

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

ANATOMICKÝ ÚSTAV 1.LF UK A
DERMATOVENEROLOGICKÁ KLINIKA 1.LF UK A VFN

DIZERTAČNÍ PRÁCE

GLYKOBIOLOGIE EPIDERMIS
ZA FYZIOLOGICKÝCH A PATOLOGICKÝCH PODMÍNEK

MUDr. LUKÁŠ LACINA

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOLOGIE A PATOLOGIE BUŇKY

HLAVNÍ ŠKOLITEL: Prof. MUDr. KAREL SMETANA JR., DrSc.
ŠKOLITEL : Prof. MUDr. JIŘÍ ŠTORK, CSc.

PRAHA

2008

Obsah

1. Poděkování	3
2. Cíle práce.....	4
3. Publikované práce autora se vztahem k tématu dizertace.....	5
4. Glykobiologie a lektinomika	6
4.1 Lektiny	8
4.2 Galektiny.....	9
5. Bazocelulární karcinom	12
5.1 Imunohistochemické nálezy u bazocelulárního karcinomu.....	14
5.2 Genodermatózy, molekulárně biologický model vzniku bazaliomu.....	15
6. Nádorové stroma, organizace a funkce	18
6.1 Vznik a rozvoj nádorového stromatu	19
6.1.1 Lokální mezenchym a jeho role při vzniku nádorového stromatu	19
6.1.2 Epitelo-mezenchymový přechod a jeho možná role při vzniku stromatu	23
6.1.3 Příspěvek prekursorů z kostní dřene k formování nádorového stromatu	25
6.1.4 Buněčná fúze jako původce vzniku nádorového stromatu.....	26
6.2 Nádorové stroma bazocelulárního karcinomu	26
7. Psoriasis	28
8. Kmenové buňky.....	30
8.1 Kmenové buňky v epidermis	31
8.2 Znaky kmenových buněk v epidermis	33
8.3 Nádorové kmenové buňky	35
9. Materiál a metody	36
9.1 Použitý biologický materiál	36
9.2 Kultivace buněk	37
9.3 Histochemie	39
9.4 Lektinová histochemie.....	41
9.5 Průtoková cytometrie (FACS)	41
9.6 Statistické hodnocení klinicko-patologických parametrů.....	42
10. Výsledky jednotlivých prací, diskuze a citační ohlas (WoS).....	43
11. Souhrn	59
12. Summary	59
13. Literatura	61
14. Soubor publikovaných prací.....	74

1. Poděkování

Mé vřelé díky za mnoho cenných rad, trvalou podporu, porozumění a vytvoření optimálních pracovních podmínek, které umožnily sepsání této dizertace, patří na prvním místě oběma mým školitelům - a sice Prof. MUDr. Karlu Smetanovi Jr., DrSc. z Anatomického ústavu 1.LF UK a Prof. MUDr. Jiřímu Štorkovi, CSc. - přednostovi Dermatovenerologické kliniky 1.LF UK a VFN.

Neocenitelné profesionální rady a praktickou pomoc mi dále poskytly v oblasti tkáňových kultur RNDr. Barbora Dvořánková, PhD. a v oblasti klinické dermatonkologie Prim. MUDr. Ivana Krajsová, MBA.

Dále můj dík patří i mým nejbližším spolupracovníkům MUDr. Zuzaně Plzakové, PhD, MUDr. Martinu Chovancovi, PhD a MUDr. Zdeňku Čadovi.

Zvláštní poděkování patří Prof. Hansi-Joachim Gabiusovi a jeho spolupracovníkům z Univerzity Ludwiga Maxmiliána v Mnichově za laskavé poskytnutí části materiálu užitého ve studiích.

Rukopis této práce laskavě pročetli a připomínkami opatřili Doc. MUDr. Růžena Pánková, CSc. a Prof. MUDr. Oldřich Eliška DrSc, za což jim oběma patří můj dík.

V neposlední řadě je nutno vzpomenout skvělou technickou asistenci, kterou při odběru a zpracování materiálu prováděly paní Eva Vancová, Iva Burdová, Marie Šlajsová, Irena Bulínová a pan Bc. Vít Hajdúch.

Prohlašuji, že tuto předloženou dizertační práci jsem vypracoval samostatně a použil jsem jen prameny, které cituji a uvádím v seznamu literatury.

V Praze 31/08/2008

MUDr. Lukáš Lacina

2. Cíle práce

Onemocnění kůže jsou etiologicky velmi heterogenní povahy a souhrnně patří mezi nejčastější lidská onemocnění vůbec. Toto spektrum zahrnuje choroby vrozené i získané. Biologická povaha těchto patologických stavů je různá, pohybuje se tedy od stavů zcela benigních až po vysoce maligní.

Mezi maligní nádorová onemocnění kůže patří například bazocelulární karcinom. Jedná se o vůbec nejčastější maligní nádor postihující evropskou populaci. Ve srovnání s jinými primárními nádory kůže, například s maligním melanomem, či karcinomem z Merkelových buněk, je bazocelulární karcinom relativně málo agresivní onemocnění. Jeho význam je ale zcela nezanedbatelný s ohledem na již zmíněnou vysokou incidenci a celkové náklady plynoucí z jeho léčby (Sterry 2007). Tyto důvody mne vedly k tomu, abych ve své práci zvolil právě bazocelulární karcinom jako jedno z modelových onemocnění.

Některá onemocnění *per se* jsou naopak biologicky povahy zcela benigní, avšak jejich chronický průběh může být doprovázen rozvojem závažných sekundárních komplikací. Stejně tak psychosocioekonomický dopad i zcela benigního nenádorového onemocnění může být v konečném efektu pro pacienta devastující. Vhodným modelem pro takovéto onemocnění s vysokou incidencí, benigním průběhem ale závažným dopadem na život pacienta je psoriáza, lupénka (Augustin et al., 2008). Proto jsem právě ji zvolil jako druhý modelový patologický stav.

Lze předpokládat, že detailní porozumění biologickým pochodům v kůži za fyziologických i za patologických podmínek může vést ke zlepšení stávajících diagnostických a terapeutických možností medicíny.

Ve své práci jsem se zaměřil na sledování následujících okruhů otázek:

- Studium glykofenotypu lidské kůže pomocí exprese a vazby endogenních lektinů (jmenovitě galektin-1, galektin-2, galektin-3 a galektin-7) za fyziologických podmínek se zvláštním zřetelem na využití těchto markerů zejména ke studiu diferenciaci epidermis
- Srovnání výsledků zjištěných v normálních tkáních se zvolenými modelovými patologickými stavy (bazocelulární karcinom a psoriáza)
- Srovnání výsledků zjištěných v normálních i patologických tkáních a za standardních kultivačních podmínek *in vitro* s experimentálně simulovanými patologickými situacemi *in vitro*

3. Publikované práce autora se vztahem k tématu dizertace

Níže uvedené práce jsou řazeny chronologicky, v textu jsou označeny římskými číslicemi, v závorce je uvedena hodnota impakt faktoru, kopie článků jsou přiřazeny na konci této dizertace a tvoří její nedílnou součást.

- I. Dvořánková B, Smetana K Jr., Chovanec M, **Lacina L**, Štork J, Plzánková Z, Galovičová M, Gabius HJ: Transient expression of keratin K19 is induced in originally negative interfollicular epidermal cells by adhesion of suspended cells. *Int. Molec. Med.* 2005,16, p. 525-531. **(IF 2.090)**
- II. **Lacina L**, Plzánková Z, Smetana K Jr., Štork J, Kaltner H, André S: Glycophenotype of Psoriatic Skin. *Folia Biologica, (Praha)* 2006 , 52, p. 10-15. **(IF 0.387)**
- III. **Lacina L**, Smetana K Jr., Dvořánková B, Štork J, Plzánková Z, Gabius HJ: Immunocyto- and histochemical profiling of nucleostemin expression: Marker of epidermal stem cells? *J Dermatol Sci*, 2006, 44(2), p. 73-80. **(IF 2.636)**
- IV. **Lacina L**, Smetana K Jr, Dvořánková B, Pytlík R, Kideryová L, Kučerová L, Plzánková Z, Štork J, Gabius HJ, André S: Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *Brit J Dermatol* 2007, 156: p. 819-829. **(IF 3.503)**
- V. **Lacina L**, Dvořánková B, Smetana K Jr, Chovanec M, Plzák J, Tachezy R, Kideryová L, Kučerová L, Čada Z, Bouček J, Kodet R, André S, Gabius HJ: Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture. *Int Radiation Biol*, 2007,83: p. 837-848, **(IF 1.468)**
- VI. Smetana K Jr, Dvořánková B, **Lacina L**, Čada Z, Vonka V. Human hair follicle and interfollicular keratinocyte reactivity to mouse HPV16-transformed cells: An in vitro study. *Oncol Rep*, 2008, 20(1), p. 75-80. **(IF 1.597)**
- VII. Dvořánková B, **Lacina L**, Smetana K Jr, Lensch M, Manning JC, André S, Gabius HJ. Human galectin-2: nuclear presence in vitro and its modulation by quiescence/stress factors. *Histol Histopathol*, 2008, 23(2), p. 167-78. **(IF 2.007)**
- VIII. Čada Z, Chovanec M, Smetana K Jr., Betka J, **Lacina L**, Plzák J, Kodet R, Štork J, Lensch M, Kaltner H, André S, Gabius HJ. Galectin-7: Will the lectin's activity establish clinical correlations in head and neck squamous and basal cell carcinomas? *Histol Histopathol*, 2008.(in press). **(IF 2.007)**

4. Glykobiologie a lektinomika

Molekulární biologie byla dlouhá léta zaměřena na sledování základní linie uchování genetické informace mezi nukleovými kyselinami (replikace, transkripce a reverzní transkripce) a realizaci této informace při syntéze proteinů (translace). Stejně intenzivně byly posléze sledovány i zpětnovazebné regulační mechanismy. S rostoucí sumou poznatků se ukázalo, že důležitou podmínkou správného fungování některých proteinů není jen jejich struktura vyplývající z přesné translace, ale že svou roli sehrávají i další strukturní úpravy, které přímo nevyplývají ze sekvence genu pro daný protein.

Kromě syntézy a degradace proteinových produktů tedy přicházejí do úvahy při regulaci biologických systémů i mechanismy jemnější, často reverzibilní, které umožňují rychleji (v porovnání se syntézou proteinu *de novo*) reagovat na změnu podmínek a přispívat tak k udržení buněčné homeostázy.

Tyto takzvané posttranslační modifikace byly patrně nejnázorněji prostudovány na příkladu fosforylací a defosforylací, které významně regulují mnoho důležitých biologických pochodů. Je tedy zcela evidentní, že stejná struktura může díky této velmi jednoduché modifikaci (ve smyslu Booleovské logiky) nabývat dvou hraničních funkčních stavů. Adicí několika stejných či různých chemických skupin může být dále dosaženo jemnější regulace biologického děje.

Z pohledu kombinatoriky a bioinformatiky mohou různé chemické sloučeniny představovat jakýsi „*hardware*“ používaný k nakládání s informací v biologických procesech. Požadavky na kódování v takovýchto systémech zahrnují především vysokou afinitu chemických vazeb při dekódování uložené informace, která eliminuje riziko neurčitých, či chybných interpretací. Další výhodou je vysoká denzita informačního kódu, která snižuje energetické nároky na uchování a přenos informace. Poslední podmínkou je i snadná dostupnost takovéto molekuly v buňce a možnost její jednoduché modifikovatelnosti (Gabiuss et al., 2004).

Uvážíme-li tyto podmínky, pak lze jednotlivé třídy sloučenin, které se běžně vyskytují v buňkách, porovnat (s ohledem na výše uvedená kritéria) jako nosiče biologické informace. Budeme-li zvažovat například krátkou šestičlennou sekvenci nukleotidů (oligonukleotid), pak je z běžně se vyskytujících nukleotidů (adenin, thymin, cytosin, guanin) možno vytvořit 4096 různých variant (tj. počet permutací = 4^6). Pokud budeme sledovat počet permutací, které je možno teoreticky odvodit z 20

α -aminokyselin při sestavování šestičlenné peptidové sekvence, pak se dostáváme k počtu 20^6 , tedy $6,4 \times 10^7$. V obou případech se ale monomery vyznačují tendencí pouze k lineárnímu řetězení. Pokud tyto počty permutací budeme stanovovat pro sacharidy, musíme uvážit, že každá z běžně se vyskytujících např. hexóz nabízí k utvoření glykosidové vazby hned několik hydroxylových skupin. Navíc je třeba uvážit, že u sacharidů je velmi běžné větvení řetězců. Tato strukturní variabilita vede nakonec při sledování počtu permutací oligomeru (hexasacharidu) utvořeného kombinací (pro lepší srovnatelnost s aminokyselinami) 20 monosacharidů k číslu $1,44 \times 10^{15}$. O další dva řády se tento počet zvětší při uvážení dalších běžně se vyskytujících modifikací sacharidového řetězce například sulfatací (Laine 1990). Ve skutečnosti je sice v přírodě známo asi 200 monosacharidů, běžně se vyskytujících v glykokonjugátech a tudíž i biologicky významných je naštěstí méně než 10.

Z uvedeného poměru vyplývá, že sacharidy velmi dobře splňují podmínky pro fungování v roli nosiče biologické informace a že tedy mohou disponovat obrovským informačním potenciálem. I jemná změna struktury, či dokonce jen konformace téže molekuly může být nositelem signálu. Do současné doby ale neexistuje přesný odhad množství informace, která je tímto způsobem kódována v reálných biologických systémech.

Studium uchování a realizace genetické informace vyústilo nakonec nejen v nutnost zkoumání jednotlivých funkčních jednotek (genů), ale i komplexně celé geneticky kódované informace, tedy ve studium genomu. Velmi záhy se ale vyskytla potřeba korelace mezi daty, která přinesla genomika, a jejich buněčnou realizací ve formě proteinů. Tato potřeba vedla postupně od určení a popisu struktury a funkcí jednotlivých proteinů ke snahám o popsání celého proteinového repertoáru (proteomu) buňky. Podle některých genomických údajů až 1% veškerých ORF (*open reading frame*) obsažených v genomu patří enzymům, které jsou schopny katalyzovat tvorbu glykosidové vazby. Databáze CAZY (*Carbohydrate-Active enZymes*) obsahuje přes 5000 předpokládaných genových produktů, do současnosti je známa struktura a funkce jen asi 10%. Pokud dále uvážíme, že více než polovina veškerých proteinů ve své v primární struktuře obsahuje sekvenci Asn-X-Ser/Thr, která je považována za predilekční místo N-glykosylace, je evidentní, že je nutné věnovat těmto modifikacím velkou pozornost (von der Lieth et al., 2004). Pokud tedy závěrem přijmeme fakt, že strukturní (posttranslační) modifikace se vyskytují často a že glykokonjugáty mohou dramaticky ovlivňovat buněčné děje, pak ale oprávněně

vyvstává i analogická potřeba jejich mapování a stanovení „glykomu“ (Rüdiger a Gabius 2001).

4.1 Lektiny

Lektiny představují specifickou skupinu proteinů schopných vázat molekuly sacharidů mechanismem, který je odlišný od reakce antigen-protilátka a nejedná se ani o enzymatickou vazbu. Lektiny jsou schopny vázat jednotlivé monosacharidy, ale přirozenými endogenními ligandy jsou sacharidové skupiny přítomné na molekulách nejrůznějších glykokonjugátů (např. glykoproteinů etc.).

Zájem o lektiny a jejich funkce se datuje již do 19. století. V roce 1888 Peter Hermann Stillmark ve své dizertační práci popsal aglutinaci erytrocytů, která byla vyvolána přidáním extraktu ze skočce (*Ricinus communis*) k suspenzi erytrocytů. Současně se mu podařilo izolovat z tohoto extraktu substanci, *hemagglutinin*, který byl zodpovědný za tento efekt – ricin (Sharon a Lis 2004). Nezávisle na těchto objevech, či dokonce dříve, byla popsána obdobná schopnost u některých látek živočišného původu, zejména u hadích jedů (S. Weir Mitchel 1897 resp. 1886, ačkoli autoři při popisu tohoto fenoménu explicitně neuvádějí termín hemagglutinaace, detailní popis publikovali v tomto smyslu až v roce 1902 Flexner a Noguchi) (Kilpatrick 2002).

Poměrně záhy bylo poukázáno na heterogenní charakter reakce téhož hemagglutininu použitého v reakci s erytrocyty různých živočišných druhů (Landsteiner a Raubitschek 1907). Ve 40. letech 20. století bylo prokázáno, že některé rostlinné substance aglutinují nestejně humánní erytrocyty různých krevních skupin, například hemagglutinin *Phaseolus limensis* shlukuje nejlépe erytrocyty krevní skupiny A, hemagglutinin *Lotus tetragonolobus* erytrocyty skupiny 0, *Griffonia simplicifolia* se skupinou B. Bylo prokázáno, že aglutinin připravený z *Dolichos biflorus* výrazně lépe reaguje s erytrocyty krevní podskupiny A1 než A2. Velmi subtilní rozdíly detekovatelné pomocí těchto substancí vedly i ke vzniku termínu lektin, který je odvozen od latinského slovesa *legere*, vybírat (Boyd a Shapleigh 1954). V padesátých letech dále prokázali W.J.T. Morgan a W.M. Watkins, že tyto lektinové hemagglutinační reakce mohou být účinně inhibovány přidáním vhodných sacharidových epitopů (např. N-acetyl-D-galaktosamin inhibuje hemagglutinační reakci lektinu z *Phaseolus limensis* s erytrocyty skupiny A, L-fukosa inhibuje reakci lektinu *Lotus tetragonolobus* s erytrocyty skupiny 0).

Později se prokázalo, že lektiny jsou schopny rozdílně aglutinovat i normální a nádorové buňky (Aub 1963).

V 60. letech byla popsána i schopnost lektinů ovlivňovat buněčný cyklus lymfocytů, byl prokázán účinek phytohemagglutininu (z *Phaseolus vulgaris*) jako mitogenu (Nowell 1960).

Postupně bylo prozkoumáno velké množství lektinů a byla určena i jejich specifická vůči nejrozličnějším sacharidovým motivům. Stále větší pozornost byla věnována i hledání a studiu lektinů ve tkáních živočišného původu. V roce 1974 byl popsán poprvé u savců lektin izolovaný z králičích jater (*mammalian hepatic lectin*, asialoglykoproteinový receptor) (Stockert et al., 1974), což vedlo ke zvýšenému zájmu o lektiny jako o molekuly schopné rozpoznávat specifické strukturní motivy. V roce 1975 byl popsán první živočišný lektin vážící galaktosu a galaktosidy (elektrolektin) (Teichberg et al., 1975). Tento typ lektinů označovaných jako „endogenní solubilní lektiny, galaptiny, nebo β -galaktosidy vážící lektiny“ se ukázal v příštích letech jako dominantní skupina, která je přítomna prakticky univerzálně v tkáních obratlovců (Harrisson 1991). Přístup studující lektiny a jejich pomocí i glykokonjugátový repertoár buňky byl označen jako „*lektinomika*“. Lektiny tedy můžeme chápat jako překladače „*glykokódu*“, informace v něm uložená může ovlivňovat nejrozličnější biologické pochody (Gabijs 2002). Lektinů lze relativně jednoduše využít při histochemických a cytochemických technikách a zdá se, že jejich význam v této oblasti vzrůstá (Smetana a André, 2008). Nejdůležitějším úkolem ale zůstává porozumění funkcím endogenních lektinů přímo v savčích buňkách.

4.2 Galektiny

Termín „galektin“ se užívá od roku 1994, kdy nahradil do té doby užívaný termín S-lektin (Barondes et al., 1994), pro proteiny vyznačující se afinitou ke galaktosidům a strukturní homologií své domény pro rozpoznávání sacharidů (CRD, *carbohydrate recognition domain* o délce cca. 135 aminokyselin). Toto označení sjednotilo nejrozličnější tradiční historické názvy a zpřehlednilo tak situaci. Proteiny vyznačující se strukturní homologií avšak bez schopnosti vázat galaktosid označujeme jako galektinům podobné proteiny (*galectin-like protein*). Tato dvojitá definiční podmínka se ukazuje jako velmi relevantní zejména s ohledem na fylogenetické stáří této

proteinové rodiny, sekvenční analýzou jsou totiž zaznamenány pochopitelně určité rozdíly, avšak jejich funkční specifikace zůstává zachována.

Zájem o živočišné lektiny se odvíjel od jejich předpokládané role při vazbě buněk k jiným buňkám či komponentám extracelulární matrix. Jednoduché biochemické postupy jako separace na kolonách pomocí navázaných galaktosidů za různých podmínek vedly k izolaci velkého množství podobných substancí. I původní název S-lektiny pochází z tohoto období, váže se k podmínkám izolace prvního známého galektinu (galektinu-1) v redukčním prostředí (tj. se zachovanou sulfhydrylovou – SH skupinou); toto, jak bylo až později objeveno, není podmínkou platnou u jiných galektinů. Teprve sekvenční analýza aminokyselinových řetězců dokázala přesně určit identitu jednotlivých extraktů a určit míru jejich homologie.

Základní struktura galektinů je velmi konzervovaná, obsahuje jednu, či dvě sacharidy rozpoznávající domény (CRD) a krátký, či dlouhý relativně flexibilní peptidový řetězec. Za biologickou aktivitu je zodpovědná právě CRD doména, která je tvořena 5 až 6 složenými peptidovými řetězci („*sandwich*“) s motivem β -skládaného listu. Tato doména je schopna rozpoznávat strukturu N-acetyllaktosaminu, afinita této vazby je ale relativně nízká (90-100 μ M), afinita vazby na glykoproteiny s polylaktosaminovou sekvencí je ale mnohem vyšší ($K_d = 1 \mu$ M) (Cho a Cummings 1995, Hirabayashi et al., 2002)

Galektiny se mohou vyskytovat jako mono- či oligomery, tyto stavy jsou závislé i na jejich koncentraci, či přítomnosti ligandu. Galektiny jsou schopny vytvářet mezi glykokonjugáty příčné vazby („*crosslinking*“), tyto děje mohou například na membránách vést k mikrosegregaci receptorů do funkčních domén a tak účinně regulovat buněčné pochody závislé na transdukci signálu (Brewer 2002).

Klasicky se galektiny dělí podle uspořádání (Hirabayashi a Kasai 1993) do tří podskupin a sice:

- I) „**prototype**“ – s jednou CRD doménou (gal-1,-2,-5,-7,-10,-13,-14)
- II) „**tandem repeat**“ - dvě různé CRD domény na témže polypeptidovém řetězci, kterou jsou vzájemně odlišné a jsou odlišné i od jiných galektinů (gal-4,-6,-8,-9,-12)
- III) „**chimera**“ kromě CRD ještě jinou doménu (gal-3,-15) (Cooper 2002).

Zařazení do těchto podskupin je čistě důsledkem struktury, nevypovídá o sekvenční homologii, ani o detailech vazby na specifické motivy. Toto rozdělení je platné pro

galektiny savců (Houzelstein et al., 2004). U ortologů původem z jiných živočišných druhů, zejména bezobratlých, bylo stanovení přesné sekvence a jejich vztahu k humánním formám v čase jejich objevu příliš komplikované, proto se objevila nomenklatura pro ně specifická (např. LEC-1, LEC-2 atd. v případě *C. elegans*), ačkoli v současnosti je tato sekvenční shoda a ortologie již často známa.

Galektiny jsou evolučně velmi starou a značně konzervovanou rodinou proteinů. Nástrojem k posouzení jejich příbuznosti je porovnání sekvence sacharidy rozpoznávající domény CRD, míra shody mezi humánní a myší formou je u většiny přes 80%, což odpovídá přibližně evoluční konzervovanosti hemoglobinu. (Leffler et al., 2004).

Přes tuto strukturní podobnost jsou funkce galektinů různorodé jak intracelulárně (Paterson et al., 2004), tak (ačkoli postrádají signální sekvenci a jejich sekrece je tak nekanonická) i extracelulárně (Ochieng et al., 2004). Galektiny ovlivňují například adhezi buněk (Brewer 2002), signální transdukcí (Shalom-Feuerstein et al., 2005), regulaci apoptózy (Nakahara et al., 2005) a buněčného cyklu. Galektiny se účastní kromě regulace pre- i postnatální homeostázy normálních tkání i v mnoha rolích procesů patologických, jako je třeba autoimunita (Buzas et al., 2006), či maligní bujení (Lahm et al., 2004)

Ve vrstevnatých dlaždicových epitelech byly intenzivně studovány zejména galektin-1, galektin-3 a galektin-7 (Smetana et al., 2003). Při těchto studiích byl potvrzen předpoklad, že postupná diferenciací epitelových buněk je doprovázena i změnou glykokonjugátových motivů (Villalobo et al., 1998). V normální epidermis bylo zjištěno, že galektin-1, stejně jako jeho reaktivní sacharidové epitopy jsou exprimovány v buňkách bazální a suprabazální vrstvy, obdobně jako galektin-7; galektin-3 a jeho reaktivní epitopy byly detekovány striktně suprabazálně (Plzák et al., 2000). Diferenciální glykosylace detekovaná lektinovou histochemií galektinu-3 je senzitivním nástrojem ke studiu diferenciací, což bylo potvrzeno i klinickou studií, ve které bylo sledováno přežívání pacientů v závislosti na glykobiologickém profilu nádoru. Detekce volných vazebných míst pro galektin-3 může sloužit jako prognostický ukazatel u dlaždicových nádorů hlavy a krku (Plzák et al., 2004).

Přítomnost galektinů v jádře byla studována nejvíce na příkladech galektinu-1 a galektinu-3 (Wang et al., 2004). Předpokládá se, že hrají roli zejména při sestřihu pre-mRNA.

5. Bazocelulární karcinom

Bazocelulární karcinom kůže (bazaliom) je nejčastějším humánním maligním tumorem vůbec (Bath-Hextall et al., 2007). Histogeneze tohoto nádoru není dodnes zcela objasněna, někteří autoři kladou jeho vznik do interfolikulární epidermis, podle jiných názorů má blíže ke strukturám vlasového folikulu. Jeho incidence se v posledních desetiletích významně zvyšuje, i když rozptyl udávané incidence v jednotlivých studiích je relativně široký. Tato fakta jsou dávana do souvislosti se změnami environmentálního i behaviorálního charakteru. Faktorem, který komplikuje přesnější epidemiologické sledování, je způsob hlášení těchto nádorů do národních, či centrálních onkologických registrů. V případě, že jsou tyto neoplázie vůbec hlášeny, bývají udávány souhrnně pod statistickou značkou MKN-10/ICD-10 (Mezinárodní klasifikace nemocí/International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) C44.0-44.9, která ovšem zahrnuje obecně jakékoli nádory kůže a kožních adnex, mimo maligní melanom, a další určené maligní choroby (např. kožní sarkomy a lymfomy). Tyto diagnózy negativně vymezují skupinu takzvaných nemelanomových nádorů kůže (*non-melanoma skin cancer*), ročně jich je zaznamenáno v USA podle American Cancer Society asi 1 milion případů. Bazocelulární karcinom přitom souhrnně představuje až asi 80% hlášených případů těchto nádorů (<http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2006PWSecured.pdf>). Problémem ale zůstává definice a hodnocení některých těžkých dysplázií a nádorů ve stádiu *carcinoma spinocelulare in situ* (Ackermann a Mones 2006). V případě, že akceptujeme toto extenzivní pojetí definice dlaždicového karcinomu kůže, mohou být tyto poměry významně odlišné.

Ve vyspělých zemích v poslední dekádě je incidence bazocelulárního karcinomu udávána od 72,6/100 000 obyvatel (Katalinic et al., 2003) do 309/100 000 (Karagas et al., 1999). Z tohoto rozmezí se výrazněji vymykají hodnoty uváděné zejména autory z Austrálie, kteří udávají incidenci v některých kohortách až 2058 případů/100 000 obyvatel (Buettner et al., 2001), i když právě v této oblasti zaznamenaly některé studie určité změny dynamiky vývoje incidence v mladších věkových kategoriích, což lze interpretovat jako první projevy úspěšnosti preventivních zdravotnických akcí (Staples et al., 2006)

Odhaduje se, že meziroční nárůst incidence bazocelulárního karcinomu v některých geografických oblastech může dosahovat až 10%, kumulativní riziko rozvoje tohoto

onemocnění je stanoveno až na 30% (Raasch et al., 2006). Ačkoli je mortalita asociovaná s bazocelulárním karcinomem relativně nízká, představuje morbidita a náklady z ní plynoucí významnou zátěž pro zdravotnické systémy (Wilkinson et al., 2006, Sterry 2007).

Rizikovým faktorem rozvoje nemelanomových nádorů kůže je především dlouhodobá expozice záření, významná je zejména ultrafialová (UV) složka světelného záření (Rigel 2008). Je třeba upozornit, že i některé terapeutické postupy užívané v dermatologii zvyšují toto riziko, kromě vlastní fototerapie UV zářením se jedná i o kombinaci s užitím psoralenů (PUVA), či aplikací dehtů (Göckermannova metoda) (Tilli et al., 2005). Další významný faktor rozvoje nemelanomových nádorů kůže představuje například dlouhodobá imunosuprese (Euvrard et al., 2003), či chronická expozice sloučeninám arzenu (Anetor et al., 2007, Kitchin et al., 2008) a jiným polutantům (Suarez et al., 2007, Mitropoulos a Norman, 2005), uvažována je stále i role humánních papilomavirů (Bouwes Bavinck et al., 2008). Jsou známy i genetické predispozice ke vzniku těchto nádorů (genodermatózy). V posledním desetiletí byly učiněny zásadní pokroky pro pochopení etiopatogeneze tohoto onemocnění až k molekulárně biologické úrovni. Některé tyto poznatky se již podařilo implementovat do terapeutických postupů (Saldanha et al., 2003).

Základem pro výběr správného postupu při léčbě pacienta stále zůstává histologicky správné a přesné zhodnocení. V současné době existuje několik klasifikačních schémat, za velmi vhodný lze označit protokol navržený *The Royal Colledge of Pathologists* (Slater a McKee, 2002), který je kompatibilní s klinickými doporučenými postupy (*Clinical guidelines*) vydanými Britskou dermatologickou společností (Telfer et al., 2008).

Tradičně je základní dichotomický postup při diagnostice bazocelulárního karcinomu zahajován rozhodnutím, zda jde o tumor splňující požadavky pro jeho bližší histologické zařazení k některé z diferenciacních linií základní buněčné populace epidermis a jejích adnex (např. ekrinní, sebaceózní), nebo se jedná o tumor bez možnosti dalšího diferenciacního určení, tedy odpovídající kategorii *basalioma solidum*.

Toto zhodnocení má význam zejména s ohledem na diferenciacní diagnostiku a vymezení bazocelulárního karcinomu vůči nádorům vycházejícím z kožních adnex tj. nádorů apokrinních, ekrinních, folikulárních, či dokonce tumorů vycházejících z vedlejších buněčných populací (např. karcinom z Merkelových buněk).

V rámci spektra histologických variant bazocelulárního karcinomu se ale jako mnohem významnější prediktivní faktor jeví histoarchitektonické uspořádání nádoru. Tento pohled umožňuje vymezení indolentních variant s klinicky příznivým průběhem a variant s agresivním biologickým chováním. Důležitým faktem ale zůstává, že se asi 1/3 všech tumorů vyznačuje smíšenou histoarchitektonickou strukturou (Sexton et al., 1990). Tento fakt je třeba zvažovat zejména v případech, kdy je indikován jiný léčebný postup než radikální chirurgická resekce. Podle některých autorů je třeba pamatovat na tzv. intrinsickou (vnitřní) chybu, kterou se může vyznačovat histologický závěr stanovený na základě probatorní biopsie provedené průbojníkem („*punch*“) nebo tangenciálním řezem („*shaving*“). Podle těchto údajů až 20% histologických hodnocení materiálu po definitivní resekci není v závěru plně shodných s jim předcházející probatorní biopsií z identického ložiska. Otázne dlouho bylo, zda je třeba na klinicky často zjištěný větší počet ložisek bazaliomu (zejména jeho varianty *basalioma superficiale*) pohlížet jako na projev plošně působících karcinogenních vlivů (teorie nádorového pole, *field cancerization*, Garcia et al., 1999). V takovém případě by jednotlivé nádorové čepy byly projevem nádorové multiplicity. V rutinním histologickém materiálu se jeví často jednotlivá hnízda nádorové tkáně zcela izolována. Některé pokusy o prostorovou rekonstrukci ale v těchto případech poukazovaly na drobné výběžky nádorové tkáně, které spojovaly jednotlivá větší nádorová hnízda (Lang, 1986). Teprve analýzou ztráty heterozygocie (*loss of heterozygosity*, LOH) například v genu *PTCH 1* bylo prokázáno, že ve většině izolovaných nádorových čepů byla zastižena identická mutace (Saldanha et al., 2002). Tato fakta spíše svědčí pro unicentrický vznik nádoru a mají tak i svůj klinický dopad, zejména pokud je nádorový čep zastižen blíže než 1 milimetr od resekčního okraje, pak je nutné pečlivé a pravidelné sledování jizvy k vyloučení recidivy, pokud není provedena reexcize.

5. 1 Imunohistochemické nálezy u bazocelulárního karcinomu.

Rutinní stanovení diagnózy bazaliomu je prováděno převážně ze standardně barvených histologických řezů, nejběžněji je ke stanovení této diagnózy zcela postačující prosté barvení hematoxylin-eosin. Pouze v některých komplikovanějších případech, nebo v situacích, kdy je odebraný vzorek suboptimální, tedy příliš malý, chybně fixovaný, z velké části nekrotický, popřípadě mechanicky poškozený chybným nakládáním s tkání v průběhu operace, a tudíž na základě morfologického

hodnocení obtížně identifikovatelný, je nutné doplnit vyšetření imunohistochemické. Z běžných, komerčně dostupných, znaků jeví bazaliomy silnou difúzní pozitivitu pro keratiny o vysoké molekulové hmotnosti, AE1/AE3, keratin 5/6, keratin 14, keratin 15, keratin 17 (Alessi et al., 2008). Keratin K19 je pozitivní jen u části bazaliomů, údaje o procentuálním zastoupení pozitivních tumorů značně kolísají (Heyl et al., 2008, Kurzen et al., 2001). Keratin K20 může pomoci při odlišení bazaliomu (negativní) oproti karcinomu z Merkelových buněk (pozitivní) (Mahmoodi et al., 2005, Ball et al., 2007). Velmi užitečné se jeví i barvení protilátkou proti epitelovým glykoproteinům (klon Ber-EP4), které je s to odlišit nejen kožní spinocelulární karcinom (negativní), ale dokonce i mikrocystický adnexální karcinom (rovněž negativní) od prakticky univerzálně silně pozitivního bazaliomu (bez ohledu na histologický subtyp) (Krahl et al., 2007).

EMA (*epithelial membrane antigen*) bývá u bazaliomů převážně negativní, u spinocelulárních karcinomů naopak pozitivní (Fan et al., 2007), tento tenotyp je velmi užitečný zejména v kombinaci s Ber-EP4 (slouží k diferenciální diagnostice bazaliomu oproti kožním spinocelulárním karcinomům a adnexálním sebaceózním tumorům).

SMA (*smooth muscle actin*) bývá u velké části bazaliomů pozitivní, u spinaliomů je negativní. Podle některých studií může pozitivita SMA být známkou agresivnějšího chování tumoru, může svědčit pro myoepitelovou diferenciaci (Kim et al., 2001).

β -catenin může být u bazocelulárních karcinomů sledován vázaný na cytoplazmatickou membránu, může být přítomen v cytoplazmě i v jádře; zdá se, že tento klíčový regulátor kaskády Wnt a jeho různé distribuční vzorce u jednotlivých histologických typů bazaliomu dobře odpovídají výše zmíněnému klasifikačnímu schématu. Zejména jaderná pozitivita β -cateninů byla pozorována u invazivního bazocelulárního karcinomu a je dávana do souvislosti se změnami aktivity regulační kaskády sonic hedgehog (El-Bahrawy et al., 2003). Změna distribuce β -cateninů byla pozorována i v našich publikovaných experimentech (IV. Lacina et al., 2007).

5.2 Genodermatózy, molekulárně biologický model vzniku bazaliomu

Syndrom névoidních bazaliomů, (OMIM 109400, synonyma: Gorlinův syndrom, syndrom Gorlin-Golz) je relativně vzácné autozomálně dominantně dědičné onemocnění. Vyznačuje se úplnou penetrancí a rozličnou mírou expresivity. Jeho

prevalence je odhadována na 1 případ na 60 000 obyvatel. První literární popisy případů névoidních bazaliomů patřících nejspíše do spektra tohoto syndromu jsou známy již z konce 19. století, přesnější syndromologická definice ale byla provedena až v roce 1960 (Gorlin a Goltz, 1960).

Vzhledem k velmi zřejmé genetické vazbě byla tato genodermatóza intenzivně studována na molekulárně biologické úrovni jako modelové onemocnění. Některé z etiopatogenetických mechanismů účastnících se při vzniku tohoto onemocnění přispěly k pochopení obecnějšího rámce karcinogeneze ve stratifikovaných epitelech.

V průběhu výzkumného období, které shrnuje tato práce, se podařilo sledovat celkem 4 pacienty s touto genodermatózou. Tuto genodermatózu se podařilo studovat nejen na histologické a imunohistochemické úrovni, ale byly provedeny i in vitro experimenty na tkáňových kulturách připravených z biopsií jedné ze sledovaných pacientek.

Klinicky se definice Gorlin-Goltzova syndromu opírá zejména o přítomnost mnohočetných névoidních bazocelulárních karcinomů (jsou přítomny až u 50% pacientů), dále je možno zastihnout v oblasti dlaní a plosek zřetelné dolíčkovaní (přítomno je až u 60% pacientů), epidermální cysty a milia a lokalizovanou hypertrichózu. Mimo kůži se charakteristicky u pacientů nalézají odontogenní keratocysty (u 65-70%), vrozené vývojové vady skeletu (70%) a kalcifikace v oblasti *falx cerebri* (70%). Pro určení diagnózy je potřebné splnění 2 z 5 těchto „velkých“ kritérií, případně musí být přítomno jedno „velké“ a 2 doplňková „malá“ kritéria (Burgodorf 2006).

Velmi atypický je zejména věk, kdy se u pacientů objevují první bazocelulární karcinomy. Pacient může být postižen již ve druhé dekádě života, což ostře kontrastuje s průměrným věkem pacientů, u kterých je diagnostikován sporadický bazocelulární karcinom (nejdříve ve 4. dekádě života s maximem v 7. dekádě). Postižena může být i kůže na místech, které nejsou exponovány slunečnímu záření. Histologicky nelze určit jednoznačně některý převažující typ asociovaný s tímto syndromem ve srovnání s případy sporadického bazaliomu. Odontogenní cysty se vyskytují převážně v oblasti molárů dolní čelisti a jako tumor se mohou objevit i u dětí v prvních 5 letech života. Tyto cysty se vyznačují až u 60% pacientů tendencí k rekurenci, někdy je jejich chování značně lokálně expanzivní a ohrožuje správný vývoj čelistního aparátu. Tento charakter vedl k jejich recentnímu převedení

z kategorie cyst mezi pravé nádory (nově tedy *keratocystický odontogenní nádor*, klasifikace podle Světové zdravotnické organizace WHO). Jejich malignizace směrem k metastazujícímu spinocelulárnímu karcinomu je známa, ale je naštěstí vzácná (Press 2008).

Genový lokus, jehož mutace je zodpovědná za vznik syndromu névoidních bazaliomů, je lokalizován v oblasti 9q22-q31. Bylo prokázáno, že v této pozici se nalézá gen *PTCH*, což je humánní homolog pro gen *patched* popsáný u *Drosophilla melanogaster*. *PTCH* patří do signální dráhy *Sonic hedgehog (Shh)*, která se významně podílí na regulaci mnoha vývojových dějů v průběhu embryogeneze (Lupi 2007).

Gen *hedgehog (Hh)* byl nejprve popsán jako jeden z faktorů regulujících správný průběh vývoje embrya a larvy *Drosophilla melanogaster*, zdůrazňován je jeho vliv na udržení ventrodorzální orientace struktur vyvíjejícího se embrya. Mezi další členy této signalizační kaskády patří kromě již zmíněného *patched (Ptch)* i membránový protein *smoothened (Smo)*, kinezinu podobný protein *costal-2 (Cos-2)*, serin/threonin kináza *fused (Fu)*, její supresor (*SuFu*) a transkripční faktor typu zinc finger *cubitus interruptus (Ci)*.

Ptch představuje nejvýznamnější negativní regulátor celé kaskády *Sonic hedgehog (Shh)*. Je vázán na buněčných membránách efektorových buněk, kde funguje v nepřítomnosti *Shh* jako konstitutivní represor proteinu *Smo*. Transdukce signálu prostřednictvím *Smo* je realizována aktivací proteinů z rodiny *Gli*, které patří do skupiny transkripčních faktorů typu *zinc finger* (jde tedy o analogii s *Ci* u *Drosophilla melanogaster*) (Wicking et al., 1999).

Výše zmíněná signalizační kaskáda a její alterace aktivující *Smo* jsou zodpovědné za vznik nejen odchylek tvořících spektrum Gorlina syndromu ale i části sporadických bazaliomů. U sporadických bazaliomů byly dále zaznamenány i mutace *Shh*, *Gli* a dalších členů této kaskády (Althar et al., 2006).

U sporadických bazocelulárních karcinomů byly dále zaznamenány nejružnější mutace *p53*, *bcl-2*, *erbB*, signální kaskády *Wnt*, vzácně *ras* proteinů – nejednotnost těchto výsledků poukazuje na heterogenní charakter sporadicky se vyskytujících bazaliomů. (Ling et al., 2001, Saldanha et al., 2003). Některé další genodermatózy jsou rovněž dávány do souvislosti s větším rizikem vzniku bazocelulárního karcinomu, jde například o Bazex syndrom (syndrom Bazex - Dupre – Christol, Gambichler et al., 2007, Vabres et al., 1995), Rombo syndrom (Michaëlsson 1981),

syndrom mnohočetných hereditárních infundibulocystických bazaliomů (Tozawa 1987, Requena et al., 2006), xeroderma pigmentosum (Dworaczek a Xiao 2007), syndrom Rotmund- Thompson (van Brabant et al., 2000).

6. Nádorové stroma, organizace a funkce

V nádoru je možno histologicky rozlišit dvě základní komponenty. Jedná se nejprve o vlastní maligně transformovanou buněčnou populaci, v případě námi studovaných karcinomů jde tedy o komponentu epitelovou. Tato součást bývá v určité analogii ke stavbě normálních orgánů označována jako parenchym. Druhou komponentou jsou pojivové tkáně mezenchymového, či ektomezenchymového původu, označované souhrnně jako nádorové stroma. Tyto dvě komponenty tvoří vnitřně vzájemně závislý celek.

V některých typech nádorů je velmi markantní rozdíl mezi oběma složkami, jak kvantitativní tak kvalitativní, mluvíme pak obecně o nádorech organoidních. Zejména u vysoce proliferujících tumorů dochází ke stírání těchto morfologických rozdílů, obecně takový tumor označujeme jako nádor histoidní.

V porovnání s maligně transformovaným nádorovým epitelem byla nádorovému stromatu dlouhodobě věnována menší pozornost, byly mu připisovány zejména role podpůrné. Na prvním místě byla zdůrazňována tvorba mechanické opory, která umožňuje v trojrozměrném prostoru malignímu epitelu proliferaci. Významná role v takovémto modelu byla připisována i nově vznikajícím cévám v této oporné kostře tumoru. Cévy zajišťují nejenom přísun živin a kyslíku a odvod metabolických zplodin, zároveň ale mohou touto cestou přicházet, či odcházet významné biologicky aktivní působky, jako například hormony a růstové faktory (Kulbe et al., 2004, Opendakker a van Damme 2004), pro které může stroma fungovat i jako rezervoár (Tlsty et al., 2006). Cévy v oblasti nádoru rovněž představují zejména díky morfologickým odchylkám ve své stavbě velmi významnou cestu, kterou dochází k prostupu nejen buněk imunitního systému hostitele, mohou jimi ale procházet i nádorové buňky v průběhu šíření nádoru a zakládání vzdálených ložisek, metastáz. Proto byla v minulosti tradičně velmi intenzivně studována zejména nádorová neoangiogeneze (Dvorak 2003).

Kromě cév se na tvorbě stromatu podílejí i fibroblasty, myofibroblasty, žírné buňky, endotelové buňky, adipocyty, makrofágy a lymfocyty. Buňky imunitního systému často tvořící nejen náhodně infiltrující populaci, ale mají i přímo charakter reaktivní

zánětlivé populace. Kromě všech zmíněných buněčných populací má při formování a určování vlastností stromatu významné místo i mezibuněčná hmota, extracelulární matrix.

6.1 Vznik a rozvoj nádorového stromatu

Vznik nádorového stromatu a jeho růst je v tradičním pojetí modelu vzniku nádoru vázán na potřeby maligně transformovaných buněk nádorového parenchymu. Vznik adekvátně fungujícího stromatu je významnou podmínkou nutnou pro to, aby proliferující maligní klon nádorových buněk byl schopen překročit určitou mezní velikost populace (Kunz-Schughardt 2003). Limit v tomto případě představuje schopnost nádoru proliferovat v avaskulárním stavu, tedy za situace, kdy jsou nádorové buňky odkázány pouze na difúzi látek, zejména kyslíku, z okolí. Při překročení jisté velikosti podléhají nádorové buňky regresivním pochodům *in vivo* i v experimentálním modelu *in vitro*. Správně fungující nádorové stroma zajišťuje neoangiogenezi pro nádorový parenchym adekvátní podmínky pro jeho rozvoj i za tuto limitní velikost. Charakter takového růstu stromatu je tedy určován ve vztahu k potřebám nádorového parenchymu, jde tedy o růst korelativní.

V některých případech dochází ke zřetelné proliferaci mezenchymu, který obklopuje rostoucí nádorové masy. V těchto případech se zdá, že jde spíše o reakci hostitelského organismu na expanzivní, či invazivní působení nádoru, že tedy tato vznikající tkáň může být v obecné rovině dána spíše do vztahu například k proliferativnímu typu zánětu. Takovýto typ růstu nádorového stromatu by tedy byl spíše reaktivního charakteru.

6.1.1 Lokální mezenchym a jeho role při vzniku nádorového stromatu

Určité nejasnosti panují kolem vzniku nádorového stromatu (Li et al., 2007). Běžně bývá jeho původ spatřován v mezenchymových tkáních, které jsou v iniciálním stádiu v blízkosti proliferujícího maligního epitelového klonu. Zdá se, že význam interakce mezi epitelem a okolním mezenchymem má klíčový význam pro určení dalšího osudu buněk, u nichž již došlo k iniciaci nádorového procesu. Tato situace má i v detailech na molekulární úrovni mnoho sledovatelných paralel mezi normálním embryonálním vývojem orgánů a vznikem nádorového onemocnění (Silberstein 2001, Shekhar et al., 2003, Fuchs 2007). Obecně platí, že pro vývojovou biologii bylo vždy ústřední otázkou, jakým způsobem vnikají tak komplexní

struktury, jako jsou tkáně složené z mnoha typů buněk a rozličných extracelulárních komponent. Nemenší význam ale mají otázky týkající se způsobu, jakým tkáně jsou schopné uchovávat jednak svoji histoarchitektoniku v průběhu života jedince a jakým způsobem jsou schopny své morfoloické charakteristiky modulovat na základě měnících se funkčních potřeb (Hagios et al., 1998). Právě poruchy této homeostázy mohou sehrávat roli v průběhu vývoje nádoru. Maligní transformace epitelu tuto homeostatickou regulaci poruší s následným dopadem na mnoho důležitých buněčných pochodů, jako je například adheze, proliferace, kontrola apoptózy atd.

Jestliže v průběhu embryogeneze dochází na základě epitelu-mezenchymových interakcí k zániku některých struktur a naopak k rozvoji jiných, pak se tedy i biologická aktivita stromatu může analogicky v konečném důsledku jevit jako tumorsupresorová, nebo naopak tumorpromotorová. (Schedin et al., 2004, Proia et al., 2005). Tyto dvě krajní možnosti byly experimentálně sledovány zejména na modelech karcinomu prsu. V prvním případě (Barcellos-Hoff et al., 2000) byly prováděny na zvířecím modelu implantace transformované (avšak netumorigenní) epitelová linie. Pouze v případě, že byla předem provedena iradiace mezenchymových tkání příjemce, došlo ke vzniku karcinomu z implantovaného epitelu, stroma zde tedy plnilo funkci nádorového promotoru. V dalším experimentu (Maffini et al., 2004) byly obdobné manipulace prováděny za pomoci chemického karcinogenu (methylnitrosourea) s obdobným výsledkem. Jako cenné se zdá v této práci ale i zjištění, že pokud jsou naopak karcinogenem ošetřené buňky epitelu implantovány do fyziologického stromatu (neošetřeného chemickým karcinogenem, či radiací), pak ke vzniku nádorů nedochází. Stroma zde tedy neposkytne vhodné prostředí a minimálně tedy nepůsobí jako nádorový promotor. Jiné experimentální modely (Medina et al., 2005) ale ukazují, že existují výrazné mezidruhové rozdíly v odpovědi na různé typy kancerogenů (zde užit pro srovnání DMBA tj. 7,12-dimethylbenzanthracen).\$

Obdobný vliv byl popsán i u člověka (Dong Le Burghis 1997), v této práci byl popsán inhibiční vliv fibroblastů izolovaných ze stromatu normální mléčné žlázy na růst linií karcinomu vycházejících z ní v porovnání s efektem fibroblastů izolovaných z biopsií pacientek s karcinomem prsu. Jiné práce popisují vliv fibroblastů nádorového stromatu na zvýšenou proliferaci karcinomových linií (Shekhar et al., 2001, Mueller et al., 2002). Alterace stromálních fibroblastů byly popsány

opakovaně s ohledem na jejich odlišnou funkci, růstové vlastnosti, rozdílný migrační potenciál a produkci rozličných růstových faktorů jako například *platelet-derived growth factor*, *insulin-like growth factor I*, *insulin-like growth factor II*, *transforming growth factor- β* , *hepatocyte growth factor*, *keratinocyte growth factor* (Singer et al., 1995, Shekhar et al., 2003). Obdobná zjištění byla publikována i u nádorů jiných orgánů včetně kůže (IV. Lacina et al., 2007, V. Lacina et al., 2007).

Vliv na modulaci chování maligně transformovaných epitelíí nelze ale připisovat jen buněčným elementům stromatu, významnou funkci také mohou sehrávat složky extracelulární matrix jimi produkované. Recentní práce (Willhauck et al., 2007) prokazují na maligních HaCat II-ras keratinocytech, že ve vhodném environmentálním kontextu může být omezen potenciál těchto buněk k invazi a dochází dokonce k změnám jejich fenotypu (Mueller et al., 2002). Tato situace koresponduje s poznatky získanými dříve na *in vitro* modelech karcinomu prsu (Weaver et al., 1997), kdy bylo podobné změny fenotypu dosaženo prostřednictvím inhibiční protilátky proti adhezivním molekulám.

V kontextu těchto poznatků se zdá být oprávněné při posuzování fenotypu nádorových buněk užívání termínu „*stromální dominance*“ (Shekhar et al., 2003), i když genetické změny tvořící vlastní podklad nádorového onemocnění stroma přímo neovlivňuje, umožňuje jejich konzervaci a eventuálně klonální rozšíření například omezením apoptózy (Chrenek et al., 2001).

Způsob, jakým z lokálního mezenchymu vzniká nádorové stroma, nebyl doposud plně objasněn. Tradičně byla hledána paralela mezi regenerující tkání a vznikajícím nádorem (Dvorak 1986). V průběhu hojení rány totiž dochází k určitým změnám ve fenotypu i sekreční aktivitě lokálních fibroblastů (Desmoulière et al., 2004). Tyto změny jsou podmíněny i působky uvolněnými v průběhu traumatu z kůže, či sliznice, jedná se například o *fibroblast growth factor 2* (FGF2), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β) (Zeisberg et al., 2000, Shephard et al., 2004). Následně mohou fibroblasty získávat výraznější motilitu (exprimují α -*smooth muscle actin*, α -SMA), putují aktivně do ranné plochy a podílejí se ve zvýšené míře svou sekreční aktivitou na produkci složek extracelulární matrix jako je kolagen I, III, V a fibronectin a spolupodílejí se na rekonstrukci bazální membrány, kterou tvoří převážně kolagen IV a laminin. Paralelně dochází k remodelaci tohoto prostředí působením enzymů,

zejména matrix metaloproteáz. Dokončené hojení za fyziologických podmínek ukončuje i působení těchto aktivovaných fibroblastů, ačkoli přesný mechanismus není plně objasněn (Li et al., 2007). Naopak buňky izolované ze stromatu nádorů nejsou schopny na rozdíl od těchto fyziologicky aktivovaných normálních fibroblastů navodit správnou polaritu regenerujících epitelů, což je ale v dobré shodě s porušenou histoarchitektonikou, kterou se vyznačují právě tumory, z nichž byly izolovány (Petersen et al., 2001, Gudjonsson et al., 2003).

Fibroblasty izolované ze stromatu nádorů sdílejí některé charakteristiky s těmito aktivovanými fibroblasty (Desmoulière et al., 2004). Způsob, kterým jsou ale „rekrutovány“ (Granot et al., 2007) není dodnes objasněn, i když se zdá, že i zde může u mnoha nádorů sehrávat tuto úlohu *transforming growth factor-β* (de Wever et al., 2003). Dále se ale uvažuje i o jiných růstových faktorech parakrině secernovaných nádorovými buňkami, jako například *platelet derived growth factor*, *basic fibroblast growth factor*, *vascular endothelial growth factor* (Li et al., 2003). Značné nejasnosti stále panují ohledně otázky, zda mohou být takto *in vivo* přeměněny ve stromální buňky jakékoli fibroblasty, nebo zda je nutná i u fibroblastů nějaká míra predispozice pro tuto přeměnu. V tomto ohledu se jako překvapivě aktuální znovu objevuje více než sto let stará teorie „vhodné půdy a semene“ („*the soil and seed theory*“, Paget 1889), která se zdá být aplikovatelná nejen na metastázy, ale i na primární nádory samé. Vzájemná závislost nádorového parenchymu a stromatu a schopnost jejich vzájemné komunikace a parakriní regulace byla recentně dokumentována na příkladu chemokinu *stroma derived factor 1* (SDF-1, nově označovaný jako CXCL12) a jeho receptoru CXCR4 u solidních nádorů i u maligních onemocnění krevetvorby (Burger et al., 2006).

Některé recentní práce poukazují na fakt, že genetické změny nevykazují pouze buňky nádorového parenchymu, což bylo doposud považováno za ústřední předmět zájmu onkogenetiky, ale že genetické změny vykazují i buňky stromatu. Některé z těchto změn dokonce dobře asociují s určitým klinickopatologickým typem nádoru (Fukino et al., 2007).

Ještě zajímavějším se ale jeví zjištění (Patocs et al., 2007), že u sporadických karcinomů prsu somatická mutace p53 limitovaná pouze na stroma, ne však na nádorové buňky, je asociována statisticky signifikantně (hodnota $P = 0,003$) s metastazováním do lymfatických uzlin. Toto zjištění však nebylo prokázáno u

případů s hereditární malignitou. V této studii nebyly zaznamenány ani částečně identické mutace mezi nádorovým parenchymem a jeho stromatem. Některé práce ale udávají shodné mutace u nádorových buněk i u buněk stromatu (Moinfar et al., 2000). Tento fenomén může částečně vysvětlit teorie o plošném působení kancerogenu („*field cancerisation*“ – Ogden 1998). Zcela legitimní, ale nikým nezodpovězená, se pak jeví otázka, jakým způsobem lze vysvětlit výše zmíněnou shodu mutací mezi buňkami epitelu a stromatu, která je v mnoha studiích natolik výrazná, že téměř vylučuje stochastický původ. Výše popsané vlastnosti stromálních buněk a zejména jejich genetické alterace, z nichž je podle některých studií alespoň určitá část sdílena s buňkami nádorového parenchymu, umožňují vysvětlit tento fakt na základě teorie unitárního vzniku nádoru. Nádorové stroma by v tomto modelu vznikalo mechanismem epitelu-mezenchymového přechodu z původní maligně transformované buňky. Společná vývojová fáze by tudíž mohla vysvětlovat některé shodné mutační znaky sdílené oběma komponentami nádoru. Diverzita, která je běžně mezi těmito buněčnými populacemi zaznamenávána, je v dobrém souhlasu s představou o mnohastupňovém procesu vedoucím až k invazivnímu nádoru (Schedin et al., 2004).

Proto se jako velmi realistická jeví zejména představa, že výsledné znaky, kterými můžeme charakterizovat nádorovou buněčnou populaci, jsou jen výsledkem evoluce zahrnující v sobě prvky iniciální a navazující genetické alterace a následný mutačně-selekční tlak, stejně jako prvky epigenetické adaptace vyplývající z kontextu mikroprostředí (Chrenek et al., 2001).

6.1.2 Epitelu-mezenchymový přechod a jeho možná role při vzniku stromatu

Epitelu-mezenchymový přechod (transformace) je jedním z významných morfogenetických procesů, který se uplatňuje při delaminaci zárodečných listů u časných embryonálních vývojových stádií mnohobuněčných organismů. Při tomto procesu dochází ke ztrátě polaritativní buňky epitelu, reorganizaci jejího cytoskeletu a redistribuci organel a zvýšení motility, včetně změn exprese tříd adhezivních molekul, hlavně cadherinů (Thiery 2003). Opačným pochodem může nabývat buňka opět epitelový charakter. Přesto, že bylo učiněno mnoho poznatků o mechanismech vedoucích k epitelu-mezenchymovému přechodu zejména *in vitro* v trojrozměrných buněčných kulturách (Ullmann et al., 2007), je porozumění fyziologickým funkcím *in vivo* stále ještě značně omezené. Intenzivní zájem se koncentruje i na sledování

těchto dějů za patologických podmínek zejména při fibrotizujících a nádorových onemocněních (Thiery 2003).

Koncept epitel-mezenchymového přechodu byl obecně přijímán v embryologii, ale jeho aplikace v postnatálním období byla považována do nedávné minulosti za poněkud kontroverzní (Lee et al., 2006).

Molekulární podstata dějů vedoucích epitelovou buňku k její transformaci v mezenchymový element byla popsána nejprve na interakci „*hepatocyte growth factor*“ a jeho *Met* receptoru s tyrozinkinázovou funkcí. Pozdější pozorování doplnila tento obraz do mnohem komplexnější podoby (Huber et al., 2005). S ohledem na sledované téma této dizertace se důležitou součástí tohoto schématu jeví faktory, které autokrinně mohou navozovat epitel-mezenchymový přechod. Mezi takové působky patří kromě již zmíněného *hepatocyte growth factor (HGF)* i *transforming cell growth factor (TGF-β)*, *epidermal growth factor (EGF)*, *insulin like growth factor I /II*“ (*IGF-I/II*) a *platelet derived growth factor (PDGF)*. Posledně jmenovaný faktor může být příkladem selhávání kontroly signálních kaskád a vzniká tak pozitivní zpětnovazebná smyčka (Jechlinger et al., 2003). Mezi signální kaskády, které hrají roli v procesu epitel-mezenchymové transformace, patří například Wnt/β-catenin, Notch, Hedgehog, NF-κB (Huber et al., 2005). Mnoho z uvedených signálních kaskád směřuje k regulaci transkripčních faktorů ze skupiny Snail/Slug. Tyto proteiny jsou charakteristické motivem „*zinc fingers*“ v C koncové oblasti. Prostřednictvím tohoto motivu interagují s DNA a regulují transkripci (De Craene et al., 2005). Dobře je dokumentována například vazba transkripčních faktorů této skupiny na promotor genu pro E-cadherin. Bylo potvrzeno i snížení výskytu E-cadherinu u nádorů exprimujících ve zvýšené míře Snail zejména v takzvané invazní frontě s výslednou vysokou agresivitou nádoru (Yokoyama 2003). Na druhou stranu existuje ale statisticky jen velmi slabá vazba mezi expresí E-cadherinu a schopností zakládat vzdálené metastázy; zdá se tedy, že pro tyto děje nemusí být podmínkou „úplný“ epitel-mezenchymový přechod, tedy naplnění všech podmínek, které jej definují (Christiansen et al., 2006, Lee et al., 2006)

Experimentální model buněk exprimujících jak cytokeratiny, tak i vimentin potvrdil zvýšenou invazivitu těchto buněk in vitro (Hendrix et al., 1997).

Některé velké studie poukazují na fakt, že právě snižující se exprese keratinů (K8, K18 a K19) u karcinomů prsu a naopak větší exprese vimentinu je u některých

skupin pacientů asociována s výraznější agresivitou nádoru (Willipinski Stapelfeld et al., 2005).

Epitelo-mezenchymový přechod a výsledné biologické chování tumoru by však mělo být vnímáno v komplexním pohledu. Existují studie, které dokazují, že linie fibroblastů odvozených mechanismem epitelo-mezenchymového přechodu z nádorového parenchymu karcinomu prsu sama o sobě není tumorigenní, při transplantaci do vhodného nositele nezakládá sama tumory, přesto, že sdílí mutace s původním karcinomem. Krucialním důkazem původu těchto fibroblastů se zdá být nenáhodná inaktivace X chromozomu zjištěná u těchto buněk. Současně ale bylo zjištěno, že jsou-li tyto stromální (mezenchymové) buňky aplikovány s epitelovou karcinomovou linií, ve výsledném efektu umožňují 3,5-7krát rychlejší růst nádoru (Petersen et al., 2003).

Zcela omezené je množství údajů o reverzním pochodu, tedy o mesenchymo-epitelovém přechodu, který by měl představovat logické ukončení výše zmíněných dějů vedoucích k založení vzdálené metastázy (Tse a Kalluri 2007). Zdá se, že určitou roli by v tomto ději mohly sehrávat i epigenetické změny ve smyslu methylace a demethylace DNA a (Christiansen et al., 2006) a zřejmě i vliv zevního prostředí.

Popsané charakteristiky epitelo-mezenchymového přechodu a jeho možný význam činí z tohoto děje jeden z předpokládaných atraktivních cílů terapeutických zásahů (Guarino et al., 2007).

Závěrem je nutné ale konstatovat, že přes rychle vzrůstající množství poznatků o epitelo-mezenchymovém přechodu *in vivo* i *in vitro* v průběhu patologických stavů (Radisky et al., 2007, Hinz et al., 2007), je třeba tato zjištění zatím posuzovat kriticky (Tarin et al., 2005).

6.1.3 Příspěvek prekursorů z kostní dřeně k formování nádorového stromatu

V posledních letech diskutována možnost, že k formování nádorového stromatu mohou přispívat i prekursorové buňky vyplavované do periferní cirkulace z kostní dřeně (Hart et al., 2004). Tato situace byla nejintenzivněji studována zejména ve vztahu k neoangiogenezi ve stromatu jak u zvířecích nádorů vznikajících spontánně, či u nádorů transplantovaných, v menším rozsahu byly tato pozorování provedena i na neopláziích lidských (Ganss 2006). Množství důkazů shromážděných v soudobé literatuře je však jen velmi omezené.

6.1.4 Buněčná fúze jako původce vzniku nádorového stromatu

Okrajově je literárně diskutována i role fúze nádorových buněk s buňkami okolního stromatu (Duelli a Lazebnik 2003). Takovýto mechanismus by mohl jednak vysvětlit chromozomální dysbalance udávané některými autory ve stromatu tumorů (Jacobsen et al., 2006). Přesto je nutné upozornit, že rozsah a význam tohoto fenoménu je obtížné *in vivo* zkoumat a jeho hodnocení je třeba provádět jen velmi opatrně.

6.2 Nádorové stroma bazocelulárního karcinomu

Komplexní role nádorového stromatu při vzniku a rozvoji bazocelulárního karcinomu může být demonstrována zejména selháváním pokusů o etablování nádorové linie *in vitro*, tedy bez vlivu specifického mikroprostředí. V těchto podmínkách nádorové epitelie přežívají jen krátkodobě a ztrácejí mnohé své vlastnosti. Historicky prováděné pokusy o autotransplantaci bazocelulárního karcinomu (van Scott et al., 1961) vždy selhávaly, pokud byly implantovány čistě epitelové částky. Pokud byly při implantaci použity společně s nimi i části mezenchymového nádorového stromatu, byl v určité části pokusů takovýto přenos úspěšný. Zvířecí modely s převážně chemicky, či UV ozářením vyvolanými nádory představují, bohužel, jen velmi přibližný a nedokonalý model. Pokusy o přenos humánního bazocelulárního karcinomu na myš (tedy xenotransplantace) byly úspěšné jen v omezeném měřítku, 14 z 18 přenesených vzorků vyústilo v tvorbu jizevnaté tkáně s epidermoidními cystami, a to i v případě, že byla použita těžce imunokompromitovaná (SCID) laboratorní myš (Carlson et al., 2002). Reziduální struktury bazaliomu po xenotransplantaci byly dobře v první pasáži znázornitelné imunohistochemicky průkazem keratinů o vysoké molekulové hmotnosti a stejně tak reagovaly s monoklonální protilátkou Ber-EP4. Neepitelové součásti transplantované tkáně byly pozitivní při barvení na SMA, vimentin, S100 protein, a dále na řadu CD antigenů. Odlišení této tkáně od okolního myšního vaziva bylo možné pomocí HLA znaků. Přenesený nádor v některých případech (3/18) přešel do anaplastického agresivně metastazujícího nádorového procesu, který se svým biologickým chováním dramaticky lišil od indolentního růstu bazocelulárního karcinomu. Imunohistochemicky tyto nádory vykazovaly pozitivitu vimentinu a SMA, byly již negativní na panel keratinů a CD znaky, Ber-EP4, S100P, lidský původ tohoto tumoru ale stále konfirmovala pozitivita v HLA systému. Tento nádor byl dobře

transplantovatelný na jinou SCID myš, ale pokusy o etablování buněčné kultury *in vitro* opakovaně selhaly. Imunohistochemický profil těchto nádorů v některých rysech odpovídá vzácně pozorovaným případům bifazického bazocelulárního karcinomu se sarkomatoidním stromatem, který je ale vhodnější klasifikovat spíše již jako karcinosarkom (Bigby et al., 2005).

Nádorové stroma kromě výše diskutovaných fibroblastů ale tvoří i další komponenty. Stroma je od parenchymu odděleno bazální laminou, která se skládá převážně z kolagenu IV a V a lamininu. V oblastech infiltrativního nádorového růstu a u primárně růstově agresivních variant je bazální membrána defektní nebo chybí úplně.

Extracelulární matrix je bohatá zejména na kyselinu hyaluronovou a dermatansulfát. Poměrně často nalézáme v bazaliomech i depozita amyloidu. Imunohistochemicky lze někdy v amorfních oblastech mezi pruhy nádorového parenchymu detekovat i keratiny, vimentin, vzácněji i krystalům podobné útvary složené z některých typů kolagenů – tyto útvary svědčí o remodelaci tkáně nádoru (Crowson 2006). Korium v okolí bazaliomů může vykazovat různě intenzivní bazofilní degeneraci (solární elastózu), tato je spojena zejména s nodulárními nádory, u povrchových bazaliomů (*basalioma superficiale*) tato asociace někdy chybí (Kaur et al., 2006).

Předpokládá se, že žírné buňky lokalizované ve větším počtu kolem nádorových čepů mohou sehrávat úlohu v uvolňování cytokinů vyvolávajících peritumorózní fibrózu, stejně jako v neoangiogenezi a při udržování UVB indukované imunosuprese (Ch'ng et al., 2006).

Výrazná neovaskularizace je jedním z klíčových diagnostických znaků toho typu tumoru (Velasco et al., 2002). Růst cév je akcelerován nejrůznějšími růstovými faktory, z nichž některé produkují nádorové buňky, či buňky stromatu. Zajímavé je zjištění, že významnou roli sehrává dysregulace stejné signální kaskády sonic hedgehog jako u nádorové populace (Nagase et al., 2008).

Převážná většina leukocytů přítomných ve stromatu bazaliomu patří do skupiny Th, zatímco Tc, NK buněk a neutrofilů je jen velmi málo, plazmatické buňky se zvýšeně vyskytují jen u exulcerovaných tumorů. Tato nevelká lymfocytární infiltrace je signifikantně dále snížena u imunosuprimovaných pacientů (Crowson 2006).

7. Psoriasis

Psoriasis (psoriáza, lupénka) je benigní, primárně kožní zánětlivé onemocnění, s akutně exantematickým, či chronicky stacionárním průběhem. Onemocnění postihuje asi 2% evropské populace bez ohledu na pohlaví, tito pacienti představují zhruba desetinu všech dermatologických pacientů. Psoriáza postihuje mladší jedince (první vrchol výskytu mezi 16-22 rokem), stejně jako pacienty starší (druhý vrchol výskytu 57-60 let). V prvním případě lze vysledovat pozitivní rodinnou anamnézu asi u jedné poloviny nemocných, forma s pozdním nástupem zpravidla takovou vazbu nevykazuje. Nejčastěji se manifestuje jako *psoriasis vulgaris*, tedy erytematózními papulami, které jsou kryty šupinami, známy jsou i formy pustulózní. Psoriasis může postihnout kteroukoli oblast kůže včetně kštice, postiženy mohou být i sliznice, dále může postihnout i nehty a její arthropatická forma postihuje i klouby (Štork et al., 2008). Rozsah postižení může být dlouhodobě limitován na několik ložisek, v některých případech však dochází až ke generalizaci a vzniku závažné psoriatické erythrodermie.

Diagnóza onemocnění je dána zejména klinickým obrazem, histologické vyšetření může tuto klinickou diagnózu potvrdit. Charakteristickým rysem je elongace papil kória (*papilomatóza*), nad těmito papilami je patrná ztenčená epidermis. Epidermis sama ale vykazuje hyperplazii z hyperproliferace (*akantózu*). Epidermis je kryta *hyperkeratózou s parakeratózou* a subkorneálně jsou přítomny *Munroovy mikroabscesy* vyplněné polymorfonukleárními leukocyty. V dermis je patrná proliferace a aktivace endotelu a infiltrace zánětlivými buňkami.

Psoriáza je označována za multifaktoriální onemocnění (Giardina et al., 2004). Již z výše uvedené charakteristiky je zřejmé, že minimálně u některých typů onemocnění jistě existuje určitá genetická vazba (Valdimarsson 2007), což je evidentní zejména na dvojčecích studiích (Grjibovski et al., 2007). Pokusy o přesnější určení genů zodpovědných za vznik psoriázy poukazují na častý výskyt určitých haplotypů HLA (*Human Leukocyte Antigen*) systému (Nair et al., 2005). Nicméně ani zde nejsou popsány vztahy platné ve 100% případů, což poukazuje na nezanedbatelný vliv zevního prostředí. Nadále tedy platí, že psoriázu je možno považovat za onemocnění polygenní (Giardina et al., 2004).

Pro studium patofyziologických mechanismů psoriázy bylo navrženo velké množství zvířecích modelů (Boehncke a Schön 2007). Žádný jednotlivý z nich, ale není plně

dostačující při modelování tohoto onemocnění, což poukazuje na složitost vzniku psoriázy a nejspíše i na možnost, že pod jednou klinicko-morfologickou diagnózou paralelně existuje několik stavů vznikajících v důsledku různých patofyziologických vlivů. Významná role je stále častěji připisována buňkám imunitního systému (Boyman et al., 2007), psoriáza je dnes často chápána jako autoimunitní onemocnění (Rott a Mrowietz 2005). Za významné činitele v tomto schématu jsou pokládány zejména T lymfocyty (Ghoreschi et al., 2007). Dále je ale znám i vliv makrofágů (Clark a Kupper 2006, Stratis et al., 2006), dendritických buněk (Jariwala 2007), neutrofilů (Keller et al., 2005), mastocytů (Petersen et al., 1998), endotelií (Goedkoop et al., 2004) a fibroblastů. (Miura et al., 2000, Oyama et al., 2000). Vlastní keratinocyty nejsou v tomto schématu pouze pasivní populací, ale samy naopak tvoří důležitý článek v etiopatogenetickém řetězci (Albanesi et al., 2007, Tschachler 2007). Jsou popsány velmi komplexní sítě cytokinů, které regulují jednotlivé buněčné populace a za jejichž spoluúčasti dochází ke vzniku psoriatického ložiska (Chamian a Krueger 2004, Nickoloff et al., 2007). Tyto cytokiny mohou ovlivňovat nejrůznější signální kaskády, například *Jun* (Zenz a Wagner 2006), *Notch* (Okuyama et al., 2008), *Wnt* (Reischl et al., 2007), *NF-κB* (Lizzul et al., 2005) a další. Některé molekulárně biologické poznatky jsou již využitelné v současné době i v terapii, například monoklonální protilátky proti TNF- α , či biologika zaměřená na T-lymfocyty jsou dnes již terapeuticky využívána (Weinberg 2003).

Modely buněčné kinetiky psoriatické epidermis prokázaly, že výše popsané patologické odchylky od histoarchitektoniky normální tkáně je možné připsat dramatickému zvětšení množství přechodně se dělících buněk v epidermis (nárůst o více než 400%), paralelně s tím klesá i tranzitní doba keratinocytu v epidermis. Zajímavé ale je, že počet předpokládaných kmenových buněk v psoriatické epidermis je ve srovnání se zdravou epidermis identický (Grabe a Neuber 2007), ačkoli v jejich bezprostředním okolí vzniká množství růstových faktorů, které jsou pro jejich propagaci esenciální (Huttunen et al., 2002). Tato pozorování odchylné diferenciaci jsou ve shodě i se staršími pracemi hodnotícími tkáň na základě lektinové histochemie (Dabelsteen et al., 1990), ale i našimi údaji o vazbě a expresi galektinů (II. Lacina et al., 2006).

8. Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou tradičně definovány jako nízce diferencované buňky, které jsou jednak nadány schopností dlouhodobého udržení si tohoto stupně diferenciace v průběhu života organismu, dále jsou ale schopny mnoha opakovaných dělení, kterými vznikají dceřiné buňky schopné podstoupit terminální diferenciaci (Lajtha 1979). Tato představa postupně překročila hranice hematologie, na jejímž poli původně vznikla, a byla rychle akceptována i obory studujícími jiné tkáně. Dnes je tento biologický koncept již všeobecně považován za platný a je v centru zájmu nejen experimentálních, ale i aplikovaných věd.

V průběhu posledních třiceti let se postupně vyvíjel pohled na tuto problematiku, což se odrazilo i ve schematickém dělení a hierarchizaci kmenových buněk. Paradigmatem je nejčasnější vývoj jedince. V okamžiku oplození oocyty spermií je určen součtem parentálních sad chromozomů genomový rámec, který vymezuje možnosti diferenciace vznikající zygoty. Všechny buněčné typy, které se ve vyvíjejícím se organismu následně vyskytnou, představují jen specifickou realizaci právě této genomové informace v daném kontextu a všechny buňky organismu mají vystopovatelnou genealogickou vazbu až k této jednobuněčné vývojové fázi. Jak empiricky dokazují případy přirozených jednovaječných dvojčat a jak bylo i experimentálně prokázáno na zvířecích modelech včetně primátů, je možno rozdělením velmi časného embrya docílit vzniku geneticky zcela identických jedinců, klonů (Schramm et al., 2004). Takovou buňku, která je schopna dát vzniku všem takzvaným zárodečným listům a všem z nich vycházejícím tkáním, je tedy možné za *totipotentní*. Spojení embryologických poznatků s teorií kmenových buněk vedlo ke vzniku kategorie tzv. *embryonálních kmenových buněk*. Již velmi záhy v průběhu embryogeneze ale dochází k postupnému omezování diferenciační schopnosti embryonálních buněk, takže po jejich oddělení od embrya by nevznikl identický klon organismu, nicméně buňky izolované z vnitřní buněčné masy blastocysty si zachovávají mimořádně široký diferenciační potenciál, jsou tedy označovány jako kmenové buňky *pluripotentní*. Diferenciační repertoár se ovšem dále postupně snižuje, situace se tak přibližuje ke stavu známému postnatálně. Kmenové buňky přítomné u jedince v průběhu postnatálního života označujeme jako *adultní kmenové buňky*. Nomenklatura sledující tyto změny do jisté míry připomíná nomenklaturu užívanou pro popis hematopoézy, kde se představa o kmenových buňkách rozšířila

nejdříve. Buňky se zachovanou širokou možností diferenciací se v postnatálním období označují jako *multipotentní*, přičemž jasná pravidla pro odlišení termínů pluripotence a multipotence explicitně stanovena nejsou. V mnoha tkáních může být diferenciatní schopnost adultní kmenové buňky omezena pouze na jednu buněčnou linii, jde tedy o kmenové buňky *monopotentní*.

Zatímco problematika embryonálních kmenových buněk, jejich výzkumu a aplikací je trvale zdrojem vleklých etických kontroverzí, je kladen stále větší důraz na studium kmenových buněk adultních, zejména s ohledem na možnost jejich budoucího biotechnologického využití.

Další oblastí, ve které se výrazným způsobem uplatnila koncepce kmenových buněk, je onkologie. Vzdůstá totiž počet prací, které spatřují v takzvaných *nádorových kmenových buňkách* klíčový element vzniku a rozvoje nádorových onemocnění.

8.1 Kmenové buňky v epidermis

Přesnější představa o struktuře a existenci kmenových buněk v epidermis byla nejprve vytvořena na základě pozorování provedených na zvířecích modelech, zejména na hřbetní kůži myši (Mackenzie 1970). V sedmdesátých letech dvacátého století vznikl nejprve model tzv. epidermálních proliferačních jednotek – *epidermal proliferation unit* - EPU (Potten a Hendry 1973, Potten 1974). Vzhledem k tomu, že tuto organizaci epidermis je u myši možno pozorovat celoživotně, byl již od této doby zvažován podíl kmenových buněk na udržení struktury EPU. Podle takového modelu by se kmenová buňka nacházela zhruba uprostřed základny EPU obklopena dceřinými přechodně se dělicími buňkami (*transit amplifying cells*), které postupně budou směřovat k diferenciaci. Další studie potvrdily, že po radiačním poškození myši epidermis (Al-Barwari 1976) dochází k obnově této tkáně z klonogenních buněk, jejichž distribuce odpovídá jak výše popsanému modelu EPU, tak i pozici kmenových buněk uprostřed clusterů ve *stratum basale* (Potten a Hendry, 1973).

Nověji byly provedeny *in vivo* experimenty s implantací geneticky modifikovaných keratinocytů (transdukce genu LacZ retrovirovým vektorem) athymické myši. β -galaktosidáza, produkt transdukovaného genu, byla následně prokazatelná v myši epidermis ve skupinách buněk, které tvořily útvary odpovídající koncepci EPU (MacKenzie 1997, Kolodka et al., 1998).

Značné úsilí bylo věnováno nalezení důkazu obdobné organizace epidermis u

člověka. Podobné, ne však zcela identické struktury, je možno podle některých autorů zastihnout pouze v okrscích, kde je relativně tenká epidermis a bazální membrána není zvlněná (břicho, předloktí, hýždě). Ani v těchto případech ale není možno vymezit bazální cluster buněk tak přesně jako u myši. V oblastech se silným stratum corneum, zvlněnou bazální membránou, či v oblastech tzv. tlustého typu kůže není taková kontinuální struktura sledovatelná prakticky vůbec. Jak dokazují pokusy provedené s transplantací xenoštetu (lidská prepuciální epidermis přenesená na myš) značeného pomocí zeleného a červeného fluorescenčního proteinu (GFP a RFP přeneseny lentivirovým vektorem) (Ghazizadeh 2005), je fluorescenční značka retinována v epidermis minimálně 28 týdnů a to v nejrůznějších oblastech, bez zjevné poziční preference, tedy odlišně od myších modelů.

Již výše citované práce C.S. Pottena vedly k představě o lokalizaci kmenových buněk ve *stratum basale* v oblastech interfolikulární epidermis. Velká pozornost byla rovněž věnována studiu populaci kmenových buněk v oblasti kožních adnex, zejména v oblasti ztlustění zevní kořenové pochvy (*bulge*) vlasového folikulu (Ma et al., 2004, Cotsarelis 2006). Studie hojení epidermis po provedené experimentální lézi, nejčastěji metodou dermabraze (Morris et al., 1983), poukázaly právě na roli reziduálních adnexálních struktur, dermabrazi neodstraněných vlasových folikulů, při regeneraci interfolikulární epidermis. Ve specifickém mikroprostředí (niche) se zde nacházejí také i pluripotentní buňky, které tam vycestovaly za vývoje z neurální lišty (Sieber-Blum et al., 2004).

Další významným problémem navazujícím na samotný průkaz existence a aktivity kmenových buněk v epidermis je jejich identifikace v tkáni. V následujícím období bylo provedeno mnoho studií snažících se přispět k přesné charakterizaci kmenových buněk v epidermis. Bohužel, do současnosti není možné stanovit jednoznačně fenotyp těchto kmenových buněk, kandidátní populaci je možno charakterizovat pouze souborem několika znaků. Přesná a pokud možno jednoduchá a jednoznačná definice takového fenotypu je nutná nejen k dalším teoretickým studiím, ale lze od ní očekávat i velký praktický dopad na poli regenerativní medicíny.

8.2 Znamky kmenových buněk v epidermis

Morfologické znamky byly v počátcích jediným klíčem k odlišení kmenových buněk v epidermis. Pionýrské práce (Lavker a Sun 1982, Lavker a Sun 1983) se zaměřovaly právě na základní mikroskopickou morfologii jednotlivých buněk ve *stratum basale*. Tímto přístupem se podařilo rozlišit buňky *stratum basale* v suprapapilárních oblastech (tj. nad vrcholem papily coria, anglicky "*shallows rete ridges*"), které se vyznačovaly nepravidelnou, pilovitou ("*serrated*"), hranicí cytoplasmy v oblasti dermoepidermální junkce.

Druhou skupinu tvořily buňky lokalizované interpapilárně, tedy v nejhlubší části čepů epidermis, (anglicky "*tips of deep rete ridges*"); pro ně byla charakteristická tzv. primitivní cytoplasma a relativně hladké ohraničení cytoplazmatickou membránou nad oblastí dermoepidermální junkce, velký karyoplazmový poměr a malá velikost (Barrandon a Green 1985).

Právě tyto buňky při autoradiografickém značení H3-thymidinem nebo Br-2-deoxyuridinem vykazovaly velmi pomalý buněčný cyklus, ačkoli v jejich bezprostředním okolí, zejména nad nimi, byly přítomny buňky s vysokou mitotickou aktivitou. Zároveň se výrazně lišila schopnost takových buněk tvořit *in vitro* klony (Barrandon a Green 1987). Tento model je ve shodě s představou o kmenových buňkách a jejich dceřiné přechodně se dělicí populaci. Přesto, že velikost buněk představuje jen velmi hrubý morfologický znak, navíc často *in situ* ve tkáni obtížně exaktně hodnotitelný, existují v poslední době technické možnosti zlepšující využitelnost *in vitro* právě tohoto znaku při segregaci určité subpopulace keratinocytů s biologicky atraktivními vlastnostmi (Dunnwald et al., 2003, Klíma et al., 2007).

Dalším znakem sloužícím k určení kmenové buňky v epidermis může být exprese specifických cytokeratinů. Například exprese keratinu 5 a 14 je specifická pro buňky bazální vrstvy epidermis a keratinu 1 a 10 pro suprabazální keratinocyty. Zejména keratin K10 je považován za marker diferencovaných keratinocytů a je tedy velmi užitečným negativním markerem kmenových buněk v epidermis (Fuchs 1990). Keratin19 se nachází ve fetální kůži v celé bazální vrstvě (Morris a Potten 1994), postnatálně u člověka je lokalizován pouze v zevní kořenové pochvě vlasového folikulu. Keratin 19 exprimující buňky jsou zároveň vysoce pozitivní na $\alpha_3\beta_1$ integrin.

Buňky vysoce pozitivní na β integrin jsou mnoha autory považovány za populaci s velkým výskytem kmenových buněk, ikdyž existuje shoda, že je tento marker neoddeluje od buněk přechodně se dělících (Jones a Watt 1993). V komplexu s pozitivitou β integrinu a K15 je možno v zevní kořenové pochvě vlasového folikulu vymezit skupinu buněk, které jsou schopny velmi dlouho retinovat DNA značku (Lyle 1998).

α_6 integrin je považován mnohými autory za významný znak fenotypového profilu kmenových buněk v epidermis. Keratinocyty vyznačující se vysokou expresí α_6 integrinu zároveň vysoce exprimují i keratin K14, marker *stratum basale*, přičemž postrádají znaky diferencujících se buněk například keratin K 10 a involukrin. Naopak paralelně s poklesem exprese tohoto integrinu se zvyšuje koexprese diferenciačních markerů. Lze tedy konstatovat, že populace α_6 integrin vysoce pozitivní je směsí bazálních a suprabazálních keratinocytů, o jejich vysokém proliferačním potenciálu svědčí zároveň i současná vysoká exprese Ki-67, která klesá paralelně s diferenciací. Je zajímavé, že kmenové buňky jsou pokládány mnoha autory za elementy velmi rychle adherující, tento fakt je dáván do souvislosti s jejich mimořádně vysokou expresí β_1 a $\alpha_6\beta_4$ integrinů (Kaur a Li 2000).

Dalším možným znakem je protein $\Delta Np63\alpha$ – varianta homologu p53. $\Delta Np63$ sehrává důležitou roli při inhibici terminální diferenciace epidermis (Koster et al., 2004). In vitro je známa jeho kolokalizace v jádrech s galektinem-1 (a epitopy rozpoznávanými tímto galektinem), ke kolokalizaci s galektinem-3 však nedochází (Chovanec et al., 2004).

Expese vazebných míst pro rostlinný lektin *Dolichos biflorus* je znakem velmi raného stádia diferenciace buněk epidermis, a to jak za *in vivo*, tak i za *in vitro* podmínek (Dvořánková et al., 2002).

CD71 (transferinový receptor) je považován za negativní marker kmenových buněk epidermis stejně jako involukrin (Kaur a Li 2000), či desmosomální proteiny např. desmoglein-3 (Wan et al., 2003).

Závěrem lze konstatovat, že ideální marker, tedy takový, který by jednoznačně určil kmenovou buňku a byl by zároveň snadno použitelný i při separaci těchto buněk ze suspenze není doposud objeven a že nezbývá než používat definici opírající se o kombinace několika markerů (Watt 1998).

8.3 Nádorové kmenové buňky

Výše uvedená fakta vytvářejí určitou rámcovou představu o funkci kmenových buněk při udržování homeostázy normálních tkání. Je ale nutné uvážit i jejich roli, kterou mohou sehrávat v patologických dějích, zejména u nádorových stavů (Gil et al., 2008) včetně karcinomů vycházejících ze stratifikovaného epitelu (Kamstrup et al., 2007).

Pomalá buněčná kinetika kmenových buněk představuje důležitý prvek pro uchování neporušené genomové informace po celou dobu života nositele. Jestliže je proces replikace DNA relativně nejrizikovějším okamžikem v průběhu buněčného cyklu, pak se malá četnost buněčných mitóz, které v porovnání s dceřinou populací kmenové buňky při asymetrickém způsobu dělení podstupují, jeví jako jednoznačná výhoda. Chyba a možnost její propagace v populačním pohledu je tedy pravděpodobnější u buněk dceřiných, které jsou ovšem již omezeny v počtu budoucích dělení. Vše tedy směřuje k eliminaci chybného klonu a k uchování základního fenotypu tkáně.

Jak bylo ale již výše uvedeno, ani kmenové buňky nejsou zcela dormantní a v případě, že genetická odchylka nebude odstraněna standardními buněčnými mechanismy, je vysoce pravděpodobné, že bude tato kmenová buňka zdrojem dlouhodobě přítomného mutovaného klonu. Obdobně může vést i několik genetických mutací v již výše diferencované buňce k opětovnému získání kmenových vlastností, včetně sebeobnovy (Ailles a Weissman 2007).

V obou případech je ale (stejně jako u normálních kmenových buněk) známa provázanost s jejich okolním prostředím (*niche*), které je tvořeno jinými buněčnými populacemi a extracelulární matrix a ve kterém jsou přítomny nejrůznější regulační faktory.

Pouze v tomto kontextu jsou schopny patrně tyto buňky udržet některé ze základních vlastností, které jsou připisovány normálním kmenovým buňkám. Mezi tyto významné schopnosti patří zvýšená odolnost vůči působení exogenních vlivů, včetně toxických látek a radiace, i odolnost vůči apoptóze. Jestliže přijmeme tento model za relevantní, pak je evidentní, že konvenční onkologické postupy, tedy chemoterapie a radioterapie, mohou podle klasické představy o svém účinku ovlivnit pouze nevelký zlomek (na myším modelu cca. 1%) těchto nádorových kmenových buněk, tedy pouze ty, které jsou ve vhodné fázi buněčného cyklu (Dunnwald et al., 2003). Několikanásobně častěji postihují tyto terapeutické modality přechodně se dělící

dceřiné buňky, které jsou sice zodpovědné za tvorbu značné části objemu tumoru („*bulky disease*“), ale pro pacienta tato buněčná populace nepředstavuje s ohledem na riziko generalizace maligního onemocnění největší riziko. Je známo, že například k úspěšnému přenosu humánního karcinomu prsu na imunokompromitovanou myš postačí 200 buněk izolovaných na základě vhodného „kmenového“ imunofenotypu povrchových znaků, zatímco přenesení více než 500 000 buněk z masy tumoru vykazujících ale již diferencovaný fenotyp ke vzniku tumoru u zvířecího příjemce za stejných podmínek nevede (Al-Hajj et al., 2003).

9. Materiál a metody

9.1 Použitý biologický materiál

Všechny vzorky byly odebírány s příslušným informovaným souhlasem a za striktního dodržení pravidel bioetiky (Helsinská deklarace) a za vědomí příslušné etické komise.

Vzorky normální epidermis ať již pro rutinní histologické, histochemické, či kultivační účely byly převážně odebírány z Kliniky plastické chirurgie FNKV. Jednalo se o zbytkový materiál po redukčních plastických operacích, částečně se jednalo i o materiál odebraný při rozsáhlejších resekcích na operačním sále Dermatovenerologické kliniky 1.LF UK a VFN.

Vzorky bazocelulárního karcinomu byly odebírány na Dermatovenerologické klinice 1.LF UK a VFN v Praze 2, převážně se jednalo o již dříve verifikované bazaliomy, vzorek byl odebírán při radikální resekcí tumoru.

Vzorky spinocelulárního karcinomu byly odebírány po předchozí histologické verifikaci na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku 1.LF UK a FN Motol.

Dále byly v našich experimentech využívány standardní komerčně dostupné linie myších embryonálních fibroblastů 3T3, linie humánních embryonálních fibroblastů LEP₁₉, linie nádorových epitelí FaDu původně izolovaných ze spinocelulárního karcinomu hltanu a linie TC-1 cíleně transformované epitelové myší linie C57BL/6 pomocí proonkogenů HPV 16 E6/E7 a aktivovaného H-ras. Jedná se epitelové myší buňky, které jsou onkogenní a mají vlastnosti fibroblastů.

Xenotransplantace buněk na zvířecím modelu byly prováděny na myši NOD/LtSz-Rag1null (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA), respektive nu/nu CD-1 ve věku 10 týdnů, která byla získána z Ústavu molekulární genetiky České akademie

věd (Praha) se souhlasem odborné komise. Podle standardního protokolu byla intraperitoneálně respektive subkutánně, s nebo bez Matrigelu, aplikována denzní suspenze kultivovaných buněk.

9.2 Kultivace buněk

Vzorky normální kůže i vzorky z nádorů byly ihned po odebrání uloženy do transportního média (kultivační médium se zvýšenou koncentrací antibiotik /penicilin, streptomycin/ a antimykotik /amfotericin B/ - vše Sigma Aldrich, Praha, Česká republika) a urychleně transportovány do kultivační laboratoře. Metodika kultivace keratinocytů vycházela z modifikované metody podle Rheinwalda a Greena (Matoušková et al., 1989). Vzorky byly tedy dále enzymaticky rozvolněny směsí trypsinu a chelatačního činidla (ethylendiamintetraoctová kyselina, EDTA), (obě Sigma Aldrich, Praha, Česká republika). V případě normální kůže byla po enzymatické digesci již snadno mechanicky, tahem, odloučena epidermis od dermis. Získaná epidermis byla dále mechanicky upravena triturací a byla z ní připravena buněčná suspenze vhodná pro zahájení kultivace interfolikulárních keratinocytů. Dermis (po odvolnění epidermis) byla dále využita jako zdroj normálních dermálních fibroblastů a folikulárních keratinocytů, obě populace spontánně migrující z této tkáně byly později separovány na základě odlišné citlivosti vůči enzymatické digesci. Vzorky nádorových tkání byly rovněž po enzymové digesci a mechanickém rozvolnění nasazeny do misek a kultivovány; migrující buňky byly enzymaticky odvolněny a dále subkultivovány.

Linie 3T3 sloužící jako nejčastější podpůrná populace při kultivaci keratinocytů byla dále kultivována v komerčně dostupném médiu HMEM (Hank's salts Modified Eagle's medium, Sevapharma, Praha, Česká republika) s přidavkem 10% bovinního séra (ZVOS, Hustopeče, Česká republika) při zvýšené tenzi oxidu uhličitého (3,3%). Zástava proliferační aktivity byla prováděna aplikací roztoku Mitomycinu C (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika), buňky po tomto zásahu byly enzymaticky odvolněny a nasazeny ve vhodné denzitě jako podpůrná populace pro keratinocyty.

Keratinocyty byly dále kultivovány v médiu obohaceném epidermálním růstovým faktorem, cholera toxinem, hydrokortizonem a inzulinem (vše Sigma Aldrich, Praha, Česká republika). Analogicky mohlo být použito i jiných fibroblastových populací, například dermálních fibroblastů, stromálních buněk z nádorů, linie LEP₁₉, TC-1 kultivovaných v komerčně dostupném médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's

Medium) s 10% fetálního bovinního séra (obé Biochrom, Berlín, Německo) při zvýšené tenzi oxidu uhličitého (5%). Dlouhodobé pasáže linie LEP₁₉ byly prováděny v komerčně dostupném médiu EPL (Sevapharma, Praha, Česká republika) při 5% oxidu uhličitého.

Linie Fadu byla kultivována v komerčně dostupném médiu EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium, Biochrom, Berlín, Německo) s 10% fetálního bovinního séra za podmínek zvýšené tenze oxidu uhličitého bez přítomnosti podpůrné populace. Kultivace ve dvojrozměrných kulturách a přímé kokultivace různých typů buněk byly prováděny nasazením buněk na sterilní standardní krycí skla. Kultivace v trojrozměrných podmínkách byly prováděny v Matrigelu - komerčně dostupném gelu s vysokým obsahem komponent extracelulární matrix (BD Biosciences, Erembodegen, Belgie).

Synchronní kultivace keratinocytů s různými fibroblasty byly prováděny v komerčně dostupných systémech *transwell insert*, které umožňují kultivaci dvou různých typů buněk a jejich vzájemné parakrinní ovlivňování rozpustnými faktory, které mohou volně difundovat přes mikroporózní membránu insertu (kolagen, polykarbonát, kolagenem potažený polytetrafluorethtylen). Tato membrána o výrobcem definované porozitě zcela vylučuje migraci buněk přes ni a tak zamezí přímému kontaktu buněčných populací (BD Falcon, Franklin Falls, USA).

Kryoprezervace jednotlivých buněčných kultur byla prováděna v médiu s 10% dimethylsulfoxidu (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika) v postupně klesajícím teplotním gradientu, buňky byly dlouhodobě deponovány v parách tekutého dusíku.

Detekce virové DNA ve zkoumaných stromálních buňkách byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) na přístroji PCR thermocycler PTC 200 (MJ Research, Inc, Waltham, MA, USA).

Cytogenetická analýza byla provedena po kultivaci buněk v médiu s obsahem demekolcinu (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika) po dobu 4 hodin, buňky byly následně enzymaticky odvolněny, a lyzovány v hypotonickém roztoku KCl a fixovány v kyselém methanolu. Chromozómy v metafázi byly obarveny G-/R- postupem a analyzovány systémem Ikaros version 5 (MetaSystems, Altlussheim, Německo). Takto bylo monitorováno vždy 50 buněk.

Ozařování buněk UV světlem bylo provedeno přístrojem light UV 1000 KL (Waldmann Lichttechnik GmbH & Co., Villingen-Schwenningen, Německo) který emituje záření o vlnové délce 311 nm (narrow band UV) do dávky 1.5 J/m².

9.3 Histochemie

Vzorky tkání normálních i nádorových byly po odběru ihned ještě na operačním sále upraveny na vhodnou velikost cca. 5 x 5 x 5mm a ponořeny do kryoprotektivního média Tissue-Tek (Sakura, Zoeterwoude, Nizozemí). Po 60 minutách, kdy byl vzorek uložen při teplotě +4°C, bylo provedeno rychlé zmrazení v tekutém dusíku a dále byl vzniklý bloček uchován při teplotě -80°C do definitivního zpracování. Zmražená tkáň byla následně nakrájena na kryostatu Cryocut-E (Reichert-Jung, Vídeň, Rakousko) na řezy o síle 7 µm. Tyto byly přeneseny na skla s povrchem modifikovaným poly-L-lysinem (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika).

Získané kultury rostoucí na krycích sklech byly po opakovaném opláchnutí v pufovaném fyziologickém roztoku (PBS) rychle usušeny v laminárně proudícím vzduchu a uchovávány do definitivního zpracování v mrazicím boxu při teplotě -20°C. Kultury v Matrigelu byly po odsátí kultivačního média bleskově zmrazeny v tekutém dusíku a rovněž uchovávány do definitivního zpracování při teplotě -80°C, kdy byly nakrájeny na kryostatu. Před vlastním imunohisto- a cytochemickým zpracováním byly vzorky krátce fixovány v paraformaldehydu (2%w/v paraformaldehydu v PBS /pH 7.3/) a permeabilizovány za použití Triton X-100 (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika). Bylo použito metody vícenásobného značení na úrovni jedné buňky (Froňková et al., 1999). Ředění protilátek použitých ve studiích respektovalo pokyny uvedené výrobcí jednotlivých protilátek. Nespecifická vazba protilátek druhého kroku byla blokována pomocí prasečího séra (DAKO, Brno, Česká republika). Po obarvení byl vzorek zamontován do média Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a hodnocení vzorků a měření bylo prováděno na fluorescenčním mikroskopu Optiphot-2 (studie I. a II.) a později (studie III. až VIII.) Nikon Eclipse 90i (Nikon, Praha, Česká republika) vybaveném specifickými filtry (pro vlnové délky barviv fluorescein isothiocyanát /FITC/, tetramethylrhodamin isothiocyanát /TRITC/, 4',6'-diamidino-2-phenylindol dilaktát DAPI) a chlazenou CCD kamerou o vysokém rozlišení Cool-1300Q (Vosskühler, Osnabrück, Německo). Analýza obrazu a měření fluorescenčních profilů bylo prováděno pomocí softwarového systému Lucia 3.2 respektive 5.1 (Laboratory Imaging, Praha, Česká republika). Výsledky byly hodnoceny Studentovým t- testem. Specificita imunohistochemické reakce byla ověřena nahrazením protilátky prvního kroku jinou v dané tkáni irelevantní protilátkou. Barvení jaderné DNA bylo

univerzálně prováděnou pomocí DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindol dilaktát, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika.).

Přehled použitých protilátek:

- β_1 integrin (CD29), mouse antihuman monoclonal ab (Immunotech, Praha, ČR).
- β -catenin, rabbit antihuman polyclonal ab, (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA)
- Cytokeratin, mouse antihuman monoclonal ab, clone LP34 (Dako, Brno, ČR)
- Epithelial antigen, mouse antihuman monoclonal ab, clone Ber-EP4 (Dako, Brno, ČR)
- Fibronectin, mouse monoclonal ab, (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- Galectin-1 non-crossreactive rabbit polyclonal ab, (Abcam, Cambridge, UK)
- Galectin-1, non-crossreactive rabbit polyclonal ab, připravil H.-J. Gabius a S. André
- Galectin-1, mouse monoclonal ab, clone 25C1, (Vector Lab, Burlingame, CA, USA),
- Galectin-2 non-crossreactive rabbit polyclonal ab, připravil H.-J. Gabius a S. André
- Galectin-3 non-crossreactive rabbit antihuman polyclonal ab, připravil H.-J. Gabius a S. André
- Galectin-3 non-crossreactive rabbit polyclonal ab, (Abcam, Cambridge, UK)
- Galectin-3, mouse monoclonal ab, clone 9C4 (VectorLab., Burlingame, CA, USA),
- Galectin-7 non-crossreactive rabbit polyclonal ab, připravil H.-J. Gabius a S. André
- Galectin-9 non-crossreactive rabbit polyclonal ab, připravil H.-J. Gabius a S. André
- HMW cytokeratin, mouse antihuman, monoclonal ab, (Dako, Brno, ČR)
- Keratin 10, mouse antihuman monoclonal ab, clone DE-K10 (Dako, Brno, ČR)
- Keratin 14 mouse antihuman monoclonal ab, clone CKB1 (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- Keratin 19 mouse antihuman monoclonal ab, (clone RCK108 -Dako, Brno, ČR, respektive Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- Keratin 20, mouse monoclonal ab, (Dako, Brno, ČR)
- Keratin 5/6, mouse antihuman, monoclonal ab, clone D5/6B4 (Dako, Brno, ČR)
- Keratin 8, mouse antihuman, monoclonal ab, clone 35 β H11 (Dako, Brno, ČR)
- Keratin peptide Kp37 (Sigma-Aldrich, Praha, ČR.).
- Ki67 - mouse antihuman monoclonal ab, clone MIB-1 (Dako, Brno, ČR).
- Kolagen IV, mouse antihuman monoclonal ab, clone COL94 (SigmaAldrich, Praha, ČR)
- Nucleostemin, goat antirat polyclonal ab (Neuromics, Bloomington, MN, USA).
- PML – mouse antihuman monoclonal ab, (Dako, Brno, ČR)
- Smooth muscle actin (SMA), mouse antihuman monoclonal ab, clone 1A4 (Dako, Brno, ČR)
- SNAIL, rabbit antihuman polyclonal ab, clone ab 17732 (Abcam, Cambridge, UK)
- Splicing factor SC35 – mouse antihuman monoclonal ab, clone SC-35 (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- Vimentin, mouse antihuman monoclonal ab, clone V9 (Dako, Brno, ČR)
- Vimentin, rabbit antihuman polyclonal ab, clone ab7783 (Abcam, Cambridge, UK)
- Wide spectrum cytokeratin, rabbit antihuman polyclonal ab, clone ab9377 (Abcam, Cambridge, UK)

Protilátky druhého kroku

- FITC-labeled swine anti-mouse immunoglobulins (AlSeVa, Praha, ČR)
- FITC-labeled swine anti-rabbit immunoglobulins (AlSeVa, Praha, ČR)
- TRITC-labeled goat anti-mouse immunoglobulins (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- TRITC-labeled donkey anti-goat immunoglobulins (Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA)
-

9.4 Lektinová histochemie

K detekci vazebných míst pro jednotlivé galektiny byly použity biotinylované galektiny, které připravil H.-J. Gabius a S. André, jako značení druhého kroku byl použit ExtrAvidin-TRITC (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika.) Jako test specifické reakce při lektinové histochemii byl buď vypuštěn z protokolu biotinylovaný galektin, popřípadě byla provedena inhibice laktózou.

9.5 Průtoková cytometrie (FACS)

Měření byla prováděna na přístroji FACSCalibur (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) na suspenzi enzymaticky odvolněných buněk po neutralizaci trypsinu sérovými proteiny; Analýza výsledků byla provedena softwarem Summit_ V3.3. Build 1024 (DakoCytomation, Fort Collins, CO, USA). Stanovovány byly následující povrchové znaky:

- CD105 (clone NS6), (Dako-Cytomation, Glostrup, Dánsko)
- CD105, (Dako, Brno, ČR)
- CD106, (Becton Dickinson, Praha, ČR)
- CD11b, (Becton Dickinson, Praha, ČR)
- CD11c, (Dako, Brno, ČR)
- CD14, (Dako, Brno, ČR)
- CD166 (Becton Dickinson, Praha, ČR),
- CD166(clone 3A6(Pharmingen, Erembodegem, Belgie)
- CD18, (Becton Dickinson, Praha, ČR)
- CD19e (Chemicon, Temecula, CA, USA)
- CD235a, (Dako, Brno, ČR)
- CD29 (clone MAR4) (Pharmingen, Erembodegem, Belgie)
- CD29, (Becton Dickinson, Praha, ČR)
- CD34, (Dako, Brno, ČR)
- CD44 (clone G44-26) (Pharmingen, Erembodegem, Belgie),
- CD44, (Becton Dickinson, Praha, Česká republika)
- CD45 (clone T29/33, (Dako-Cytomation, Glostrup, Dánsko)
- CD45, (Becton Dickinson, Praha, ČR)
- CD45, (Dako, Brno, ČR)
- CD49a, (Becton Dickinson, Praha, ČR)
- CD49c (Chemicon, Temecula, CA, USA)
- CD49d, (Becton Dickinson, Praha, ČR)
- CD63, (Becton Dickinson, Praha, ČR)
- CD71, (Dako, Brno, ČR)
- CD90 (clone 5E10) (Pharmingen, Erembodegem, Belgie)
- CD90, (Becton Dickinson, Praha, ČR)
- CXCR4 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

- HLA-A, B, C (clone W6/32), (Dako-Cytomation, Glostrup, Dánsko)
- HLA-A, -B, -C (Dako, Brno, ČR),
- HLA-DR, DP, DQ (clone CR3/43), (Dako-Cytomation, Glostrup, Dánsko)
- Negativní kontrola: IgG1 (Dako, Brno, ČR)

9.6 Statistické hodnocení klinicko-patologických parametrů

Statistická analýza klinicko-patologických parametrů ve studii VIII byla prováděna χ^2 testem s výjimkou hodnocení Ki-67, tento parametr byl ošetřen pomocí Mann-Whitneyho U testu. Celkové přežití a období bez známky choroby (*disease-free survival*) byly stanoveny standardizovanou metodikou, databáze byla analyzována pomocí Gehan-Wilcoxonova testu. Analýzy byly prováděny pomocí softwaru Statistica 6.0 (StatSoft, Praha, ČR).

Detailní popis použitých metod je v jednotlivých publikacích tvořících nedílnou součást této dizertační práce.

10. Výsledky jednotlivých prací, diskuze a citační ohlas (WoS)

- I. Dvořánková B, Smetana K Jr., Chovanec M, Lacina L, Štork J, Plzáková Z, Galovičová M, Gabius HJ: **Transient expression of keratin K19 is induced in originally negative interfollicular epidermal cells by adhesion of suspended cells.** *Int. Molec. Med.* 2005,16, p. 525-531. (IF 2,090)

Doposud nebyl stanoven všeobecně akceptovaný fenotyp kmenové populace buněk v epidermis, který by byl založen na přítomnosti jediného znaku. K přesnější charakterizaci „kmenovosti“ (*stemness*) těchto buněk je potřeba v současnosti používat kombinaci několika znaků, což komplikuje jejich separaci a tím i následný výzkum a biotechnologické využití.

Naše práce potvrzuje známé morfologické vlastnosti kandidátní populace (tj. malý průměr kolem 10 μm) a expresi keratinu K19 v lidské epidermis. 25% keratinocytů, které byly pozorovány v oblasti ztluštění zevní kořenové pochvy („*bulge*“) vlasových folikulů, vykazovalo pozitivitu tohoto znaku, zatímco keratinocyty interfolikulárních úseků epidermis byly prakticky zcela (99,8%) negativní. Průměr K19 pozitivních buněk ale byl bez ohledu na původ těchto keratinocytů prakticky identický.

K19 pozitivní buňky z oblasti „*bulge*“ zároveň exprimovaly vazebné epitopy pro galektin-1 v jádrech a byla pozorována jen nepatrná pozitivita signálu v cytoplazmě. Naproti tomu v interfolikulárních oblastech buňky uniformně vykazovaly vazebná místa pro galektin-1 v cytoplazmě a nebyla detekována jeho vazebná pozitivita v oblasti jádra.

V podmínkách *in vitro* byly porovnány tyto výsledky zjištěné *in situ* pro obě populace keratinocytů. Bylo zjištěno, že folikulární keratinocyty jsou ve velkém procentu pozitivní na K19 a že buňky K19 pozitivní i negativní exprimují jaderná vazebná místa pro galektin-1. Pozitivita K19 alespoň části těchto buněk byla zachována v průběhu celé kultivace (168 hodin maximálně) stejně jako u vazebných míst pro galektin-1. Překvapivě i buňky izolované z interfolikulární epidermis, kterou považujeme podle popsaného stavu *in situ* za K19 negativní, vykazovaly v krátkém časovém intervalu vysokou pozitivitu K19, tato ale rychle společně s vazebnými místy pro galektin-1 v jádrech mizela. U buněk K19 pozitivních byly prokazovány určité morfologické odlišnosti (buňky byly kulatější a jejich cytoplazma

byla méně rozprostřená), jejich stanovený průměr byl vždy statisticky signifikantně menší než u K19 negativních buněk. Jejich průměr byl srovnatelný s průměrem buněk vysoce pozitivních na přítomnost β_1 integrinu, které se vyznačovaly vysokou odolností vůči anoikis a přežívaly dlouhodobě v neadhezivním prostředí (24 hodin při 37°C).

K posouzení vlivu senescence v tkáňové kultuře byly porovnány fenotypy buněk čerstvě izolovaných z tkáně a buněk dlouhodobě kultivovaných *in vitro* (tj. 1272 hodin). Pozitivita K19 i vazebných míst pro galektin-1 v jádře byla zaznamenána ve zvýšené míře i u folikulárních keratinocytů (5. pasáž), které byly po 1272 hodinách enzymaticky odvolněny a bylo jim následně dovoleno readherovat. Buňky interfolikulárního původu (7. pasáž) jevíly pozitivitu K19 po readhezi, ale vazebná místa pro galektin-1 byla v jádrech negativní. Rozdíl v počtu pasáží je způsoben metodou izolace z tkáně. Současně bylo u takových dlouhodobě kultivovaných buněk morfologicky evidentní, že jsou narozdíl od adherujících buněk čerstvě připravených z tkáně mnohem více rozprostřené, jejich průměr je větší, mnoho z těchto zejména interfolikulárních buněk jeví vakuolizaci a cytochemicky lze u nich prokázat i známky terminální diferenciace (keratohyalinová granula).

Tato studie demonstruje za použití konvenční imunohisto- a cytochemie rozšířené o postupy lektinové histochemie diverzitu předpokládané kmenové populace v epidermis. Byly ověřeny rozdíly mezi fenotypovým profilem folikulárních a interfolikulárních keratinocytů. Zdá se, že tyto poznatky harmonizují s představou o hierarchii kmenových buněk v epidermis. Současně je tak ale i demaskována výrazná fenotypová plasticita keratinocytů v závislosti na zevních podmínkách. Potvrzuje se tím definitivně, že nelze relevantně spoléhat na jednotlivý znak jako na průkaz kmenovosti. Jednotlivé ukazatele je třeba vždy striktně zatím hodnotit v kontextu dalších znaků a situace, ve které se sledovaná buňka nachází. Průkaz vazebných míst pro galektin-1 v jádrech kandidátních buněk může v budoucnosti být dalším ze znaků, který zpřesňuje naše poznatky o diferenciačních pochodech v epidermis, i když tento jev sám o sobě vyžaduje do budoucna bližší objasnění. Sám fakt, že v návaznosti na zevní stimul (odvolnění a readheze) dokáží keratinocyty ve významném procentu projít nejspíše určitými změnami svého diferenciačního programu, které jsou ve svém výsledku fenotypicky zjizitelné, je důležitým poznatkem s potenciálním terapeutickým dopadem zejména na problematiku hojení ran a technologii přípravy kožních náhrad.

Tato práce byla citována podle Web of Science (mimo autocitace):

- a) Klima, J. et al., *Folia Biol.* 53, 33-36, 2007
- b) Motlik, J. et al., *Theriogenol.* 67, 105-111, 2007
- c) Schlabe, J. et al., *Burns* 34, 376-384, 2008

II. Lacina L, Plzáková Z, Smetana K Jr., Štork J, Kaltner H, André S: Glycophenotype of Psoriatic Skin. *Folia Biologica, (Praha)* 2006 ,52, p. 10-15. (IF 0.387)

Psoriasis vulgaris je jednou z nejvýznamnějších kožních chorob. Přes její značné rozšíření zůstává její etiologie a mnoho z patogenetických mechanismů neznámo, či objasněno jen kuse. Naším cílem bylo srovnat strukturu normální tkáně a tkáně z psoriatického ložiska a případné odchylky blíže popsat i za užití lektinové histochemie.

V naší studii nebyl nalezen rozdíl mezi distribucí keratinů K-10 a Kp37 v normální epidermis a ve vzorcích z psoriatických lézí. K-10 byl detekován suprabazálně, zatímco Kp37 ve *stratum basale*. V obou typech vzorků byla také shodně zaznamenána v cytoplasmě pozitivita galektinu-7 s maximem v oblasti *stratum corneum*. Vazebná místa pro galektin-7 nebyla zastižena.

Galektin-1 nebyl prokázán ani v normální ani psoriatické epidermis, ale ve vzorcích z psoriatických ložisek byla zjištěna velmi výrazná pozitivita tohoto galektinu extracelulárně v dermis. Výrazný byl i rozdíl v expresi galektinu-3, v normální epidermis je exprimován suprabazálně, u psoriázy nebyl detekován vůbec.

Dále byly zkoumány i reaktivní epitopy pro endogenní lektiny. Vazebná místa pro galektin-1 byla pozorována v normální epidermis, v psoriatické epidermis zcela chyběla. Vazebná místa pro galektin-3 byla přítomna u obou typů vzorků, nejvíce jich bylo v hyperkeratózách překrývajících psoriatická ložiska. Mnoho vazebných míst pro galektin-3, stejně jako samotný tento galektin, rovněž exprimují endotelové buňky v dermis psoriatických ložisek, toto zjištění považujeme za důkaz aktivace endotelu v průběhu vzniku a rozvoje psoriatické diatézy. Proliferující keratinocyty byly v normální epidermis přítomny ve *stratum basale*, v psoriatické epidermis i

suprabazálně. Tyto buňky však nebyly podle očekávání rozpoznávány galektinem-3, což je ve shodě se staršími pracemi (Plzák et al., 2001, Holíková et al., 2002).

Byly tedy prokázány významné rozdíly mezi expresí endogenních lektinů a jejich reaktivních glykoligandů v patologické tkáni psoriatického ložiska ve srovnání s normální epidermis. Tyto poznatky dále zpřesňují představu o strukturní podstatě patologických změn zejména s ohledem na aberantní glykosylaci u této běžné choroby a dále upozorňují na možnosti jejího sledování pomocí lektinové histochemie.

Tato práce byla citována podle Web of Science (mimo autocitace):

- a) Čada Z. et al.,: *Anticancer Res.* 27: 3279-3284, 2007
- b) Klíma J. et al.,: *Folia Biol.* 53: 33-36, 2007

III. Lacina L, Smetana K Jr., Dvořánková B, Štork J, Plzáková Z, Gabius HJ: Immunocyto- and histochemical profiling of nucleostemin expression: Marker of epidermal stem cells? *J Dermatol Sci*, 2006, 44(2), p. 73-80. (IF 2.636)

Naše předchozí práce mapující znaky kmenovosti v epidermis a jejich ovlivnitelnost environmentálními faktory znovu dokladovala, že je stále nutné definovat fenotyp předpokládané kmenové populace pomocí souboru znaků. V soudobé literatuře byl diskutován význam nukleosteminu, proteinu vážícího se na GTP a interagujícího s p53 a jeho přesunů mezi jadérkem a nukleoplazmou. Tento protein byl popsán u kmenových buněk kostní dřeně a nervové tkáně a u některých nádorů (Tsai a McKay 2002 a 2005). Jeho exprese v epidermis a její vztah ke kmenové populaci byla doposud neznáma.

V naší studii byla detekována přítomnost nukleosteminu nejen podle předpokladů ve *stratum basale*, ale i v suprabazálních vrstvách, kde signál kolokalizoval i s expresí keratinu 10, markeru terminálně diferencovaných keratinocytů. Nukleostemin byl prokázán bez ohledu na proliferační stav buňky, což bylo hodnoceno koexpresí proliferačního znaku Ki-67.

In vitro jsme testovali přítomnost nukleosteminu ve folikulárních i interfolikulárních keratinocytech. V případě interfolikulárních keratinocytů byl nukleostemin zjištěn jen velmi málo či byl zcela negativní bez ohledu na to, zda tyto keratinocyty byly kultivovány samostatně, či spolu s buňkami podpůrnými

(myší fibroblasty linie 3T3). U keratinocytů folikulárních byla dobře znázornitelná přítomnost nukleosteminu v nukleolech, tento stav byl ale závislý na přítomnosti podpůrných buněk. Bez nich nukleostemin exprimován nebyl. Ve všech případech bez ohledu na expresi nukleosteminu byly populace keratinocytů dobře vitální a docházelo k proliferaci, což bylo opět hodnoceno přítomností Ki-67. Dále byla hodnocena koexprese nukleosteminu s K19, kdy až 2/3 folikulárních keratinocytů vykazovaly fenotyp K19⁺/nukleostemin⁺, zatímco interfolikulární K19 pozitivní keratinocyty *in vitro* byly nukleostemin negativní. Rozdíly mezi oběma populacemi keratinocytů byly shledány i v expresi endogenních lektinů, u nukleostemin pozitivních folikulárních keratinocytů byl současně v jádře přítomen i galektin-1, zatímco u interfolikulárních nukleostemin pozitivních buněk nebyl tento galektin v jádře přítomen. Galektiny -3 a -9 nebyly v jádrech detekovány vůbec, oba byly ale přítomny v cytoplazmě, kde intenzita signálu pro galektin-9 byla silnější.

Dále jsme pozorovali nukleostemin i za vybraných patologických situací. Hojně byl přítomen v nádorových buňkách bazocelulárního karcinomu, kde byla intenzita signálu v porovnání s normální epidermis silnější. Dále jsme testovali přítomnost nukleosteminu u nádorové linie FaDu, kde byl nalezen v 93% společně s galektinem-1 v jádře. Postupem doby kultivace jaderná exprese galektinu-1 klesala, zatímco exprese nukleosteminu byla beze změny.

Závěrem lze konstatovat, že nukleostemin nepředstavuje v epidermis *in situ* jednoznačný marker kmenovosti, protože je přítomen i v subrabazálních vrstvách v buňkách K10 pozitivních. Zdá se ale, že zejména *in vitro* je ale přítomnost nukleosteminu indikátorem určitého proliferačního/diferenciačního stavu. Jeho funkční význam musí být ještě specifikován.

Tato práce byla citována podle Web of Science (mimo autocitace):

- a) Čada Z et al.,: *Anticancer Res.* 27: 3279-3284, 2007
- b) Klima J et al.,: *Folia Biol.* 53: 33-36, 2007
- c) Jafarnejad SM et al.,: *Cell Prolif.* 41: 28-35, 2008
- d) Siddiqui S et al.,: *Circulation Res* 103: 89-97, 2008

IV. Lacina L, Smetana K Jr, Dvořánková B, Pytlík R, Kideryová L, Kučerová L, Plzánková Z, Štok J, Gabius HJ, André S: Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *Brit J Dermatol* 2007, 156: p. 819-829. (IF 3.503)

Dlouhodobé studium keratinocytů umožnilo porovnání jejich *in situ* stanoveného fenotypu s fenotypem stanoveným *in vitro*. Toto srovnání primárně vycházelo ze sledování procesů hojení a potřeby kultivace a expanze keratinocytů různými způsoby *in vitro* zejména pro terapeutické účely (Dvořánková 1996). Pozdější snahy o modelování patologických situací v epidermis byly umožněny na základě modifikací této základní propracované metodiky.

Iniciálně byly sledovány a porovnávány kokultury několika linií fibroblastů a normálních interfolikulárních keratinocytů. Kromě standardně používané podpůrné myši fibroblastové linie 3T3 byly jako podpůrné buňky použity i fibroblasty linie LEP₁₉, normální dermální fibroblasty a fibroblasty získané ze stromatu lidského bazocelulárního karcinomu. Již při kultivaci byla patrna výrazně vyšší tvorba extracelulární matrix v případě, že byly jako podpůrné buňky použity posledně jmenované fibroblasty. Imunohistochemicky byl v této mezibuněčné hmotě masivně prokázán galektin-1, což je v dobrém souladu s pozorováním na řezech nádory. V ostatních kokulturách (LEP₁₉, 3T3, dermální fibroblasty) byla produkce extracelulární matrix bohaté na galektin-1 jen malá, či žádná.

Keratinocyty bez ohledu na typ podpůrných fibroblastů exprimovaly iniciálně (tedy krátce po adhezi, tj. do 48 hodin) uniformně jako marker *stratum basale* keratin K14 a keratin K19. Výrazné odlišnosti byly ale detekovatelné již po 5 dnech společné kultivace. Keratinocyty na standardních podpůrných buňkách 3T3 a stejně tak na LEP₁₉ a normálních lidských dermálních fibroblastech tvořily velké kompaktní kolonie, zatím co buňky kokultivované se stromálními fibroblasty tvořily jen malé kolonie disperzního charakteru. Ve shodě s naší předchozí prací byla po 5 dnech od adheze populace keratinocytů negativní při barvení na keratin K19, pouze v kokultuře se stromálními fibroblasty byla udržena pozitivita K19. Dále byl pouze v tomto typu kokultury v keratinocytech detekován výrazně nucleostemin a Ber-EP4 i jaderná vazebná místa pro galektin-1, což opět odpovídá situaci v čepích bazocelulárního karcinomu. Všechny keratinocyty rostoucí na stromálních buňkách vykazovaly i po 5 dnech pozitivitu K14, zatím co u jiných typů fibroblastů byla

omezena jen na periferii kolonie, která simuluje situaci při dermoepidermální junkci *in situ*. Samotná populace stromálních fibroblastů vykazovala iniciálně pozitivitu při barvení na vimentin a částečně i na SMA (smooth muscle actin), dlouhodobé udržení těchto buněk v kultuře bylo doprovázeno udržením biologické aktivity vůči keratinocytům, avšak zaznamenali jsme i ztrátu některých tinkčních vlastností a zároveň byly detekovány v těchto pozdějších pasážích cytogenetické odchylky.

K určení, zda jsou kokultivací navozené odchylky od normálního fenotypu závislé na přímém kontaktu dvou buněčných populací, tedy na přímé epitelo-mezenchymové interakci, jsme provedli kultivaci v systému, ve kterém jsou obě populace separovány mikroporózní membránou, která umožňuje výměnu biologicky aktivních molekul (např. růstových faktorů), neumožňuje však průchod buněk. Touto synchronní kultivací bylo zjištěno, že i v tomto systému je v keratinocytech po 5 dnech detekovatelný K19 a nukleostemin. Dalším krokem bylo ověření výsledků kultivací keratinocytů ve filtrátu média, ve kterém nejdříve rostly buňky stromální. Touto metachronní kultivací ale nebylo dosaženo analogické změny fenotypu keratinocytů.

Zdá se, že podstatou zjištěných odchylek je rozdílná produkce solubilních biologicky aktivních látek o předpokládané nízké koncentraci. Na základě takového parakrinního působení stromálních buněk tedy bylo dosaženo změny fenotypu normálních interfolikulárních keratinocytů, jejichž výsledný fenotyp připomínal v některých rysech epitelovou komponentu nádoru, ze kterého byly stromální buňky získány. V některých rysech připomínal i kmenové buňky epidermis. Výrazná produkce extracelulární matrix bohaté na galektin-1 a její funkční konsekvence nejsou přes svou zajímavost doposud objasněny. Je zjevné, že interakce mezi epitelem a mezenchymem sehrává důležitou roli v morfogenezi nejen za normálních stavů, ale i v patologických situacích jako jsou nádory.

Tato práce byla citována podle Web of Science (mimo autocitace):

- a) Čada Z et al., *Anticancer Res.* 27: 3279-3284, 2007
- b) Siddiqui S et al., *Circulation Res* 103: 89-97, 2008

- V. **Lacina L, Dvořánková B, Smetana K Jr, Chovanec M, Plzák J, Tachezy R, Kideryová L, Kučerová L, Čada Z, Bouček J, Kodet R, André S, Gabius HJ: Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture. *Int Radiation Biol*, 2007,83: p. 837-848, (IF 1.468)**

Dříve vyslovený předpoklad o významu interakce mezi epitelem a okolním mezenchymem v průběhu maligního onemocnění byl v této práci testován na příkladu spinocelulárního karcinomu z oblastí hlavy a krku.

Izolované stromální fibroblasty byly vimentin pozitivní, vyznačovaly se normálním karyotypem, výraznou proliferační potencií (Ki-67 cca v 1/3 buněk), současně část těchto fibroblastů exprimovala v nukleolech nukleostemin (bez ohledu na Ki-67 pozitivitu). Tyto buňky byly uniformně (podle očekávání) negativní při barvení na cytokeratiny. Vzhledem k tomu, že je velká část karcinomů hlavy a krku asociována s HPV infekcí, byla provedena příslušná screeningová detekce s negativním výsledkem. Byla zaznamenána exprese galektinu-1 v cytoplazmě těchto stromálních buněk, stejně tak byl tento galektin masivně přítomen v jimi tvořené extracelulární matrix. Současně byla detekována vazebná místa pro galektin-1 nejen v jádrech těchto fibroblastů, ale i v nádorovém epitelu, který byly paralelně izolován ze vzorků nádoru. Zmíněné keratinocyty dále exprimovaly keratin K8, tedy intermediární filamenta, která se normálně vyskytují v tomto epitelu pouze prenatalně a postnatalně jsou přítomná pouze v některých agresivních nádorech. Tyto poznatky byly v souladu s fenotypem stanoveným *in situ* při histochemickém vyšetření resekovaného tumoru.

Takto charakterizované stromální fibroblasty jsme použili v přímé kokultuře ať již ve dvourozměrné na podložních sklech, či ve prostorové v Matrigelu s analogickými výsledky. Ve dvourozměrných kulturách byl markantní rozdíl již v morfologii kolonií kokultivovaných normálních interfolikulárních humánních keratinocytů. Zatímco na konvenčně užívaných podpurných buňkách nabývaly tyto kolonie běžné kompaktní, dobře ohraničené, morfologie, v pokusu se stromálními fibroblasty vykazovaly keratinocyty atypickou morfologii s mnoha výběžky a vznikající kolonie byly difúzní a neostře ohraničené. Stanovený fenotyp těchto keratinocytů byl

atypický, důležitou odchylkou byly zejména pozitivita K8, tento znak byl exprimován markantně na hranicích kolonií, tento distribuční vzorec asocioval nádorovou „*invazní frontu*“ *in situ*. Tumor, z něhož jsme stromální fibroblasty připravili, patřil rovněž ke K8 pozitivním nádorům. K8 pozitivní keratinocyty v experimentu obsahovaly rovněž velká nukleostemin pozitivní jádérka. Tento znak byl ale závislý na proliferačním stavu stromálních buněk. Pokud byly keratinocyty kultivovány společně s plně vitálními stromálními fibroblasty, pak v nich bylo možno detekovat pozitivitu nukleosteminu. V případě, že byly stromální buňky ošetřeny Mitomycinem C, tedy látkou, která zastaví jejich proliferaci, pak nebylo možno nukleostemin v nukleolech keratinocytů znázornit. Normální keratinocyty současně v tomto typu kokultury dlouhodobě exprimovaly i K19. Dále byl pozorován přesun β -cateninů z asociace s cytoplazmatickou membránou do cytoplazmy a do jádra.

Přítomnost keratinů byla v tomto typu kokultury současně znázorněna i v keratinocytech paralelně s expresí vimentinu. Tento poněkud kuriózní fenotyp považujeme za projev epitelu-mezenchymového přechodu *in vitro*. Dalším důkazem, který podporuje tuto hypotézu, je přítomnost transkripčního faktoru Snail v jádrech těchto buněk.

Závislost výše popsaných fenotypových změn normálních interfolikulárních keratinocytů na přímém kontaktu se stromálními fibroblasty byla testována separací obou populací mikroporózní membránou v inzertových systémech. V této synchronní kokultuře bylo dosaženo opět positivity keratinů 8 a 19 a nukleosteminu. Opět byla zaznamenána v keratinocytech i koexprese keratinů s vimentinem. Keratinocyty pod vlivem filtrovaného média obohaceného o předpokládané solubilní faktory (metachronní kultivace) exprimovaly K8 a vimentin. K19 a nukleostemin byly v tomto experimentu negativní.

Vzhledem ke stále nejasnému původu stromálních buněk a námi *in vitro* sledovaného epitelu-mezenchymového přechodu jsme vystavili stromální buňky působení prodiferenčního činidla butyrátu sodného. Předpokládaná fenotypová změna směrem k výraznému zastoupení buněk s epitelovým fenotypem ale nebyla dosažena. Paralelně prováděný pokus s implantací etablované nádorové linie FaDu imunodeficientní myši rovněž neprokázal novotvorbu stromálních fibroblastů z transplantované čistě epitelové populace. Stroma vznikající v markantně rostoucích tumorech bylo u recipienta tvořeno jeho vlastními fibroblasty, což se podařilo

prokázat specifickou monoklonální protilátkou proti vimentinu (Dako clone V9), která je schopna jemně diskriminovat lidský a myší antigen.

V závěru lze konstatovat, že byl *in vitro* demonstrován nepochybný biologický účinek stromálních buněk, který je zprostředkován pomocí solubilních biologicky aktivních faktorů. Jejich přesná (genová a proteomická) analýza je naším dalším úkolem. Lze však již v tomto stádiu oprávněně uvažovat o významu těchto vztahů v průběhu vzniku a rozvoje maligních onemocnění. Předpokládáme, že lze uvažovat o stromálních fibroblastech jako o vysoce aktivním účastníkovi maligních nádorových procesů, který byl v současných terapeutických schématech značně opomíjen. Nezanedbatelný je zejména jejich příspěvek k tvorbě specifického mikroprostředí (niche), které může být rozhodujícím faktorem komplikujícím u pacientů eradikaci nádorové buněčné populace. Udržení některých charakteristik kmenových buněk, zejména určité schopnosti sebeobnovy, může být faktorem, který umožňuje nádorovým buňkám unikat konvenčním onkologickým terapeutickým postupům a přispívat tak k další progresi nádorového onemocnění.

VI. Smetana K Jr, Dvořánková B, Lacina L, Čada Z, Vonka V. Human hair follicle and interfollicular keratinocyte reactivity to mouse HPV16-transformed cells: An *in vitro* study. *Oncol Rep*, 2008, 20(1), p.75-80. (IF 1.597)

Otázka původu stromálních fibroblastů, která byla diskutována již v úvodní části, zůstává stále definitivně nevyřešena. Vzhledem k námi již dříve pozorovaným změnám fenotypu normálních keratinocytů rostoucích pod vlivem nádorových stromálních buněk (viz Výsledky a diskuse u předchozích dvou publikací) se jako neopomenutelná hypotéza jeví možnost vzniku nádorového stromatu přímo z geneticky alterovaných buněk epitelu mechanismem epitelu-mezenchymového přechodu.

Tento jev jen těžko pozorovatelný *in vivo* a jen velmi obtížně cíleně modelovatelný *in vitro* musí nutně vyústit ve vznik dvou sice morfologicky odlišných populací (nádorový parenchym *versus* nádorové stroma). Základní sada genetických alterací musí ale v tomto případě být sdílena oběma populacemi a případná genetická diverzita je tak jen druhotná.

Jestliže jsou některá nádorová onemocnění pevně asociována s infekcí onkogenními viry včetně HPV, pak toto pravidlo musí platit i pro výsledné genetické změny stromatu, pokud vzniklo epitel-mesenchymovým přechodem.

Buněčná linie TC-1 byla zvolena jako model tohoto procesu. Byla totiž cíleně připravena transformací epitelových buněk (myší kmen C57BL/6) pomocí onkogenů HPV 16 E6/E7 a aktivovaného *H-ras*. Tyto buňky byly použity jako podpůrná populace pro růst normálních humánních folikulárních a interfolikulárních keratinocytů *in vitro*. Pro srovnání byly použity kultury, kde podpůrné buňky představovaly buňky linie 3T3 rovněž myšího původu.

Již pozorování tvaru kolonií ukázalo první rozdíly, oba typy normálních keratinocytů pod vlivem TC-1 netvořily klasické ploché, dobře demarkované kolonie jako na kontrolních podpůrných buňkách 3T3, ale vznikaly polokulovité, místy až papilomatózně výběžkaté kolonie. Keratinocyty obou typů byly v těchto kulturách velmi malé, jejich hranice byly ale jen obtížně odlišitelné, částečně i dílem prostorového uspořádání kolonií. Měřitelným parametrem byla tedy jen plocha jejich jádra po obarvení barvivem 4',6'-diamidino-2-phenylindol dilaktát (DAPI). Změřené parametry byly srovnatelné s plochou jader rychle adherujících keratinocytů (tj. na integriny bohatých, tedy nesoucích některé znaky kmenových buněk). Po separaci TC-1 buněk v kokultuře mikroporózní membránou byly markantní první rozdíly mezi těmito typy keratinocytů, interfolikulární keratinocyty tvořily velké kolonie, zatímco folikulární keratinocyty tvořily kolonie mnohem menší.

Imunohistochemicky byly opět pozorovány zásadní rozdíly proti kontrolním kokultuřám s 3T3 feederem. Keratinocyty kokultivované s TC-1 vykazovaly téměř uniformně pozitivitu K8 a K19, ale navíc masivně, tj. ve více než 50% buněk, i koexpresi keratinu spolu s vimentinem. Tento fenotyp byl ověřen i po separaci mikroporózní membránou a i po ošetření TC-1 Mitomycinem C se stejnými výsledky. V malém procentu (tj. pod 5%) byly v kokultuřách keratinocytů a TC-1 přítomny i obrovské buňky s monstrózními jádry rovněž koexprimující keratiny s vimentinem. Nukleostemin byl detekován prakticky ve všech keratinocytech kokultivovaných s TC-1, na 3T3 podpůrných buňkách byl u interfolikulárních keratinocytů nukleostemin negativní a u folikulárních pozitivní jen v menším zlomku.

Námi získané údaje na tomto modelu dále potvrzují již dříve sledovanou aktivitu stromálních buněk a jejich zásadní vliv na morfogenetické pochody za patologických

situací. Přesto, že byly použity modifikované buňky myšního původu a normální lidské keratinocyty, považujeme tento model za relevantní pro porozumění malignímu procesu v mnoha ohledech, protože biologicky aktivní faktory zodpovědné za popsané změny nejsou nejspíše druhově specifické a lze na ně pohlížet do jisté míry jako na univerzální.

VII. **Dvořánková B, Lacina L, Smetana K Jr, Lensch M, Manning JC, André S, Gabius HJ. Human galectin-2: nuclear presence in vitro and its modulation by quiescence/stress factors. *Histol Histopathol*, 2008, 23(2), p. 167-78. (IF 2.007)**

Galektin-2 z podskupiny „prototype“, který se vyznačuje tvorbou homodimerů a výraznou sekvenční příbuzností ke galektinu-1, byl dáván do souvislosti s celou řadou biologických dějů. Chyběly však přesnější poznatky o jeho distribuci v jednotlivých buněčných kompartmentech. Naším cílem tedy bylo porovnání jeho jaderné/cytoplazmatické distribuce v různých buněčných kulturách fibroblastů *in vitro* a porovnání zjištěného profilu s již dříve stanovenými profily pro galektin-1 a galektin-3.

V základním screeningu byly testovány normální lidské dermální fibroblasty a keratinocyty, dále i etablované humánní fibroblastové linie LEP₁₉, myší fibroblastová linie 3T3. Paralelně byly testovány fibroblasty izolované ze stromatu humánních nádorů (bazocelulární karcinom) a epitelová nádorová linie FaDu izolovaná ze spinocelulárního karcinomu hypofaryngu. Dále jsme testovali i průkaz galektinu-1 a galektinu-2 v původně negativních buňkách HCT-15 (linie karcinomu tlustého střeva) po jejich transfekci příslušnými vektory.

V transfekovaných buňkách HCT-15 byl zaznamenán signál pro galektin-2 v jádrech i cytoplazmě. Dále jsme zaznamenali pozitivitu jen v jádrech některých fibroblastů linie 3T3. Tento pozitivní signál byl v nukleoplazmě nehomogenně distribuován a vytvářel striktně extranukleolárně granulární maxima. V kulturách ve stádiu před dosažením konfluence byla zastížena podobná distribuce signálu galektinu-1 a galektinu-2 v jádrech, galektin-3 nebyl zastížen vůbec. Počáteční překryv signálu mohl svědčit pro imunocytochemickou nespecifitu signálu těchto sekvenčně homologních galektinů, v době dosažení konfluence (5 dní od nasazení kultury) však

ve shodě s dříve zjištěnými poznatky signál galektinu-1 vymizel a přetrvával jen signál pro galektin-2.

Vzhledem ke známé závislosti mezi zevními podmínkami (sérová deplece v kultivačním médiu) a vymizením galektinu-3 v jádře (Moutsatsos et al., 1987) byla testována obdobným způsobem i senzitivita galektinu-2 k zevním stimulům. Sérová deplece vedla ke kvalitativním i kvantitativním změnám, byla zjištěna přítomnost galektinu-2 i v jádrech fibroblastů LEP₁₉ a dermálních fibroblastů. Obdobných výsledků bylo dosaženo po ozáření UV paprsky, stejně jako po vystavení buněk účinkům Mitomycinu C. Interfolikulární keratinocyty nevykazovaly v jádrech přítomnost galektinu-2 ani před ani po vystavení těmto fyzikálním, či chemickým vlivům. Zajímavý byl ale jejich vliv na fibroblasty různých linií, které byly použity jako podpůrná populace (*feeder*) v kokultuře s keratinocyty. Pouhé zavedení této kokultury vedlo u linie LEP₁₉ k objevení galektinu-2 v jádře, zatímco u podpůrných buněk standardně ošetřených mitomycinem C byl v kokultuře zaznamenán pokles intenzity signálu pro galektin-2. Tento poznatek je dalším příkladem interakce mezi epitelem a mezenchymem v průběhu morfogenetických pochodů. Stromální buňky z časných pasáží byly vůči výše uvedeným možnostem stimulace rezistentní.

Při pátrání po roli galektinu-2 v jednotlivých buněčných kompartmentech jsme využili metody dvojitého značení a případné kolokalizace s jinými znaky známé funkce. Na základě stanoveného profilu fluorescenčního signálu bylo prokázáno, že galektin-2 je lokalizován v interchromatinových prostorech. Případná vazba na DNA, či RNA byla testována digescí příslušnými enzymy, přičemž pouze ošetření RNázou vedlo i k vymizení signálu. Imunofluorescenční vzorec distribuce galektinu poukazoval na možnost, že galektin-2 bude přítomen v některém z typů jaderných tělísek. Tyto struktury dále účinně kompartmentalizují prostor uvnitř jádra a umožňují tak významně zvýšit účinnost interakcí například některých regulačních proteinů. Mezi nejčastěji studované struktury tohoto typu bývají řazena Cajalova tělíka, splicing specles a PML tělíka (PML bodies – Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies). Signál pro galektin-2 nekolokalizoval se signálem SC35, což svědčí pro fakt, že na rozdíl od jiných galektinů se pravděpodobně galektin-2 neúčastní sestřihu RNA. Naopak kolokalizace s proteinem PML připouští úvahu o jeho možné roli v tomto typu jaderného tělíka.

Regulační mechanismy probíhající uvnitř buněčného jádra často zahrnují formaci a eventuálně strukturní modifikaci trojrozměrných komplexů tvořených různými

proteiny interagujícími s nukleovými kyselinami. Dynamická modifikace těchto komplexů představuje rychlý způsob, jakým mohou být regulovány pochody jako reakce na exogenní, či endogenní stresový stimul prostřednictvím regulace genové exprese, diferenciaci, apoptózy (Zimber et al., 2004).

PML tělíška jsou proteinové struktury uvnitř buněčného jádra, které dosahují velikosti v rozmezí 0,3 – 1,0 μm . Průměrně se v jádře vyskytuje 10 takových tělíšek, odtud také bylo odvozeno jejich alternativní značení ND10 (nuclear domain 10), když jejich počet ve skutečnosti může kolísat mezi 5 a 30 tělíšky na jedno jádro. Poprvé tato tělíška byla vizualizovaná pomocí autoprotilátek ze séra pacientů trpících primární biliární cirhózou. Následně byla tato tělíška popsána i u jiných patologických stavů, jejich nejčastější označení (PML NB) je odvozeno z jejich výskytu u pacientů trpících akutní promyelocytární leukémií. U tohoto onemocnění krvetvorby dochází ke genové translokaci za vzniku fúzního proteinu (PML-RAR), který vzniká na základě fúze genu pro PML protein a genu proteinu receptoru kyseliny retinové (RAR- α). Tato tělíška byla následně nalézána právě u pacientů trpících akutní promyelocytární leukémií a byla označována jako Promyelocytic Leukemia Oncogenic Domains (PODs). Dalším synonymem užívaným pro PML NB jsou Kremerova tělíška.

PML tělíška jsou zastihována v interchromatinovém prostoru, nejsou asociována s DNA a v jejich centru není přítomna ani RNA. Nově syntetizovaná RNA může být zastížena v jejich periférii (Boisvert et al., 2000).

Je známo, že dominantním proteinem podílejícím se na stavbě těchto tělíšek je již výše zmíněný PML protein. Celkově bylo doposud popsáno více než 40 proteinů, které byly zastíženy v PML tělíškách. Část z nich patří do větší skupiny takzvaných RING proteinů, které se vyznačují doménou typu „zinc finger“ a jsou schopny regulovat transkripci a uplatňovat se při zachování genomové stability (Dellaire a Bazett-Jones, 2004).

Přesto, že biologický význam PML není plně objasněn, lze považovat za prokázané, že tyto dynamické struktury slouží jako kompartmenty, ve kterých dochází ke shromažďování a úpravě důležitých regulačních faktorů. Tyto faktory mohou ve vhodných situacích opouštět rezervoár (PML tělíška) při odpovědi na zevní stresové stimuly jako je UV záření, alkylační činidla, ionty těžkých kovů, virová infekce či jiné poškození. Námi dokumentovaný stav po ozáření UV paprsky, kdy byl v okolí

PML tělíska detekován signál pro galektin-2 z něj vystupující, či do něj vstupující, je v dobrém souladu s tímto předpokladem.

Lze tedy shrnout, že stimulace exogenním stresem je provázána přítomností galektinu-2 v jádře sledovaných buněk. Byla tedy poprvé popsána *in vitro* jeho přítomnost v jádře. Dále bylo prioritně prokázáno, že signál galektinu-2 kolokalizuje v oblasti PML jaderných tělísek. Jeho přesná role v buněčném jádře ale není dosud známa.

VIII. Čada Z, Chovanec M, Smetana K Jr., Betka J, Lacina L, Plzák J, Kodet R, Štork J, Lensch M, Kaltner H, André S, Gabius HJ. Galectin-7: Will the lectin's activity establish clinical correlations in head and neck squamous and basal cell carcinomas? *Histol Histopathol*, 2008.(*in press*). (IF 2.007)

Funkční diverzita jednotlivých členů rodiny galektinů a jejich účast v pro- či protinádorových procesech zakládá oprávněnou otázku, zda mohou být i další galektiny se svojí schopností odlišení aberantní glykosylace, která je velmi u nádorových stavů běžná, využity stejně jako galektin-3 v diagnostické patologii jako prediktivní znak (Plzák et al.,2004).

Homodimerický prototype galektin-7 detekovaný polyklonální (zkříženě nereagující) protilátkou byl zastižen ve všech vrstvách normální humánní epidermis a sliznic dutiny ústní, hltanu i hrtanu (celkem n=57). Galektin-7 byl zastižen jak v jádrech (nejvíce v nukleolech), tak i v cytoplazmě. Toto pozorování opět rozšířilo a potvrdilo poznatky o přítomnosti galektinů v jádrech.

Galektin-7 naopak nebyl detekován v čepech bazocelulárního karcinomu (n=10), což bylo v ostrém kontrastu s pozitivitou okolní epidermis.

Ve spinocelulárních karcinomech (ať již primárních n=47, či v metastázách n=25) nebyl výskyt galektinu-7 jednotný, bylo možno odlišit 4 různé vzorce exprese.

- 1) *intenzivní homogenní (32% primárních nádorů a 12% metastáz)*
- 2) *intenzivní heterogenní (25,5% primárních tumorů a 32% metastáz)*
- 3) *slabý homogenní (25,5% primárních nádorů, 20% metastáz)*
- 4) *negativní (17% primárních nádorů a 36% metastáz)*

Oblasti s neintenzivnějším signálem většinou byly zastiženy v centrálních partiích tumorů a často odpovídaly oblastem s tvorbou keratinových perel (korelace ke keratinizaci P=0,0105). Přítomnost galektinu-7 v jádrech byla potvrzena pouze u

vzorků s intenzivní expresí bez ohledu na její subtyp. Intenzivní homogenní exprese galektinu-7 byla rovněž asociována s dobře formovanou bazální membránou (hodnoceno barvením na kolagen-IV). U ostatních typů exprese galektinu-7 byly zaznamenány různě významné defekty bazální membrány, či dokonce její absence u nádorů galektin-7 negativních. Intenzivní homogenní typ exprese galektinu-7 koreloval s histologickým *gradingem* ($P= 0,0009$). Nebyla zastižena korelace přítomnosti galektinu-7 k proliferaci hodnocené pomocí Ki-67 ($P= 0,1376$). Korelace také nebyla nalezena k věku, pohlaví, místu primárního nádoru, angio- a lymfangio-invazi a perineurálnímu a extrakapsulárnímu šíření, či výsledku léčby. Bohužel nebyly zaznamenány ani statisticky významné rozdíly mezi expresí galektinu-7 a přežitím pacientů.

Přes některé zjištěné zajímavé údaje o vztahu přítomnosti galektinu-7 k diferenciačním pochodům zejména v nádorových tkáních nelze, bohužel, učinit z těchto pozorování v současné době zcela jednoznačný diagnosticko-terapeutický závěr.

11. Souhrn

- Lidská epidermis exprimuje galektin-1, -2, -3 a -7. Galektin-1 a jeho vazební partneři jsou exprimováni v jádrech buněk velmi blízkých či totožných s epidermálními kmenovými buňkami. Exprese galektinu-3 je závislá na stupni diferenciaci buněk jak *in situ* tak *in vitro*. Podobná závislost platí i pro vazebná místa pro tento galektin. Galektin-2 je exprimován v jádrech fibroblastů zejména ve stresových podmínkách. Exprese galektinu-7 není podmíněna stupněm diferenciaci keratinocytů. Výskyt vazebných míst pro tento galektin nebyl v lidské kůži pozorován.
- Exprese galektinů a jejich glykoligandů v bazaliomu a psoritickém ložisku odráží stupeň jejich diferenciaci. Za důležitou považujeme absenci galektinu-7 a vazebných míst pro galektin-3 v epitelových buňkách bazaliomu. Vysoce typickým znakem je zmnožení galektinu-1 ve stromatu bazaliomu a v psoriatické dermis. Byl rovněž zjištěn vztah mezi stupněm diferenciaci buněk spinaliomu a expresí galektinu-7. Tato závislost však nemá vztah k přežití pacientů.
- Prioritními nálezy je zjištění, že fibroblasty ze stromatu lidských bazalionů a spinaliomů jsou histologicky aktivní a jsou schopny významně ovlivnit fenotyp normálních keratinocytů směrem k buňkám nádorovým.

12. Summary

- Galectins-1,-3 and -7 are expressed in human epidermis. Galectin-1 and his binding sites are expressed there in the nuclei of cells which are closely related to or are identical with the stem cell population. Expression pattern of galectin-3 is differentiation-dependent in tissue as well as *in vitro*. Binding sites for this galectin are present in the similar manner. Expression of galectin-7 is not observed in differentiation-dependent manner. Binding sites for this member of galectins family were never observed in the epidermis. Galectin-2 is expressed in the nuclei of fibroblast under stress conditions.
- Expression of observed galectins and their binding sites in basal cell carcinoma and in psoriatic plaque refers to the differentiation level. We emphasize the lack of galectin-7 and binding sites for galectin-3 in basal cell carcinoma epithelium. Highly typical is abundant presence of galectin-1 in the stroma of basal cell carcinoma and in dermis of psoriatic plaque. We have also observed the dependence of galectin-7 expression on differentiation of squamous cell carcinoma. This relationship has no correlation to the survival of patients.
- The biological activity of stromal fibroblast toward to normal keratinocytes resulting in induction of „cancer-like“ phenotype is the highlight of this study.

13. Literatura

- i. Ackerman AB, Mones JM. Solar (actinic) keratosis is squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2006;155(1), p. 9-22
- ii. Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol.* 2007, 18(5), p. 460-6.
- iii. Albanesi C, De Pità O, Girolomoni G. Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. *Clin Dermatol.* 2007, 25(6), p.581-8.
- iv. Al-Barwari SE, Potten CS. Regeneration and dose-response characteristics of irradiated mouse dorsal epidermal cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1976, 30(3), p. 201-16.
- v. Alessi E, Venegoni L, Fanoni D, Berti E. Cytokeratin profile in basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol.* 2008, 30(3), p. 249-55.
- vi. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100(7), p.3983-8.
- vii. Anetor JI, Wanibuchi H, Fukushima S. Arsenic exposure and its health effects and risk of cancer in developing countries, p. micronutrients as host defence. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2007, 8(1), p. 13-23.
- viii. Athar M, Tang X, Lee JL, Kopelovich L, Kim AL. Correlations between the Sonic Hedgehog pathway and basal cell carcinoma. *Int J Dermatol.* 2007, 46(11), p. 1113-7
- ix. Aub JC, Tieslau C, Lankaster A. Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat germ lipase and associates mukopolysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1963, 50, p. 613-9.
- x. Augustin M, Krüger K, Radtke MA, Schwippl I, Reich K. Disease severity, quality of life and health care in plaque-type psoriasis: a multicenter cross-sectional study in Germany. *Dermatology.* 2008, 216(4), p.366-72.
- xi. Ball NJ, Tanhuanco-Kho G. Merkel cell carcinoma frequently shows histologic features of basal cell carcinoma: a study of 30 cases. *J Cutan Pathol.* 2007, 34(8), p. 612-9.
- xii. Barcellos-Hoff MH, Ewan KB. Transforming growth factor-beta and breast cancer: Mammary gland development. *Breast Cancer Res.* 2000, 2(2), p. 92-9
- xiii. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem.* 1994, 269(33), p. 20807-10.
- xiv. Barrandon Y, Green H. Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985, 82(16), p. 5390-4.
- xv. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987, 84(8), p. 2302-6.
- xvi. Bath-Hextall F, Leonardi-Bee J, Smith C, Meal A, Hubbard R. Trends in incidence of skin basal cell carcinoma. Additional evidence from a UK primary care database study. *Int J Cancer.* 2007, 121(9), p. 2105-8.
- xvii. Bigby SM, Charlton A, Miller MV, Zwi LJ, Oliver GF. Biphasic sarcomatoid basal cell carcinoma (carcinosarcoma): four cases with immunohistochemistry and review of the literature. *J Cutan Pathol.* 2005, 32(2), p. 141-7.
- xviii. Boehncke WH, Schön MP. Animal models of psoriasis. *Clin Dermatol.* 2007, 25(6), p.596-605.

- xix. Boisvert FM, Hendzel MJ, Bazett-Jones DP. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J Cell Biol.* 2000, 148(2), p. 283-92.
- xx. Bouwes Bavinck JN, Plasmeijer EI, Feltkamp MC. Beta-papillomavirus infection and skin cancer. *J Invest Dermatol.* 2008, 128(6), p. 1355-8.
- xxi. Boyd WC, Shapleigh E. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). *Blood.* 1954, 9(12), p. 1194-8.
- xxii. Boyman O, Conrad C, Tonel G, Gilliet M, Nestle FO. The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. *Trends Immunol.* 2007, 28(2), p.51-7.
- xxiii. Brewer CF. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1572(2-3), p. 255-62.
- xxiv. Buettner PG, Raasch BA, Incidence rates of skin cancer in Townsville, Australia. *Int J Cancer.* 1998, 78(5), p. 587-93.
- xxv. Burgdorf WH. Cancer-associated genodermatoses: a personal history. *Exp Dermatol.* 2006, 15(9), p. 653-66.
- xxvi. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* 2006, 107(5), p. 1761-7.
- xxvii. Buzás EI, György B, Pásztói M, Jelinek I, Falus A, Gabius HJ. Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. *Autoimmunity.* 2006, 39(8), p. 691-704.
- xxviii. Carlson JA, Combates NJ, Stenn KS, Prouty SM. Anaplastic neoplasms arising from basal cell carcinoma xenotransplants into SCID-beige mice. *J Cutan Pathol.* 2002, 29(5), p. 268-78
- xxix. Clark RA, Kupper TS. Misbehaving macrophages in the pathogenesis of psoriasis. *J Clin Invest.* 2006, 116(8), p.2084-7.
- xxx. Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1572(2-3), p. 209-31.
- xxxi. Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol.* 2006,126(7), p. 1459-68.
- xxxii. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol.* 2006,19 Suppl 2, p. S127-47
- xxxiii. Dabelsteen E, Broby-Johansen U, Jeppe-Jensen D, Mandel U. Cell surface glycosylation patterns in psoriasis. *APMIS.* 1990,98(3), p. 221-8.
- xxxiv. De Craene B, Gilbert B, Stove C, et al. The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res.* 2005, 65(14), p. 6237-44.
- xxxv. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* 2003, 200(4), p. 429-47.
- xxxvi. Delleire G, Bazett-Jones DP. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays.* 2004, 26(9), p. 963-77
- xxxvii. Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6), p. 509-17.
- xxxviii. Dong-Le Bourhis X, Berthois Y, Millot G, Degeorges A, Sylvi M, Martin PM, Calvo F. Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in co-culture. *Int J Cancer.* 1997, 71(1), p. 42-8
- xxxix. Duelli D, Lazebnik Y. Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell.* 2003, 3(5), p. 445-8.

- xl. Dunnwald M, Chinnathambi S, Alexandrunas D, Bickenbach JR. Mouse epidermal stem cells proceed through the cell cycle. *J Cell Physiol.* 2003, 195(2), p.194-201.
- xli. Dvorak HF. Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol.* 2003, 162(6), p. 1747-57.
- xliv. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *NEJM.* 1986,315(26), p.1650-9.
- xliii. Dvoránková B, Motlík J, Holíková Z, Vacík J, Smetana K Jr. Dolichos biflorus agglutinin-binding site expression in basal keratinocytes is associated with cell differentiation. *Biol Cell.* 2002, 94(6), p. 365-73
- xliv. Dvoránková B, Smetana K Jr, Vacík J, Jelínková M. Cultivation of keratinocytes on poly HEMA and their migration after inversion. *Folia Biol (Praha).* 1996;42(3), p. 83-6.
- xlv. Dworaczek H, Xiao W. Xeroderma pigmentosum: a glimpse into nucleotide excision repair, genetic instability, and cancer. *Crit Rev Oncog.* 2007, 13(2), p. 159-77.
- xlvi. El-Bahrawy M, El-Masry N, Alison M, Poulosom R, Fallowfield M. Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2003, 148(5), p. 964-70
- xlvii. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med* 2003; 348, p. 1681-1691
- xlviii. Fan YS, Carr RA, Sanders DS, Smith AP, Lazar AJ, Calonje E. Characteristic Ber-EP4 and EMA expression in sebaceoma is immunohistochemically distinct from basal cell carcinoma. *Histopathology.* 2007, 51(1), p. 80-6.
- xlix. Fronková V, Holíková Z, Liu FT, Homolka J, Rijken DC, André S, Bovin NV, Smetana K Jr, Gabius HJ. Simultaneous detection of endogenous lectins and their binding capacity at the single-cell level--a technical note. *Folia Biol (Praha).* 1999;45(4), p.157-62.
- i. Fuchs E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol.* 1990, 111(6 Pt 2), p. 2807-14.
- ii. Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature.* 2007, 445(7130), p. 834-42.
- lii. Fukino K, Shen L, Patocs A, Mutter GL, Eng C. Genomic instability within tumor stroma and clinicopathological characteristics of sporadic primary invasive breast carcinoma. *JAMA.* 2007, 297(19), p. 2103-11
- liii. Gabius HJ, André S, Kaltner H, Siebert HC. The sugar code: functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta.* 2002,1572(2-3), p.165-77.
- liv. Gabius HJ, Siebert HC, André S, Jiménez-Barbero J, Rüdiger H. Chemical biology of the sugar code. *Chembiochem.* 2004, 5(6), p. 740-64
- lv. Gambichler T, Hoffjan S, Altmeyer P, Bechara FG. A case of sporadic Bazex-Dupré-Christol syndrome presenting with scarring folliculitis of the scalp. *Br J Dermatol.* 2007, 156(1), p. 184-6.
- lvi. Ganss R. Tumor stroma fosters neovascularization by recruitment of progenitor cells into the tumor bed. *J Cell Mol Med.* 2006, 10(4), p. 857-65.
- lvii. Garcia SB, Park HS, Novelli M, Wright NA. Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets. *J Pathol.* 1999, 187(1), p. 61-81.
- lviii. Ghazizadeh S, Taichman LB. Organization of stem cells and their progeny in human epidermis. *J Invest Dermatol.* 2005, 124(2), p. 367-72.

- lix. Ghoreschi K, Weigert C, Röcken M. Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis. *Clin Dermatol.* 2007, 25(6), p.574-80.
- lx. Giardina E, Sinibaldi C, Novelli G. The psoriasis genetics as a model of complex disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2004, 3(2), p.129-36.
- lxi. Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet.* 2008;49(2), p. 193-9.
- lxii. Goedkoop AY, Kraan MC, Picavet DI, de Rie MA, Teunissen MB, Bos JD, Tak PP. Deactivation of endothelium and reduction in angiogenesis in psoriatic skin and synovium by low dose infliximab therapy in combination with stable methotrexate therapy: a prospective single-centre study. *Arthritis Res Ther.* 2004, 6(4), p. R326-34.
- lxiii. Gorlin RJ, Goltz RW. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. *N Engl J Med.* 1960, 262, p. 908-12.
- lxiv. Grabe N, Neuber K. Simulating psoriasis by altering transit amplifying cells. *Bioinformatics.* 2007, 1;23(11), p. 1309-12.
- lxv. Granot D, Addadi Y, Kalchenko V, Harmelin A, Kunz-Schughart LA, Neeman M. In vivo imaging of the systemic recruitment of fibroblasts to the angiogenic rim of ovarian carcinoma tumors. *Cancer Res.* 2007,67(19), p.9180-9.
- lxvi. Grjibovski AM, Olsen AO, Magnus P, Harris JR. Psoriasis in Norwegian twins: contribution of genetic and environmental effects. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007, 21(10), p.1337-43.
- lxvii. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology.* 2007, 39(3), p. 305-18.
- lxviii. Gudjonsson T, Rønnev-Jessen L, Villadsen R, Bissell MJ, Petersen OW. To create the correct microenvironment: three-dimensional heterotypic collagen assays for human breast epithelial morphogenesis and neoplasia. *Methods.* 2003, 30(3), p. 247-55.
- lxix. Hagios C, Lochter A, Bissell MJ. Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998, 353(1370), p. 857-70.
- lxx. Harrison FL. Soluble vertebrate lectins: ubiquitous but inscrutable proteins. *J Cell Sci.* 1991,100 (Pt 1), p. 9-14
- lxxi. Hart C, Drewel D, Mueller G, Grassinger J, Zaiss M, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Reichle A, Holler E, Hennemann B. Expression and function of homing-essential molecules and enhanced in vivo homing ability of human peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells after stimulation with stem cell factor. *Stem Cells.* 2004, 22(4), p. 580-9.
- lxxii. Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Trevor KT. Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am J Pathol.* 1997, 150(2), p. 483-95.
- lxxiii. Heyl J, Mehregan D. Immunolabeling pattern of cytokeratin 19 expression may distinguish sebaceous tumors from basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol.* 2008, 35(1), p. 40-5.
- lxxiv. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast, p. one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007, 170(6), p. 1807-16.
- lxxv. Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide

- specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*. 2002,1572(2-3, p. 232-54.
- lxxvi. Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*. 1993, 3(4), p. 297-304.
- lxxvii. Holíková Z, Hrdlicková-Cela E, Plzák J, Smetana K Jr, Betka J, Dvoránková B, Esner M, Wasano K, André S, Kaltner H, Motlík J, Hercogová J, Kodet R, Gabius HJ. Defining the glycophenotype of squamous epithelia using plant and mammalian lectins. Differentiation-dependent expression of alpha2,6- and alpha2,3-linked N-acetylneuraminic acid in squamous epithelia and carcinomas, and its differential effect on binding of the endogenous lectins galectins-1 and -3. *APMIS*. 2002, 110(12), p. 845-56.
- lxxviii. Houzelstein D, Gonçalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, Drickamer K, Leffler H, Poirier F. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol*. 2004, 21(7), p. 1177-87.
- lxxix. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2004, 114(4), p. 569-81
- lxxx. Huttunen M, Naukkarinen A, Horsmanheimo M, Harvima IT. Transient production of stem cell factor in dermal cells but increasing expression of Kit receptor in mast cells during normal wound healing. *Arch Dermatol Res*. 2002, 294(7), p.324-30. Epub 2002
- lxxxii. Chamian F, Krueger JG. Psoriasis vulgaris: an interplay of T lymphocytes, dendritic cells, and inflammatory cytokines in pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol*. 2004, 16(4), p.331-7.
- lxxxiii. Ch'ng S, Wallis RA, Yuan L, Davis PF, Tan ST. Mast cells and cutaneous malignancies. *Mod Pathol*. 2006, 19(1), p. 149-59
- lxxxiii. Cho M, Cummings RD. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. *J Biol Chem*. 1995, 270(10), p. 5198-206.
- lxxxiv. Chovanec M, Smetana K Jr, Dvoránková B, Plzáková Z, André S, Gabius HJ. Decrease of nuclear reactivity to growth-regulatory galectin-1 in senescent human keratinocytes and detection of non-uniform staining profile alterations upon prolonged culture for galectin-1 and -3. *Anat Histol Embryol*. 2004, 33(6), p. 348-54.
- lxxxv. Chrenek MA, Wong P, Weaver VM. Tumour-stromal interactions. Integrins and cell adhesions as modulators of mammary cell survival and transformation. *Breast Cancer Res*. 2001;3(4), p. 224-9
- lxxxvi. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006, 66(17), p. 8319-26
- lxxxvii. Jacobsen BM, Harrell JC, Jedlicka P, Borges VF, Varella-Garcia M, Horwitz KB. Spontaneous fusion with, and transformation of mouse stroma by, malignant human breast cancer epithelium. *Cancer Res*. 2006, 66(16), p. 8274-9
- lxxxviii. Jariwala SP. The role of dendritic cells in the immunopathogenesis of psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2007,299(8), p.359-66.

- lxxxix. Jechlinger M, Grunert S, Tamir IH, Janda E, Lüdemann S, Waerner T, Seither P, Weith A, Beug H, Kraut N. Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene*. 2003, 22(46), p. 7155-69
- xc. Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*. 1993, 73(4), p. 713-24.
- xc. Kamstrup MR, Gniadecki R, Skovgaard GL. Putative cancer stem cells in cutaneous malignancies. *Exp Dermatol*. 2007, 16(4), p.297-301.
- xcii. Karagas MR, Greenberg ER, Spencer SK, Stukel TA, Mott LA. Increase in incidence rates of basal cell and squamous cell skin cancer in New Hampshire, USA. New Hampshire Skin Cancer Study Group. *Int J Cancer*. 1999, 81(4), p. 555-9.
- xciii. Katalinic A, Kunze U, Schäfer T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br J Dermatol*. 2003, 149(6), p. 1200-6.
- xciv. Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol*. 2000, 114(3), p. 413-20
- xcv. Kaur P, Mulvaney M, Carlson JA. Basal cell carcinoma progression correlates with host immune response and stromal alterations: a histologic analysis. *Am J Dermatopathol*. 2006, 28(4), p. 293-307
- xcvi. Keller M, Spanou Z, Schaerli P, Britschgi M, Yawalkar N, Seitz M, Villiger PM, Pichler WJ. T cell-regulated neutrophilic inflammation in autoinflammatory diseases. *J Immunol*. 2005, 175(11), p.7678-86.
- xcvii. Kilpatrick DC. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 1572(2-3), p. 187-97. Review
- xcviii. Kim YC, Vandersteen DP, Chung YJ, Myong NH. Signet ring cell basal cell carcinoma: a basal cell carcinoma with myoepithelial differentiation. *Am J Dermatopathol*. 2001, 23(6), p. 525-9.
- xcix. Kitchin KT, Wallace K. The role of protein binding of trivalent arsenicals in arsenic carcinogenesis and toxicity. *J Inorg Biochem*. 2008, 102(3), p. 532-9.
- c. Klima J, Motlík J, Gabius HJ, Smetana K Jr. Phenotypic characterization of porcine interfollicular keratinocytes separated by elutriation: a technical note. *Folia Biol (Praha)*. 2007;53(1), p. 33-6.
- ci. Kolodka TM, Garlick JA, Taichman LB. Evidence for keratinocyte stem cells in vitro: long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95(8), p. 4356-61.
- cii. Koster MI, Roop DR. p63 and epithelial appendage development. *Differentiation*. 2004, 72(8), p. 364-70.
- ciii. Krahl D, Sellheyer K. Monoclonal antibody Ber-EP4 reliably discriminates between microcystic adnexal carcinoma and basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2007, 34(10), p. 782-7.
- civ. Kulbe H, Levinson NR, Balkwill F, Wilson JL. The chemokine network in cancer--much more than directing cell movement. *Int J Dev Biol*. 2004, 48(5-6), p. 489-96.
- cv. Kunz-Schughart LA, Wenninger S, Neumeier T, Seidl P, Knuechel R. Three-dimensional tissue structure affects sensitivity of fibroblasts to TGF-beta 1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003, 284(1), p. 209-19.

- cvi. Kurzen H, Esposito L, Langbein L, Hartschuh W. Cytokeratins as markers of follicular differentiation: an immunohistochemical study of trichoblastoma and basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol.* 2001, 23(6), p. 501-9.
- cvii. Lahm H, André S, Hoeflich A, Kaltner H, Siebert HC, Sordat B, von der Lieth CW, Wolf E, Gabius HJ. Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj J.* 2004;20(4):227-38.
- cviii. Laine RA. Glycoconjugates: overview and strategy. *Methods Enzymol.* 1990;193, p.539-53.
- cix. Lajtha LG. Stem cell concepts. *Differentiation.* 1979;14(1-2), p. 23-34
- cx. Landsteiner K, Raubitschek H, Beobachtungen Über Hämolyse und Hämagglutination. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 1907, 45, p. 600–607.
- cxii. Lang PG, Maize JC. Histologic evolution of recurrent basal cell carcinoma and treatment implications. *J Am Acad Dermatol* 1986;14, p. 186–196.
- cxiii. Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells. *J Invest Dermatol.* 1983 Jul;81(1 Suppl), p. 121s-7s
- cxiiii. Lavker RM, Sun TT. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science.* 1982, 215(4537), p. 1239-41.
- cxv. Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Ling MT, Kwok WK, Wang XH, Wong YC, Guan XY, Man K, Chau KL, Fan ST. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res.* 2006, 12(18), p. 5369-76.
- cxvi. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J.* 2004;19(7-9), p. 433-40.
- cxvii. Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem.* 2007, 101(4), p. 805-15
- cxviii. Ling G, Ahmadian A, Persson A, Undén AB, Afink G, Williams C, Uhlén M, Toftgård R, Lundberg J, Pontén F. PATCHED and p53 gene alterations in sporadic and hereditary basal cell cancer. *Oncogene.* 2001, 20(53), p. 7770-8
- cxix. Lizzul PF, Aphale A, Malaviya R, Sun Y, Masud S, Dombrovskiy V, Gottlieb AB. Differential expression of phosphorylated NF-kappaB/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF-kappaB in response to treatment with etanercept. *J Invest Dermatol.* 2005, 124(6), p. 1275-83.
- cx. Lupi O. Correlations between the Sonic Hedgehog pathway and basal cell carcinoma *Int J Dermatol.* 2007, 46(11), p. 1113-7
- cxxi. Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, Elder DE, Albelda S, Cotsarelis G. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *J Cell Sci.* 1998, 111 (Pt 21), p. 3179-88.
- cxvii. Ma DR, Yang EN, Lee ST. A review: the location, molecular characterisation and multipotency of hair follicle epidermal stem cells. *Ann Acad Med Singapore.* 2004, 33(6), p. 784-8.
- cxviii. Mackenzie IC. Relationship between mitosis and the ordered structure of the stratum corneum in mouse epidermis. *Nature.* 1970, 226(5246), p. 653-5.
- cxviii. Mackenzie IC. Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure. *J Invest Dermatol.* 1997, 109(3), p. 377-83.

- cxxiv. Maffini MV, Soto AM, Calabro JM, Ucci AA, Sonnenschein C. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci.* 2004 , 117(8), p.1495-502.
- cxxv. Mahmoodi M, Asad H, Salim S, Kantor G, Minimo C. Anti-cytokeratin 20 staining of Merkel cells helps differentiate basaloid proliferations overlying dermatofibromas from basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 2005, 32(7), p. 491-5.
- cxxvi. Matousková E, Veselý P, Königová R. Modified method of in vitro cultivation of human keratinocytes suitable for grafting. *Folia Biol (Praha).* 1989;35(4), p. 267-71.
- cxxvii. Medina D, Kittrell F. Stroma is not a major target in DMBA-mediated tumorigenesis of mouse mammary preneoplasia. *J Cell Sci.* 2005, 118(Pt 1), p. 123-7
- cxxviii. Michaëlsson G, Olsson E, Westermark P. The Rombo syndrome: a familial disorder with vermiculate atrophoderma, milia, hypotrichosis, trichoepitheliomas, basal cell carcinomas and peripheral vasodilation with cyanosis. *Acta Derm Venereol.* 1981;61(6), p. 497-503
- cxxix. Mitropoulos P, Norman R. Occupational nonsolar risk factors of squamous cell carcinoma of the skin: a population-based case-controlled study. *Dermatol Online J.* 2005, 11(2), p. 5.
- cxxx. Miura H, Sano S, Higashiyama M, Yoshikawa K, Itami S. Involvement of insulin-like growth factor-I in psoriasis as a paracrine growth factor: dermal fibroblasts play a regulatory role in developing psoriatic lesions. *Arch Dermatol Res.* 2000, 292(12), p. 590-7.
- cxxxi. Moinfar F, Man YG, Arnould L, Bratthauer GL, Ratschek M, Tavassoli FA. Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res.* 2000, 60(9), p. 2562-6
- cxlii. Morgan WT, Watkins WM. The inhibition of the haemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars. *Br J Exp Pathol.* 1953, 34(1), p. 94-103
- cxliiii. Morris R, Argyris TS. Epidermal cell cycle and transit times during hyperplastic growth induced by abrasion or treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 1983,43(10), p. 4935-42
- cxliiii. Morris RJ, Potten CS. Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro. *Cell Prolif.* 1994, 27(5), p. 279-89.
- cxliiii. Moutsatsos IK, Wade M, Schindler M, Wang JL. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987, 84(18), p. 6452-6.
- cxliiii. Mueller MM, Fusenig NE. Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation.* 2002,70(9-10), p. 486-97.
- cxliiii. Nagase T, Nagase M, Machida M, Fujita T. Hedgehog signalling in vascular development. *Angiogenesis.* 2008;11(1), p.71-7
- cxliiii. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NV, Jenisch S, Weichenthal M, Abecasis GR, Lim HW, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet.* 2006, 78(5), p.827-51

- cxviii. Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*. 2005, 10(2), p. 267-75.
- cxix. Nickoloff BJ, Xin H, Nestle FO, Qin JZ. The cytokine and chemokine network in psoriasis. *Clin Dermatol*. 2007, 25(6), p. 568-73.
- cxli. Nowell PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res*. 1960, 20, p. 462-6.
- cxlii. Ogden GR. Field cancerisation in the head and neck. *Oral Dis*. 1998, 4(1), p. 1-3
- cxliii. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J*. 2004;19(7-9), p. 527-35.
- cxliv. Okuyama R, Tagami H, Aiba S. Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. *J Dermatol Sci*. 2008, 49(3), p. 187-94.
- cxlv. Opdenakker G, Van Damme J. The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines. *Int J Dev Biol*. 2004, 48(5-6), p. 519-27.
- cxlvi. Oyama N, Iwatsuki K, Satoh M, Akiba H, Kaneko F. Dermal fibroblasts are one of the therapeutic targets for topical application of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3: the possible involvement of transforming growth factor-beta induction. *Br J Dermatol*. 2000, 143(6), p. 1140-8.
- cxlvii. Paget S. The Distribution Of Secondary Growths In Cancer Of The Breast, *The Lancet*, 1889, Volume 133, Issue 3421, p. 571-573
- cxlviii. Patocs A, Zhang L, Xu Y, Weber F, Caldes T, Mutter GL, Platzer P, Eng C. Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med*. 2007, 357(25), p. 2543-51
- cxlix. Patterson RJ, Wang W, Wang JL. Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. *Glycoconj J*. 2004;19(7-9), p. 499-506.
- cli. Petersen LJ, Hansen U, Kristensen JK, Nielsen H, Skov PS, Nielsen HJ. Studies on mast cells and histamine release in psoriasis: the effect of ranitidine. *Acta Derm Venereol*. 1998, 78(3), p. 190-3
- cli. Petersen OW, Lind Nielsen H, Gudjonsson T, Villadsen R, Rønnov-Jessen L, Bissell MJ. The plasticity of human breast carcinoma cells is more than epithelial to mesenchymal conversion. *Breast Cancer Res*. 2001;3(4), p. 213-7.
- clii. Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, Bissell MJ, Rønnov-Jessen L. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am J Pathol*. 2003, 162(2), p. 391-402.
- cliii. Plzák J, Betka J, Smetana K Jr, Chovanec M, Kaltner H, André S, Kodet R, Gabius HJ. Galectin-3 - an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *Eur J Cancer*. 2004, 40(15), p. 2324-30
- cliv. Plzak J, Smetana K Jr, Betka J, Kodet R, Kaltner H, Gabius HJ. 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*. 2000,5(4), p. 369-72.
- clv. Plzák J, Smetana K Jr, Hrdlicková E, Kodet R, Holíková Z, Liu FT, Dvoránková B, Kaltner H, Betka J, Gabius HJ. Expression of galectin-3-reactive ligands in squamous cancer and normal epithelial cells as a marker of differentiation. *Int J Oncol*. 2001, 19(1), p. 59-64.

- clvi. Potten CS, Hendry JH. Letter: Clonogenic cells and stem cells in epidermis. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1973, 24(5), p. 537-40.
- clvii. Potten CS. The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet.* 1974, 7(1), p. 77-88.
- clviii. Press SG. Odontogenic tumors of the maxillary sinus. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;16(1):47-54
- clix. Proia DA, Kuperwasser C. Stroma: tumor agonist or antagonist. *Cell Cycle.* 2005, 4(8), p. 1022-5.
- clx. Raasch BA, Buettner PG, Garbe C. Basal cell carcinoma: histological classification and body-site distribution. *Br J Dermatol.* 2006,155, p.401-7.
- clxi. Radisky DC, Kenny PA, Bissell MJ. Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem.* 2007,101(4), p. 830-9. Review.
- clxii. Reischl J, Schwenke S, Beekman JM, Mrowietz U, Stürzebecher S, Heubach JF. Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques. *J Invest Dermatol.* 2007, 127(1), p.163-9.
- clxiii. Requena L, Fariña MC, Robledo M, Sanguenza OP, Sanchez E, Villanueva A, Marquina A, Tamarit R. Multiple hereditary infundibulocystic basal cell carcinomas: a genodermatosis different from nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Arch Dermatol.* 1999, 135(10), p.1227-35.
- clxiv. Rigel DS. Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *J Am Acad Dermatol.* 2008, 58(5 Suppl 2), p. S129-32
- clxv. Rott S, Mrowietz U. Recent developments in the use of biologics in psoriasis and autoimmune disorders. The role of autoantibodies. *BMJ.* 2005, 26;330(7493), p. 716-20.
- clxvi. Rüdiger H, Gabius HJ. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj J.* 2001,(8):589-613.
- clxvii. Saldanha G, Fletcher A, Slater DN. Basal cell carcinoma: a dermatopathological and molecular biological update. *Br J Dermatol.* 2003, 148(2), p. 195-202
- clxviii. Saldanha G, Shaw JA, Fletcher A. Evidence that superficial basal cell carcinoma is monoclonal from analysis of the Ptc1 gene locus. *Br J Dermatol.* 2002, 147(5), p. 931-5.
- clxix. Sexton M, Jones DB, Maloney ME. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 1990;23, p. 1118–1126.
- clxx. Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A, Kloog Y. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2005 , 65(16), p.7292-300.
- clxxi. Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* 2004;14(11), p. 53-62.
- clxxii. Shekhar MP, Pauley R, Heppner G. Host microenvironment in breast cancer development: extracellular matrix-stromal cell contribution to neoplastic phenotype of epithelial cells in the breast. *Breast Cancer Res.* 2003;5(3), p. 130-5
- clxxiii. Shekhar MP, Werdell J, Santner SJ, Pauley RJ, Tait L. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. *Cancer Res.* 2001, 61(4), p. 1320-6

- clxxiv. Shephard P, Martin G, Smola-Hess S, Brunner G, Krieg T, Smola H. Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor-beta and interleukin-1. *Am J Pathol.* 2004, 164(6), p. 2055-66
- clxxv. Schedin P, Elias A. Multistep tumorigenesis and the microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2004;6(2), p. 93-101.
- clxxvi. Schön MP. Animal models of psoriasis: a critical appraisal. *Exp Dermatol.* 2008, 17(8),p.703-12.
- clxxvii. Schramm RD, Paprocki AM. In vitro development and cell allocation following aggregation of split embryos with tetraploid or developmentally asynchronous blastomeres in rhesus monkeys. *Cloning Stem Cells.* 2004;6(3), p. 302-14
- clxxviii. Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn.* 2004, 231(2), p. 258-69.
- clxxix. Silberstein GB. Tumour-stromal interactions. Role of the stroma in mammary development. *Breast Cancer Res.* 2001;3(4), p. 218-23.
- clxxx. Singer C, Rasmussen A, Smith HS, Lippman ME, Lynch HT, Cullen KJ. Malignant breast epithelium selects for insulin-like growth factor II expression in breast stroma: evidence for paracrine function. *Cancer Res.* 1995, 55(11), p. 2448-54
- clxxxi. Slater DN, McKee PH. Minimum Dataset for the Histopathological Reporting of Common Skin Cancers. London: The Royal College of Pathologists, 2002, p. 1–23.
- clxxxii. Smetana K Jr, André S. Mammalian lectin as tool in glycochemistry and histochemistry with relevance for diagnostic procedure. *Methods Mol Biol.* 2008;418, p.171-86.
- clxxxiii. Smetana K Jr, Plzák J, Dvoránková B, Holíková Z. Functional consequences of the glycophenotype of squamous epithelia--practical employment. *Folia Biol (Praha).* 2003;49(3), p. 118-27.
- clxxxiv. Staples MP, Elwood M, Burton RC, Williams JL, Marks R, Giles GG. Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust.* 2006, 184(1), p. 6-10
- clxxxv. Sterry W. Skin diseases with high public health impact. Nonmelanoma skin cancer. *Eur J Dermatol.* 2007, 17(6), p. 562-3.
- clxxxvi. Stockert RJ, Morell AG, Scheinberg IH. Mammalian hepatic lectin. *Science.* 1974, 186(4161), p. 365-6.
- clxxxvii. Stratis A, Pasparakis M, Rupec RA, Markur D, Hartmann K, Scharffetter-Kochanek K, Peters T, van Rooijen N, Krieg T, Haase I. Pathogenic role for skin macrophages in a mouse model of keratinocyte-induced psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest.* 2006, 116(8), p.2094-104.
- clxxxviii. Suárez B, López-Abente G, Martínez C, Navarro C, Tormo MJ, Rosso S, Schraub S, Gafà L, Sancho-Garnier H, Wechsler J, Zanetti R. Occupation and skin cancer: the results of the HELIOS-I multicenter case-control study. *BMC Public Health.* 2007, 7(147), p. 180.
- clxxxix. Štork J.(ed.) *Dermatovenerologie.* Praha, 2008, Galén/Karolinum, 502 s.
- exc. Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res.* 2005, 65(14), p. 5996-6000.

- cxci. Teichberg VI, Silman I, Beitsch DD, Resheff G. A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975, 72(4), p. 1383-7.
- cxcii. Telfer NR, Colver GB, Morton CA; British Association of Dermatologists. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2008, 159(1), p. 35-48.
- cxci. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*. 2003, 15(6), p. 740-6
- cxci. Tilli CM, Van Steensel MA, Krekels GA, Neumann HA, Ramaekers FC. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2005 Jun;152(6):1108-24.
- cxci. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol*. 2006;1, p. 119-50.
- cxci. Tozawa T, Ackerman AB. Basal cell carcinoma with follicular differentiation. *Am J Dermatopathol*. 1987, 9(6), p. 474-82.
- cxci. Tsai RY, McKay RD. A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol*. 2005, 168(2), p. 179-84
- cxci. Tsai RY, McKay RD. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev*. 2002, 16(23), p. 2991-3003.
- cxci. Tse JC, Kalluri R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem*. 2007, 101(4), p. 816-29.
- cc. Tschachler E. Psoriasis: the epidermal component. *Clin Dermatol*. 2007, 25(6), p. 589-95.
- cc. Ullmann U, In't Veld P, Gilles C, Sermon K, De Rycke M, Van de Velde H, Van Steirteghem A, Liebaers I. Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions. *Mol Hum Reprod*. 2007, 13(1), p. 21-32.
- cc. Vabres P, Lacombe D, Rabinowitz LG, Aubert G, Anderson CE, Taieb A, Bonafé JL, Hors-Cayla MC. The gene for Bazex-Dupré-Christol syndrome maps to chromosome Xq. *J Invest Dermatol*. 1995, 105(1), p. 87-91
- cc. Valdimarsson H. The genetic basis of psoriasis. *Clin Dermatol*. 2007, 25(6), p. 563-7.
- cc. van Brabant AJ, Stan R, Ellis NA. DNA helicases, genomic instability, and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1, p. 409-59.
- cc. van Scott EJ, Reinertson RP. The modulating influence of stromal environment on epithelial cells studied in human autotransplants. *J Invest Dermatol*. 1961, 36, p. 109-31
- cc. Velasco P, Lange-Asschenfeldt B. Dermatological aspects of angiogenesis. *Br J Dermatol*. 2002 Nov;147(5):841-52.
- cc. Villalobo A, Gabius H. Signaling pathways for transduction of the initial message of the glycode into cellular responses. *Acta Anat (Basel)*. 1998, 161(1-4), p. 110-29.
- cc. von der Lieth CW, Bohne-Lang A, Lohmann KK, Frank M. Bioinformatics for glycomics: status, methods, requirements and perspectives. *Brief Bioinform*. 2004, 5(2), p. 164-78
- cc. Wan H, Stone MG, Simpson C, Reynolds LE, Marshall JF, Hart IR, Hodivala-Dilke KM, Eady RA. Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell-containing population of keratinocytes. *J Cell Sci*. 2003, 116(Pt 20), p. 4239-48.

- ccx. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1673(1-2), p.75-93
- ccxi. Watt FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1998, 353(1370), p. 831-7.
- ccxii. Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C, Bissell MJ. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol*. 1997, 137(1), p. 231-45
- ccxiii. Weinberg JM. An overview of infliximab, etanercept, efalizumab, and alefacept as biologic therapy for psoriasis. *Clin Ther*. 2003, 25(10), p. 2487-505.
- ccxiv. Wicking C, Smyth I, Bale A. The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene*. 1999, 18(55), p. 7844-51.
- ccxv. Wilkinson D, Askew DA, Dixon A. Skin cancer clinics in Australia: workload profile and performance indicators from an analysis of billing data. *Med J Aust*. 2006, 184(4), p. 162-4.
- ccxvi. Willhauck MJ, Mirancea N, Vosseler S, Pavesio A, Boukamp P, Mueller MM, Fusenig NE, Stark HJ. Reversion of tumor phenotype in surface transplants of skin SCC cells by scaffold-induced stroma modulation. *Carcinogenesis*. 2007, 28(3), p. 595-610.
- ccxvii. Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G, Heukeshoven J, Pantel K. Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells *Clin Cancer Res*. 2005, 11(22), p. 8006-14.
- ccxviii. Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, Tsutsumi S, Tomonari M, Taki M, Hosokawa H, Nagayama M. Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol*. 2003, 22(4), p. 891-8.
- ccxix. Zeisberg M, Strutz F, Müller GA. Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol*. 2000, 13 Suppl 3, p. S111-20.
- ccxx. Zenz R, Wagner EF. Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006, 38(7), p. 1043-9.
- ccxxi. Zimmer A, Nguyen QD, Gespach C. Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cell Signal*. 2004, 16(10), p. 1085-104.

14. Soubor publikovaných prací