

**Univerzita Karlova**

**1.lékařská fakulta**

Studijní program: Experimentální chirurgie

MUDr. Štěpán Novák

**Autoreferát disertační práce**

**Vzájemná komunikace a vztah mezi nádorovými buňkami a nádorovým  
mikroprostředím**

*Mutual communication and relationship between tumor cells and the tumor  
microenvironment*

Školitel: RNDr. Pavol Szabo, Ph.D.

Praha, 2023

V Praze, 13.7.2023

MUDr. Štěpán Novák

Podpis

## **ABSTRAKT:**

Předložená disertační práce se věnuje dvěma hlavními cílům.

Jako první byla zkoumána interakce mezi čtyřmi buněčnými liniemi pankreatického duktálního adenokarcinomu (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) a kondiciovaných médií z normálních/zdravých fibroblastů (healthy fibroblasts, HF) a nádorově-asociovaných fibroblastů (cancer associated fibroblasts, CAFs) odvozených z PDAC (PDAC-derived CAFs, PANFs), buněk odvozených z ascitické tekutiny pacientů v terminálním stádiu PDAC a primárním tumorem PDAC. Následně byl stanoven celogenomový profil PANF.

Druhým cílem bylo imunohistochemicky, pomocí detekce tenascinu (Ten), fibronectinu (Fn) a galectinu-1 (Gal-1), odlišit buňky spinocelulárního karcinomu (SCC), buňky z okraje chirurgického resektátu (MSR) a buňky normální sliznice (NM) u pacientů operovaných pro spinocelulární karcinom hlavy a krku (HNSCC) a tyto výsledky korelovat s jejich klinickými charakteristikami. Následně byl proveden celogenomový profil vzorků SCC, MSR a NM na základě stratifikace exprese Ten.

### **Výsledky**

Kultivace čtyř linií PDAC pod vlivem kondiciovaných médií z HF a PANF měla heterogenní charakter. Po stimulaci bylo nejvíce agresivní chování získáno u buněčné linie Panc-1 zatímco linie PaTu-8902 byla médii spíše inhibována. Transkriptom PANF prokázal zvýšenou expresi některých genů (např. IL-6, IL-8, MFG8, periostin), které mohou přispívat k nádorové progresi a agresivitě.

Byl prokázán statisticky významný rozdíl koexprese Ten, Fn, Gal-1 mezi vzorky SCC, NM i MSR ( $p < 0,01$  resp.  $p < 0,05$ ). Microarray analýza genové exprese zjistila zvýšenou expresi několika genů souvisejících s nádorovou progresí u Ten+ (tenascin pozitivní) SCC a silnou aktivitou genů souvisejících s metabolismem lipidů v MSR Ten- (tenascin negativní) SCC.

### **Závěr**

TME významně ovlivňuje chování buněk PDAC. Na základě jejich vysoké variability a jejich rozdílné interakce s TME, je pravděpodobná budoucnost léčby ve stanovení individualizovaného nádorově specifického léčebného protokolu. Genová analýza prokázala významné a specifické změny na základě Ten stratifikace u SCC pacientů, nicméně bez vlivu na prognózu onemocnění.

## **ABSTRACT:**

The present dissertation addresses two main objectives.

First, the interaction between four pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cell lines and conditioned media from normal/healthy fibroblasts was investigated, HF) and cancer-associated fibroblasts (CAFs) derived from PDAC (PDAC-derived CAFs, PANFs), cells derived from ascitic fluid of patients with end-stage PDAC and primary PDAC tumor. Subsequently, the genome-wide profile of PANFs was determined.

The second aim was to differentiate squamous cell carcinoma (SCC) cells, surgical resection margin (MSR) cells and normal mucosa (NM) cells in patients operated for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) by immunohistochemistry, using detection of tenascin (Ten), fibronectin (Fn) and galectin-1 (Gal-1), and to correlate these results with their clinical characteristics. Subsequently, whole-genome profiling of SCC, MSR and NM samples was performed based on Ten expression stratification.

### **Results**

Cultivation of the four PDAC lines under the influence of conditioned media from HF and PANF was heterogeneous. After stimulation, the most aggressive behavior was obtained in the Panc-1 cell line while the PaTu-8902 line was rather inhibited by the media. The PANF transcriptome showed increased expression of some genes (e.g. IL-6, IL-8, MFG8, periostin) that may contribute to tumor progression and aggressiveness.

There was a statistically significant difference in co-expression of Ten, Fn, Gal-1 between SCC, NM and MSR samples ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively). Microarray analysis of gene expression revealed increased expression of several genes related to tumor progression in Ten<sup>+</sup> (tenascin positive) SCC and strong activity of genes related to lipid metabolism in MSR Ten<sup>-</sup> (tenascin negative) SCC.

### **Conclusion**

TME significantly affects the behavior of PDAC cells. Based on their high variability and their differential interaction with TME, the likely future of treatment lies in the establishment of an individualized tumor-specific treatment protocol. Gene analysis showed significant and specific changes based on Ten stratification in SCC patients, however, without affecting disease prognosis.

# ÚVOD

## Karcinom pankreatu

PDAC je jednou z nejmalignějších forem nádorového bujení, představuje 1,8 % všech nádorových onemocnění a způsobuje 4,6 % všech úmrtí na rakovinu (Lippi and Mattiuzzi 2020). PDAC je charakterizován agresivní povahou a rychlou tvorbou metastáz. 5leté přežití se pohybuje pouze kolem 7 %. (Chen et al. 2017).

Faktory které zvyšují riziko PDAC jsou kouření (Ryan, Hong, and Bardeesy 2014), chronická pankreatitida, excesivní konzumpce alkoholu a vyšší věk (Yadav and Lowenfels 2013; Henley et al. 2020).

Histopatologickým znakem PDAC je desmoplastická reakce na nádor, která je přítomna u primárního tumoru i metastáz (Whatcott et al. 2015). V PDAC jsou hojně zastoupeny CAF, které vznikají aktivací lokálních fibroblastů a pankreatických hvězdicových buněk (pancreatic stellate cell, PSC). Tento přechod je doprovázen úbytkem intracelulárních lipidových kapének a expresí aktivačního markeru  $\alpha$ SMA ( $\alpha$  smooth muscle actin) (Apte et al. 2004).

Pochopení desmoplázie jako výlučně protektivního faktoru PDAC je již překonané, současné výzkumy potvrzují komplexnější vnímání TME se snahou o holistický přístup k experimentální terapii (Ho, Jaffee, and Zheng 2020).

## Karcinomy hlavy a krku

HNSCC je celosvětově šestým nejčastějším nádorovým onemocněním. Velké evropské i americké epidemiologické studie popisují v posledních 40 letech vzestupný trend v incidenci karcinomů orofaryngu (oropharyngeal squamous cell carcinoma, OPSCC), a to zejména u mladších jedinců (Gudleviciene et al. 2014; Hammarstedt et al. 2006; Ellington et al. 2020).

Mezi hlavní etiologické faktory patří kouření, konzumace alkoholu a infekce HPV (human papillomavirus)(Schneider et al. 2014). Vzestup počtu nově diagnostikovaných případů OPSCC (a to i u nekuřáků) je přisuzován zvyšující se prevalenci vysoce rizikových typů HPV u mladších jedinců (Smith et al. 2004).

Pro klinickou praxi je přítomnost HPV detekována pomocí exprese proteinu p16 (Shinn et al. 2021). Klinické rozdíly mezi HPV pozitivními a negativními OPSCC vedly k jejich samostatnému odlišení v klinické i patologické TNM klasifikaci v poslední 8. edici

UICC/AJCC (Union for International Cancer Control/American Joint Committee on Cancer) (Huang and O'Sullivan 2017).

HPV pozitivní OPSCC mají výrazně lepší prognózu (Dayyani et al. 2010). Z těchto důvodů je u HPV pozitivních OPSCC zvažována deeskalace léčby (Hay and Nixon 2018).

## Nádorové mikroprostředí

Dřívější předpoklad, že TME má pouze podpůrnou funkci je již překonán a v současné nádorové biologii je mu připisována významná role umožňující přímé ovlivnění funkce nádorového parenchymu (Li, Fan, and Houghton 2007; Lorusso and Ruegg 2008; Plzak et al. 2010). TME tvoří populace CAF, jiných mezenchymových buněk, imunitních buněk, kmenových buněk, vláken extracelulární matrix (ECM), cév a signálních molekul. (Metwaly et al. 2012; Polyak, Haviv, and Campbell 2009; Hamburger and Salmon 1977).

Jednu z nejpočetnějších buněčných populací nádorového stromatu představují CAF. Morfologicky se jedná o vřetenité buňky, které jsou charakteristické expresí vimentinu,  $\alpha$ -SMA (alpha smooth muscle actin) a FAP (fibroblast activation protein) (Kim, Jung, and Koo 2015; Cirri and Chiarugi 2011; Rupp et al. 2015). Jsou důležitým producentem ECM a zdrojem růstových faktorů, cytokinů a chemokinů. Podporují tak tumorigenezi, angiinvazi, nádorovou imunosupresi a zakládání metastáz (Chen and Song 2019).

Aktivita CAF je možným faktorem selhání protinádorové léčby cílené pouze na vlastní nádorové buňky (Sun 2015; Slany et al. 2015). Předpokládá se, že eliminace nebo modifikace CAF může být jednou z cest protinádorové terapie.

## CÍL PRÁCE

### Cíl 1

Bod A: Porovnání rychlosti růstu buněk čtyř komerčních PDAC linií kultivovaných v běžném kultivačním médiu a při použití kondiciovaných médií z HF a PANF.

Bod B: Určení rozdílné exprese specifických buněčných markerů spojených s nízkou buněčnou diferenciací a epitel-mezenchymálním přechodem u komerčních linií PDAC ve standardním kultivačním médiu a po jejich stimulaci kondiciovanými médii z HF a PANF.

Bod C: Srovnání exprese vybraných specifických markerů IL-6, IL-8 a MFGE8 (Milk fat globule-EGF factor 8) a jejich receptorů u komerčních buněčných linií PDAC (stimulovaných

a nestimulovaných kondiciovanými médii), u buněk z punktátu ascitu PDAC a u nádorových buněk ze vzorků PDAC.

Bod D: Srovnání vzájemné genové exprese HF, PANF a CAF z maligního melanomu.

## Cíl 2

Bod A: Analýza imunohistochemického profilu markerů Ten, Fn a Gal u NM, MSR a SCC.

Bod B: Nalezení vztahu mezi metastatickým postižením krčních uzlin a přežitím pacienta na podkladě exprese Ten, Fn a Gal u MSR a SCC.

Bod C: Porovnání genové exprese na podkladě DNA microarray analýzy Ten pozitivních a Ten negativních vzorků SCC.

## **3. MATERIÁL A METODIKA**

Detailní popis metodik je uveden v jednotlivých článcích, které tvoří součást této dizertační práce.

## **4. VÝSLEDKY**

### Cíl 1

Efekt kondiciovaných médií na formování buněčných kolonií buněčných linií PDAC  
Výsledky ukázaly, že efekt kondiciovaných médií na velikost a počet buněčných linií závisí na typu linie PDAC. V 6 případech z 8 převážil pozitivní efekt. Kondicionovaná média z PANF (P10 a P11) zvětšují velikost kolonií u Panc-1, MIAPaCa-2 a CAPAN-2, u PaTu-8902 nebyl pozorován vliv velikost kolonií v porovnání s kultivací v kontrolním/běžném médiu. Kondicionovaná média z HF zvětšují velikost kolonií u Panc-1, MIAPaCa-2 a PaTu-8902, u CAPAN-2 byl pozorován mírně negativní vliv na velikost kolonií v porovnání s kultivací v běžném médiu. Počet kolonií u Panc-1 a CAPAN-2 stimulovaných kondiciovanými médii z PANF/HF byl větší než při kultivaci v běžném médiu, ale pouze u Panc-1 byl efekt kondiciovaných linií z PANF větší než u kondiciovaných médií z HF. Inhibiční aktivita na počet kolonií byla pozorována u linií MIAPaCa-2 a PaTu-8902 v porovnání s kultivací v běžném médiu.

## Western blot analýza PDAC buněčných linií pod vlivem kondiciovaných médií

Metodou Western blot byla na proteinové úrovni hodnocena diferenciací na podkladě exprese K8, K14, K19 a EMT na základě exprese markerů Slug, Snail, vimentin a E-cadherin/N-cadherin. Největší změnu exprese pod vlivem kondiciovaných médií vykazoval K8, zatímco exprese K14 a K19 zůstala relativně stabilní. Kondicionovaná média indukovala expresi K8 u linií Panc-1 a CAPAN-2, naopak snížila jeho expresi u linie MIAPaCa-2. Exprese K8 u linie PaTu-8902 byla beze změny. Kondicionovaná média expresi N-cadherinu a Snail a snižovala expresi E-cadherinu u linií Panc-1 a MiaPaCa-2. U linie CAPAN-2 byla při použití kondiciovaných médií minimální změna v expresi Snail a Slug, došlo ke zvýšení exprese E-cadherinu a absencí N-cadherinu. Kondicionovaná média neměla zásadní vliv na změnu biologických vlastností PaTu-8902 linie.

## Imunofluorescenční analýza buněčných linií PDAC

Imunofluorescenčním barvením byla na fenotypové úrovni hodnocena exprese K8, K17, K19 vimentinu a Ki67. Exprese K8 byla prokázána u všech linií PDAC, přidání kondiciovaných médií expresi K8 lehce zvýšilo u linií Panc-1 a MIAPaCa-2, snížilo u linie CAPAN-2, u linie PaTu-8902 zůstala exprese K8 neměnná. Exprese K19 nevykázala zásadní změnu při kultivaci v kondiciovaných médiích u žádné linie. Signál pro K17 nebyl zjištěn u většiny linií. Linie Panc-1 a MiaPaCa-2 exprimovaly vimentin, linie CAPAN-2 vykazovala slabší signál pro vimentin, u linie PaTu-8902 byla na přítomnost vimentinu velmi chudá. U Ki67 nebyla prokázána významná změna při použití kondiciovaných médií u linií Panc-1 a MIAPaCa-2. U linií PaTu-8902 a CAPAN-2 byla při použití kondiciovaných médií exprese Ki67 zvýšena. Použití médií obohacených o IL6, IL8 a MFGE8 indukovalo signál pro K19 a inhibovalo pro K8 a vimentin u linie CAPAN-2.

## Imunohistochemická analýza v bright-field mikroskopii buněčných linií PDAC a buněk z ascitu

Imunohistochemickou analýzou byla u buněk z ascitu sledována exprese K7, K8 a K19 a vimentinu a exprese MFGE8. Dále byla porovnávána exprese IL6, IL8, VEGFA, receptorů pro IL6 (IL6R), IL8 (IL8R) a VEGFAR1, VEGFAR2 mezi nádorovými liniemi PDAC a buňkami z ascitu. Analýza prokázala že PANC-1 linie byla pozitivní na všechny testované markery. U ostatních linií a buněk z ascitu byla pozorována individuální variabilita mezi sledovanými

markery. Obzvláště se lišila exprese IL8, IL8R1 a IL8R2. Všechny pankreatické linie exprimují VEGFA a oba proteinové receptory VEGFAR1, VEGFAR2 stejně jako IL6 a IL8R2. Pouze Panc-1 byly lehce pozitivní na IL8R1. Slabý signál pro MFGES byl detekován pouze pro buňky ascitu. Buňky ascitu také exprimovaly K7, K8, K19 a vimentin.

### Imunohistopatologie PDAC vzorků

Analyzované vzorky od pacientů P10 a P11 vykazovaly typické morfologické charakteristiky PDAC charakterizované extensivním desmoplastickým stromatem s infiltrací skupinami nádorových buněk. U vzorků byla imunohistochemicky hodnocena exprese IL6, IL8, IL6R, IL8R1, IL8R2 a VEGFA. Expres IL6 a IL6R byla prokázána v nádorových buňkách i nádorovém stromatu. Signál exprese IL8, obou receptorů IL8R1, IL8R2 chyběl v 8 z 11 sledovaných vzorků. Ačkoliv protein VEGFA chyběl u většiny vzorků byly detekovány oba receptory VEGFAR1 a VEGFAR2 v nádorových buňkách i nádorovém stromatu.

### Imunohistochemická a Western blot analýza PANF

Imunohistochemicky byla zjišťována přítomnost markerů vimentin, WSK,  $\alpha$ -SMA, fibronectin, nestin a Ki67 u PANF a HF. U PANF byla zřetelná exprese vimentinu, fibronectinu,  $\alpha$ -SMA a nestinu naopak HF  $\alpha$ -SMA a nestin neexprimují. Metodou Western blot byla analyzována přítomnost PDGFR- $\beta$ , vimentinu, WSK u PANF a HF. Western blot ukázal pouze slabou expresi PDGFR- $\beta$  u PANF v porovnání s HF.

### ELISA detekce IL6, IL8 a MFGES linií PDAC a HF/PANF

Produkce sledovaných faktorů prokázala individuální variabilitu u PDAC s nízkou produkcí IL-6. Sekrece všech sledovaných faktorů u HF i PANF byla časově dependentní se zvýšením sekrece při 120hodinové kultivaci. Při kultivaci PDAC v kondicionovaných médiích z HF/PANF (za 48 hodin) se silně zvýšila produkce IL6. Použití kondicionovaných médií z HF/PANF nemělo vliv na produkci IL8 a MFGES.

### Expresní celogenomové profilování transcriptomu HF, PANF a MELF

PANF se odlišuje od MELF a HF v transkripční aktivitě 1521 genů. Na podkladě Gene set enrichment analýzy KEGG cest byl prokázán rozdíl v následujících drahách souvisejících s karcinogenezí: *TGF- $\beta$  signaling pathway*, *Transcriptional misregulation in cancer*, *Focal adhesion*, *ECM-receptor interaction*.



Ačkoliv je *vimentin* exprimován ve všech studovaných fibroblastech, jeho exprese v PANF a MELF je nižší než u HF. Exprese *FAP* typická pro CAF byla přítomna ve všech typech fibroblastů. Další rozdíl mezi HF, PANF a MELF byl pozorován v transkripci *K8* a *K18*, která byla pozorována pouze u PANF. Všechny studované fibroblasty překvapivě exprimovaly *K19*. PANF vykazovaly významně silnější expresi *SMA* v porovnání s HF/MELF. Hladina transkriptů *IL6*, *VEGFA* a *MFGGE8* byla zvýšena u PANF/MELF v porovnání s HF. Na druhou stranu koncentrace *IL8* byla nižší u PANF než u HF/MELF. Exprese *integrinu* a *periostinu* byla vyšší u PANF a MELF v porovnání s HF.

## Cíl 2

### Imunofluorescenční detekce Ten, Fn a Gal-1 u SCC, NM a MSR

Ten a Gal-1 často chyběly v NM a MSR, ale byly silně exprimovány v SCC (NM nebo MSR vs. SCC;  $p < 0.01$ ). Exprese Fn byla v NM rovnoměrná, kdy polovina vzorků byla pozitivní (Fn+) a druhá polovina negativní (Fn-). U MSR a SCC byla exprese převážně Fn+ (NM vs. MSR nebo SCC;  $p < 0.01$ ). Společná koexprese Ten+, Fn+, Gal-1 pozitivních (Gal-1+) vzorků se vyskytovala častěji u SCC ( $n=42$ , 55 %) než u NM ( $n=3$ , 9 %  $p < 0.01$ ). Nejčastější kombinace markerů u NM byla Ten- Fn+, Gal-1 negativních (Gal-1-) ( $n=15$ , 45 %) a Ten- Fn+, Gal-1- ( $n=13$ ; 39 %). Tyto kombinace byly naopak vzácné u SCC Ten- Fn+, Gal-1- (3 %) a Ten- Fn+, Gal-1- (4 %;  $p < 0.01$ ). U vzorků MSR se vyskytovali kombinace Ten+ Fn+ Gal-1+ ( $n=8$ ; 24 %), Ten-Fn+Gal-1- ( $n=12$ ; 36 %) and Ten-Fn-Gal-1- ( $n=11$ ; 33 %) s podobnou četností ( $p=0.568$ ). Rozdíly v koexpresi jednotlivých markerů mezi SCC a MSR jsou statisticky významné ( $p < 0.05$ ).

### Vztah mezi expresí Ten, Fn, Gal-1 a přítomností uzlinových metastáz

Nebyla zjištěna žádná statisticky signifikantní korelace mezi pozitivitou jednotlivých markerů a přítomností uzlinových metastáz (Ten:  $p=0.0715$ ; Fn:  $p=0.906$ ; Gal-1:  $p=0.963$ ).

### Vztah mezi expresí Ten, Fn a Gal-1 a přežitím pacienta

Bylo hodnoceno přežití pacienta (overall survival, OS) i přežití pacientů bez návratu onemocnění (disease free survival DFS), kde nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi 2letým a 5letým OS a DFS, u Ten+ a Ten- pacientů s SCC. U pacientů s Ten+ a Ten- resekátem (MSR) byl rozdíl mezi 2letým a 5letým OS a DFS významnější, nedosáhl ovšem

statistické významnosti (2roky OS:  $p=0.168$ ; 5let OS:  $p=0.218$ ; 2roky DFS:  $p=0.0742$ ; 5let DFS:  $p=0.122$ ). U pacientů NM pozitivita pro tenascin (Ten+) statisticky významně zhoršila 5leté OS a DFS ( $p < 0.05$ ). Nebyla zjištěna žádná signifikantní korelace mezi Fn+ a Fn- pacienty s SCC, MSR a NM a 2/5letým a přežitím (OS a DFS). 2leté OS u Gal-1- SCC ukazovalo na lepší prognózu, data však nedosáhla statistické významnosti. Žádná další statisticky významná korelace mezi Gal-1+ a Gal-1- SCC, MSR a NM nebyla zjištěna.

### Microarray analýza Ten- a Ten+ vzorků SCC

Při porovnání RNA profilu Ten- a Ten+ SCC byl zjištěn rozdíl v expresi 115 genů.

Analýza GSEA ontologie biologického procesu GO ukazuje na asociaci rozdílně transkribovaných genů ( $p < 0.005$ , odds ratio  $> 4$ , a minimálně 3 DEG v genovém setu) v *JAK-STAT* signalizační dráze (GO:0046427), *Gamma-aminobutyric acid* signalizační dráze (GO:0007214), *ncRNA* zpracování (GO:0034470) a *Positive regulation of STAT cascade* (GO:1904894).

Geny se zvýšenou expresí u Ten+ SCC jsou *argonaute 2 (AGO2)*, *pseudouridylate synthase 7 (PUS7)* a *preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME)*. Naopak geny se sníženou expresí u Ten+ SCC jsou například: *V-set and transmembrane domain containing 2 like (VSTM2L)*, *iduronidase alpha-L- (IDUA)*, *beta-ureidopropionase 1 (UPB1)*, *cerebellin 2 precursor (CBLN2)*, *myosin light chain 9 (MYL9)*, *basal cell adhesion molecule (BCAM)* *LIF*, *interleukin 6 family cytokine (LIF)*.

Při porovnání RNA profilu MSR mezi Ten- a Ten+ SCC byl zjištěn rozdíl ve 154 genech.

Analýza GSEA ontologie biologického procesu GO ukazuje na asociaci rozdílně transkribovaných genů ( $p < 0.005$ , odds ratio  $> 4$ , a minimálně 3 DEG v genovém setu) například v *acylglycerol acyl-chain remodeling (GO:0036155)*, *regulation of sequestering of triglyceride (GO:0010889)*, *lipid storage (GO:0019915)*, *triglyceride biosynthetic process (GO:0019432)*, *fatty acid homeostasis (GO:0055089)*, *neutral lipid biosynthetic process (GO:0046460)*

U MSR Ten+ SCC byla zjištěna zvýšená aktivita genu *signal recognition particle 9 (SRP9)*.

Naopak geny se sníženou aktivitou byly například: *thyroid hormone responsive (THRSP)*, *perilipin 4 (PLIN4)*, *G0/G1 switch 2 (G0S2)*, *perilipin 1 (PLIN1)*, *lipoprotein lipase (LPL)*, *superoxide dismutase 3 (SOD3)*, *regulator of G protein signaling 2 (RGS2)*, *lipase E, hormone sensitive type (LIPE)*.

Expresní profil NM u Ten– a Ten+ SCC je podobný. Byla zjištěna rozdílná exprese u genů pro *RAB11B* (člen rodiny RAS onkogenů) a genu *pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor (PPDPF)*, nebyla ovšem dosažena statistická významnost ( $p=0.21$ ).

## DISKUZE

### Cíl 1

TME má klíčovou roli umožňující přímé biologické ovlivnění nádorového parenchymu. Vzhledem k tomu, že u PDAC tvoří desmoplastické stroma až 90 % objemu nádoru, lze předpokládat jeho kruciální význam (Opitz et al. 2021). U většiny nádorů je popisován tumor podporující vliv TME s pozitivním efektem na velikost, rychlost dělení a metastatický potenciál nádorových buněk a také schopnost nádoru odolávat imunitní reakci a protinádorové terapii (Li, Fan, and Houghton 2007; Lorusso and Ruegg 2008; Plzak et al. 2010; Anderson and Simon 2020). U nádorů pankreatu je ovšem role TME velmi variabilní a je popsána i jeho supresivní role při progresi nádorového bujení, a to jak experimentálními, tak i klinickými studii (Ho, Jaffee, and Zheng 2020; Ding et al. 2018). Zdá se, že biologický účinek CAF u PDAC, na rozdíl od jiných typů tumorů, má překvapivě spíše inhibiční než pronádorový efekt (Omary et al. 2007). Podobně variabilní výsledek interakce PANF s liniemi PDAC byl pozorován i v našich experimentech. Změna je pravděpodobně vyvolána jak rozdílným fenotypem, tak rozdílnou sensitivitou PDAC na parakrinní stimulaci PANF. Jednotlivé linie PDAC odpovídaly na vliv PANF různorodě z hlediska růstu, velikosti kolonií a variability fenotypu. Nejagresivnější chování bylo pozorováno u linie Panc-1 (zvýšení počtu buněk a velikosti kolonií, současná exprese vimentinu a K8), linie PaTu-8902 byla PANF naopak inhibována. Několik studií prokázalo, že agresivita a invazivita PDAC je závislá na EMT (Rhim et al. 2012; Alderton 2013). S EMT je spojena zvýšená exprese transkripčních faktorů Snail, Slug, proteinu vimentinu a změna exprese E-cadherinu na N-cadherinu (Liu et al. 2015; Hotz et al. 2007). V našich experimentech proto byla hodnocena jejich přítomnost, resp. nepřítomnost.

Role PANF byla variabilní. PANF stimulace linií PANC-1 a MiaPaCa-2 prokázala up-regulaci sledovaných znaků. Linie PaTu-8902 a CAPAN-2 na straně druhé projevíly jistou rezistenci vůči účinku PANF. Změny v přítomnosti různých keratinů u nádorových buněk PDAC byly popsány v několika studiích. Jejich přesná role v nádorové progresi není zatím jasně definována. Jako příklad můžeme uvést expresi K17 nebo K19. Expese K19 je u PDAC je přítomna při maligní transformaci (Brembeck and Rustgi 2000). Abundantní expese K17 u

PDAC byla v některých studiích spojena s nejagresivnějším subtypem malignity pankreatu (Roa-Pena et al. 2019), na druhou stranu v jiných pracích byla up-regulace K17 definována protektivním účinkem, potlačením EMT a supresí nádorové proliferace (Zeng et al. 2020). CAF a jejich kondicionovaná média mají schopnost ovlivnit změnu exprese keratinů u nádorových buněk (Dvorankova et al. 2012). V rámci naší studie byl prokázán minimální vliv PANF na linie PDAC, pouze u linie PaTu-8902 byla kondicionovanými médii potencována exprese K19. Prozánětlivé cytokiny jsou dysregulovány u mnoha biologických procesů. Rozhodující dopad mají IL-6 a IL-8 (Padoan, Plebani, and Basso 2019). Hladina cirkulujícího IL6 je signifikantně zvýšena u pacientů s PDAC a pozitivně koreluje s nádorovou progresí a metastatickým potenciálem (Holmer et al. 2014; Kim et al. 2017). IL-8 je spojen s invazivitou, neovaskularizací a celkovou progresí PDAC (Matsuo et al. 2009). Pro porovnání vlivu IL-6 a IL-8 v naší práci, byla srovnána jejich exprese a exprese jejich receptorů u linií PDAC, buněk z ascitu a zmražených řezů P10/P11. U všech zkoumaných vzorků byla prokázána vysoká pozitivita pro IL-6 a IL-6R, exprese IL-8 měla větší variabilitu a u zmražených řezů P10/P11 nebyl signál pro IL-8 a IL-8R přítomen vůbec. Proměnlivost v expresi IL-8 a IL-8R byla nicméně publikována i jinými skupinami (Hussain et al. 2010). S úmyslem prokázat nezbytnou minimální koncentraci interleukinů pro adekvátní biologickou odpověď byla stanovena kvantita syntézy IL-6 a IL-8 PDAC liniemi a PANF a následně byl hodnocen vliv na jejich produkci při vzájemné interakci PDAC a PANF. Jak linie PDAC, tak HF a PANF produkovaly IL-6. Hladina IL-6 byla vyšší u PANF i HF než u všech linií. Linie PDAC secernovaly IL-8 ve větším množství než IL-6, u PANF i HF byla ale jeho produkce variabilnější. Na mRNA úrovni byla exprese IL-8 nižší u HF než u MELF. Při vzájemné interakci mezi PANF a liniemi PDAC se exprese IL-6 výrazně zvýšila. To ukazuje na regulaci produkce IL-6 jak nádorovými buňkami, tak i CAF. Naopak produkce IL-8 nebyla ovlivněna kondicionovanými médii z HF ani PANF, což může poukazovat na relativní autonomii v jeho produkci buňkami PDAC.

MFGE8 má schopnost vazby na povrch apoptických buněk s následnou neefektivní imunitní odpovědí, je tak důležitým faktorem nádorové progresi (Sugano et al. 2011). Funkce MFGE8 u PDAC zatím není popsána. Stanovení expresního profilu a produkce proteinů potvrdilo výrazně vyšší expresi MFGE8 u PANF než u kontrolních HF. U linií PDAC byla vyšší sekrece MFGE8 prokázána pouze u Panc-1, nicméně u všech linií byla produkce MFGE8 zvýšena při dlouhodobé kultivaci. Exprese MFGE8 u HF i PANF byla významná a časově dependentní. Kondicionovaná média z HF i PANF ovšem dopad na zvýšení sekrece MFGE8 nádorovými buňkami neměla. To ukazuje na důležitou, relativně autonomní roli PANF v produkci MFGE8.

Zkoumáním transkriptomu HF a CAF se potvrdily rozdílné biologické vlastnosti a chování obou buněčných skupin. CAF mají geny se zvýšenou aktivitou pro cytokiny, které mají schopnost parakrinně stimulovat nádorové buňky a podpořit tak jejich proliferaci, invazivitu, angiogenezí, EMT a metastatický potenciál (Gonzalez et al. 2016; Papaccio et al. 2021). Při porovnání HF, MELF a PANF, které byly použity v předchozích experimentech, byl zjištěn rozdíl v několika KEGG drahách. Deregulována byla například signalizační dráha *TGF- $\beta$* , jedna z nejdůležitějších drah spojená s EMT (Xu, Lamouille, and Derynck 2009). PANF exprimovaly vyšší hodnoty *periostinu* spojeného s angiogenezí a EMT (Kanno et al. 2008; Liu et al. 2016) a *VEGF-A* který ovlivňuje nejen angiogenezí a vaskulární permeabilitu, ale také formování kmenových nádorových buněk nebo iniciaci nádorového bujení (Goel and Mercurio 2013). Nebyla prokázána významná nadprodukce *IL-6* a *IL-8*, naopak byl zvýšeně aktivován  $\alpha$ SMA. PANF představuje heterogenní populaci buněk s možností diversifikace funkcí při tvorbě reaktivního nádorového mikroprostředí. Obecně nejpočetnější zastoupení ve stromatu mají 2 linie PANF. První skupina je spojena s expresí  $\alpha$ SMA a nízkou produkcí zánětlivých cytokinů, zatímco druhou skupinu PANF charakterizuje vysoká produkce zánětlivých cytokinů a absence  $\alpha$ SMA (Watt and Morton 2021). Expresní profil námi izolovaných PANF odpovídal první skupině CAF. Existuje několik hypotéz popisující možný původ CAF. Jedním z hlavních zdrojů CAF jsou lokální HF, podocyty a mezenchymové SC (Dvorankova et al. 2015). Imunohistochemické znázornění izolovaných PANF na vybrané cytokeratiny bylo negativní, ovšem transkript mRNA pro K8 a K19 byl u PANF detekován. Je diskutabilní, zda můžeme tímto způsobem predikovat EMT u CAF, protože exprese cytokeratinů byla zjištěna u HF nebo mezenchymových SC i za jiných podmínek (Yang et al. 2015; Tong et al. 2018; Chen et al. 2018).

TME u PDAC není jednotná entita, ale poměrně heterogenní ekosystém. Zdá se, že terapie cílená na TME by mohla přinášet rozdílné účinky v důsledku jeho molekulární heterogenity.

## Cíl 2

Imunohistochemické barvení potvrdilo častější koexpresi Ten, Fn a Gal-1 u vzorků SCC, v porovnání se vzorky NM a MSR. Jejich pozitivní vliv na nádorovou proliferaci, EMT, angiogenezí a nádorovou migraci je všeobecně přijímán (Yoshida, Akatsuka, and Imanaka-Yoshida 2015; Lin et al. 2019; Cousin and Cloninger 2016), ovšem vliv na prognózu pacienta je předmětem diskusí. Exprese Ten u CAF je spojována s vyšším stádiem onemocnění, přítomností uzlinových metastáz, klinickým stádiem a nádorovou rekurencí (Yang et al. 2016).

Existují ale i práce, které nepopisují asociaci mezi přežitím a expresí Ten (Atula et al. 2003) nebo je popsána asociace pouze při expresi Ten ve stromální tkáni (Sundquist et al. 2017). Na základě metaanalýz je přítomnost Gal-1 v nádorech spojena s horší prognózou (Wu et al. 2018). Asociace mezi výskytem Fn a přežitím je sporná (Lin et al. 2019). V našem souboru ovšem žádný vztah mezi expresí těchto molekul a klinickým statusem pacientů prokázán nebyl.

V další fázi experimentu byla provedena celogenomová analýza transkriptomu a určen rozdíl v genové expresi mezi Ten<sup>+</sup> a Ten<sup>-</sup> SCC. Srovnání genového profilu identifikovalo rozdílnou expresi genů pro kinázy a genů pro receptory související s nádorovou proliferací.

Mezi geny se sníženou aktivitou u Ten – SCC patří *JAK2*. Tato strukturně non-receptorová kináza asociovaná s cytokininovými receptory se podílí na buněčné proliferaci, diferenciaci nebo histonové modifikaci a její overexprese je spojena se špatnou prognózou u nasofaryngeálních karcinomů (He et al. 2016). Druhý prominentní gen se sníženou aktivitou je *Notch1*, který kontroluje diferenciaci buněk včetně EMT (Yu and Li 2022). *Notch1* je tak zapojen v mnoha vývojových procesech a mutacích asociovaných s různými typy leukémií a HNSCC (Leong et al. 2007; Cancer Genome Atlas 2015).

Mezi geny se zvýšenou aktivitou u Ten<sup>-</sup> SCC patří *LIF* a *BCAM*. *LIF* podporuje aktivaci HF u různých typů nádorů (Albregues et al. 2014). *BCAM* je asociován s nízkou diferencovanými keratinocyty a je exprimován u epiteliálních kožních tumorů nebo u zánětlivého procesu v epidermis (Schon et al. 2000). V další části mapování genové exprese byl hodnocen transkripční profil MSR na základě stratifikace Ten SCC. Ten<sup>-</sup> SCC měli v okolním MSR silnou aktivitu genů spojených s lipidovým metabolismem. Prominentním genem byl *LEP*, který hraje klíčovou roli v energetické bilanci a adaptaci organismu na hladovění (Mechanick, Zhao, and Garvey 2018), patří ale také mezi tumor podporující geny například u karcinomu prsu nebo jater (Barone et al. 2012; Xiong et al. 2014). *LEP* je zapojen do regulace ERK dráhy a JAK2-STAT signalizace, zároveň se podílí na up-regulaci proteinu BIRC5 a v neposlední řadě koriguje přítomnost MMP a TIMP (Jiang et al. 2008; Jiang, Li, and Rui 2008; Park et al. 2001). Nárůst exprese *LEP* koreloval s nadprodukcí *Gal-12*. Naše výsledky odhalují výrazné rozdíly v genové expresi u vzorků stratifikovaných podle matrixového glykoproteinu Ten, nicméně bez prognostického významu. U MSR byl nejvýraznější rozdíl vyjádřen v genové expresi spojené s lipidovým metabolismem.

## ZÁVĚR

TME má klíčovou roli umožňující přímé biologické ovlivnění nádorového parenchymu PDAC. Při interakci PANF s liniemi PDAC byl zjištěn jejich heterogenní efekt. Nejagresivnější chování z hlediska růstu buněk, velikosti kolonií a fenotypu bylo pozorováno u linie Panc-1, linie PaTu-8902 byla PANF naopak inhibována. PANF zvýšeně exprimovaly markery spojené s EMT (Snail, Slug, N-cadherin a vimentin) u linií Panc-1 a MiaPaCa-2. Vliv PANF na změnu exprese cytokeratinů byl minimální, pouze u linie PaTu-8902 byla potencována exprese K19. U linií PDAC, buněk z ascitu a P10/P11 byla prokázána vysoká pozitivita pro IL-6 a IL-6R. IL-6 produkovaly ve významném množství i samotné HF a PANF. Sekrece IL-6 byla při vzájemné interakci mezi PANF a liniemi PDAC výrazně potencována. Ačkoliv linie PDAC produkovaly významné množství IL-8, nebylo jeho množství ovlivněné kondicionovanými médii z HF ani PANF. Stanovení expresního profilu a produkce proteinů potvrdilo časově dependentní expresi MFGE8 u PANF a linie Panc-1. Stejně jako u IL-8 neměla kondicionovaná média z HF i PANF vliv na jeho sekreci.

Analýza transkriptomu PANF prokázala vyšší hodnoty mRNA u některých genů například *periostinu*, *VEGF-A* a  *$\alpha$ SMA*, překvapivě nebyla prokázána významná exprese *IL-6* a *IL-8*. U PANF byl dále prokázán transkript pro K8 a K19, což by mohla být známka jejich epiteliálního původu a EMT.

Získaná data doplňují mozaiku interakce mezi PANF a buňkami PDAC, vzhledem k její variabilitě lze predikovat budoucnost léčebné strategie PDAC spíše v její individualizaci pro konkrétního pacienta.

Imunohistochemické barvení potvrdilo častější koexpresi Ten, Fn a Gal-1 u vzorků SCC, v porovnání se vzorky NM a MSR. Srovnání genového profilu mezi Ten+ a Ten– SCC identifikovalo rozdílnou expresi genů pro kinázy a genů pro receptory související s nádorovou proliferací.

K důležitým genům se sníženou aktivitou u Ten– SCC patří *JAK2* a *Notch1*. Mezi geny s relevantně zvýšenou aktivitou u Ten– SCC patří *LIF* nebo *BCAM*.

Ten– SCC měli v okolním MSR silnou aktivitu genů spojených s lipidovým metabolismem, prominentním genem byl LEP. Naše výsledky odhalují výrazné rozdíly v genové expresi u vzorků stratifikovaných podle matrixového glykoproteinu Ten, nicméně bez prognostického významu.

## 7. LITERATURA

- Albregues, J., I. Bourget, C. Pons, V. Butet, P. Hofman, S. Tartare-Deckert, C. C. Feral, G. Meneguzzi, and C. Gaggioli. 2014. 'LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer', *Cell Rep*, 7: 1664-78.
- Alderton, G. K. 2013. 'Metastasis: Epithelial to mesenchymal and back again', *Nat Rev Cancer*, 13: 3.
- Anderson, N. M., and M. C. Simon. 2020. 'The tumor microenvironment', *Curr Biol*, 30: R921-R25.
- Apte, M. V., S. Park, P. A. Phillips, N. Santucci, D. Goldstein, R. K. Kumar, G. A. Ramm, M. Buchler, H. Friess, J. A. McCarroll, G. Keogh, N. Merrett, R. Pirola, and J. S. Wilson. 2004. 'Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells', *Pancreas*, 29: 179-87.
- Atula, T., J. Hedstrom, P. Finne, I. Leivo, M. Markkanen-Leppanen, and C. Haglund. 2003. 'Tenascin-C expression and its prognostic significance in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma', *Anticancer Res*, 23: 3051-6.
- Barone, I., S. Catalano, L. Gelsomino, S. Marsico, C. Giordano, S. Panza, D. Bonofiglio, G. Bossi, K. R. Covington, S. A. Fuqua, and S. Ando. 2012. 'Leptin mediates tumor-stromal interactions that promote the invasive growth of breast cancer cells', *Cancer Res*, 72: 1416-27.
- Brembeck, F. H., and A. K. Rustgi. 2000. 'The tissue-dependent keratin 19 gene transcription is regulated by GSK3 $\beta$ /KLF4 and Sp1', *J Biol Chem*, 275: 28230-9.
- Cancer Genome Atlas, Network. 2015. 'Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas', *Nature*, 517: 576-82.
- Cirri, P., and P. Chiarugi. 2011. 'Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin', *Am J Cancer Res*, 1: 482-97.
- Cousin, J. M., and M. J. Cloninger. 2016. 'The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1', *Int J Mol Sci*, 17.
- Dayyani, F., C. J. Etzel, M. Liu, C. H. Ho, S. M. Lippman, and A. S. Tsao. 2010. 'Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC)', *Head Neck Oncol*, 2: 15.
- Ding, S. M., A. L. Lu, W. Zhang, L. Zhou, H. Y. Xie, S. S. Zheng, and Q. Y. Li. 2018. 'The role of cancer-associated fibroblast MRC-5 in pancreatic cancer', *J Cancer*, 9: 614-28.
- Dvorankova, B., K. Smetana, Jr., B. Rihova, J. Kucera, R. Mateu, and P. Szabo. 2015. 'Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice', *Histochem Cell Biol*, 143: 463-9.
- Dvorankova, B., P. Szabo, L. Lacina, O. Kodet, E. Matouskova, and K. Smetana, 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', *Histochem Cell Biol*, 137: 679-85.
- Ellington, T. D., S. J. Henley, V. Senkomago, M. E. O'Neil, R. J. Wilson, S. Singh, C. C. Thomas, M. Wu, and L. C. Richardson. 2020. 'Trends in Incidence of Cancers of the Oral Cavity and Pharynx - United States 2007-2016', *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 69: 433-38.
- Goel, H. L., and A. M. Mercurio. 2013. 'VEGF targets the tumour cell', *Nat Rev Cancer*, 13: 871-82.
- Gonzalez, L., N. Eiro, B. Fernandez-Garcia, L. O. Gonzalez, F. Dominguez, and F. J. Vizoso. 2016. 'Gene expression profile of normal and cancer-associated fibroblasts according to intratumoral inflammatory cells phenotype from breast cancer tissue', *Mol Carcinog*, 55: 1489-502.
- Gudleviciene, Z., J. Didziapetriene, I. Mackeviciene, S. Cienas, R. Smolyakova, and A. Zhukavetc. 2014. 'Prevalence of human papillomaviruses in patients with head and neck squamous cell carcinoma in Lithuania and Belarus', *J Med Virol*, 86: 531-5.
- Hamburger, A. W., and S. E. Salmon. 1977. 'Primary bioassay of human tumor stem cells', *Science*, 197: 461-3.
- Hammarstedt, L., D. Lindquist, H. Dahlstrand, M. Romanitan, L. O. Dahlgren, J. Joneberg, N. Creson, J. Lindholm, W. Ye, T. Dalianis, and E. Munck-Wikland. 2006. 'Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer', *Int J Cancer*, 119: 2620-3.



- Hay, A., and I. J. Nixon. 2018. 'Recent advances in the understanding and management of oropharyngeal cancer', *F1000Res*, 7.
- He, H. L., Y. E. Lee, P. I. Liang, S. W. Lee, T. J. Chen, T. C. Chan, C. H. Hsing, I. W. Chang, Y. L. Shiue, and C. F. Li. 2016. 'Overexpression of JAK2: a predictor of unfavorable prognosis for nasopharyngeal carcinoma', *Future Oncol*, 12: 1887-96.
- Henley, S. J., E. M. Ward, S. Scott, J. Ma, R. N. Anderson, A. U. Firth, C. C. Thomas, F. Islami, H. K. Weir, D. R. Lewis, R. L. Sherman, M. Wu, V. B. Benard, L. C. Richardson, A. Jemal, K. Cronin, and B. A. Kohler. 2020. 'Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics', *Cancer*, 126: 2225-49.
- Ho, W. J., E. M. Jaffee, and L. Zheng. 2020. 'The tumour microenvironment in pancreatic cancer - clinical challenges and opportunities', *Nat Rev Clin Oncol*, 17: 527-40.
- Holmer, R., F. A. Goumas, G. H. Waetzig, S. Rose-John, and H. Kalthoff. 2014. 'Interleukin-6: a villain in the drama of pancreatic cancer development and progression', *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 13: 371-80.
- Hotz, B., M. Arndt, S. Dullat, S. Bhargava, H. J. Buhr, and H. G. Hotz. 2007. 'Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer', *Clin Cancer Res*, 13: 4769-76.
- Huang, S. H., and B. O'Sullivan. 2017. 'Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer', *Curr Treat Options Oncol*, 18: 40.
- Hussain, F., J. Wang, R. Ahmed, S. K. Guest, E. W. Lam, G. Stamp, and M. El-Bahrawy. 2010. 'The expression of IL-8 and IL-8 receptors in pancreatic adenocarcinomas and pancreatic neuroendocrine tumours', *Cytokine*, 49: 134-40.
- Chen, K., W. Qian, Z. Jiang, L. Cheng, J. Li, L. Sun, C. Zhou, L. Gao, M. Lei, B. Yan, J. Cao, W. Duan, and Q. Ma. 2017. 'Metformin suppresses cancer initiation and progression in genetic mouse models of pancreatic cancer', *Mol Cancer*, 16: 131.
- Chen, S., M. Wang, X. Chen, S. Chen, L. Liu, J. Zhu, J. Wang, X. Yang, and X. Cai. 2018. 'In Vitro Expression of Cytokeratin 19 in Adipose-Derived Stem Cells Is Induced by Epidermal Growth Factor', *Med Sci Monit*, 24: 4254-61.
- Chen, X., and E. Song. 2019. 'Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts', *Nat Rev Drug Discov*, 18: 99-115.
- Jiang, H., J. Yu, H. Guo, H. Song, and S. Chen. 2008. 'Upregulation of survivin by leptin/STAT3 signaling in MCF-7 cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 368: 1-5.
- Jiang, L., Z. Li, and L. Rui. 2008. 'Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways', *J Biol Chem*, 283: 28066-73.
- Kanno, A., K. Satoh, A. Masamune, M. Hirota, K. Kimura, J. Umino, S. Hamada, A. Satoh, S. Egawa, F. Motoi, M. Unno, and T. Shimosegawa. 2008. 'Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells', *Int J Cancer*, 122: 2707-18.
- Kim, H. M., W. H. Jung, and J. S. Koo. 2015. 'Expression of cancer-associated fibroblast related proteins in metastatic breast cancer: an immunohistochemical analysis', *J Transl Med*, 13: 222.
- Kim, H. W., J. C. Lee, K. H. Paik, J. Kang, J. Kim, and J. H. Hwang. 2017. 'Serum interleukin-6 is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma progression pattern', *Medicine (Baltimore)*, 96: e5926.
- Leong, K. G., K. Niessen, I. Kulic, A. Raouf, C. Eaves, I. Pollet, and A. Karsan. 2007. 'Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin', *J Exp Med*, 204: 2935-48.
- Li, H., X. Fan, and J. Houghton. 2007. 'Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer', *J Cell Biochem*, 101: 805-15.
- Lin, T. C., C. H. Yang, L. H. Cheng, W. T. Chang, Y. R. Lin, and H. C. Cheng. 2019. 'Fibronectin in Cancer: Friend or Foe', *Cells*, 9.

- Lippi, G., and C. Mattiuzzi. 2020. 'The global burden of pancreatic cancer', *Arch Med Sci*, 16: 820-24.
- Liu, C. Y., H. H. Lin, M. J. Tang, and Y. K. Wang. 2015. 'Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation', *Oncotarget*, 6: 15966-83.
- Liu, Y., F. Li, F. Gao, L. Xing, P. Qin, X. Liang, J. Zhang, X. Qiao, L. Lin, Q. Zhao, and L. Du. 2016. 'Periostin promotes tumor angiogenesis in pancreatic cancer via Erk/VEGF signaling', *Oncotarget*, 7: 40148-59.
- Lorusso, G., and C. Rugg. 2008. 'The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis', *Histochem Cell Biol*, 130: 1091-103.
- Matsuo, Y., N. Ochi, H. Sawai, A. Yasuda, H. Takahashi, H. Funahashi, H. Takeyama, Z. Tong, and S. Guha. 2009. 'CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 $\alpha$  co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer', *Int J Cancer*, 124: 853-61.
- Mechanick, J. I., S. Zhao, and W. T. Garvey. 2018. 'Leptin, An Adipokine With Central Importance in the Global Obesity Problem', *Glob Heart*, 13: 113-27.
- Metwaly, H., S. Maruyama, M. Yamazaki, M. Tsuneki, T. Abe, K. Y. Jen, J. Cheng, and T. Saku. 2012. 'Parenchymal-stromal switching for extracellular matrix production on invasion of oral squamous cell carcinoma', *Hum Pathol*, 43: 1973-81.
- Omary, M. B., A. Lugea, A. W. Lowe, and S. J. Pandol. 2007. 'The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases', *J Clin Invest*, 117: 50-9.
- Opitz, F. V., L. Haeberle, A. Daum, and I. Esposito. 2021. 'Tumor Microenvironment in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia', *Cancers (Basel)*, 13.
- Padoan, A., M. Plebani, and D. Basso. 2019. 'Inflammation and Pancreatic Cancer: Focus on Metabolism, Cytokines, and Immunity', *Int J Mol Sci*, 20.
- Papaccio, F., D. Kovacs, B. Bellei, S. Caputo, E. Migliano, C. Cota, and M. Picardo. 2021. 'Profiling Cancer-Associated Fibroblasts in Melanoma', *Int J Mol Sci*, 22.
- Park, H. Y., H. M. Kwon, H. J. Lim, B. K. Hong, J. Y. Lee, B. E. Park, Y. Jang, S. Y. Cho, and H. S. Kim. 2001. 'Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro', *Exp Mol Med*, 33: 95-102.
- Plzak, J., L. Lacina, M. Chovanec, B. Dvorankova, P. Szabo, Z. Cada, and K. Smetana, Jr. 2010. 'Epithelial-stromal interaction in squamous cell epithelium-derived tumors: an important new player in the control of tumor biological properties', *Anticancer Res*, 30: 455-62.
- Polyak, K., I. Haviv, and I. G. Campbell. 2009. 'Co-evolution of tumor cells and their microenvironment', *Trends Genet*, 25: 30-8.
- Rhim, A. D., E. T. Mirek, N. M. Aiello, A. Maitra, J. M. Bailey, F. McAllister, M. Reichert, G. L. Beatty, A. K. Rustgi, R. H. Vonderheide, S. D. Leach, and B. Z. Stanger. 2012. 'EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation', *Cell*, 148: 349-61.
- Roa-Pena, L., C. V. Leiton, S. Babu, C. H. Pan, E. A. Vanner, A. Akalin, J. Bandovic, R. A. Moffitt, K. R. Shroyer, and L. F. Escobar-Hoyos. 2019. 'Keratin 17 identifies the most lethal molecular subtype of pancreatic cancer', *Sci Rep*, 9: 11239.
- Rupp, C., M. Scherzer, A. Rudisch, C. Unger, C. Haslinger, N. Schweifer, M. Artaker, H. Nivarthi, R. Moriggl, M. Hengstschlager, D. Kerjaschki, W. Sommergruber, H. Dolznig, and P. Garin-Chesa. 2015. 'IGFBP7, a novel tumor stroma marker, with growth-promoting effects in colon cancer through a paracrine tumor-stroma interaction', *Oncogene*, 34: 815-25.
- Ryan, D. P., T. S. Hong, and N. Bardeesy. 2014. 'Pancreatic adenocarcinoma', *N Engl J Med*, 371: 2140-1.
- Shinn, J. R., S. J. Davis, K. A. Lang-Kuhs, S. Rohde, X. Wang, P. Liu, W. D. Dupont, D. Plummer, Jr., W. L. Thorstad, R. D. Chernock, M. Mehrad, and J. S. Lewis, Jr. 2021. 'Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma With Discordant p16 and HPV mRNA Results: Incidence and Characterization in a Large, Contemporary United States Cohort', *Am J Surg Pathol*, 45: 951-61.

- Schneider, I. J., M. E. Flores, D. A. Nickel, L. G. Martins, and J. Traebert. 2014. 'Survival rates of patients with cancer of the lip, mouth and pharynx: a cohort study of 10 years', *Rev Bras Epidemiol*, 17: 680-91.
- Schon, M., C. E. Klein, V. Hogenkamp, R. Kaufmann, B. G. Wienrich, and M. P. Schon. 2000. 'Basal-cell adhesion molecule (B-CAM) is induced in epithelial skin tumors and inflammatory epidermis, and is expressed at cell-cell and cell-substrate contact sites', *J Invest Dermatol*, 115: 1047-53.
- Slany, A., A. Bileck, B. Muqaku, and C. Gerner. 2015. 'Targeting breast cancer-associated fibroblasts to improve anti-cancer therapy', *Breast*, 24: 532-8.
- Smith, E. M., J. M. Ritchie, K. F. Summersgill, J. P. Klussmann, J. H. Lee, D. Wang, T. H. Haugen, and L. P. Turek. 2004. 'Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers', *Int J Cancer*, 108: 766-72.
- Sugano, G., I. Bernard-Pierrot, M. Lae, C. Battail, Y. Allory, N. Stransky, S. Krumeich, M. L. Lepage, P. Maille, M. H. Donnadieu, C. C. Abbou, S. Benhamou, T. Lebret, X. Sastre-Garau, S. Amigorena, F. Radvanyi, and C. Thery. 2011. 'Milk fat globule--epidermal growth factor--factor VIII (MFGE8)/lactadherin promotes bladder tumor development', *Oncogene*, 30: 642-53.
- Sun, Y. 2015. 'Translational horizons in the tumor microenvironment: harnessing breakthroughs and targeting cures', *Med Res Rev*, 35: 408-36.
- Sundquist, E., J. H. Kauppila, J. Veijola, R. Mroueh, P. Lehenkari, S. Laitinen, J. Risteli, Y. Soini, V. M. Kosma, I. Sawazaki-Calone, C. C. Macedo, R. Bloigu, R. D. Coletta, and T. Salo. 2017. 'Tenascin-C and fibronectin expression divide early stage tongue cancer into low- and high-risk groups', *Br J Cancer*, 116: 640-48.
- Tong, J., S. Mou, L. Xiong, Z. Wang, R. Wang, A. Weigand, Q. Yuan, R. E. Horch, J. Sun, and J. Yang. 2018. 'Adipose-derived mesenchymal stem cells formed acinar-like structure when stimulated with breast epithelial cells in three-dimensional culture', *PLoS One*, 13: e0204077.
- Watt, D. M., and J. P. Morton. 2021. 'Heterogeneity in Pancreatic Cancer Fibroblasts-TGFbeta as a Master Regulator?', *Cancers (Basel)*, 13.
- Whatcott, C. J., C. H. Diep, P. Jiang, A. Watanabe, J. LoBello, C. Sima, G. Hostetter, H. M. Shepard, D. D. Von Hoff, and H. Han. 2015. 'Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer', *Clin Cancer Res*, 21: 3561-8.
- Wu, R., T. Wu, K. Wang, S. Luo, Z. Chen, M. Fan, D. Xue, H. Lu, Q. Zhuang, and X. Xu. 2018. 'Prognostic significance of galectin-1 expression in patients with cancer: a meta-analysis', *Cancer Cell Int*, 18: 108.
- Xiong, Y., J. Zhang, M. Liu, M. An, L. Lei, and W. Guo. 2014. 'Human leptin protein activates the growth of HepG2 cells by inhibiting PERKmediated ER stress and apoptosis', *Mol Med Rep*, 10: 1649-55.
- Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck. 2009. 'TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition', *Cell Res*, 19: 156-72.
- Yadav, D., and A. B. Lowenfels. 2013. 'The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer', *Gastroenterology*, 144: 1252-61.
- Yang, J., L. Xiong, R. Wang, Q. Yuan, Y. Xia, J. Sun, and R. E. Horch. 2015. 'In vitro expression of cytokeratin 18, 19 and tube formation of adipose-derived stem cells induced by the breast epithelial cell line HBL-100', *J Cell Mol Med*, 19: 2827-31.
- Yang, Z. T., S. Y. Yeo, Y. X. Yin, Z. H. Lin, H. M. Lee, Y. H. Xuan, Y. Cui, and S. H. Kim. 2016. 'Tenascin-C, a Prognostic Determinant of Esophageal Squamous Cell Carcinoma', *PLoS One*, 11: e0145807.
- Yoshida, T., T. Akatsuka, and K. Imanaka-Yoshida. 2015. 'Tenascin-C and integrins in cancer', *Cell Adh Migr*, 9: 96-104.
- Yu, L., and W. Li. 2022. 'Abnormal activation of notch 1 signaling causes apoptosis resistance in cervical cancer', *Int J Clin Exp Pathol*, 15: 11-19.

Zeng, Y., M. Zou, Y. Liu, K. Que, Y. Wang, C. Liu, J. Gong, and Y. You. 2020. 'Keratin 17 Suppresses Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer', *Front Med (Lausanne)*, 7: 572494.

### 8.1 Publikace, které jsou podkladem disertace

Desmoplastic crosstalk in pancreatic ductal adenocarcinoma is reflected by different responses of Panc-1, MIAPaCa-2, PaTu-8902, and CAPAN-2 cell lines to cancer-associated/normal fibroblasts.

Novak, S., Kolar, M., Szabo, A., Vernerova, Z., Lacina, L., Strnad, H., Sachova, J., Hradilova, M., Havranek, J., Spanko, M., Coma, M., Urban, L., Kanuchova, M., Melegova, N., Gurlich, R., Dvorak, J., Smetana jr., K., Gal, P., Szabo, P. *Cancer Genomics and Proteomic* 2021, 18(3), pp. 221–243  
IF 3.395

Detection of distinct changes in gene-expression profiles in specimens of tumors and transition zones of tenascin-positive/-negative head and neck squamous cell carcinoma.

Zivicova, V., Gal, P., Mifkova, A., Novak, S., Kaltner, H., Kolar, M., Strnad, H., Sachova, J., Hradilova, M., Chovanec, M., Gabius, H-J., Smetana jr., K., Zdenek, F., *Anticancer Research*, 2018, 38(3), pp. 1279–1290  
IF 1,935

### 8.2 Publikace bez vztahu k disertaci

Molecular changes underlying hypertrophic scarring following burns involve specific deregulations at allwound healing stages (inflammation, proliferation and maturation).

Coma, M., Frohlichova, L., Urban, L., Zajicek, R., Urban, T., Szabo, P., Novak, S., Fetissof, V., Dvorankova, B., Smetana jr., K., Gal, P. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(2), pp. 1–20, 897  
IF 6,208

The role of fine-needle aspiration biopsy (FNAB) in the diagnostic management of parotid gland masses with emphasis on potential pitfalls.

Dostalova, L., Kalfert, D., Jechova, A., Koucky, V., Novak, S., Kuchar, M., Zabrodsky, M., Novakova Kodetova, D., Ludvikova, M., Kholova, I., Plzak, J. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2020, 277(6), pp. 1763–1769  
IF 2,503

The role of fine-needle aspiration biopsy (FNAB) in Warthin tumour diagnosis and management.

Jechova, A., Kuchar, M., Novak, S., Koucky, V., Dostalova, L., Zabrodsky, M., Kalfert, D., Plzak, J. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2019, 276(10), pp. 2941–2946  
IF 1.809

How Signaling Molecules Regulate Tumor Microenvironment: Parallels to Wound Repair.

Gal, P., Varinska, L., Faber, L., Novak, S., Szabo, P., Mitrengova, P., Mirossay, A., Mucaji, P., Smetana jr., K.  
Molecules, 2017, 22(11), 1818  
IF 3,098

Adenoid cystic carcinoma of the auricle.  
Novak, S., Fik, Z., Kalfert, D., Lukes, P., Plzak, J.  
Otorinolaryngologie a Foniatrie, 2017, 66(3), pp. 148–151  
IF: 0