differentiation-dependent alterations in human squamous cell carcinomas of the oropharynx and larynx. *Int J Mol Med*. 5, 369-372.

Pock, L., Fikrle, T., Drlik, L., Zlosky, P. (2008) *Dermatoskopický atlas*. *Phlebomedica* 2, 77-79.

Powell, A.M., Sakuma-Oyama, Y., Oyama, N., Black, M.M. (2005). Collagen XVII/BP180: a collagenous transmembrane protein and component of the dermoepidermal anchoring complex. *Clinical and experimental dermatology* 30, 682-687.

Povysil, C., et Stainer, I. (2011). *Obecná patologie*. Grada 1, 191-202.

Poynter, J.N., Elder, J.T., Fullen, D.R., Nair, R.P., Soengas, M.S., Johnson, T.M., Redman, B., Thomas, N.E., Gruber, S.B. (2006). BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma research* 16, 267-273.

Presland, R.B., et Dale, B.A. (2000). Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 11(4): 383-408.

Prost-Squarcioni, C. (2006). [Histology of skin and hair follicle]. *Medecine sciences: M/S* 22, 131-137.

Rabinovich, G.A., Toscano, M.A., Jackson, S.S., Vasta, G.R. (2007). Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current opinion in structural biology* 17, 513-520.

Radisky, D.C., Kenny, P.A., Bissell, M.J. (2007). Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *Journal of cellular biochemistry* 101, 830-839.

Rahman, M., Hoh, B., Kohler, N., Dunbar, E.M., Murad, G.J. (2012). The future of glioma treatment: stem cells, nanotechnology and personalized medicine. *Future oncology* 8, 1149-1156.

Rasanen, K., Vaheri, A. (2010). Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Experimental cell research* 316, 2713-2722.

Reed, J.A., Shea, C.R. (2011) Lentigo maligna: melanoma in situ on chronically sun-damaged skin. *Arch Pathol Lab Med*. 135, 838-41.

Ribatti, D., Crivellato, E. (2012). Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochimica et biophysica acta* 1822, 2-8.

- Ribero, S., Osella-Abate, S., Sanlorenzo, M., Savoia, P., Astrua, C., Cavaliere, G., Tomasini, C., Senetta, R., Macripo, G., Bernengo, M.G., et al. (2013). Favourable prognostic role of regression of primary melanoma in AJCC stage I-II patients. *The British journal of dermatology* 169, 1240-1245.
- Rihova, B., Strohalm, J., Kovar, M., Mrkvan, T., Subr, V., Hovorka, O., Sirova, M., Rozprimova, L., Kubackova, K., and Ulbrich, K. (2005). Induction of systemic antitumour resistance with targeted polymers. *Scandinavian journal of immunology* 62 Suppl. 1, 100-105.
- Rikiishi, H. (2012). Autophagic action of new targeting agents in head and neck oncology. *Cancer biology & therapy* 13, 978-991.
- Roy, R., Yang, J., Moses, M.A. (2009). Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 5287-5297.
- Sadler, T.W. (2011). *Langmanova lékařská embryologie. Překlad 10. vydání. Grada* 1, 79-102.
- Sapute, P.S., Hazarey, V., Ahmed, R., Yadav, L. (2013). Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 14, 5579-5587.
- Sennett, R., et Rendl, M. (2012). Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. *Semin Cell Dev Biol.* 23(8): 917-27.
- Serrano, M., et Blasco, M.A. (2001). Putting the stress on senescence. *Current opinion in cell biology* 13, 748-753.
- Sharon, N., et Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14, 53R-62R.
- Shenenberger, D.W. (2012). Cutaneous malignant melanoma: a primary care perspective. *American family physician* 85, 161-168.
- Sherratt, M.J. (2009). Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age* 31, 305-325.
- Schiaffino, M.V. (2010). Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42, 1094-1104.
- Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., Maltais, L., Omary, M.B., Parry, D.A., Rogers, M.A., et al. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *The Journal of cell biology* 174, 169-174.
- Sloan, A.E., Nock, C.J., Einstein, D.B. (2009). Diagnosis and treatment of melanoma brain metastasis: a literature review. *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center* 16, 248-255.

- Smetana, K., Jr., Dvorankova, B., Chovanec, M., Boucek, J., Klima, J., Motlik, J., Lensch, M., Kaltner, H., Andre, S., Gabius, H.J. (2006). Nuclear presence of adhesion-/growth-regulatory galectins in normal/malignant cells of squamous epithelial origin. *Histochemistry and cell biology* 125, 171-182.
- Smetana, K., Jr., Plzak, J., Dvorankova, B., Holikova, Z. (2003). Functional consequences of the glyco-phenotype of squamous epithelia--practical employment. *Folia biologica* 49, 118-127.
- Smolle, J., Hofmann-Wellenhof, R., Fink-Puches, R. (1996). Melanoma and stroma: an interaction of biological and prognostic importance. *Seminars in cutaneous medicine and surgery* 15, 326-335.
- Soria, J.C., Mauguen, A., Reck, M., Sandler, A.B., Saijo, N., Johnson, D.H., Burcoveanu, D., Fukuoka, M., Besse, B., Pignon, J.P., et al. (2013). Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 24, 20-30.
- Sorrell, J.M., Baber, M.A., Caplan, A.I. (2007). Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. *Cell and tissue research* 327, 499-510.
- Sorrell, J.M., et Caplan, A.I. (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of cell science* 117, 667-675.
- Spacek, M., Mitas, P., Lacina, L., Krajsova, I., Hodkova, G., Salmay, M., Spunda, R., Brlicova, L., and Lindner, J. (2011). [Cytostatic hyperthermic isolated limb perfusion (HILP) in VFN (General Faculty Hospital in Prague)]. *Rozhledy v chirurgii : mesicnik Ceskoslovenske chirurgicke spolecnosti* 90, 62-66.
- Spatz, A., Stock, N., Batist, G., van Kempen, L.C. (2010). The biology of melanoma prognostic factors. *Discovery medicine* 10, 87-93.
- Steele, R.J., Lane, D.P. (2005). P53 in cancer: a paradigm for modern management of cancer. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland* 3, 197-205.
- Stork, J., Arenberger, P., Pizinger, K., Semradova, V., Vosmik, F. (2007). *Dermatovenerologie*. Grada. Praha 1, 1-9.
- Stork, J., Arenberger, P., Pizinger, K., Semradova, V., Vosmik, F. (2007). *Dermatovenerologie*. Grada. Praha 1, 370-371.
- Stricklin, S.M., Stoecker, W.V., Malters, J.M., Drugge, R., Oliviero, M., Rabinovitz, H.S., Perry, L.A. (2012). Melanoma in situ in a private practice setting 2005 through 2009: location, lesion size, lack of concern. *Journal of the American Academy of Dermatology* 67, e105-109.

- Strnad, H., Lacina, L., Kolar, M., Cada, Z., Vlcek, C., Dvorankova, B., Betka, J., Plzak, J., Chovanec, M., Sachova, J., et al. (2010). Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. *Histochemistry and cell biology* 133, 201-211.
- Strojan, P., Smid, L., Cizmarevic, B., Zagar, T., Auersperg, M. (2006). Verrucous carcinoma of the larynx: determining the best treatment option. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 32, 984-988.
- Sulic, S., Panic, L., Dikic, I., Volarevic, S. (2005). Deregulation of cell growth and malignant transformation. *Croatian medical journal* 46, 622-638.
- Sundaram, S., Johnson, A.R., Makowski, L. (2013). Obesity, metabolism and the microenvironment: Links to cancer. *Journal of carcinogenesis* 12, 19.
- Supernat, A., Lapinska-Szumczyk, S., Majewska, H., Gulczynski, J., Biernat, W., Wydra, D., Zaczek, A.J. (2013). Epithelial-mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells in Endometrial Cancer. *Anticancer research* 33, 5461-5469.
- Szabo, P., Kolar, M., Dvorankova, B., Lacina, L., Stork, J., Vlcek, C., 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. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 103, 233-248.
- Szabo, P., Valach, J., Smetana, K., Jr., Dvorankova, B. (2013). Comparative analysis of IL-8 and CXCL-1 production by normal and cancer stromal fibroblasts. *Folia biologica* 59, 134-137.
- Tacastacas, J.D., Bray, J., Cohen, Y.K., Arbesman, J., Kim, J., Koon, H.B., Honda, K., Cooper, K.D., Gerstenblith, M.R. (2014). Update on primary mucosal melanoma. *J Am Acad Dermatol*. S0190-9622(14)01265-1. [Epub ahead of print].
- Takeda, K., Takahashi, N.H., Shibahara, S. (2007). Neuroendocrine functions of melanocytes: beyond the skin-deep melanin maker. *The Tohoku journal of experimental medicine* 211, 201-221.
- Takeda, T., Sugihara, K., Hirayama, Y., Hirano, M., Tanuma, J.I., Semba, I. (2006). Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 35, 369-375.
- Talmadge, J.E., Donkor, M., Scholar, E. (2007). Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer metastasis reviews* 26, 373-400.
- Tarhini, A.A., Gogas, H., Kirkwood, J.M. (2012). IFN-alpha in the treatment of melanoma. *Journal of immunology* 189, 3789-3793.

- Tatum, J.L., Kelloff, G.J., Gillies, R.J., Arbeit, J.M., Brown, J.M., Chao, K.S., Chapman, J.D., Eckelman, W.C., Fyles, A.W., Giaccia, A.J., et al. (2006). Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *International journal of radiation biology* 82, 699-757.
- Taylor, P.L., Barker, R.A., Blume, K.G., Cattaneo, E., Colman, A., Deng, H., Edgar, H., Fox, I.J., Gerstle, C., Goldstein, L.S., et al. (2010). Patients beware: commercialized stem cell treatments on the web. *Cell stem cell* 7, 43-49.
- Teichberg, V.I., Silman, I., Beitsch, D.D., Resheff, G. (1975). A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 1383-1387.
- Testori, A., Rutkowski, P., Marsden, J., Bastholt, L., Chiarion-Sileni, V., Hauschild, A., Eggermont, A.M. (2009). Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 20 Suppl. 6, vi22-29.
- Thiery, J.P. (2009). [Epithelial-mesenchymal transitions in cancer onset and progression]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 193, 1969-1978.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Thompson, J.F., et Shaw, H.M. (2007). Sentinel node mapping for melanoma: results of trials and current applications. *Surg Oncol Clin N Am.* 16, 35-54.
- Thompson, J.F., Soong, S.J., Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Ding, S., Coit, D.G., Flaherty, K.T., Gimotty, P.A., Johnson, T., Johnson, M.M., et al. (2011). Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 2199-2205.
- Tiago, M., de Oliveira, E.M., Brohem, C.A., Pennacchi, P.C., Paes, R.D., Haga, R.B., Campa, A., Barros, S.B., Smalley, K.S., Maria-Engler, S.S. (2014) Fibroblasts Protect Melanoma Cells from the Cytotoxic Effects of Doxorubicin. *Tissue Eng Part A*. Mar 25. [Epub ahead of print].
- Tobin, D.J. (2008). Human hair pigmentation--biological aspects. *International journal of cosmetic science* 30, 233-257.
- Toner, M., O'Regan, E.M. (2009). Head and neck squamous cell carcinoma in the young: a spectrum or a distinct group? Part 1. *Head Neck Pathol.* 3, 246-8.
- Trowbridge, J.M., et Gallo, R.L. (2002). Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology* 12, 117R-125R.

- Trowbridge, J.M., Rudisill, J.A., Ron, D., and Gallo, R.L. (2002). Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7). *The Journal of biological chemistry* 277, 42815-42820.
- Uong, A., et Zon, L.I. (2010). Melanocytes in development and cancer. *Journal of cellular physiology* 222, 38-41.
- Upadhyay, J., Upadhyay, R.B., Agrawal, P., Jaitley, S., and Shekhar, R. (2013). Langerhans Cells and Their Role in Oral Mucosal Diseases. *North American journal of medical sciences* 5, 505-514.
- Ushiki, T. (2002). Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Archives of histology and cytology* 65, 109-126.
- ÚZIS. (2010) Novotvary 2010 ČR. Cancer Incidence 2010 in the Czech Republic 1-246.
- Vacek, Z. (1988). *Histologie a histologická technika*. Avicenum. Zdravotnické nakladatelství. Praha 408-418.
- Valach, J., Fik, Z., Strnad, H., Chovanec, M., Plzak, J., Cada, Z., Szabo, P., Sachova, J., Hroudova, M., Urbanova, M., et al. (2012). Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *International journal of cancer Journal international du cancer* 131, 2499-2508.
- Van Den Bossche, K., Naeyaert, J.M., Lambert, J. (2006). The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic* 7, 769-778.
- van der Rest, M., et Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5, 2814-2823.
- Van Kilsdonk, J.W., Bergers, M., Van Kempen, L.C., Schalkwijk, J., Swart, G.W. (2010). Keratinocytes drive melanoma invasion in a reconstructed skin model. *Melanoma research* 20, 372-380.
- Van Obberghen-Schilling, E., Tucker, R.P., Saupe, F., Gasser, I., Cseh, B., Orend, G. (2011). Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *The International journal of developmental biology* 55, 511-525.
- van Rooyen, B.A., Schafer, G., Leaner, V.D., Parker, M.I. (2013). Tumour cells down-regulate CCN2 gene expression in co-cultured fibroblasts in a Smad7- and ERK-dependent manner. *Cell communication and signaling: CCS*. 11, 75.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (1999). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY). 2.

- Viera, M.H., Vivas, A.C., Berman, B. (2012) Update on Keloid Management: Clinical and Basic Science Advances. *Adv Wound Care* 1, 200-206.
- Veierod, M.B., Adami, H.O., Lund, E., Armstrong, B.K., Weiderpass, E. (2010). Sun and solarium exposure and melanoma risk: effects of age, pigmentary characteristics, and nevi. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19, 111-120.
- Verma, S., Quirt, I., McCready, D., Bak, K., Charette, M., Iscoe, N. (2006). Systematic review of systemic adjuvant therapy for patients at high risk for recurrent melanoma. *Cancer* 106, 1431-1442.
- Vermorken, J.B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H.R., Cupissol, D., et al. (2008). Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 359, 1116-1127.
- Villalobo, A., et Gabius, H. (1998). Signaling pathways for transduction of the initial message of the glycode into cellular responses. *Acta anatomica* 161, 110-129.
- Von Hanseemann, D. (1902) *Die mikroskopische Diagnose der bosartigen Geschwulste*. Hirschwald, Berlin. 2.
- Vosmik, F. (1996). [Malignant melanoma of the skin. Epidemiology, risk factors, clinical diagnosis]. *Casopis lekaru ceskych* 135, 405-408.
- Vuong, K., McGeechan, K., Armstrong, B.K., Investigators, A., Investigators, G.E.M., Cust, A.E. (2013). Occupational sun exposure and risk of melanoma according to anatomical site. *Int J Cancer* 134, 2735-41.
- Wang, J., Chen, J., Miller, D.D., Li, W. (2013). Synergistic Combination of Novel Tubulin Inhibitor ABI-274 and Vemurafenib Overcome Vemurafenib Acquired Resistance in BRAFV600E Melanoma. *Mol Cancer Ther.* 13, 16-26.
- Wang, W., Li, Q., Yamada, T., Matsumoto, K., Matsumoto, I., Oda, M., Watanabe, G., Kayano, Y., Nishioka, Y., Sone, S., et al. (2009). Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 6630-6638.
- Weiland, A., Roswall, P., Hatzihristidis, T.C., Pietras, K., Ostman, A., Strell, C. (2012). Fibroblast-dependent regulation of the stem cell properties of cancer cells. *Neoplasma* 59, 719-727.
- Werner, S., Krieg, T., Smola, H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *The Journal of investigative dermatology* 127, 998-1008.
- WHO Classification of Tumours. Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P., Sidransky, D. (2005) *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours* 3.



- WHO Classification of Tumours. LeBoit, P.E., Burg, G., Weedon, D., Sarasin, A. (2005). Pathology and Genetics of Tumours of the Skin 3.
- Xing, F., Saidou, J., Watabe, K. (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Frontiers in bioscience* 15, 166-179.
- Yamauchi, A., Kontani, K., Kihara, M., Nishi, N., Yokomise, H., Hirashima, M. (2006). Galectin-9, a novel prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *The breast journal* 12, S196-200.
- Yin, M., Soikkeli, J., Jahkola, T., Virolainen, S., Saksela, O., Hölttä, E. (2014). Osteopontin promotes the invasive growth of melanoma cells by activating integrin  $\alpha\beta 3$  and down-regulating tetraspanin CD9. *Am J Pathol.* 184, 842-58.
- Yoichi, T., Nagashima, T., Yagata, H., Yoshida, K., Suzuki, M., Fujimori, T., Sangai, T., Nakatani, Y., Miyazaki, M. (2009). Breast cancer with cartilaginous and/or osseous metaplasia. *Breast Cancer* 16, 234-237.
- Yurchenco, P.D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, 1-27.
- Zhao, X.H., Laschinger, C., Arora, P., Szaszi, K., Kapus, A., McCulloch, C.A. (2007). Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *Journal of cell science* 120, 1801-1809.