

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Obor: Anatomie, histologie a embryologie



RNDr. Pavol Szabo, Ph.D.

Nádorové mikroprostředí: klíčový faktor agresivity tumoru

Tumor microenvironment: a key factor in tumor aggressiveness

Typ závěrečné práce: Habilitační práce

Praha, 2024

Prohlášení:

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

Identifikační záznam:

SZABO, Pavol, *Nádorové mikroprostředí: klíčový faktor agresivity tumoru. [Tumor microenvironment: a key factor in tumor aggressiveness]*. Praha, 2024. Počet stran 99.
Habilitationální práce (doc.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta.

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval svým nejbližším spolupracovníkům z 1.LF UK prof. MUDr. Karlu Smetanovi ml., DrSc., RNDr. Barboře Dvořánkové, Ph.D., MUDr. Lukáši Lacinovi, Ph.D., RNDr. Karolíně Strnadové, Ph.D. a skupině pod vedením Mgr. Michala Koláře, Ph.D., z Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Dále děkuji RNDr. Petru Gálovi, DrSc., MBA a RNDr. Matúši Čomovi, Ph.D. z LF UPJŠ.

Doc. MUDr. Ondřeji Naňkovi, Ph.D. děkuji za podporu a vytvoření přátelských podmínek na pracovišti, bez kterých bych nebyl schopen práci dokončit.

Rukopis této práce laskavě přečetl a připomínkami opatřil prof. MUDr. Karel Smetana ml., DrSc, za což mu patří můj dík.

Za vynikající technickou asistenci při zpracování materiálu děkuji Ivě Burdové, Marii Jindrákové, Heleně Stýblové.

Finančně byly tyto studie podpořeny grantovými agenturami GAČR, AZV, výzkumnými záměry MŠMT, APVV, Evropský fond ERDF, Program Exceles, Univerzitní granty UK.

Abstrakt

Maligní onemocnění představují celosvětově jednu z nejčastějších příčin úmrtí – v roce 2020 způsobily smrt přibližně 10 milionů lidí. Existuje celá řada doporučených léčebných postupů na odhalení, zpomalení, odstranění a v nejlepším případě vyléčení onkologických pacientů. Naproti tomu incidence nových případů každým rokem stoupá. Cílem prezentovaných experimentů bylo ukázat klíčovou roli stromálních buněk, konkrétně nádorově asociovaných fibroblastů pro formování reaktivního nádorového mikroprostředí nezbytného pro agresivitu karcinomů. Naše experimenty prokazují, že nádorově asociované fibroblasty izolované z různých typů maligní tkáně produkují solubilní molekuly (chemokiny, interleukiny) podporující proliferaci a migraci nádorových buněk. Z našich výsledků vyplývá, že ovlivnění nádorově asociovaných fibroblastů by mohlo být novou léčebnou metodou a tak rozšířit protinádorový terapeutický arsenál.

Klíčová slova: nádorově asociované fibroblasty, nádorové mikroprostředí, interleukiny

Abstract

Malignant diseases are one of the most common causes of death worldwide, accounting for approximately 10 million deaths in 2020. There are a number of recommended treatments to detect, slow down, eliminate and at best cure cancer patients. In contrast, the incidence of new cases is increasing every year. The aim of the presented experiments was to show the key role of stromal cells, specifically cancer associated fibroblasts, for the formation of a reactive tumor microenvironment necessary for the aggressiveness of cancers. Our experiments demonstrate that cancer associated fibroblasts isolated from different types of malignant tissue produce soluble molecules (chemokines, interleukins) that support the proliferation and migration of tumor cells. Our results show that affecting cancer associated fibroblasts could be a new treatment method and thus expand the anti-tumor therapeutic arsenal.

Key words: cancer associated fibroblasts, tumor microenvironment, interleukins

Seznam zkratek

BMP7 – bone morphogenetic protein 7

CAF – cancer associated fibroblast

CRD – carbohydrate recognition domain

CSF1 – macrophage colony stimulating factor 1

CSF1R – macrophage colony stimulating factor 1 receptor

CTLA-4 – cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4

DNMT – DNA metyltransferáza

ECM – extracelullar matrix

EGF – epidermal growth factor

EGFR – epidermal growth factor receptor

EMT – epithelial to mesenchymal transition

ERK 1/2 – extracellular signal-regulated kinases

FAP – fibroblast activating protein

FGF – fibroblast growth factor

FSP1 – fibroblast specific protein 1

G-CSF – granulocyte colony stimulating factor

GLI – zinc finger protein

GM-CSF – granulocyte–macrophage colony stimulating factor

HGF – hepatocyte growth factor

HIFs – hypoxia inducible factors

IL-1,-4,-6,-8,-10,-12,-13 – interleukin

IL-6R – interleukin 6 receptor

INF γ – interferon γ

JNK – c-Jun N-terminal kinases

K-8,-14,-18,-19 – keratin

LIF – leukemia inhibitory factor

MCP-1 – monocyte chemotactic protein 1

MEK – mitogen-activated protein kinase

MFGE8 – milk fat globule-EGF factor 8 protein

MHC II – major histocompatibility complex II

MIF – macrophage migration inhibitory factor

MMP – matrix metalloproteinase

NF- κ B – nuclear factor κ B

NK – natural killer cells

PD-1 – programmed death 1 (receptor)

PD-L1 – programmed death ligand 1

PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma

PDGF – platelet-derived growth factor

PDGFR α – platelet-derived growth factor receptor α

PLOD2 – procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2

SAA – serum amyloid A protein

SDF1 – stromal cell-derived factor 1

STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3

TAM – tumor associated macrophage

TGF- β – tumor transforming growth factor β

TIMP-1 – tissue inhibitor of metalloproteinase 1

TME – tumor microenvironment

TNF α – tumor necrosis factor α

VEGF – vascular endothelial growth factor

VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor

α -SMA – alfa smooth muscle actin

Obsah

Poděkování.....	4
Abstrakt	5
Abstract.....	6
Seznam zkratek	7
1 Cíle habilitační práce	12
2 Úvod.....	12
3 Literární přehled	13
3.1 <i>Epidemiologie nádorů v České republice</i>	<i>13</i>
3.2 <i>Nádorový ekosystém</i>	<i>15</i>
3.3 <i>Nádorově asociované fibroblasty</i>	<i>17</i>
3.3.1 <i>Původ nádorově asociovaných fibroblastů.....</i>	<i>18</i>
3.3.2 <i>Biologické vlastnosti nádorově asociovaných fibroblastů</i>	<i>19</i>
3.3.3 <i>Nádorově asociované fibroblasty a galektiny</i>	<i>21</i>
3.3.4 <i>Vliv nádorově asociovaných fibroblastů na zdravé buňky v podmínkách in vitro</i>	<i>23</i>
3.3.5 <i>Funkce exozomů v interakci nádorově asociovaných fibroblastů s nádorovými buňkami</i>	<i>24</i>
3.3.6 <i>FAP u nádorově asociovaných fibroblastů</i>	<i>27</i>
3.3.7 <i>Sonic hedgehog u nádorově asociovaných fibroblastů</i>	<i>28</i>
3.3.8 <i>Heterogenita populace nádorově asociovaných fibroblastů.....</i>	<i>28</i>
3.4 <i>IL-6 a nádory.....</i>	<i>30</i>
3.4.1 <i>Struktura IL-6, jeho receptoru a signalizace</i>	<i>30</i>
3.4.2 <i>IL-6 v nádorech.....</i>	<i>32</i>
3.4.3 <i>IL-6 a nádorová rezistence.....</i>	<i>33</i>
3.4.4 <i>IL-6 a další chemokiny/cytokiny</i>	<i>34</i>
3.5 <i>Vaskulární systém.....</i>	<i>35</i>
3.5.1 <i>Cévní řečiště v tumorech</i>	<i>36</i>
3.5.2 <i>Exozomy a angiogeneze</i>	<i>36</i>
3.5.3 <i>Endotelové buňky a extracelulární matrix</i>	<i>37</i>
3.6 <i>Funkce imunitního systému.....</i>	<i>37</i>
3.7 <i>Nádorově asociované makrofágy</i>	<i>39</i>
3.7.1 <i>Diferencované M1/M2 makrofágy.....</i>	<i>40</i>
3.7.2 <i>Vztah nádorově asociovaných fibroblastů a tumor asociovaných makrofágů</i>	<i>41</i>
3.7.3 <i>Tumor asociované makrofágy v melanomu.....</i>	<i>43</i>
3.7.4 <i>Součinnost imunitních buněk v nádoru.....</i>	<i>43</i>
3.7.5 <i>Exozomy a tumor asociované makrofágy</i>	<i>44</i>
3.7.6 <i>Mezenchymové buňky a imunitní odezva.....</i>	<i>45</i>
3.8 <i>Extracelulární matrix</i>	<i>46</i>
3.8.1 <i>Kolagen.....</i>	<i>47</i>
3.8.2 <i>Proteoglykany</i>	<i>48</i>
3.8.3 <i>Fibronektin.....</i>	<i>49</i>
3.8.4 <i>Bazální lamina</i>	<i>49</i>
3.8.5 <i>Matrixové metaloproteinázy a hypoxie.....</i>	<i>50</i>
4 Materiál a metody	52

5	Výsledky	52
6	Diskuse	73
7	Závěr.....	76
8	Seznam použité literatury	78
9	Soubor publikovaných prací	99

1 Cíle habilitační práce

V prezentované habilitační práci jsem se zaměřil na následující cíle:

- 1) Studium utváření reaktivního nádorového mikroprostředí spojené s biologickou aktivitou nádorově asociovaných fibroblastů včetně jejich původu.
- 2) Studium účinku vybraných bioaktivních faktorů a miRNA produkovanými buňkami nádorového ekosystému na možné biologické chování tumoru.

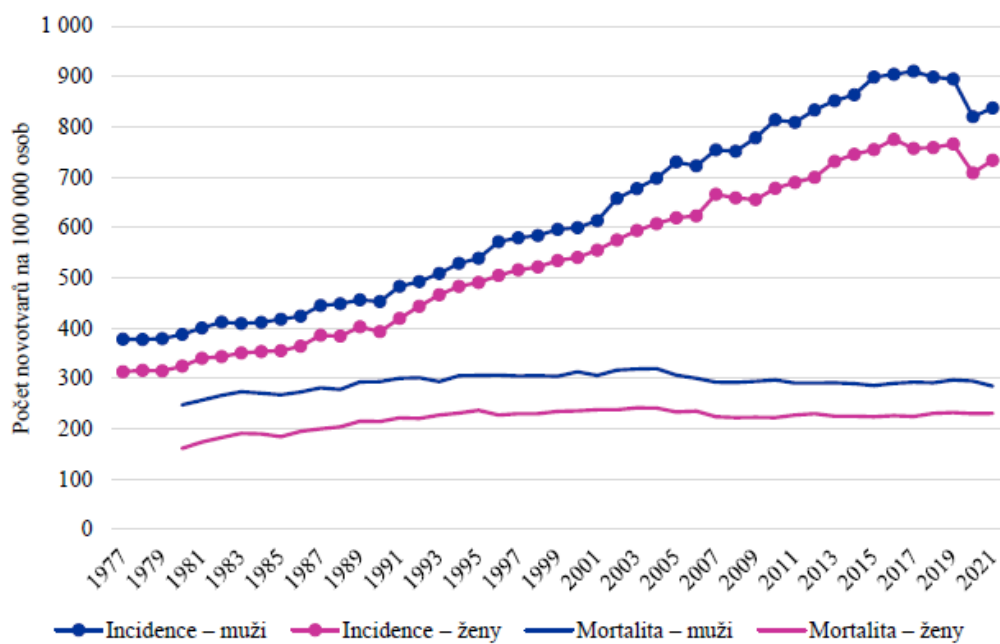
2 Úvod

Solidní tumor není náhodnou směsí různých typů buněk a extracelulárních vláken, ale svou organizací spíše připomíná orgán i když strukturálně a funkčně abnormální. Vytvářejí se složitým komplexem interakcí mezi rostoucími buňkami novotvaru pomocí procesů často podobným probíhajících ve formujících se orgánech. Nádory interagují se zbytkem organismu. Zatímco normální orgány mají funkce, které podporují přežití organismu, systémové účinky nádorového orgánu jsou často pro pacienta letální. Pohlížet na tumor jako orgán se svým vývojem, specifickou mikro a makroskopickou strukturou, syntopií, cévním zásobením, inervací, lymfatickou drenáží a v neposlední řadě i činnostmi nabízí paralelu k utváření a popisu zdravých orgánových systémů. Je to důvodem, proč i klasické morfologické obory, jako jsou anatomie a embryologie, se stále více věnují studiu nádorů. Navíc mohou významně přispět k pochopení vztahu mezi architekturou nádoru a jeho maligním potenciálem.

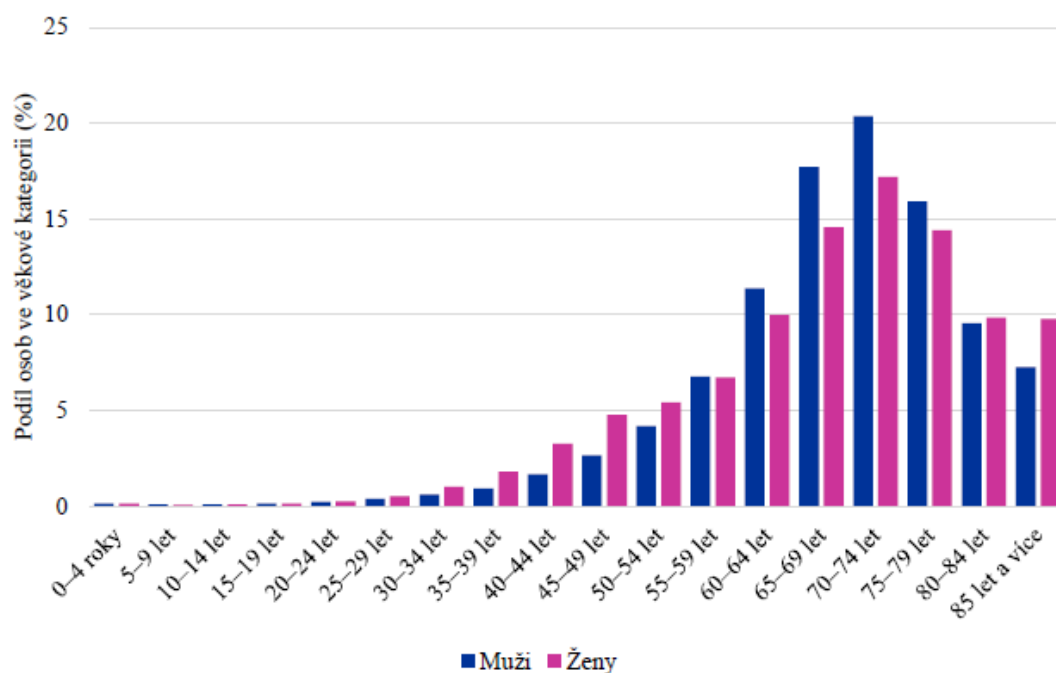
3 Literární přehled

3.1 *Epidemiologie nádorů v České republice*

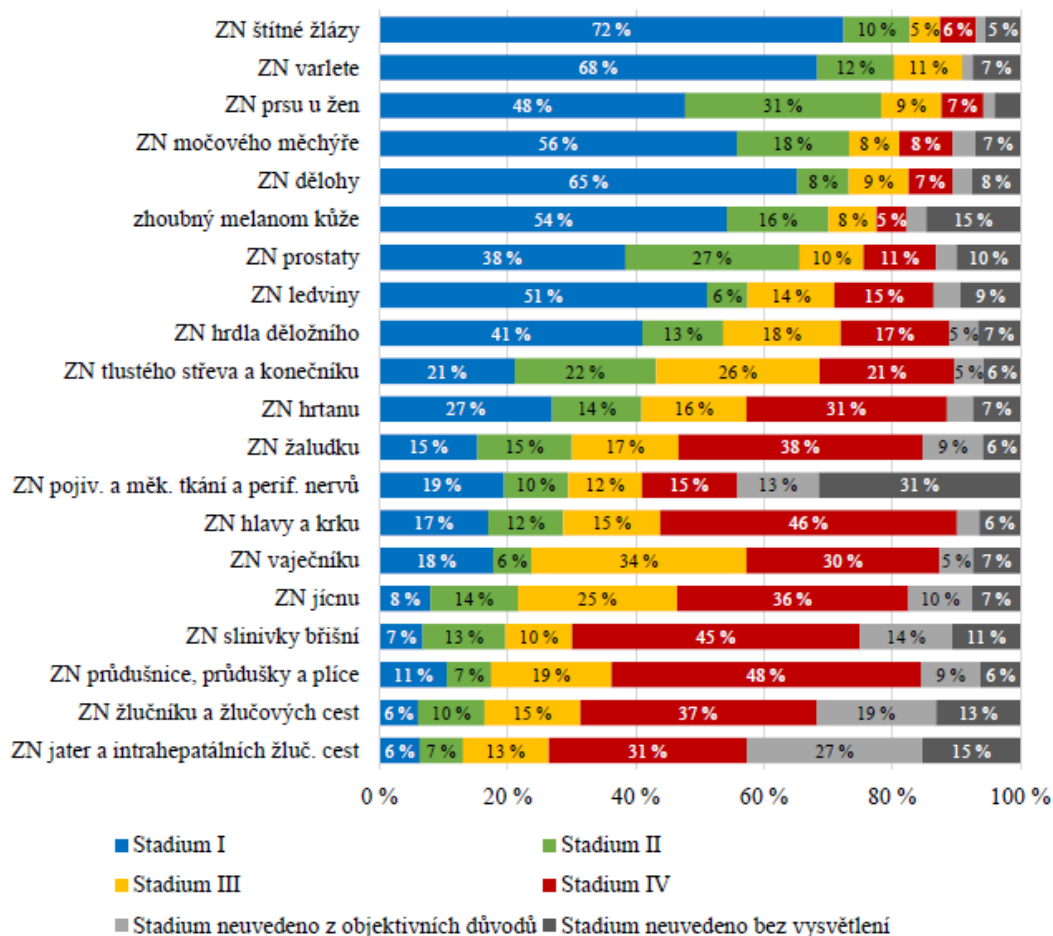
Celopopulačně sbíraná data Národního onkologického registru dokládají rostoucí onkologickou zátěž české populace. Navzdory vysoké incidenci nádorů se dlouhodobě daří stabilizovat či dokonce snižovat mortalitu, což následně vede k významnému nárůstu celkové prevalence pacientů. Je nepochybné, že péče o vysoké počty pacientů bude i v blízké budoucnosti vyžadovat značné finanční prostředky. Z průběhu hlášení vyplývá, že v letech 2020 a 2021 byly počty nových případů nižší oproti rokům předchozím v důsledku změn v organizaci léčebné péče v souvislosti s pandemií COVID-19 a v důsledku vysokého počtu nadúmrtí především v seniorní části populace během pandemie COVID-19. Opětný nárůst zachytu novotvarů lze očekávat od roku 2022. Incidence zhoubných novotvarů kromě nemelanomových kožních dosáhla v roce 2021 hodnoty 58 461 nově diagnostikovaných onemocnění, což je 556,7 na 100 000 osob. Mezi nejčastější malignity patřily nádory prostaty, prsu u žen, tlustého střeva a konečníku, průdušnice, průdušky a plíce, které dohromady tvořily téměř polovinu (48,5 %) všech zhoubných nádorů diagnostikovaných v ČR v roce 2021. Věkové složení je charakteristické výraznou převahou osob vyššího věku. Mortalita tvořila 19,3 % všech úmrtí v České republice v roce 2021 (UZIS, Novotvary 2019–2021 ČR) (Obrázek 1-3).



Obrázek 1. Vývoj incidence a mortality na zhoubná onemocnění dle pohlaví, přepočten na 100 000 osob v letech 1977-2021 (UZIS).



Obrázek 2. Věková struktura pacientů se zhoubným onemocněním 2017–2021 (UZIS).



Obrázek 3. Zastoupení klinických stadií vybraných nádorových onemocnění v období 2017–2021 (UZIS).

3.2 Nádorový ekosystém

Nádorové mikroprostředí – stroma představuje heterogenní populaci různých buněčných typů a extracelulárních struktur, které obklopují buňky vlastního nádorového parenchymu. Klíčový význam pro rozvoj a růst novotvaru je vzájemná kooperace mezi nádorovým „semínkem“ a výživnou „půdou“ stromatu (Paget, 1989). Pericyty, fibroblasty, buňky imunitního systému, endotelové buňky, adipocyty představují nejpočetnější buněčnou složku, která podporuje remodelaci extracelulární matrix, migraci, neoangiogenezi, invazivitu a v neposlední řadě lékovou rezistenci prostřednictvím produkce různorodých růstových faktorů, chemokinů a cytokinů (Hanahan & Coussens, 2012). Organizace stromální komponenty je variabilní u různých nádorů a není celkem jasný proces aktivace lokálního

mezenchymu, nadto i vzájemná komunikace mezi nádorovou a podpůrnou jednotkou. V průběhu hojení a zápalového procesu mění buňky lokálního stromatu svůj fenotyp a stávají se dočasně aktivním stromatem. Za jistých podmínek se můžou nádorové buňky spolupodílet na pokračující proměně aktivního stromatu na nádorové reaktivní mikroprostředí. Vzájemná interakce mezi nádorovým parenchymem a jeho stromatem představuje klíčovou roli pro progresi nádoru. Jak už bylo popsáno Haroldem Dvorakem, organizace nádorového mikroprostředí je velice podobná mikroprostředí hojící se rány zahrnující infiltraci fibroblastů, imunitních buněk, remodelaci extracelulární matrix a tvorbu nového cévního řečiště. Nádorová masa je tvořena velice nesourodou populací buněk, při které dochází k aktivaci lokálního ne-nádorového tkaniva obsahující mezenchymové stromální buňky, adipocyty, endotelové buňky a množství mediátorů a růstových faktorů podporujících vývoj samotných nádorových buněk (Dvorak, 1986). Bylo identifikováno a popsáno několik zdrojů hostitelské tkáně, která slouží jako původce pro utváření reaktivního mikroprostředí: kostní dřev složená z mezenchymálních buněk, endotelových buněk, imunitních buněk, adipocytů a fibroblastů; pojivová tkáň složená z fibroblastů a mezenchymálních buněk; tuková tkáň složená z adipocytů; krevní cévy tvořené z pericytů a endotelových buněk (Xiong et al., 2015; H. Yan et al., 2022).

Invazivita a metastazování tumoru je jedním ze základních znaků úspěšného šíření nádorového onemocnění v těle. Podmínkou je přítomnost vhodného mikroprostředí, které je tvořeno nejméně ze šesti rozdílných typů buněčných populací: fibroblastů, pericytů, adipocytů, makrofágů, imunitních buněk a mezenchymových kmenových buněk pocházejících z kostní dřevě (Xiong et al., 2015; Mezawa et al., 2019; Joseph et al., 2021; Plava et al., 2021; Mujal et al., 2022). V rámci nádorového mikroprostředí dochází nejen k epitel-mezenchymovému přechodu (EMT – epithelial to mesenchymal transition), ale i k přechodu mezi buňkami tvořící samotné podpůrné stroma. Nejčastější je aktivace fibroblastů v procesu vytváření reaktivního nádorového mikroprostředí (Midgley et al., 2013). Přechod epitelové buňky na mezenchymovu má hlavní cíl, a to podpořit invazivitu samotného tumoru. U nádoru glioblastomu se buňky, s vlastnostmi podobnými kmenovým, transdiferencují na murální buňky, které vytvářejí novou vaskulární síť důležitou pro nutritivní výživu nádorové masy (Scully et al., 2012). Na úrovni regulace genů, Twist 1 přes Jagged1/KLF 4 dráhu ovlivňuje přechod epitelových buněk nádoru hlavy a krku na buňky endotelové za účelem neoangiogeneze tkáně (H. F. Chen et al., 2014).

Fenotypové a tím i biologické vlastnosti nádorového mikroprostředí jsou dané původem buněčných typů, které ho utvářejí a z toho důvodu se jedná o heterogenní jednotku, kde jednotlivé složky exprimují specifické markery charakteristické pro danou buněčnou skupinu. Příkladem může být identifikace nejméně pěti typů nádorově asociovaných stromálních buněk

popsaných Bussardem: od buněk s vlastnostmi podobnými mezenchymové kmenové buňce (málo agresivní charakter, omezená schopnost remodelace extracelulární matrix, exprese znaků CD105, CD90, CD73, CD44) až po nejagresivnější formu indikovanou zvýšenou expresí fibroblastového aktivujícího proteinu (FAP – fibroblast activating protein) a fibroblastového specifického proteinu 1 (FSP1 – fibroblast specific protein 1). Tuto skupinu charakterizuje masivní remodelace extracelulární matrix (ECM – extracellular matrix), snížená exprese alfa hladkosvalového aktinu (α -SMA – alfa smooth muscle actin) (Kidd et al., 2012; Spaeth et al., 2013; Bussard et al., 2016) (Tabulka 1).

Fenotyp	Expresní znaky	Agresivita
Podobný mezenchymové kmenové buňce	CD105, CD90, CD73, CD44	málo agresivní
Podobný endotelovým buňkám	CD31	
Podobný myofibroblastům	Tenascin C, α -SMA	středně agresivní
Podobný pericytům	NG2, PDGFR	
ECM remodelující	FSP1, FAP	velmi agresivní

Tabulka 1. Expresí fenotypových znaků nádorově asociovaných fibroblastů spojených s agresivitou zhoubného onemocnění.

Navíc schopnost nádorových buněk přizpůsobit se novým okolnostem, po čase vyústí v rezistenci na podávanou medikaci. Nicméně interakce nádor – mikroprostředí vykazuje uniformní chování v rámci několika kategorií tumorů. A proto léčba, která by byla zaměřená na vzájemnou komunikaci tumor – stroma by byla použitelná pro široké spektrum pacientů, kde by se zároveň snížilo riziko rezistence a genetického driftu. Zahrnovala by nejenom oboustranné působení nádor – mezenchym, ale i metastatické niche, imunitní buňky, ECM a endotelové buňky (Togo et al., 2013).

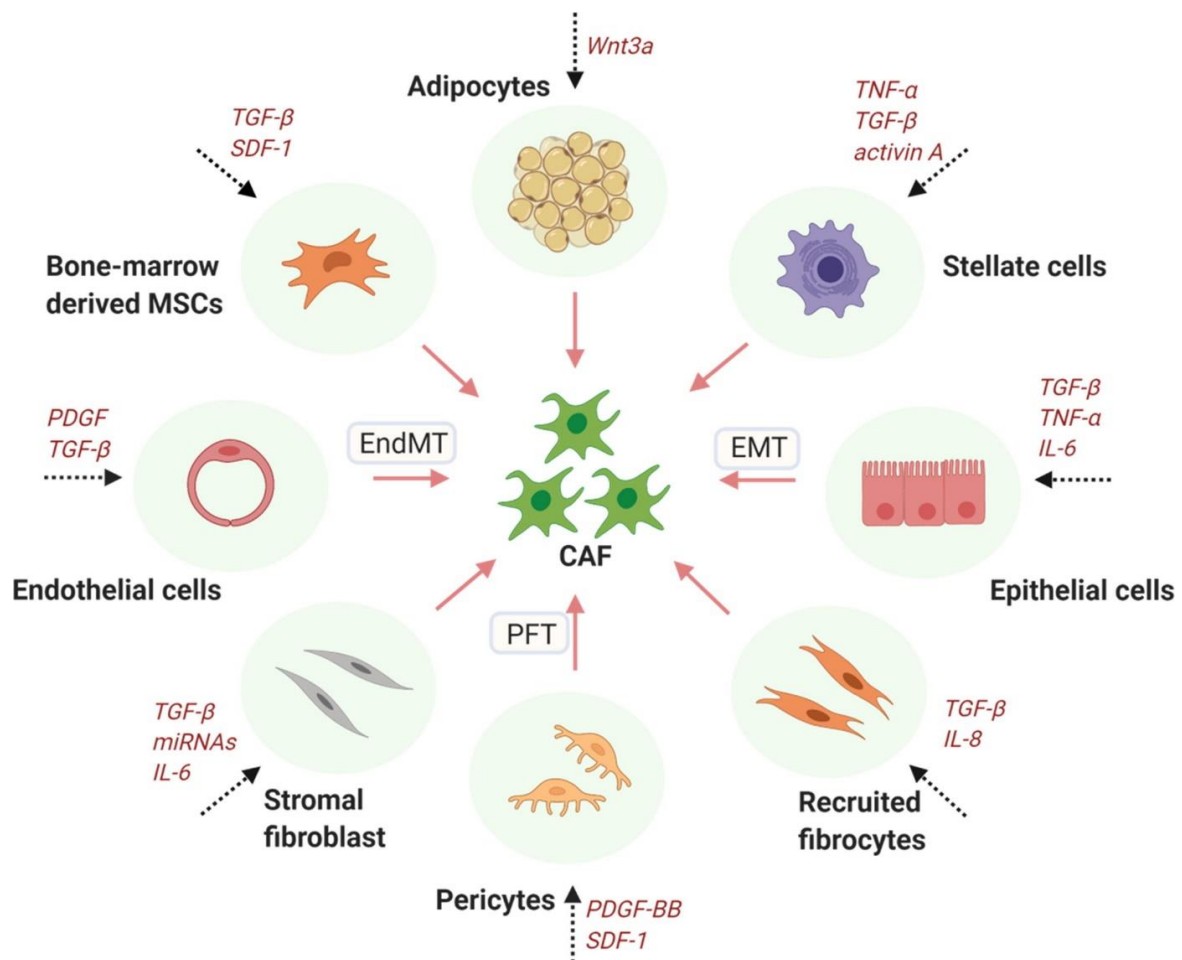
3.3 Nádorově asociované fibroblasty

Fibroblasty pomocí destrukce a opětovné produkce ECM a signálních molekul ovlivňují její strukturu a funkčnost a stejným mechanismem i tvorbu granulační tkáně při hojící se ráně (Rognoni & Watt, 2018). Transformace zdravých fibroblastů na nádorově asociované

fibroblasty (CAF – cancer associated fibroblast) v rámci nádorového mikroprostředí probíhá v závislosti na produkci tkáňově-specifických proteinů jako jsou fibroblastový růstový faktor (FGF – fibroblasts growth factor), monocytový chemotaktický protein 1 (MCP-1 – monocyte chemotactic protein 1), růstový faktor z destiček (PDGF – platelet-derived growth factor), tkáňový inhibitor metaloproteináz 1 (TIMP-1 – tissue inhibitor of metalloproteinase 1) a tumor transformující růstový faktor β (TGF- β – tumor transforming growth factor β) (Quail & Joyce, 2013; T. Song et al., 2015).

3.3.1 Původ nádorově asociovaných fibroblastů

Hlavním zdrojem CAF jsou lokální fibroblasty, ale vznikají mohou i z mezenchymových buněk kostní dřeně, pericytů, tukové tkáně, endotelových buněk, hladkých svalových buněk a makrofágů (Ostman & Augsten, 2009; Ganguly et al., 2020; ChallaSivaKanaka et al., 2022) (Obrázek 4).



Obrázek 4. Původ CAF (Rimal et al., 2022).

Mnoho otázek nabízí hypotéza o původu CAF, které by vznikaly ze samotných nádorových buněk během epitel-mezenchymového přechodu. Zvířecí experimenty nabídly zajímavé výsledky. Embryonální plicní epitelové myší buňky, získané z inbrední linie C57BL/6 a transfekované HPV 16 *E6/E7* geny, vykazovaly fenotypové znaky typické pro fibroblasty. Během přímé kokultivace s lidskými zdravými folikulárními a interfolikulárními keratinocyty měnily expresní profil normálních keratinocytů, které získaly znaky velice podobné nádorovým epitelům (Smetana et al., 2008). Xenotransplantace nádorového štěpu buněk z jednoho živočišného druhu na jiný umožní snadno identifikovat zdroj CAF v těle hostitele. Inokulované lidské nádorové buňky do imunokomprimované nu/nu myši po čase vytvoří tumor, jehož stromální fibroblasty mají původ pouze v lokálním mezenchymu příjemce. Druhá odlišnost byla potvrzená imunohistochemickým průkazem lidského vimentinu, který byl negativní (Dvorankova et al., 2015). Porovnávání mutační variace u nádorů vaječníků a prsu naznačuje malý klinický dopad CAF, které vznikly z původní nádorové buňky procesem EMT (Qiu et al., 2008).

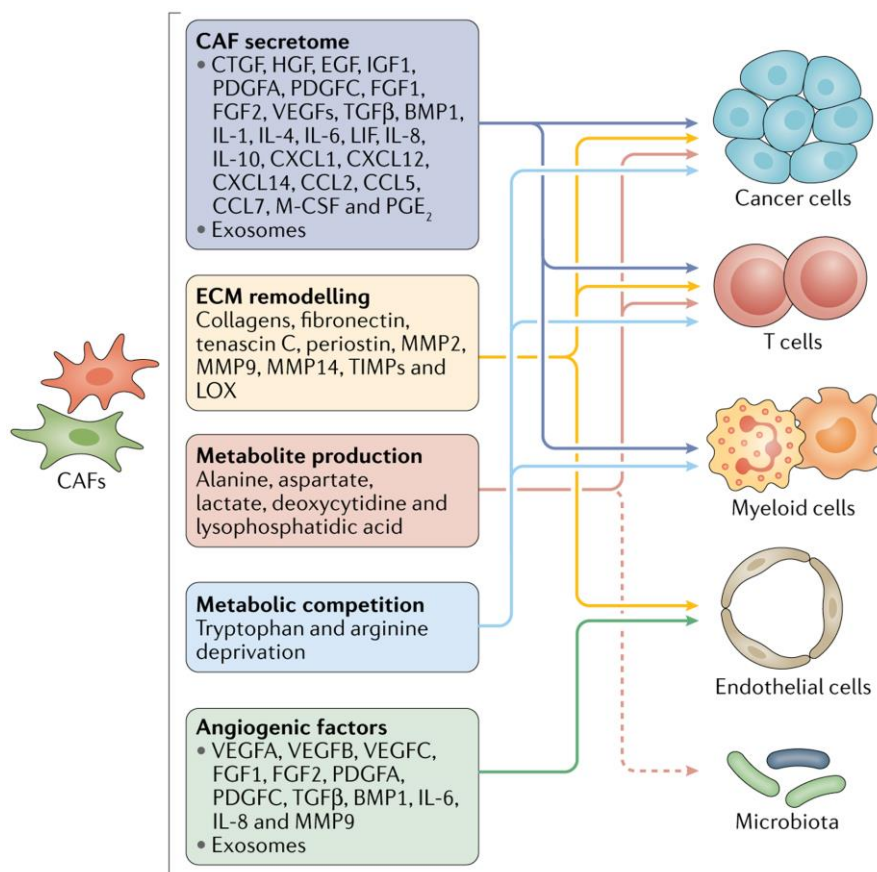
Spouštěčem CAF fenotypu nemusí být nevyhnutelně bezprostřední kontakt s nádorovými buňkami, ale pravděpodobně víc závisí od jejich epigenetických modifikací (Kang et al., 2015). Epigenetické změny, které nastanou u zdravých dermálních fibroblastů pod vlivem leukemického inhibičního faktoru (LIF – leukemia inhibitory factor), kdy nastartují stabilní proinvasivní CAF fenotyp. Nastává aktivace JAK/STAT3 signální dráhy spojené s acylací STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) a zintenzivnění funkce DNA metyltransferáz DNMT1 a DNMT3B (Albregues et al., 2015).

3.3.2 Biologické vlastnosti nádorově asociovaných fibroblastů

CAF mají výrazný účinek na biologické chování různých typů nádorů (Plzak et al., 2010; Lacina et al., 2015). Jejich klíčová role jako nádorově asociovaných fibroblastů je potvrzená v procesu tumorigeneze, kde u nádorů pankreatu, prostaty a prsu tvoří největší populaci stromálních buněk (Ohlund et al., 2014). Vlastnosti CAF jsou velice podobné fibroblastům vyskytujícím se v ráně a při lokálních zánětlivých reakcích tkáně typické pro revmatické onemocnění. CAF v nádorech vykazují zvýšenou biologickou aktivitu, parakrinní produkci signálních molekul stimulující růst nádoru a mohou být důvodem terapeutické rezistence (Herrera et al., 2021).

V obecném měřítku se nejpočetnější buněčná populace nádorového mikroprostředí zejména angažuje v podněcování nádorové progresi, ale jejich vysoká funkční plasticita na základě vlivu prostředí může vzácněji vést k opačnému inhibičnímu efektu. Sérový amyloid A protein 3 (SAA3 – serum amyloid A protein) z rodiny apolipoproteinů stimuluje pronádorovou aktivitu PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor α) pozitivních CAF. Mutace genu pro SAA3 protein u duktálního adenokarcinomu pankreatu (PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma) má za následek inverzi funkce CAF z pro- na anti-nádorový (Rhim et al., 2014; Djurec et al., 2018).

CAF navozují ve stromatu nepřetržitou zánětlivou reakci a tím tvorbou pro-zánětlivých faktorů, napomáhají utváření nových cév, migraci makrofágů, a tím výrazně stimuluji propagaci nádoru (Erez et al., 2010). Sekrecí růstových faktorů podněcují pericyty a endotelové buňky k tvorbě nového cévního řečiště, a navíc jsou zapojeny do remodelace ECM (Hanahan & Coussens, 2012). CAF jsou rovněž producentem chemokinů a interleukinů (IL – interleukin), kam patří IL-6, IL-8, CXCL-1, dále syntetizují hepatocytární růstový faktor (HGF – hepatocyte growth factor), PDGF, vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF – vascular endothelial growth factor) a stromální buněčný faktor 1 (SDF1 – stromal cell-derived factor 1) (Kolar et al., 2012; Junttila & de Sauvage, 2013). Syntéza pro-zánětlivých IL-6 a IL-8 koreluje s nádorovou progresí (Strnadova et al., 2022; Xiao et al., 2022) (Obrázek 5).



Obrázek 5. Interakce mezi CAF a jinými typy buněk v TME (Y. Chen et al., 2021).

Reakce imunitních buněk produkujících faktory, jako jsou protilátky, cytolytické enzymy, perforin, granzym na nádorovou tkáň, může být maskována inhibičním účinkem CAF. Stromální nádorové fibroblasty izolované z melanomu zabrání napadení tumoru NK buňkami, které tak uniknou zpod kontrolního aparátu řízeného leukocyty (Balsamo et al., 2009). CAF a aktivované fibroblasty produkují do ECM oligomerní glykoprotein tenascin-C, který se akumuluje ve stromatu v průběhu procesu hojení ran a nádorového růstu. Přítomnost tenascin-C napomáhá rozvoji široké škály nádorů (Berndt et al., 2015).

3.3.3 Nádorově asociované fibroblasty a galektiny

CAF produkují nejrůznější variace makromolekul, které utvářejí proteinové struktury ECM zahrnující kolagen, fibronectin, tenascin a méně známý endogenní lektin galektin-1 (gal-1). Endogenní lektiny – galektiny, jsou biopolymery schopnou dekódovat biologickou informaci uloženou v cukerním řetězci – glykokód (Solis et al., 2015). Sacharidové oligomery a polymery unikaly dlouhou dobu ze zorného pole molekulární biologie. Možnost, že by se

sacharidy mohly podílet na předávání informace při buněčných dějích byla opomíjená a tato schopnost zůstávala rezervována v základním dogmatu DNA, RNA a proteinům. Rozmanitost struktury sacharidů a možnost jejich dalšího řetězení z nich činí velmi variabilní nástroj pro kódování, uchovávání a realizaci informace. Pojem glykokód definuje skutečnost, že i cukerné polymery jsou dnes považovány za média vhodná pro uložení biologické informace. Receptorový systém v podobě proteinů – lektinů je způsobilý přečíst kódy zapsané v řetězených sacharidech (Gabiuss et al., 2011).

Schopnost lektinu rozpoznávat specifické cukerné motivy je dána aminokyselinovou sekvencí v jejich molekule, přesněji ve specializované doméně rozpoznávající sacharidy tzv. CRD (carbohydrate recognition domain). CRD působí jako jistý morfologicky a funkčně diskriminující faktor, protože neumožňuje navázání různých anomerů, byť by jejich chemický vzorec byl identický a lišily se jen pozicí vazby. Pojem galektin byl zaveden v roce 1994 pro ty lektiny, které splňují následující podmínky: (I) afinitu k β -galaktosidům a (II) sekvenční homologii v části, která se váže se sacharidem (CRD je tvořena 135 aminokyselinami). Přítomnost gal-1 souvisí s růstem nádoru v důsledku jeho schopnosti stimulovat jednak buňky mikroprostředí, ale i samotné nádorové buňky (Dvorankova et al., 2011; Astorgues-Xerri et al., 2014). Exprese gal-1 je ovlivněna hypoxickým faktorem 1 (HIF-1 – hypoxia inducible factor 1) proteinem, který se angažuje v malignitě tumorů (Ito et al., 2012). Při řízení přechodu fibroblastů na myofibroblasty, která je spojena s nárůstem přítomnosti α -SMA pozitivních buněk, hraje endogenní lektin gal-1 nepostradatelnou roli. Mikroprostředí dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku je bohaté na gal-1 a nádorové stroma dosahuje téměř rovnosti poměru zastoupení v korelaci k nádorovému epitelu. Další ze skupiny lektinů, gal-3, je přítomen ve fibrotické tkáni, jakožto důsledek hojivého procesu po zánětu či zranění tkáně (Nishi et al., 2007; Valach et al., 2012). Souhra účinků gal-1/3 vyvolává anoikis u pacientů s nádorem pankreatu (Sanchez-Ruderisch et al., 2011; S. Song et al., 2012). Při srovnání biologického vlivu galektinů na řízení přechodu fibroblastů na myofibroblasty má gal-1 větší efekt v konfrontaci s aktivitou gal-3 (Dvorankova et al., 2011). Gal-1 se navíc podílí na imunomodulaci reakce tumoru, formování cévních spojek nepostradatelných pro zásobení nádoru, podporuje růst a zároveň schopnost metastazovat migrujícím buňkám (Griffioen & Thijssen, 2014; Thijssen & Griffioen, 2014). Způsobilost nádoru uniknout adekvátní imunitní reakci spojenou s aktivitou cytotoxických T-lymfocytů, podporuje gal-1 vazbou na cílové N- nebo O- glykany (Cedeno-Laurent & Dimitroff, 2012). Povrchové glykoproteinové markery/receptory charakteristické pro primární T-lymfocyty (CD4, CD7, CD43 a CD45) slouží k vazbě ligandu gal-1, který je schopen indukovat řízenou buněčnou smrt aktivovaných T-lymfocytů (Perillo et

al., 1995). Funkce gal-1 je širokospektrální a jeho potenciální terapeutické využití by bylo závislé na typu nádoru a konkrétním stavu pacienta (Martinez-Bosch et al., 2022). Podobně gal-3, secernován buňkami nádorového mikroprostředí včetně CAF, hraje významnou roli v maskování imunitního dohledu pomocí inhibice působení CD8 pozitivních cytotoxických lymfocytů, interferenci s NK buňkami (NK – natural killer cells), a tím podporuje přežívání a metastazování (Ruvolo, 2016). Příslibem pro pacienty v pokročilém stádiu maligního melanomu je začátek první fáze klinického hodnocení účinku kombinace inhibitoru gal-3 (galaktoarabino-rhamnogalakturonat GR-MD-02) společně s monoklonální protilátkou ipilimumab s očekávaným výsledkem aktivovat imunitní protinádorovou odpověď. První slibné výsledky byly dostupné v březnu 2018 s tendencí pokračovat v dalším testování (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02117362>).

3.3.4 Vliv nádorově asociovaných fibroblastů na zdravé buňky v podmínkách *in vitro*

Možnost úzké spolupráce s klinickým pracovištěm nabízí jedinečnou příležitost získat primární nádorovou tkáň od onkologických pacientů po souhlasu místní etické komise a předchozím podepsání informovaného souhlasu pacientem. *In vitro* experimenty laboratoře prof. Smetany poukázaly na schopnost indukovat u normálních keratinocytů izolovaných ze zdravé epidermis expresi znaků nádorových buněk anebo epidermálních kmenových buněk pod vlivem CAF z dlaždicobuněčného karcinomu. Zdravé lidské keratinocyty, které byly kultivované společně s CAF získané z bazocelulárního, dlaždicobuněčného karcinomu a dermatofibromu vyvolaly expresi keratinů-8, -19 a navíc intermediálního filamenta vimentinu typického pro mezenchymové buňky (Lacina, Dvorankova, et al., 2007; Lacina, Smetana, et al., 2007; Kideryova et al., 2009).

Keratin-19 je jedním ze znaků kmenové buňky epidermis nacházející se v „bulge“ vlasového folikulu a keratin-8 se v epidermis vyskytuje jenom prenatalně. Jejich postnatalní přítomnost v epidermis je asociována se špatnou prognózou nádorového onemocnění (Fillies et al., 2006). Koexprese keratinů-8, -19, vimentinu a transkripčního faktoru Snail v jádře keratinocytů pod vlivem CAF je známkou epitel-mezenchymového přechodu spojeného s agresivitou a metastazováním (Thiery et al., 2009).

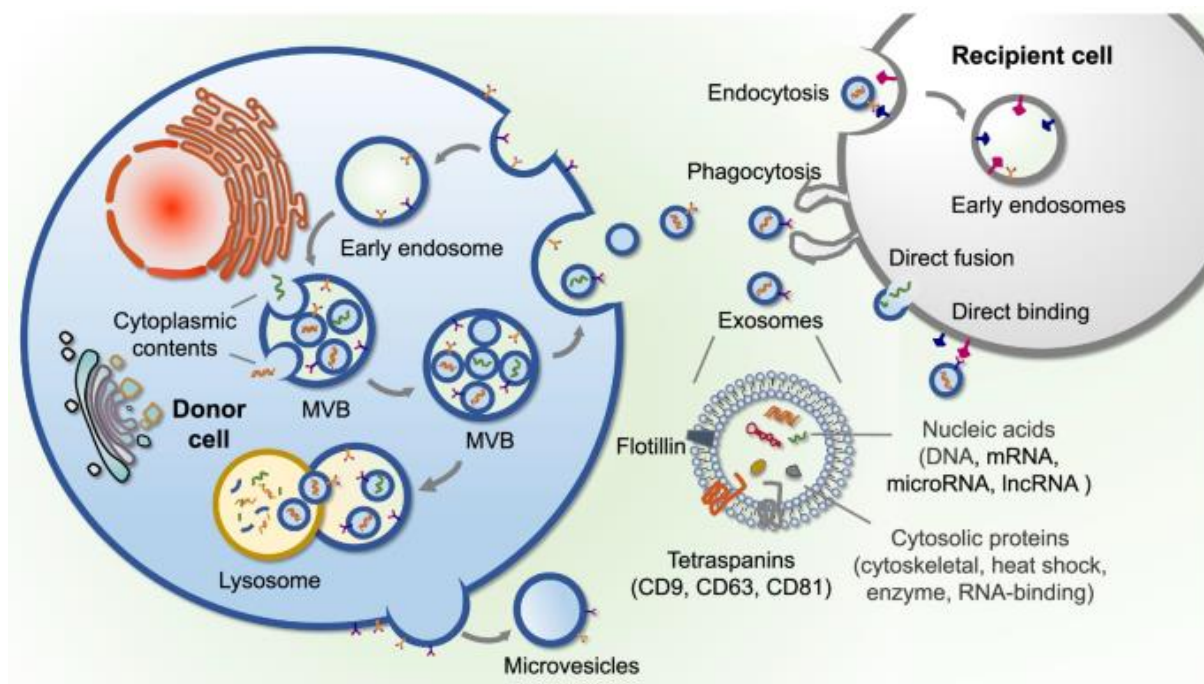
CAF izolované z bazocelulárního karcinomu spouštějí u normálních fibroblastů fenotypové změny typické pro mezenchymové kmenové buňky, včetně diferenciační plasticity

(Szabo et al., 2011). Porovnání transkriptomu mezi normálními zdravými fibroblasty a CAF z různorodých tumorů pomocí kvantitativní microarray analýzy demonstrovalo rozdílnou expresi v 560 genech (Strnad et al., 2010).

3.3.5 Funkce exozomů v interakci nádorově asociovaných fibroblastů s nádorovými buňkami

V rámci intercelulární komunikace mezi stromatem a nádorovými buňkami se uplatňuje široké spektrum signálních a růstových molekul, matrixových metaloproteináz (MMP – matrix metalloproteinase), jejichž primárním cílem je výrazně napomáhat proliferaci a migraci nádorových buněk. Přežívání zhoubných buněk v primárním ložisku a postupná tvorba vzdálených metastáz je často podmíněná vysokou aktivitou CAF. Zajímavou charakteristikou CAF je schopnost migrovat společně s epitelovými nádorovými buňkami skrz bazální laminu do cévních a lymfatických kapilár, a tím ulehčit přemístování se nádorových buněk přes vrstvu endotelových buněk z/do cév a zakládat sekundární metastatická centra. To potvrzuje názor, že primární tumor neposkytuje jenom nádorové buňky, ale navíc i podpůrný mezenchym pro úspěšnější vnik metastáz (Choi et al., 2014; Luo et al., 2015).

Vzájemné spojení primárního tumoru a vzdálené metastázy mohou vedle solubilních molekul obstarat i exozomy. V roce 2007 důležitá studie definovala funkci exozomů jako nosiče informací mezibuněčné komunikace schopné transportovat mRNA a microRNA (Valadi et al., 2007) (Obrázek 6).



Obrázek 6. Biogeneze, obsah a internalizace exozomů (D. Yu et al., 2022).

Srovnání biologického účinku exozomů produkovaných zdravými a nádorovými buňkami v *in vitro* podmínkách prokázal jejich rozdílný účinek. V kontrastu se zdravými buňkami, byly exozomy syntetizované maligní kulturou schopné změnit normální fenotyp buněk na nádorový (Stefanius et al., 2019; C. H. Wu et al., 2019). Parakrinní exozomová signalizace tumoru s okolními buňkami má potenciál spouštěče komunikační sítě odpovědné za nárůst proliferace, invazivity, exprese EMT znaků i u méně agresivních nádorů. Buněčná linie MIA PaCa-2 nádoru pankreatu knock outem pro annexin A1 protein prokázala slabou migrační a metastatickou kapacitu. Kultivační medium získané z WT (wild type) linie a obohacené o exozomy obsahující annexin A1 protein, nastartoval u knock out MIA PaCa-2 buněk EMT a zvýšil jejich motilitu (Pessolano et al., 2018).

Dosažená rezistence maligních buněk na aplikovanou protinádorovou terapii představuje velkou komplikaci pro úspěšnou léčbu onkologických pacientů. Jedním z klíčových faktorů, který připouští neadekvátní odpověď tumoru vůči podané medikaci je hypoxie. Specifické podmínky navozené nízkou saturací kyslíkem způsobí změnu expresního a fenotypového projevu v maligních buňkách. Získaná schopnost podlehnout EMT se projeví přítomností znaků jako N-cadherin, snail, slug, vimentin a produkcí pro-invazivních matrixových metaloproteináz (Greaves & Calle, 2022). Parakrinní sekrece exozomů v maligních buňkách ovaria pod vlivem hypoxického nádorového mikroprostředí (TME – tumor

microenvironment) vede k efluxu podané cisplatinou a zvýšení přežívání buněk tumoru. Lék Amiloride inhibuje produkci exozomů způsobené hypoxickým prostředím. Společně s cisplatinou omezí proliferaci a mobilizuje apoptickou kaskádu v maligních buňkách (Dorayappan et al., 2018).

Aktivace fibroblastů specifickými signálními molekulami vede k přepnutí jejich fenotypu na CAF a umožní postupně formovat součásti TME v souladu s nezbytnou mezibuněčnou interakcí. Poslední studie popisuje vzájemně prospěšné působení mezi CAF a nádorovými buňkami. Buňky tumoru močového měchýře produkují exozomy s TGF- β , který cílové fibroblasty transformuje na CAF. Kondiciované médium z takto vzniklých CAF obohacené o IL-6 podporuje EMT, migraci a invazivitu u neinvazivních buněk nádoru močového měchýře (Ringuette Goulet et al., 2018; Goulet et al., 2019).

Intenzivní parakrinní spolupráce CAF – tumor byla zaznamenána i u dalších typů nádoru. Exozomální miR1247-3p maligních buněk se podílí na přepnutí fibroblastů na CAF s efektem zvýšení rezistence a přežívání buněk karcinomu jater. Následné spuštění kaskády β 1-intergrin – nukleární transkripční faktor kappa B (NF- κ B – nuclear factor κ B) v maligních buňkách zesiluje jejich metastazaci do plic (T. Fang et al., 2018). Exozomy původem z PDAC podněcují Kupfferovy buňky v játrech k syntéze TGF- β . Vyvolaný řetězec odpovědí aktivuje Itovy buňky, diferencuje myofibroblasty, zvyšuje produkci fibronektinu v ECM a ve výsledku utváří pro-metastatické mikroprostředí (Costa-Silva et al., 2015). Chemorezistenci na léčivo gemcitabine při PDAC signifikantně zvyšují exozomy syntetizované v CAF (Richards et al., 2017). Skupina zaměřená na studium nádoru ovarií reportovala výsledky vlivu exozomů z CAF na nárůst exprese TGF- β 1 doprovázené spuštěním Smad signalizace. Účinek exozomů byl spojen s nárůstem migrace a invazivity maligních buněk (W. Li et al., 2017). Na schopnosti epitelových buněk uniknout vzájemnému těsnému spojení a částečně modifikovat svůj fenotyp prostřednictvím EMT se různou aktivitou podílí i CAF. Exozomy vytvořené CAF zapínají v plicích nádorových buňkách EMT pomocí Snail1 transkripčního faktoru (You et al., 2019), exozomální miR-181d-5p z CAF inhibuje apoptózu a podporuje EMT u tumoru prsu (H. Wang et al., 2020). Parakrinní CAF sekrece exozomů obsahujících miR34a-5p napomáhá EMT u dlaždicobuněčného karcinomu ústní dutiny (Y. Y. Li et al., 2018).

3.3.6 FAP u nádorově asociovaných fibroblastů

Exprese FAP u populace CAF je znakem výrazně agresivního a pro-nádorového fenotypu. FAP patří k membránovým serinovým proteázám, které mohou být v malém množství detekované u zdravých fibroblastů, ale jeho přítomnost se prudce zvyšuje v průběhu hojení ran, u revmatoidní artritidy, plicní fibrózy a cirhózy jater (Loh et al., 2021; Mathieson et al., 2022; McAndrews et al., 2022). Endopeptidázovou aktivitou je FAP schopný degradovat kolagen I. Enzymatický účinek FAP podporuje angiogenezi, podílí se na přestavbě ECM a dává možnost nádorovým buňkám dělit se na úkor přestavby stromatu (C. Lu et al., 2011). Postupné ubývání FAP pozitivních buněk ve stromatu na myším modelu melanomu stimuluje imunitní odpověď organismu pomocí nepřímé aktivace CD8 pozitivních T-lymfocytů (Y. Zhang & Ertl, 2016). Na druhou stranu, zvýšená koncentrace FAP pozitivních CAF v PDAC má diametrálně rozdílný vliv na CD8 pozitivní T-lymfocyty. FAP pozitivní CAF pomocí imunosupresivní CXCL12 – CXCR4 kaskády blokuje infiltraci cytotoxických T-lymfocytů do nádoru (Feig et al., 2013). Předpoklad jednosměrného zaměření biologicky aktivních molekul je v živém organismu často matoucí a jejich funkce v závislosti od širokého spektra okolností a vlivů figuruje v kontrastu. Příkladem je tumor supresorový efekt FAP. Nádorové mikroprostředí bude „soudcem“, které rozhodne o osudu FAP směrem stimulačním nebo inhibičním ve finální působnosti na nádorovou masu (R. Liu et al., 2012). Exprese FAP na povrchu stromálních CAF je často spojená s neadekvátní imunitní odpovědí a následným přežíváním nádoru. Preklinické studie zaměřené na sledování aktivace efektorových T-lymfocytů pomocí chimérického FAP specifického antigenu potvrdily schopnost omezit růst tumoru (Millul et al., 2021). Bi-specifické syntetické aktivátory T-buněk s dvěma rozdílnými vazebnými antigen doménami pro antigen aktivují imunitní systém hostitele, konkrétně cytotoxické T-lymfocyty k selektivní eliminaci nádorových buněk.

Onkolytické viry jsou metodami genového inženýrství upravené tak, aby se dokázaly v nádorových buňkách replikovat a lyzovat je. Nádorové mikroprostředí omezuje působnost onkolytických virů vytvářením bariéry, která brání penetraci a šíření viru. De Sostoa myším aplikoval onkolytický adenovirus, který nesl FAP bi-specifický syntetický aktivátor T-buněk s cílem aktivovat lymfocyty proti CAF. Bi-specifický aktivátor se jednou vazebnou doménou spojil s CD3 pozitivními lymfocyty a druhou vazebnou doménou s FAP antigenem CAF. Aktivované a proliferačně stimulované T-lymfocyty svým cytotoxickým účinkem výrazně snížily populaci FAP pozitivních CAF ve stromatu nádoru (de Sostoa et al., 2019).

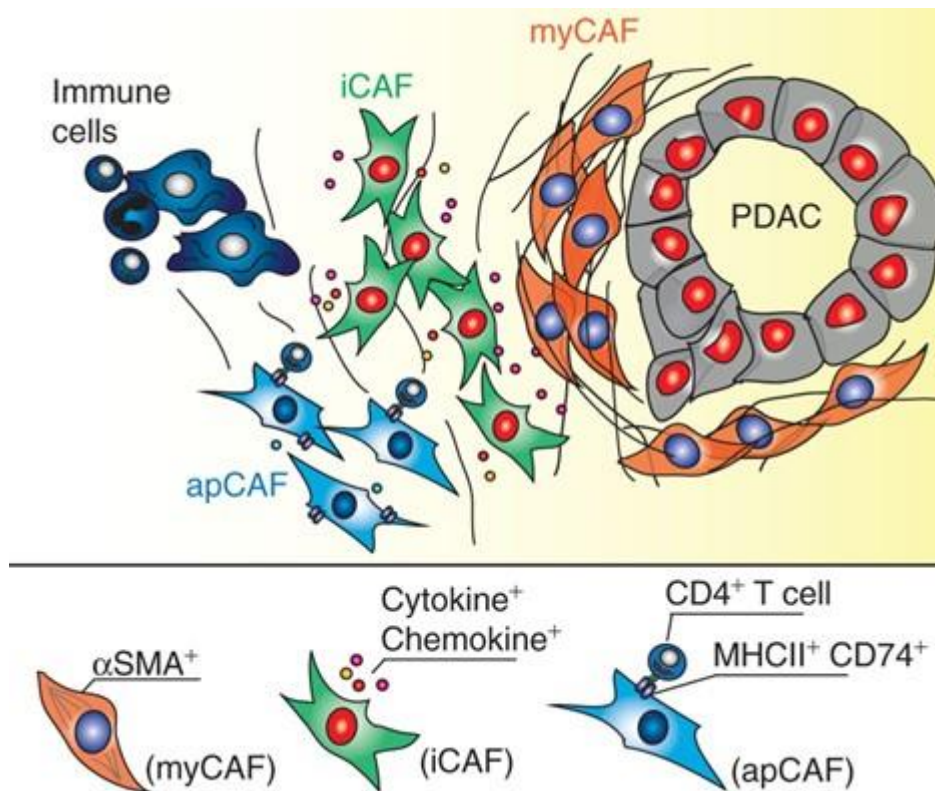
3.3.7 Sonic hedgehog u nádorově asociovaných fibroblastů

Standardním léčebným postupem aplikovaným onkologickým pacientům je užití radioterapie, chirurgické odstranění zhoubné tkáně, chemoterapie, imunoterapie nebo hormonální terapie, většinou použité v různých kombinacích. Běžně nasazená chemoterapie může vyvolat metabolické a fenotypové změny lokálních fibroblastů směrem k vlastnostem podobným CAF. Proměna vede k přepnutí metabolismu CAF na anaerobní glykolýzu, aktivaci autofagie a vytvoření pro-zánětlivého mikroprostředí. Odpověď nádorových buněk na metabolický zlom CAF způsobí mobilizaci interferonové signalizace, antioxidační reakci a Sonic hedgehog/GLI signalizaci, která u epitelových buněk karcinomu prsu navodí expresi znaků charakteristických pro nádorové kmenové buňky (Peiris-Pages et al., 2015). Aktivace hedgehog dráhy napomáhá udržovat pro-maligní charakter CAF ve stromatu. Samotné neoplastické buňky jsou schopné nadprodukcí specializovaných ligandů výrazně potencovat součásti reaktivního mikroprostředí a formovat podmínky k růstu novotvaru. PDAC intenzivně secernují Sonic hedgehog ligand pro receptor na povrchu CAF. Aktivované CAF prostřednictvím Sonic hedgehog dráhy reprogramují proteosyntézu vláken a molekul ECM (Steele et al., 2021). V první fázi nadějně klinické studie (NCT02027376) u pacientek s triple negativním karcinomem prsu bylo použito cytostatikum docetaxel společně se Smoothened inhibitorem hedgehog signalizace v CAF (Cazet et al., 2018).

3.3.8 Heterogenita populace nádorově asociovaných fibroblastů

Každý buněčný typ v lidském těle je specifický díky přítomnosti povrchových a nitrobuněčných znaků. Pomocí nich můžeme buňky použitím vhodných technik identifikovat. Postupně se objevovaly další znaky, které exprimují CAF. Patří k nim α -SMA, tenascin-C, FSP-1, FAP a neurální-gliový antigen (Mezawa & Orimo, 2022). Různorodý původ CAF může diverzifikovat jejich funkci v rámci celé populace fibroblastů asociovaných s nádorem. V důsledku velké heterogenity CAF v nádorovém stromatu, ale i exprese znaků podobných s normálními aktivovanými fibroblasty dochází často k problému jich od sebe spolehlivě rozlišit. Sekvenční analýza na úrovni jedné buňky (Single cell sequencing) identifikovala v axilárních lymfatických uzlinách 4 typy CAF původem z metastázy karcinomu prsu. Nejpočetnější zastoupení z CAF měly dvě pro-invasivní třídy. Jedna stimulovala migraci a EMT pomocí CXCL12 a TGF- β kaskády, druhá zapnutím Notch signalizace iniciovala rozsev tumoru (Givel et al., 2018; Kieffer et al., 2020; Pelon et al., 2020). Ve stromatu PDAC byly

popsané CAF s myofibroblastovým charakterem (myCAF) vzniklé prostřednictvím TGF- β , respektive IL-1/JAK-STAT signalizace (Biffi et al., 2019). Ty exprimují α -SMA a bezprostředně sousedí s neoplastickou tkání PDAC. Pro-zánětlivá populace CAF (iCAF) produkovala IL-6 a další bioaktivní molekuly. Navíc postrádala α -SMA pozitivitu i samotný kontakt s nádorovými buňkami (Ohlund et al., 2017). Jiná studie u PDAC klasifikovala další subpopulaci tzv. antigen prezentující CAF (apCAF) charakterizovanou přítomností povrchového receptoru hlavního histokompatibilního komplexu II (MHC II – major histocompatibility complex II) a CD74. Na základě principu vystavení antigenu CD4 pozitivním lymfocytům, se CAF pravděpodobně účastní modulace imunitní odpovědi organismu (Belle & DeNardo, 2019; Elyada et al., 2019) (Obrázek 7).



Obrázek 7. Heterogenní populace CAF v mikroprostředí duktálního adenokarcinomu pankreatu (Belle & DeNardo, 2019).

Nová skupina meflin (ISLR) pozitivních CAF byla detekovaná v nádorech kolorekta a pankreatu (Kobayashi et al., 2021; Takahashi et al., 2021; Ichihara et al., 2022; Ando et al., 2024). Meflin představuje glykofosfatidylinositolovou kotvu spojující protein s fosfolipidem

na buněčné membráně. Single cell sequencing analýza meflin pozitivních CAF prokázala jejich nízkou hladinu mRNA pro α -SMA a potvrdila rozdíl od konvenčních α -SMA pozitivních CAF (Mizutani et al., 2019). Navíc myší nádorové modely a vzorky tkáně pacientů poukazují na možný meflin pozitivní CAF supresní účinek na růst tumoru (Kobayashi et al., 2021). Meflin interaguje s kostním morfogenetickým proteinem 7 (BMP7 – bone morphogenetic protein 7). Utvořený komplex meflin/BMP7 inhibuje aktivitu TGF- β a následně potlačuje jím regulované signální dráhy včetně tkáňové fibrózy (Hara et al., 2019; Nakahara et al., 2021). Meflin formuje možnou pro nádor restriční populaci CAF (rCAF). Vodítkem restričního mechanismu rCAF může být přímá úměra mezi počtem infiltrovaných CD4 pozitivních T lymfocytů a meflin pozitivních CAF v nádorovém stromatu u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (Miyai et al., 2022). Důležité je co nejlépe poznat a popsat expresní profil, funkci a zdroj jednotlivých typů CAF. Vítanou odměnou bude efektivní inhibice interakce mezi nádorovou buňkou a CAF s výsledným potlačením a zastavením proliferace maligních buněk.

3.4 *IL-6 a nádory*

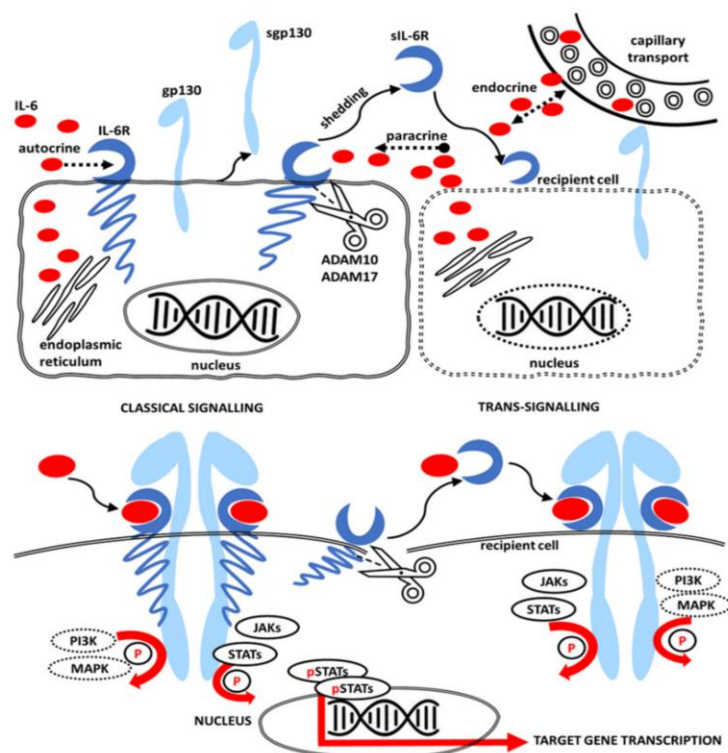
3.4.1 Struktura IL-6, jeho receptoru a signalizace

IL-6 patří mezi glykoproteiny. Jeho molekulární hmotnost se pohybuje kolem 25 kDa. Na polypeptidový řetězec s glykosidickou vazbou se váže sacharidová podjednotka. IL-6 tvoří čtyři dlouhé α -helix šroubovice stabilizované mezimolekulárními disulfidickými můstky (Scheller et al., 2011). Poprvé byl popsán v souvislosti s diferenciací B-lymfocytů, u kterých indukuje zrání do finálního stádia plazmatické buňky schopné produkovat protilátky proti specifickým antigenům (Hirano et al., 1985).

IL-6 se váže na receptor IL-6R lokalizovaný na plazmatické membráně buňky a vazbou ligandu na receptor vytvoří IL-6/IL-6R komplex asociovaný s transduktorem signálu gp130 (CD130). Výsledkem je homodimerizace gp130 za vzniku aktivovaného IL-6 receptor komplexu s hexamerní strukturou konstituovanou ze dvou IL-6, dvou IL-6R a dvou gp130 (Hibi et al., 1990). Existují tři lokusy vazby IL-6 na IL-6R a gp130. Ig doména lidského receptoru IL-6 není přímo zapojená do vazby s ligandem IL-6 (Yawata et al., 1993). IL-6 přenáší signál prostřednictvím dvou složek IL-6R. První část sestává z 80 kDa transmembránového receptoru s krátkou cytoplazmatickou doménou (mbIL-6R, IL-6R α , gp80 nebo CD126). Druhá, kratší a

solubilní, je orientovaná extracelulárně (sIL-6R) (Jones et al., 2001). Klasická IL-6 signalizace, která je převládající formou přenosu IL-6 informací, vyžaduje na cytoplazmatické membráně navázaný receptor (mbIL-6R). Je omezená pouze pro hepatocyty, některé leukocyty a epitelové buňky. Součástí IL-6 receptoru je velice krátká cytoplazmatická doména, u které absentují specifické motivy nezbytné pro transdukcii intracelulární signalizace. Hexamerní struktura komplexu zahrnuje dvě gp130 (IL-6R β) jednotky, bohaté na SHP-2, a JAK/STAT motivy nezbytné k potenciální intracelulární signalizaci. Navázání ligandu IL-6 na příslušný receptor vyvolá dimerizaci gp130. Strukturní změny IL-6/IL-6R aktivují v cytoplazmě vázané tyrosin kinázy s kapacitou fosforylovat transkripční faktory cílových genů (Mihara et al., 2012). Exprese gp130 je přítomná téměř ve všech orgánech včetně mozku, plic, srdce, ledvin, sleziny a placenty (Yoshida et al., 1996). STAT3 je transkripční aktivátor, transduktor gp130 signalizace, odpovědný za reakci buňky na různé cytokinové a růstové podněty. IL-6 interaguje s IL-6R/gp130 receptorem na povrchu cílových buněk, aktivuje JAK kinázu, která fosforylaci STAT3 přenáší vnitrobuněčnou signalizaci (Johnson et al., 2018).

Druhou formou přenosu IL-6 informace je trans-signalizace. Vzniká navázáním IL-6 na solubilní formu IL-6R. Solubilní forma IL-6R je výsledkem proteolytického štěpení IL-6R z buněčné membrány metaloproteázami ADAM10 a ADAM17 (Wolf et al., 2014; Schaper & Rose-John, 2015). (Obrázek 8). Trans-signální přenos IL-6 informace může být aktivován v jakékoli buňce, v důsledku exprese gp130 ve všech buňkách. Trans-signalizace zahrnuje především prozánětlivé reakce, zatímco klasická signalizace je spojována s protizánětlivými a regeneračními procesy (Wolf et al., 2014). Přítomnost IL-6R na povrchu buněk se zdá být jedním z prokancerogenních faktorů (Scheller et al., 2014). Solubilní forma gp130, která s největší pravděpodobností vzniká alternativním sestřihem, inhibuje trans-signální dráhu (Jostock et al., 2001; Wolf et al., 2014).



Obrázek 8. Glykoprotein gp130 může být vázán na membránu (gp130) nebo být v solubilní formě (sgp130). IL-6R, pokud je exprimován, může být navázán na membránu nebo být uvolněn jako rozpustný receptor (sIL-6R) díky proteázové aktivitě ADAM10 s ADAM 17. sIL-6R se může uplatnit jako receptor IL-6 i u buněk, které samotné neexprimují svůj vlastní IL-6R. Aktivace gp130 komplexem IL-6/IL-6R (klasická signalizace) nebo IL-6/sIL-6R (trans-signalizace) vede k fosforylaci transkripčních faktorů JAKs/STATs, PI3K a MAPK (Spanko et al., 2021).

3.4.2 IL-6 v nádorech

IL-6 je popisován jako molekula se širokospektrálním účinkem, která má nezastupitelné místo při zánětlivých reakcích včetně iniciace imunitní odpovědi. U pacientů s nádorovým onemocněním je IL-6 produkován ve zvýšené míře oběma složkami, tj. podpůrným stromatem i samotným nádorem, kde facilituje epitelo-mezenchymový přechod, migraci nádorových buněk a podněcuje aktivitu stromálních buněk (P. Li et al., 2015). Zvýšená koncentrace IL-6 v séru a jiných biologických tekutinách onkologických pacientů byla potvrzena u mnoha typů nádorových onemocnění (H. Sato et al., 2016). CAF izolované z ductálního karcinomu prsu vytvářejí velké množství IL-6. Extracelulárně u nádorové linie MCF10.DCIS napomáhá IL-6 růstu a proliferaci buněk, které následně vytvářejí velké multiceulární struktury navzájem propojené výběžky (Osuala et al., 2015). Stromální fibroblasty z melanomu ovlivňují

melanomové buňky, vyvolávají agresivnější chování nádoru za hypoxických podmínek a pravděpodobně na daném efektu participují společně IL-6 s IL-8 (Comito et al., 2012; Kodet et al., 2013; Jobe et al., 2016). Pro úspěšný růst a únik před účinnou terapií je pro nádorové buňky důležité udržovat nízký diferenciační status, který u dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku a kolorektálního karcinomu pomáhá navodit právě IL-6 (Kolar et al., 2012; Holmer et al., 2015). Fibroblasty z lokálního mezenchymu obklopující nádor nebo přítomné v hojící se ráně, mění své biologické vlastnosti a aktivitu po stimulaci specifickým agens a stávají se z nich CAF v tumoru a aktivované fibroblasty v ráně. Exprese Twist1 navozená přítomností IL-6 u lidských fibroblastů ze žaludku, má za následek jejich konverzi na CAF přes fosforylaci transkripčního faktoru STAT3 (K. W. Lee et al., 2015). Produkce IL-6 fibroblasty původem z PDAC aktivovala v jaterních hepatocytech STAT3 signální kaskádu. Spuštěním STAT3 dráhy se dramaticky zvýší produkce SAA1/2 u hepatocytů. Apolipoproteiny SAA1/2 v závislosti na zánětlivém stimulu jsou odpovědné za infiltraci buněk myeloidní řady a fibrózu jater. Blokace řetězce IL-6/STAT3/SAA zabraňuje formování prometastatického prostředí a překáží tvorbě metastáz v játrech. Na druhou stranu, zvýšená koncentrace SAA proteinu v cirkulaci u pacientů s PDAC a kolorektálním karcinomem korelovala s přítomností metastáz v játrech (J. W. Lee et al., 2019). Tvorba IL-6 prostatickými nádorovými buňkami vyvolává změnu fenotypu lokálních fibroblastů na CAF determinovanou zvýšenou expresí FAP. Tato proměna řídí autokrinní aktivaci produkci IL-6 nádorově asociovanými fibroblasty, které tak zvyšují migrační schopnost nádorových buněk a zakládání sekundárních ložisek pomocí EMT (Giannoni et al., 2010).

3.4.3 IL-6 a nádorová rezistence

Váženým problémem léčby pacientů se zhoubným onemocněním bývá získaná rezistence na protinádorovou medikaci. Set několika bioaktivních molekul, který zahrnuje i IL-6 je společně odpovědný za získanou odolnost BRAF mutovaných melanomových buněk na aplikovaný vemurafenib (Kodet et al., 2018). Utlumení aktivity genu pro IL-6 pomocí miR-98 na myším modelu inhibuje migrační a metastatické chování nádorových buněk z melanomu (F. Li et al., 2014; X. Li et al., 2014). Potlačení p53 dependentní exprese miR-34a pomocí IL-6R/STAT3/mi-34a zpětné kličky brání dalšímu vývoji kolorektálního karcinomu (Rokavec et al., 2014). CAF izolované z PDAC mají na svém povrchu zvýšený počet receptorů pro mTOR-4E-BP-1 signalizaci, která je cílem imunosupresivní terapie rapamycinem. Zablokování mTOR-4E-BP-1 dráhy značně zredukuje počet α -SMA pozitivních CAF, a navíc i produkci IL-

6. Xenograft lidských pankreatických buněčných nádorových linií MIA PaCa-2 nebo Panc-1 společně s CAF inokulovaný do experimentálních myší, předem ošetřenými pasireotidem (inhibitor mTOR-4E-BP-1 dráhy), a následně vystavené účinku gemcitabinu, sníží chemorezistenci a velikost nádoru (Duluc et al., 2015). Exozomy secernované buňkami karcinomu prsu nesoucí gp130 se podílí na vzájemné mezibuněčné interakci a stimulují makrofágy k produkci IL-6. Aktivace IL-6/gp130/STAT3 dráhy je spojena s potlačením adekvátní imunitní reakce proti nádorovým buňkám (Ham et al., 2018).

Pleiotropní efekt IL-6 může podporovat proliferaci a tvorbu metastáz maligních buněk pomocí aktivace STAT3, s cílem inhibovat činnost antigen prezentujících dendritických buněk a vyvolat dysfunkci imunitního systému. Nabízí se logická alternativa blokovat IL-6/STAT3 signalizaci s úmyslem podpořit obrannou schopnost organismu. Nádorová linie CT26 myšního karcinomu tlustého střeva byla aplikovaná IL-6 deficientním jedincům. V porovnání s WT byl růst nádoru u IL-6 deficientní skupiny výrazně potlačen a jeho redukci doprovázelo i vyčerpání CD8 pozitivních lymfocytů. Nádorové mikroprostředí u IL-6 deficientních myší akumulovalo zralé dendritické buňky, CD4 pozitivní lymfocyty, cytotoxické lymfocyty, které produkovaly interferon γ (INF γ – interferon γ). Současně, IL-6 deficientní řada na povrchu CT26 buněk signifikantně exprimovala programovaný ligand smrti 1 (PD-L1 – programmed death ligand 1) (Ohno et al., 2017). Oblasti TME s nedostatečným přísunem kyslíku lákají velké množství imunosupresivních buněk. Po spuštění STAT3 dráhy u rezistentního nádoru prsu, tumor asociované makrofágy (TAM – tumor associated macrophages) secernují HIF-1 α . V závislosti na poškození DNA reaguje tumor supresorový protein p53 zastavením buněčného cyklu a navozením apoptózy pomocí regulace transkripce BCL-2 a BAX genů. Poměr hladiny Bcl-2/Bax proteinů je indikátorem náchylnosti buňky aktivovat vlastní program apoptózy. Nízká hodnota poměru proteinů brání spuštění regulované buněčné smrti (Di Pietro et al., 2009). HIF-1 α participuje na IL-6 lékové rezistenci podmíněnou relací Bcl-2/Bax proteinů. Zdá se, že IL-6 je klíčovým faktorem odpovědným za cytotoxickou odolnost a neschopnost indukovat apoptózu po podání chemoterapie u buněk karcinomu prsu (K. Wang et al., 2018).

3.4.4 IL-6 a další chemokiny/cytokiny

Na základě dominance můžeme pro-zánětlivé chemokiny/cytokiny separovat do skupin: a) převaha IL-6 a podpora zánětlivé reakce a růstu tumoru b) převaha IL-12, TRAIL, INF γ , navození imunitní reakce a blokace nádorové progresse. Jiná skupina chemokinů IL-10, IL-13 a TGF- β má schopnost inhibovat produkci INF γ CD4 pozitivními lymfocyty. Aktivace

transkripčních faktorů STAT3 a NF- κ B stimuluje produkci pro-zánětlivých molekul a negativně ovlivňuje sekreci chemokinů, nezbytných k nastartování imunitní reakce (Mirzaei et al., 2019). Komplexní přístup studie nádorového mikroprostředí odhalil léčebné užití tocilizumabu a reparixinu na blokaci receptorů pro IL-6 a IL-8, který u zvířecího modelu snižuje schopnost nádorových buněk karcinomu prsu migrovat do plic, jater a lymfatických uzlin a vytvářet tak vzdálené metastázy (Jayatilaka et al., 2017). Trojkombinace blokace biologického účinku IL-6, IL-8 a CXCL-1 utvářených buňkami stromatu se zdá být ještě více perspektivní u dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku (Kolar et al., 2012). Existuje mnoho molekulárních propojení a souvislostí mezi IL-6 a nádorem, obdobně jako mezi nádorem a chronickou ránou (Gal et al., 2022). Účinkem IL-6 získávají nádorové buňky nové fenotypové znaky a funkční vlastnosti. Utvářejí se další biologické schopnosti a možnosti tumoru nezbytné pro jeho přežívání a evoluci směrem k vytváření metastáz a celkovému selhání organismu pacienta.

3.5 Vaskulární systém

Kontinuální přísun okysličené krve s živinami a neustálé zvětšování a tvorba komplexnějších kapilárních cest u rostoucího nádoru má za úkol vytvořit podmínky pro jeho další růst a šíření. Nádorová angiogeneze zahrnuje vytváření nových kapilárních spojek většinou pučením původních již formovaných cév a jako taková se obecně liší od vaskulogeneze (schopnosti *de novo* tvorby cév z prekurzorů původem z kostní dřeně). Důležitou zvláštností jsou vaskulogenní mimikry, kdy s pomocí nádorových buněk vzniká ekvivalent cévních sítí schopných transportovat krevní elementy. Nerovnováha mezi pro- a anti-angiogenními signály je přímo ovlivněna interakcí VEGF ligandem s jeho VEGFR2 receptorem (Welti et al., 2013). Nádorově asociované endotelové buňky se od zdravých endotelových buněk liší v mnoha aspektech a vykazují odlišný expresní profil. Přenos informace pomocí extracelulárně signál-redukující protein kinázy (ERK 1/2 – extracellular signal-regulated kinases) vyvolá znásobení počtu CXCR7 receptorů na povrchu nádorově asociované endotelové buňky, které interagují s chemokinovým ligandem obsahujícím specifický CXC motiv (Yamada et al., 2015).

3.5.1 Cévní řečiště v tumorech

Nádorové mikroprostředí aktivně přispívá k novotvorbě cév, jejichž strukturní nedokonalost způsobuje vysokou permeabilitu a nízkou funkční stabilitu endotelových buněk. Stěny nádorově asociovaných cév jsou konstrukčně oslabené a neschopné zaručit dostatečný průsvit kapilár. Jsou náchylné podléhat mechanickým tlakům proliferujících nádorových buněk a absence hierarchické organizace vede k poruchám průtoku spojených s nedostatečnou perfuzí krve bohatou na kyslík a živiny. Nedokonalost vybudovaného cévního systému v konečném důsledku podporuje nastartování hypoxického fenotypu, deprivaci esenciálních živin, pokles pH pod hodnotu 7 a ve finále podporuje aktivaci zánětlivého prostředí. Tyto vlastnosti cévního systému souvisejí s nádorovým mikroprostředím a ovlivňují růst a diseminaci nádorových buněk (Filippi et al., 2018).

Cévní organizace nádoru je ve srovnání s normální tkání velice omezená. Redukuje růst a saturaci tumoru kyslíkem, který tak přechází do méně výhodných hypoxických podmínek. Narůstající vzdálenost ohniska nádoru od cévních kapilár souvisí s poklesem průniku účinné látky napříč maligní tkání. To může vést k nedostatečné odpovědi karcinomu na aplikovanou léčbu. Důležitým prognostickým znakem v rámci klinických výsledků u řady typu nádorů je hustota kapilárního řečiště (J. L. Chen et al., 2020; Kourea et al., 2021; Lin et al., 2022). Výrazný nárůst produkce pro-angiogenního proteinu VEGF koreluje se schopností nádorových buněk migrovat a formovat metastáze u pacientů s karcinomem tlustého střeva a konečníku, plic a ledvin (Hegde et al., 2013).

3.5.2 Exozomy a angiogeneze

Potenciál nastartovat proces angiogeneze za účelem kontinuálního agresivního růstu tumoru má parakrinní sekrece malých vezikul – exozomů nádorovými buňkami. Maligní buňky produkují exozomy, které reprogramují endotelové buňky, stimulují je k remodelaci a vytváření sítě krevních kapilár. Studie s exozomy miR-130a a miR-155 secernované nádorovými buňkami žaludku prokázaly jejich pro-angiogenní efekt (H. Yang et al., 2018; T. Deng et al., 2020). Schopnost potencovat angiogenezi za účelem mechanismu vlastního přežití byla popsána u exozomů pocházejících z nádoru hlavy a krku (S. Sato et al., 2019). Rychlý růst a proliferace nádorových buněk neposkytuje dostatečný čas vybudovat a přizpůsobit spleť cévních kapilár novým podmínkám. Z toho důvodu se některé části nádorové masy mohou dostat mimo dosah dostatečné oxidační a nutritivní saturace. Plasticita tumoru sa projeví

částečnou adaptací na hypoxické podmínky. Buňky ze spinocelulárního karcinomu jícnu v hypoxickém prostředí uvolňují exozomy, které upravují fenotyp a transkriptom endotelových buněk s cílem facilitovat angiogenzi (Mao et al., 2019).

3.5.3 Endotelové buňky a extracelulární matrix

Vzájemná souhra všech buněčných a nebuněčných částí nádorového mikroprostředí je nezbytná pro vytvoření reaktivního stromatu. Nejen CAF, ale i ECM matrice reprezentuje dynamickou komunikační síť. Pomocí interakce molekul ECM s integrinovými receptory na povrchu endotelových buněk je zabezpečen přenos signálů. ECM už není definována jenom na základě mechanických vlastností jako fyzická bariéra, ale má výrazný pro-angiogenní efekt. Regulační aparát reakce mikrovaskulárních endotelových buněk s ECM angiogenními stimuly je pořád nedostatečně objasněn a popsán (Feng et al., 1999; Rhodes & Simons, 2007; Perzelova et al., 2014).

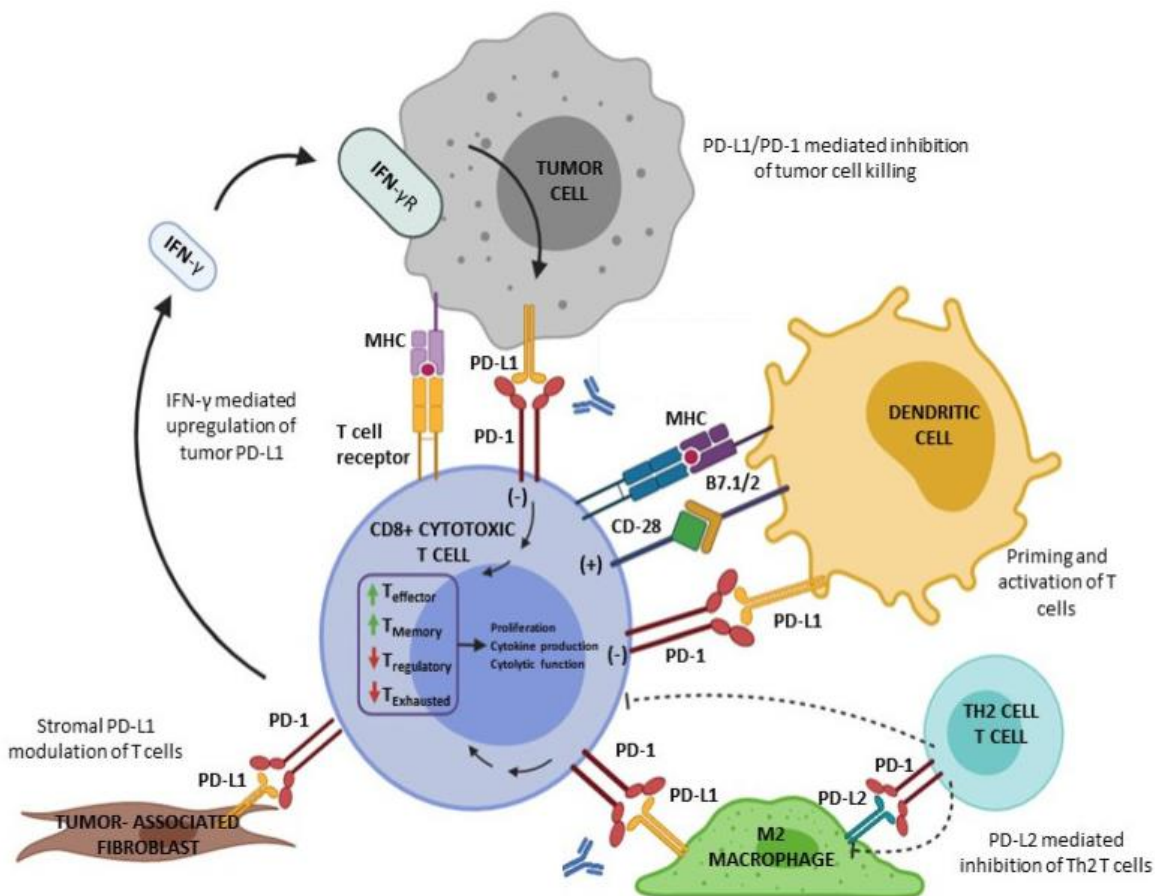
Endotelové buňky vystavené účinku TGF- β prodělávají endotel – mezenchymový přechod a mění se na buňky s fibroblastoidním charakterem. Buňky *de novo* exprimují znaky FSP1 a α -SMA příznačné pro CAF a je potlačena translace membránového proteinu CD31, který je kódovaný PECAM 1 genem a slouží k indentifikaci endotelových buněk (Pardali et al., 2017). Chemoterapeutická léčba nádorů prsu zvyšuje produkci tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF α – tumor necrosis factor α) endotelovými buňkami nádorového stromatu. Změna vyvolá přes NF- κ B vazbu na promotory genů CXCL-1/2 a zvětší jejich tvorbu nádorovými buňkami. Syntéza obou chemokinů působí jako chemoatraktant pro migrující buňky myeloidní řady (granulocyty, megakaryocyty, žírné buňky), které produkcí S100A8/9 proteinů zvyšují chemorezistenci a přežívání nádorových buněk karcinomu prsu (Acharyya et al., 2012). Vaskulární síť nádorového mikroprostředí aktivně napomáhá epitelovým maligním buňkám zdárně unikat cíleně zaměřené terapii a zvyšuje pravděpodobnost získat rezistenci.

3.6 Funkce imunitního systému

Imunitní systém zahrnuje soubor buněk, molekul a procesů, které chrání hostitele před cizími antigeny (v podobě bakterií a parazitů), viry, nádorovými buňkami a toxiny. Kromě fyzických a chemických bariér, které chrání před infekcí, lze imunitní systém zjednodušeně rozdělit na dvě „obrané linie“: vrozenou imunitu a adaptivní imunitu. Vrozená imunita

představuje první linii obrany proti patogenu. Jedná se o antigen-nezávislý (nespecifický) obranný mechanismus, který hostitel využije okamžitě nebo během několika hodin po setkání s cizorodým agens. Vrozená imunitní odpověď nemá žádnou imunologickou paměť. Nemá schopnost opětovně rozpoznat a zapamatovat si stejný patogen. Na druhé straně adaptivní imunita je antigen specifická s časovou prodlevou mezi expozicí antigenu a maximální reakcí. Adaptivní imunita má paměťovou schopnost, která hostiteli umožňuje rychlejší a účinnější imunitní odpověď po následné expozici antigenu. Vrozená a adaptivní imunita se vzájemně nevylučují, ale spíše se doplňují, přičemž defekty v obou systémech mají za následek zranitelnost hostitele nebo nepřiměřené reakce. K buňkám vrozené imunity patří NK buňky, žírné buňky, granulocyty, $\gamma\delta$ T buňky; a fagocytární skupina buněk makrofágů, neutrofilů a dendritických buněk. Adaptivní imunitu zabezpečují T a B lymfocyty (Bonilla & Oettgen, 2010; Turvey & Broide, 2010).

Chemické atrahování a infiltrace nádorového mikroprostředí imunitními buňkami přispívá k utváření reaktivního niche, moduluje imunitní odpověď organismu na přítomnost maligní tkáně, která uniká regulační a obranné mašinérii organismu. Nádorově asociované makrofágy, nádorově asociované neutrofile, myeloidní supresorové buňky, regulační B-lymfocyty, regulační T-lymfocyty, dendritické buňky, NK se se svou biologickou aktivitou výrazně podílejí na kompozici pro-nádorového stromatu (Jia et al., 2022; Y. Wu et al., 2022; Y. Yan et al., 2022). Pod selektivním tlakem adaptivní imunity nádorové buňky se slabou imunogenicitou v tumoru převládnu a úspěšně unikají imunitnímu systému hostitele (O'Donnell et al., 2019). Nedostatečná imunogenicita spolu s imunosupresivními faktory např. imunitními kontrolními body, přeprogramováním metabolitů a dysregulací repertoárů cytokinů, podpoří růst vybraných nádorových buněk v klinicky zjevné léze (Peng et al., 2022; Yi et al., 2022). Imunosupresivní působení nádorových buněk na cytotoxické T buňky je spojeno zejména se signalizací receptoru programované buněčné smrti 1 (PD-1 – programmed death receptor 1) po navázání ligandu PD-L1 na nádorových buňkách či TAM (Herbst et al., 2020). Podobný význam má i inhibice cytotoxických T-lymfocytů cestou CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4). (Obrázek 9).



Obrázek 9. Mechanismus účinku PD-1/L1 na protinádorovou imunitu (Nunez Abad et al., 2022).

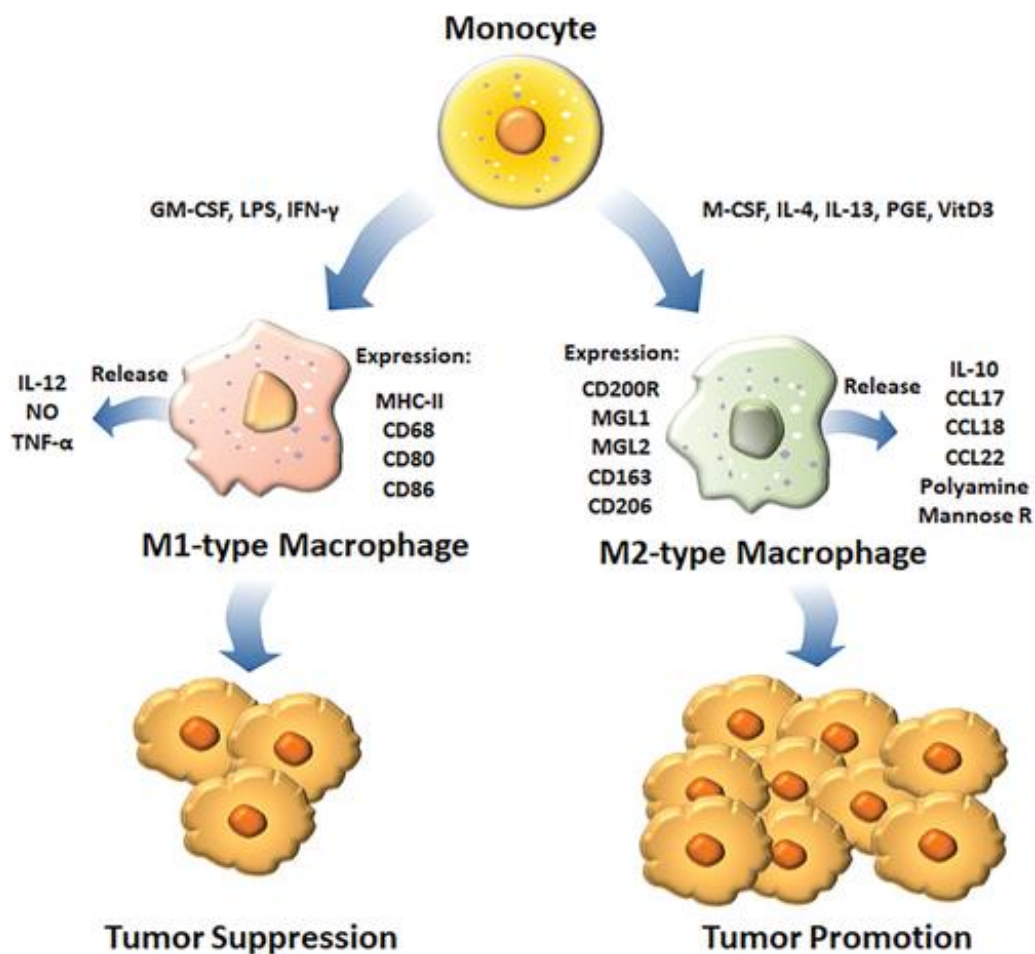
3.7 Nádorově asociované makrofágy

Makrofágy jsou součástí první linie obrany organismu. Během infekce, zánětu nebo poranění tkáně migrují na základě chemotatického podnětu do místa poškození. Pohlcují fagocytózou patogeny a buněčné zbytky a tráví je ve fagolyzozomech, které jsou výsledkem fúze fagozomů s lysozomy. Tato degradace přispívá nejen k odstranění patogenu, ale také usnadňuje prezentaci výsledných peptidů buňkám specifického imunitního systému, T a B lymfocytům prostřednictvím MHC II komplexu. Tím je zahájena antigenně specifická imunitní odpověď. Enzymy spojené s fagolyzozomy navíc usnadňují produkci velkého množství reaktivních forem kyslíku, které účinně zabíjejí fagocytované patogeny. V závislosti na stimulech prostředí a povaze patogenu/antigeny, se kterou přijde do kontaktu, může být preferována diferenciace na makrofágy M1 nebo M2. Převládající diferenciální profil určuje

funkční orientaci makrofágů (Lendeckel et al., 2022). Makrofágy k progresi růstu nádoru a metastázování přispívají různými mechanismy, včetně podpory přežití a proliferace maligních buněk, angiogeneze a potlačením vrozených a adaptivních imunitních odpovědí (Locati et al., 2020).

3.7.1 Diferencované M1/M2 makrofágy

M1 diferencované makrofágy jsou klasicky aktivované interferonem γ nebo lipopolysacharidem, produkují pro-zánětlivé cytokiny a iniciují imunitní reakci. Spouštěčem diferenciace M2 makrofágů je přítomnost interleukinů IL-4, IL-10, IL-13 (Espinosa Gonzalez et al., 2022). Podílejí se na organizování ECM a jsou asociovány v procesu hojení ran a reparace tkání. TAM mohou mít charakterové atributy jak M1, tak M2 makrofágů (Chavez-Galan et al., 2015). Zatímco M1 makrofágy spíše růst tumoru potlačují, M2 makrofágy jej stimulují (Obrázek 10).



Obrázek 10. Rozdíly mezi makrofágy typu M1 a M2 (Y. Cheng et al., 2021).

Funkční a fenotypová heterogenita TAM je podmíněná širokou škálou induktorů. TAM se mohou rekrutovat z monocytů, případně z residua lokálních makrofágů (Cassetta & Pollard, 2018; Guo et al., 2022). Maligní buňky v hypoxických podmínkách produkují semaphorin 3A, který působí formou chemoatraktantu na migrující TAM následně vyvolávající odolnost vůči imunitní reakci a proangiogenní povahu hypoxického prostředí (Casazza et al., 2013).

Přirozená činnost M1 makrofágů zpomaluje růst nádorů a potencuje efektivitu imunoterapie produkcí exozomů. Studie popsaly dvojí strategii eliminace maligních buněk M1 makrofágy. První možností je mechanismus sekrece několika cytotoxických agens (ROS, NO) přímo M1 makrofágy vedoucí k destrukci nádorových buněk. Ten má často delší časovou prodlevu, od 24h do 72h (Bernsmeier et al., 2020). Časový interval druhé reakce je kratší (několik hodin), ale vyžaduje přítomnost specifických protilátek secernovaných B-lymfocyty k navození cytotoxicity (Bruns et al., 2015). Subpopulace M2 makrofágů zesiluje invazivitu a migraci nádorových buněk, podporou tvorby nových cévních kapilár a způsobuje imunosupresi v odpovědi lymfocytů na vlastní změněnou tkáň obsahující nádorově specifické antigeny (Medrek et al., 2012). Výsledkem parakrinní metabolické agilnosti M2 pro-nádorových TAM v niche je přítomnost široké škály cytokinů včetně epidermálního růstového faktoru (EGF – epidermal growth factor), PDGF, TGF- β 1, receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR – epidermal growth factor receptor) a FGF (Yin et al., 2016). Léčba zaměřená na potlačení aktivity nádorově asociovaných makrofágů, redukuje pučení nových cév, inhibuje růst a migraci nádorových buněk a zvyšuje efektivitu aplikované terapie (DeNardo et al., 2011).

Jednou ze základních vlastností makrofágů je velká plasticita fenotypu v závislosti na nádorovém prostředí. Nabízí se alternativa nové terapie, ve formě reprogramovat TAM zpátky na anti-tumor makrofágy M1 se schopností suprimovat maligní tkáň. Endogenní lektin zvaný manózoový receptor CD206 přítomný na povrchu pro-nádorových M2 po navázání RP-182 prochází konformační změnou a přepne M2 fenotyp na anti-tumor M1 (Jaynes et al., 2020).

3.7.2 Vztah nádorově asociovaných fibroblastů a tumor asociovaných makrofágů

Vzájemná kooperace CAF a TAM v nádorovém mikroprostředí podléhá vlivu faktoru stimulující kolonie makrofágů 1 (CSF1 – macrophage colony stimulating factor 1) s CSF1R receptorem. Produkce CSF1 v kožních nádorech koreluje s přítomností zvýšeného počtu a délkou přežívání CSF1R/CD163 pozitivních makrofágů (Neubert et al., 2018). V rámci subpopulace TAM byly pomocí scRNA-seq popsány dvě heterogenní skupiny: a) prozánětlivé,

antinádorové C1QC (complement C1q C chain) pozitivní TAM b) proangiogenní, pronádorové SPP1 (secreted phosphoprotein 1) pozitivní TAM (L. Zhang et al., 2020). Autoři dokázali pomocí blokace CSF1R přednostně eliminovat C1QC pozitivní TAM na úkor zvýšeného podílu SPP1 pozitivních TAM. Změna poměru C1QC vs SPP1 pozitivních TAM ve prospěch SPP1 predikuje zhoršené přežívání pacientů. Kombinována blokační terapie CSF1R a PD-L1 měla ale překvapivou lepší odpověď v případě subkutánně aplikovaného hepatocelulárního karcinomu s vysokou expresí SPP1 (SPP1^{hi}) laboratorním myším (Zhu et al., 2019). Jedno z možných vysvětlení se nabízí v důsledku vyčerpání inhibitoru CSF1R relativně vyšším zastoupením imunosupresivních SPP1 pozitivních TAM, které vedlo k finální remodelaci a potlačení pronádorové funkce TME. Produkce CSF1 není výlučnou doménou CAF/TAM nádorového stromatu. Maligní buňky pocházející z agresivního PDAC pomocí sekrece CSF1 indukovaly v TAM tvorbu granulínu, který svým účinkem aktivoval fibroblasty a v konečné fázi i samotný růst nádoru (Quaranta et al., 2018).

Signální molekuly produkované CAF sloužící k rekrutaci myeloidních buněk do nádorového stromatu, nemusí mít povahu CC chemokinů (charakteristická přítomnost dvou sousedících disulfidických vazeb) popřípadě CXC chemokinů (charakteristická přítomnost jedné aminokyseliny oddělující N-terminální disulfidické vazby) chemokinů. Schopnost secernovat C3 složku komplementu prostřednictvím CD34 pozitivních CAF byla prokázána u melanomu a nádorů v oblasti hlavy a krku (Puram et al., 2017). Aktivovaná forma C3a komplementu C3, je příčinou afinity a migrace C3aR pozitivních volně cirkulujících monocytů do nádorového mikroprostředí. Analýza prokázala největší hustotu C3aR pozitivních makrofágů primárně v sousedství s CD34 pozitivními CAF. Blokace C3a nebo receptoru C3aR omezila infiltraci nádoru C3aR pozitivními makrofágy a suprimovala růst tumoru. Vzájemná kooperace TAM a CAF pomocí schématu C3a ligand – C3aR receptor se jeví konzistentní pro širokou škálu nádorů (Davidson et al., 2020). Komplexní pohled na vzájemnou komunikaci mezi CAF a TAM v reaktivním TME můžeme popsat působením CAF na vzdělávání TAM a jejich prekurzory. Obráceně TAM v pozici instruktorů aktivují reziduální fibroblasty. Protilátka zaměřená proti faktoru inhibujícímu makrofágy (MIF – macrophage migration inhibitory factor) byla testovaná na myším modelu osteosarkomu, kde její účinek bránil tvorbě cévních a lymfatických kapilár (Kubota et al., 2009). V případě nasazení protilátky proti MIF v podobě systémového léčiva může ale vyvstat několik vážných problémů. Většina inhibitorů zánětlivých odpovědí má rozsáhlý pleiotropní účinek schopný ovlivnit přestavbu tkáně, modulovat imunitní reakci a v neposlední řadě stimulovat růst nádoru. MIF, se zdá, má pozitivní i negativní dopad a další testování je nezbytné.

3.7.3 Tumor asociované makrofágy v melanomu

Vzájemná souhra biologické aktivity TME s maligními buňkami představuje jeden z rozhodujících prvků úspěšného nádorového růstu s možností zakládání sekundárních metastatických center. Vytvářejí se složitá schémata interakce buněčných populací a signálních molekul navzájem s cílem podpořit úspěšné přežívání tumoru. Nově rekrutované makrofágy účinkem buněk z melanomu produkují IL-1 β , který vyvolá u CAF syntézu IL-8. Následně, IL-8 přitahuje CXCR2 pozitivní imunitní buňky, hlavně neutrofilů do nádoru. CAF a makrofágy zpětně svou aktivitou vyvolají u melanomových buněk rezistenci na léčbu BRAF mutací a inhibici mitogenem aktivované proteinkinázy (MEK – mitogen-activated protein kinase). Medikace provedená blokací CXCR2 receptoru, případně genetickou ablaci IL-1R, má synergický efekt s aplikací MEK inhibitorů (Young et al., 2017). Přechod M1 makrofágů na TAM je možný a u melanomu je popsán následkem přítomnosti a stimulace makrofágů mezenchymovou složkou maligního stromatu (Yamada et al., 2016; Falleni et al., 2017).

Maligní melanom bývá velice často infiltrován velkým počtem zánětlivých buněk různorodé funkce. Prevalence dendritických buněk a lymfocytů z celé plejády imunitních buněk koreluje s lepší prognózou přežívání pacientů (Ladanyi, 2015). Na druhé straně, převaha imunosupresivních CD4 a CD25 pozitivních supresorových T-lymfocytů v nádoru je předpokladem slabé aktivity imunitního systému vůči neoplastické tkáni (Gray et al., 2017).

3.7.4 Součinnost imunitních buněk v nádoru

Diferencované dendritické buňky a nádorově asociované makrofágy suprimují imunologickou reakci T-lymfocytů na přítomnost rostoucího nádoru, remodelují ECM a podporují EMT nádorových buněk (J. Yu et al., 2013). Cytotoxické T-lymfocyty přítomné v nádorovém stromatu jsou konfrontovány s nadprodukcí ligandů, které navodí expresi inhibičních receptorů: CTLA-4 a PD-1 na povrchu CD8 pozitivních T buněk (Pardoll, 2012).

Neadekvátní odezvu T-lymfocytů na vyvíjející se nádor pankreatu řídí distribuce bioaktivních faktorů: granulocytární makrofágový kolonie stimulující faktor (GM-CSF – granulocyte–macrophage colony stimulating factor) a granulocytární kolonie stimulující faktor (G-CSF – granulocyte colony stimulating factor) produkované imunosupresivním milieum utvářeným myeloidní vývojovou řadou buněk (Arnoletti et al., 2022). Stěhování nezralých makrofágů, dendritických buněk a neutrofilů do okolí nádoru, které si sám řídí, neslouží jenom k modulaci adekvátní imunitní reakce T-lymfocytů, ale i k syntéze angiogenních proteinů TGF-

β a VEGFA (R. Chen et al., 2022). Výsledkem je, že imunokompetentní buňky myeloidní řady brzdí aktivaci, proliferaci a migraci efektorových T-lymfocytů a zvyšují imunitní nezávislost nádorových buněk (Komohara et al., 2015).

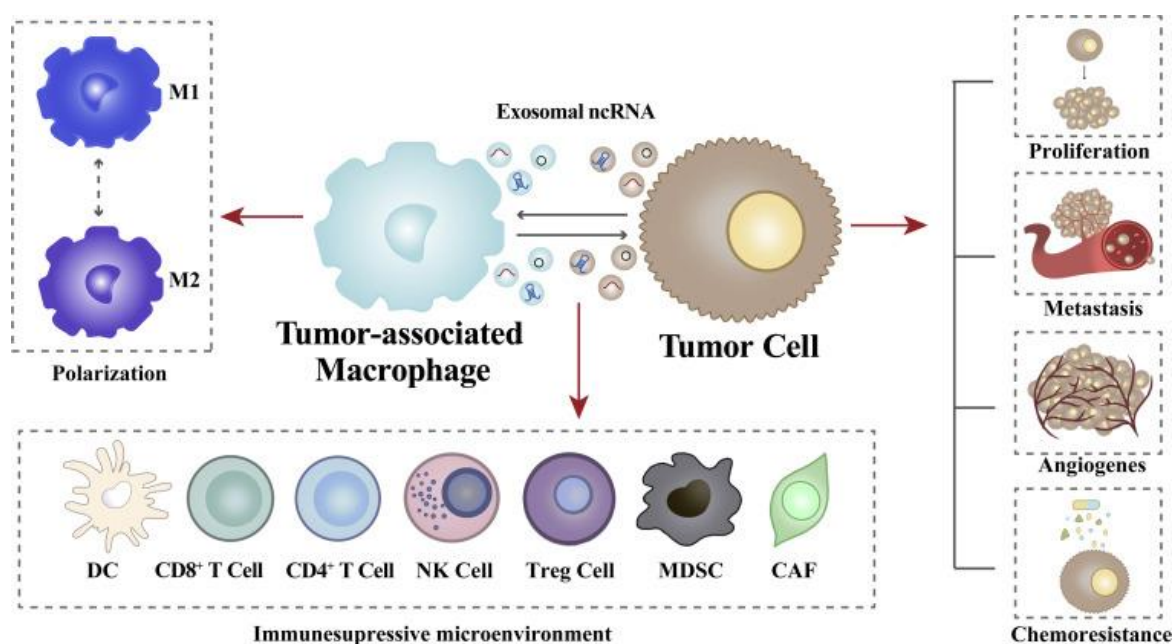
Neopomenutelná je i pro-tumorigenní aktivita B-lymfocytů, která udržuje stav chronické imunitní odpovědi. Diverzifikace činností buněk imunitního systému je podpořena přítomností zánětlivých žírných buněk s granulemi histaminu, které podporují tvorbu nových kapilár, a funkčně plastických nádorově asociovaných makrofágů. Ty přizpůsobí systém vrozené imunitní strategie potřebám nádorových buněk (Junttila & de Sauvage, 2013). Hlavní funkcí PD-1 receptoru je negativní regulace imunitní odpovědi. Signalizace přes PD-1 blokuje proliferaci a funkci efektorových T-lymfocytů (CD8 pozitivních) v důsledku navození apoptózy, a naopak brání apoptóze regulačním T-lymfocytům (skupina CD4 pozitivních) (Francisco et al., 2010).

3.7.5 Exozomy a tumor asociované makrofágy

Exozomy původem z nádoru prsu, glioblastomu a melanomu přenášejí na svém povrchu ligand PD-L1 a vazbou na PD-1 membránový receptor znemožňují aktivovat T-lymfocyty. Nádorové buňky jsou tak schopné systematicky suprimovat obranný mechanismus organismu. Naopak inhibice sekrece exozomů výrazně podpořila proti-nádorový účinek T-lymfocytů (G. Chen et al., 2018; Ricklefs et al., 2018; Y. Yang et al., 2018).

Cytokiny TNF α a IFN γ (interferon γ) jsou produkovány širokou škálou buněk a mají zásadní význam pro regulaci a iniciaci imunitních reakcí. Exozomy původem z tumoru pankreatu signifikantně snižují produkci TNF α a IFN γ vlastními NK buňkami a jsou příčinou neadekvátní cytotoxické odezvy organismu na agresivní nádor (J. Zhao et al., 2019) (Obrázek 11).

Gemcitabine je chemoterapeutikum, které se indikuje v široké škále nádorů včetně PDAC. Zvýšená biologická aktivita nádorově asociovaných makrofágů prostřednictvím nadprodukce deaminázy nukleosidu C zapříčiní rezistenci pankreatických nádorových buněk vůči tomuto cytostatiku (Weizman et al., 2014). *In vitro* a *in vivo* experimenty na myším modelu PDAC ukázaly sníženou citlivost na aplikovaný gemcitabine. Příčinou byl přenos miR-365 prostřednictvím exosomů z makrofágů do buněk PDAC a následná nedostatečná inhibice enzymů zapojených do syntézy DNA (Binenbaum et al., 2018).



Obrázek 11. Interakcí mezi nádorovými buňkami a TAM prostřednictvím exosomálních nekódujících RNA vzniká imunosupresivní mikroprostředí podporující nádorový růst (Xu et al., 2022).

3.7.6 Mezenchymové buňky a imunitní odezva

Nové léčebné postupy se snaží naučit buňky imunitního systému rozpoznat a selektivně napadat vlastní nádorovou tkáň nebo modifikovat metabolické dráhy maligních buněk. Naopak strategií nádoru a jeho mikroprostředí je hledat, jak se co nejefektivněji cílené terapii vyhnout. Nabízí se několik přístupů, jak pozastavit náchylnost mezenchymových stromálních buněk k potlačení imunitní reakce: a) aplikace léčiva, které inhibuje schopnost mezenchymových buněk, buď regulovat imunitní odpověď, nebo se účastní na podpoře růstu nádorových buněk; b) látka, která specificky nezvratně poškodí mezenchymové buňky přítomné v nádorovém mikroprostředí; c) medikament s dispozicí zvrátit a přepnout imunoregulační fenotyp nádorového stromatu na imunostimulační s tendencí atrahovat cytotoxické T-lymfocyty a NK buňky do neoplastické tkáně (N. Cheng et al., 2021; J. Wu & Cai, 2021).

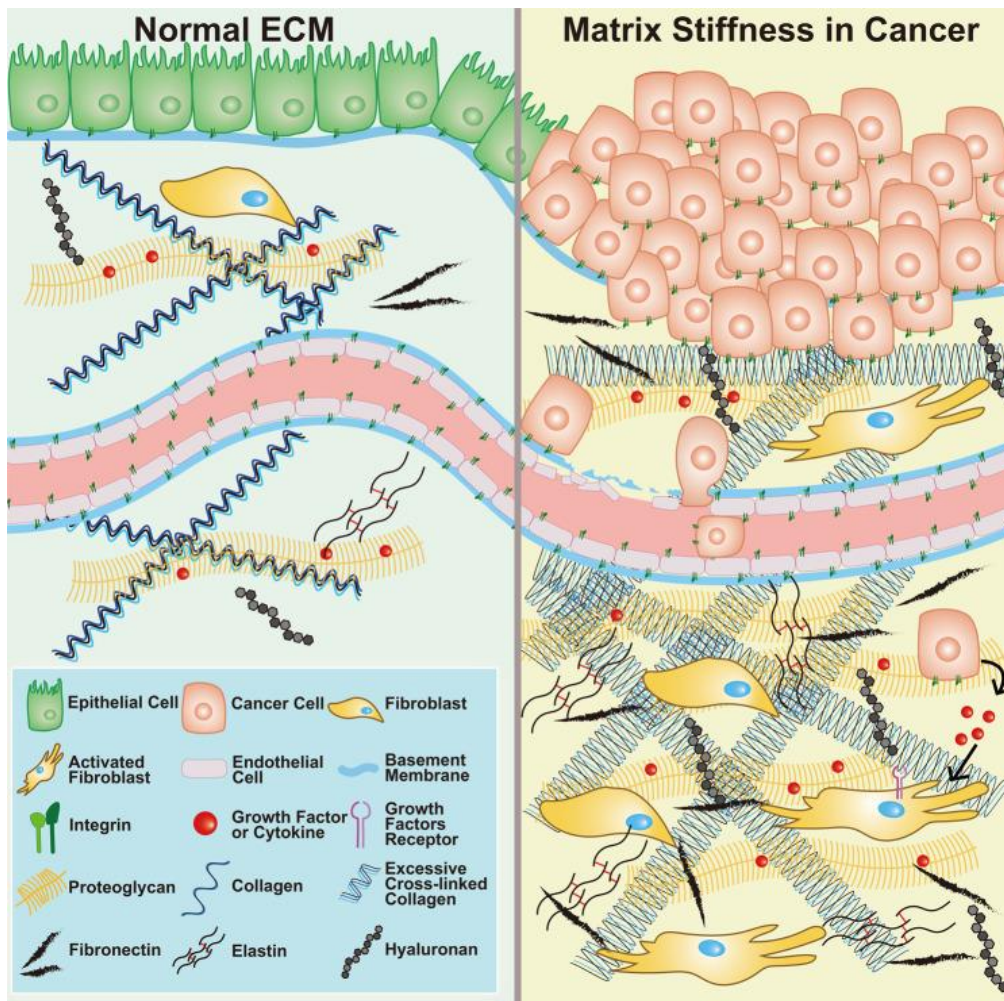
Některé studie prokázaly, že pro dosažení lepších výsledků aplikované terapie je účinné jemně přibrzdit imunitní reakci odpovědných buněk. Příkladem může být produkce IL-6 TAM podporující proliferaci CD44 pozitivních nádorových kmenových buněk u pacientů s hepatocelulárním karcinomem korelující s recidivou a následným přežíváním po nasazené medikaci (Wan et al., 2014). Blokace vazby IL-6 na receptor tocilizumabem, imunosupresivním

léčivem užívaným k léčbě revmatoidní artritidy, efektivně inhibuje množení nejvíc rezistentních CD44 pozitivních buněk řízenou parakrinní interakcí s nádorově asociovanými makrofágy (Ruffell & Coussens, 2015).

3.8 *Extracelulární matrix*

Nejběžnější definice extracelulární matrix vychází z jejich fyzikálních a chemických vlastností, kde v tkáních utváří nebuněčnou složku, čímž poskytuje mechanickou a biochemickou oporu pro buněčnou část. Prvotní názory popisovaly ECM jen jako neaktivní nebuněčný element tkání, který slouží pouze k uchycení a tvorbě typické 3D tkáňové organizace (Cheung et al., 2022). Opak je však pravdou.

ECM představuje fyziologicky velice aktivní komponentu esenciální pro mezibuněčnou interakci, adhezi a místo pro další dělení buněk. ECM se skládá ze složité sítě vzájemně propojených molekul vody, minerálů, proteoglykanů a fibrilárních proteinů syntetizovaných lokálními buňkami. Složitá struktura makromolekul ECM poskytuje dostatečný počet vazebných míst k „uskladnění“ signálních proteinů určených pro cílové buňky. Přenáší mechanickou informaci do buněk, ve kterých aktivuje intracelulární signální dráhy spojené s uspořádáním cytoskeletální buněčné kostry (Uhler & Shivashankar, 2017). Organizace a podíl jednotek ECM je tkáňově specifický, aby co nejvíce zohledňoval jedinečnou strukturu, uspořádání a funkci buněčné a nebuněčné části mikroprostředí jako celku (Frantz et al., 2010; Bonnans et al., 2014). Tkáňově originální kompozice buňka – ECM je výsledkem dynamických biochemických a biofyzikálních procesů v průběhu vzniku a následného formování orgánů (Kai et al., 2016). Lokální buňky svojí biologickou aktivitou secernují elementy ECM v závislosti na tkáňové specializaci. Produkce a formování fibrilárních proteinů včetně kolagenu, elastinu a lamininu podléhá kontrole v závislosti na fázi embryonálního vývoje nebo stavu onemocnění. Homeostáza mezi novotvorbou a degradací ECM je řízená aktivitou buněk za účelem zachování všech nezbytných vlastností orgánů (P. Lu et al., 2011; Jablonska-Trypuc et al., 2016). ECM představuje velice dynamický komplex, kde dochází k neustálé remodelaci, degradaci a modifikaci vláken pomocí enzymů proteináz štěpících proteiny, a nepřetržité tvorbě nových fibril (Obrázek 12).



Obrázek 12. Schematické znázornění komponent ECM v normální tkáni (vlevo) a TME (vpravo) (Huang et al., 2021).

3.8.1 Kolagen

Mezi hlavní složky ECM patří kolagen, laminin, fibronectin a proteoglykany, které podmiňují vznik variabilních struktur se specifickými vlastnosti z nich vytvořených. Nejvíce zastoupeným ECM proteinem v lidské tkáni je kolagen se svými 28 různými subtypy (Ricard-Blum, 2011).

Struktura jednotlivých typů kolagenu se od sebe liší na základě uspořádání aminokyselin v polypeptidovém řetězci, ale ve finále všechny formují pravotočivý triple helix řetězec s homotrimerními nebo heterotrimerními vlákny. Rodina kolagenů obsahuje v řetězci Gly-X-Y motiv, přičemž X a Y jsou zastoupeny aminokyselinami prolinu a hydroxyprolinu (Shoulders & Raines, 2009). Každé kolagenní vlákno je zkonstruováno polymerizací několika kolagenních

podjednotek v závislosti na tkáni. Nejběžnějším typem kolagenních fibril je kolagen I. Ten je přítomen v pojivových tkáních, kůži, rohovce a hojící se ráně (Muiznieks & Keeley, 2013).

Kolagenní vlákna jsou odpovědná za vytváření supramolekulárních struktur s dalšími jednotkami ECM. Podmiňují fyzikální a chemické vlastnosti ECM, protože obsahují vazebná místa pro růstové a regulační faktory a slouží k interakci mezi buňkou a ECM. Buňky se vážou na proteinová vlákna ECM pomocí schématu ECM – membránový receptor integrin – cytoskelet. Nárůst hustoty kolagenu v mikroprostředí způsobí vzestup exprese integrinu na plazmatické membráně buněk, umožní vytvoření vazby kolagen – integrin a ve finále napomáhá rozvoji nádoru (Levental et al., 2009).

Molekula kolagenu představuje velice složitý komplex vzájemně interagujících podjednotek. Jejich konečná organizace je pod dohledem enzymu protein-lysin-6 oxidázy (LOX). V rámci klinických studií byla potvrzena korelace mezi nárůstem aktivity LOX enzymu se zmožením vaziva a zvýšeným rizikem metastazování nádoru (Erler et al., 2006). V oblasti invazivních okrajů nádoru má LOX enzym nezastupitelné místo, kde svojí aktivitou indukuje polymerizaci aktinových vláken v cytoplazmě nádorových buněk. Aktinová makromolekulová vlákna umožňují kontrakci a následnou migraci buněk, která navíc označí cestu pro další nádorové buňky schopné přesídlení na nové vhodné místo (M. Fang et al., 2014). Pomocí imunohistochemických metod se podařilo u karcinomu prsu popsat organizaci kolagenových fibril společně s lokálním nádorovým epitelem v procesu migrace. Podél lineárně orientovaných kolagenních fibril v místě invazivního okraje nádoru jsou orientovány nádorové buňky připravené migrovat. Trend směřování kolagenových vláken určuje proud migrace proliferujících buněk z primárního nádoru a může plnit funkci „vzletové“ dráhy neoplastické invaze (Conklin et al., 2011; Han et al., 2016).

3.8.2 Proteoglykany

Proteiny s kovalentně vázanými polysacharidy obsahující derivát kyseliny uronové a hexózu, glykosaminoglykany, představují další stavební kámen ECM ve formě proteoglykanů. Kyselina hyaluronová, heparansulfát, dermatansulfát, keratansulfát dodávají negativní náboj molekule proteoglykanu, která je schopná zachytávat vodu a kationty v ECM s výslednou lubrikační a hydratační schopností (Iozzo & Schaefer, 2015).

Proteoglykany se mohou vázat se širokým spektrem molekul včetně růstových faktorů a receptorů, kolagenových vláken a dalších ECM proteinů. Strukturní variabilita proteoglykanů podmiňuje jejich funkčnost v ECM, bez které by došlo ke kolapsu uspořádaní nebuněčné části

mikroprostředí. Vysoká koncentrace kyseliny hyaluronové v ECM je známkou špatné prognózy u pacientů s nádorem prostaty a prsu. Utváří substrát, který se podílí na iniciaci EMT a umožní nádorovým buňkám migrovat včetně intravazace do cévního a lymfatického systému (Camenisch et al., 2000; Josefsson et al., 2011; Riching et al., 2014). Některé studie popisují duální funkci kyseliny hyaluronové v TME, kde inhibice degradace kyseliny je spojená s nižší migrací a proliferací buněk (M. Liu et al., 2019).

3.8.3 Fibronektin

Přítomnost široké škály jedinečných domén v molekule glykoproteinu fibronektinu zabezpečuje vzájemnou interakci s dílčími složkami ECM a vazbu s povrchovými receptory buněk. Fibronektin je kódován pouze jedním genem, ale posttranskripčním sestřihem mRNA vzniká výsledný peptidový řetězec ve 20 isoformách. Vytváří hustou síť podobnou kolagenové (Singh et al., 2010). Fibroblasty produkují fibronektin do extracelulárního prostoru ve formě dvou jednotek heterodimeru spojených vzájemně prostřednictvím aminokyseliny cysteinu disulfidickou vazbou (Schwarzbauer, 1991). Velká vazebná variabilita fibronektinu určuje rozpětí jeho funkcí v procesu adheze buněk, hojení ran, opsonizace anebo slouží jako rezervoár signálních molekul (Assuncao et al., 2021; Rohringer et al., 2022).

Na nádorové progresi se fibronektin aktivně podílí několika klíčovými událostmi. Mimo aktivní remodelaci proteinových fibril vyvolává biofyzikální a biochemické impulzy ovlivňující migraci a adhezi nádorových buněk (Geiger & Yamada, 2011). Dělicí se nádorové buňky iniciují výrazné změny architektiky ECM v souladu s potřebami rostoucího tumoru. Neustálá interakce mezi ECM a nádorovými buňkami dokáže velice jemně vyladit zvýšenou potřebu produkce a extracelulární sekrece fibronektinu, kolagenu I, III a IV (Malik et al., 2015). Zvýšení hustoty a síťování fibrilárních proteinů ECM navzájem amplifikuje množství vazebných míst pro růstové faktory rušící mezibuněčnou adhezi, polaritu, a tím podporují šíření nádoru (Paszek et al., 2005).

3.8.4 Bazální lamina

Zvláštní formou ECM je bazální lamina, která představuje přirozenou bariéru mezi epitelem a mezenchymem. Strukturní složení bazální laminy se na různých místech těla liší, ale hlavní stavební komponenty zůstávají stejné: kolagen IV. typu, laminin, perlekan a entaktin. Jednou ze základních vlastností maligních buněk je schopnost proniknout skrz bazální laminu a dostat se mimo těsné intercelulární spojení typické pro epitelovou tkáň. Za tímto účelem se

vyvinulo několik metod infiltrace nádorových buněk napříč bazální laminou. Dělicí se neoplastické buňky zvětšují svůj objem a jsou prostorově omezovány bazální laminou k dalšímu růstu. Rostoucí populace nádorových buněk výrazně zvyšuje mechanické namáhání laminy, které vede až k jejímu prasknutí a uvolnění buněk do stromatu (Hiramatsu et al., 2013). Na tomto jevu se podílí i degradace bazální laminy enzymy produkovanými nádorovými buňkami (Ala-aho et al., 2004). Dalším způsobem překonání překážky v podobě bazální laminy je utváření tzv. invapodií. Nádorové buňky se přichytí o bazální laminu a vytvoří raménko invapodium na svém invazivním pólu bohaté na F-aktin, čímž rozruší celistvost struktury laminy. Rozšíření místa porušené laminy slouží dalším buňkám k úniku do mikroprostředí směrem k cévnímu řečišti (Schoumacher et al., 2010).

3.8.5 Matrixové metaloproteinázy a hypoxie

Matrixové metaloproteinázy jsou endopeptidázy vyžadující pro svou aktivitu přítomnost atomu zinku. Z buněk jsou secernovány v podobě neaktivních prekurzorů. Po aktivaci, například plazminem, se podílejí na štěpení proteinů kolagenu, lamininu a následné remodelaci vláken ECM. Účinkem MMP se demaskují vazebná místa v ECM zprostředkující proliferaci pomocí interakce se skupinou membránových integrinových receptorů na povrchu buněk. Přestavba ECM pomocí MMP2 mobilizuje sekreci TGF- β , které svým účinkem modifikuje imunitní reakci a buněčnou invazi spojenou s proliferací (Imai et al., 1997). V neposlední řadě MMP podněcují uvolňování růstových faktorů podporujících angiogenezi. Potřeby rychle rostoucího nádorového parenchymu nestačí uspokojit dezorganizovaná síť cévních kapilár. Uvnitř nádoru se z toho důvodu objevují hypoxická místa s nízkou saturací kyslíkem. Hypoxie napomáhá udržovat nádorové buňky ve stavu nízké diferenciaci, který napomáhá flexibilně reagovat novotvaru na další situace spojené například s neadekvátní odpovědí na podávanou terapii. Nádorová hypoxie je potom špatným prognostickým znakem pro vývoj onemocnění. Novým okolnostem spojeným s nedostatečným přísunem kyslíku se nádorové buňky přizpůsobí mobilizací alternativních signálních drah. HIFs jsou odpovědné za intracelulární reakci neoplastických buněk na hypoxické podmínky a současně podněcují angiogenezi. Činnost heterodimerního transkripčního faktoru HIF-1 je spojená se zvýšením koncentrace MMP a produkcí kolagenových vláken (Spill et al., 2016). Ztráta apiko – bazální orientace, narušení vzájemného kontaktu epitelových buněk zprostředkovaného membránovými proteiny kadheriny, ukazují na EMT a invazivní chování nádorových buněk. Tento jev může být spuštěn spoluúčastí HIF-1 proteinu (Kumar & Gabilovich, 2014). Hypoxie

indukuje tvorbu MMP2 a MMP9 na podporu migrace a metastazování maligních buněk (Sun et al., 2020). Léčba, zaměřená specificky na potlačení účinku MMP, vykazuje slabé klinické výsledky. Vhodní pacienti vybraní ke klinické studii inhibice MMP se většinou nacházejí v konečných stádiích nádorového onemocnění (Fingleton, 2008). Působení MMP je nejvýraznější na začátku tvorby nádoru a léčba pomocí MMP inhibitorů by mohla být efektivnější právě ve zpomalení zakládání nového ložiska.

4 Materiál a metody

Materiál a metody jsou detailně popsány v příložených publikacích.

5 Výsledky

Výsledky cílů habilitační práce formulovaných na začátku jsou shrnuty v těchto publikacích:

Cíl 1:

1. Dvořánková, B., Smetana, K. Jr., Říhová, B., Kučera, J., Mateu, R., Szabo, P.: Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice. *Histochem Cell Biol.* 143(5):463-9 doi:10.1007/s00418-014-1293-z (2015) IF 3.054 Q2

2. Novák, Š., Kolář, M., Szabó, A., Vernerová, Z., Lacina, L., Strnad, H., Šáchová, J., Hradilová, M., Havránek, J., Španko, M., Čoma, M., Urban, L., Kaňuchová, M., Melegová, N., Gürlich, R., Dvořák, J., Smetana, K. Jr., Gál, P., Szabo, P.: Desmoplastic Crosstalk in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Is Reflected by Different Responses of Panc-1, MIA PaCa-2, PaTu-8902, and CAPAN-2 Cell Lines to Cancer-associated/Normal Fibroblasts. *Cancer Genomics & Proteomics.* May-Jun 2021;18(3):221-243 doi:10.21873/cgp.20254 (2021) IF: 4.069 Q3

Cíl 2:

3. Urban, L., Novák, Š., Čoma, M., Dvořánková, B., Lacina, L., Šáchová, J., Hradilová, M., Svatoňová, P., Kolář, M., Strnad, H., Březinová, J., Smetana, K. Jr., Gál, P., Szabo, P.: Unravelling heterogeneous effects of cancer-associated fibroblasts on poor prognosis markers in breast cancer EM-G3 cell line: In vitro-targeted treatment (anti-IL-6, anti-VEGF-A, anti-MFGE8) based on transcriptomic profiling. *Onco Reports.* 51(1) doi:10.3892/or.2023.8662 (2024) IF 4.2 Q2

4. Mandys, V., Popov, A., Gürlich, R., Havránek, J., Pfeiferová, L., Kolář, M., Vránová, J., Smetana, K., Jr., Lacina, L., Szabo, P.: Expression of Selected miRNAs in Normal and Cancer-Associated Fibroblasts and in BxPc3 and MIA PaCa-2 Cell Lines of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci.* 24(4):3617. doi:10.3390/ijms24043617 (2023) IF: 5.6 Q1

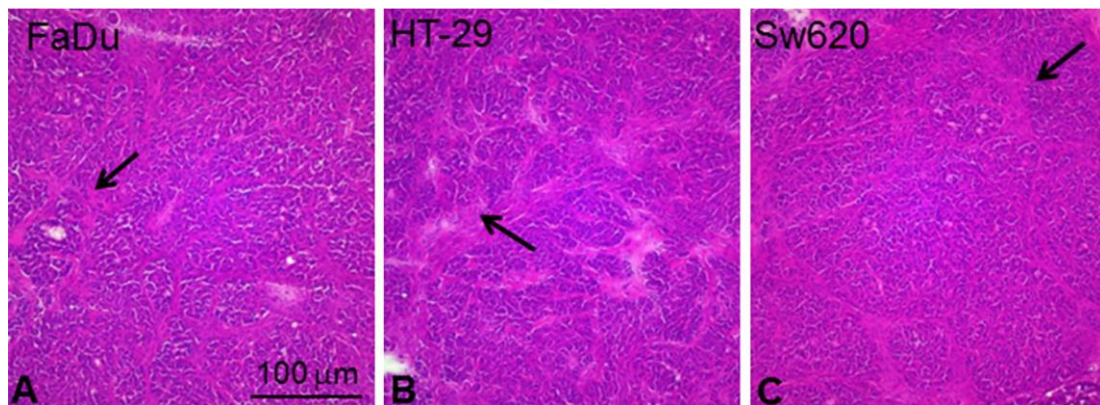
5. Urban, L., Čoma, M., Lacina, L., Szabo, P., Sabová, J., Urban, T., Šuca, H., Lukačín, Š., Zajíček, R., Smetana, K. Jr., Gál, P.: Heterogeneous response to TGF- β 1/3 isoforms in fibroblasts of different origins: implications for wound healing and tumorigenesis. *Histochem Cell Biol.* doi:10.1007/s00418-023-02221-5 (2023) IF 2.3 Q2

Popis výsledků

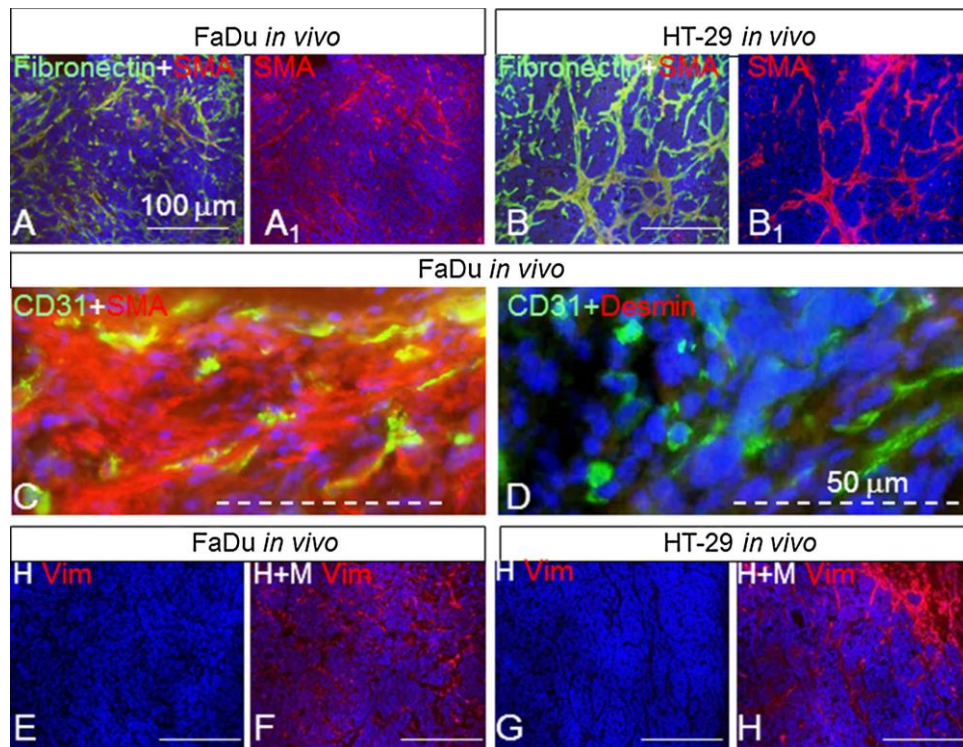
Dvořánková, B., Smetana, K. Jr., Říhová, B., Kučera, J., Mateu, R., Szabo, P.: Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice. *Histochem Cell Biol.* doi: 10.1007/s00418-014-1293-z 143(5):463-9 (2015)

Tumor představuje komplexní organizovanou tkáň složenou z nádorových buněk a populace stromálních buněk včetně fibroblastů, imunitních buněk, lymfatických a cévních kapilár a molekul ECM (Egeblad et al., 2010). CAF v nádorovém mikroprostředí dle cytologické klasifikace můžeme řadit mezi myofibroblasty s častou expresí α -SMA (Smetana et al., 2013). CAF představují heterogenní skupinu buněk, které mají zásadní postavení při formování reaktivního stromatu. Potenciální zdroj CAF může být nejenom aktivovaný lokální mezenchym, ale i mezenchymové kmenové buňky v kostní dřeni, tuková tkáň a endotelové buňky. Akumulace mutací a ztráta heterozygosity v buňkách nabízí domněnku původu CAF přímo z buněk tumoru procesem EMT. Využili jsme model xenoštěpu lidských nádorových buněk do myšího příjemce. Experiment byl prováděn na 8 týdnů starých imunodeficientních athymických nu/nu CD1 myších samičího pohlaví. Štěp lidských buněčných linií FaDu (dlaždicobuněčný karcinom hypopharynxu), Sw620 (kolorektální adenokarcinom) a HT-29 (kolorektální adenokarcinom) byl aplikován subkutánně a po vytvoření nádoru v 5 časových intervalech byly myši usmrceny a tumory byly dál analyzovány (Obrázek 13). Imunohistochemické barvení prokázalo přítomnost bohaté sítě fibronektinových vláken, vysoké zastoupení SMA pozitivních CAF, výskyt CD31 pozitivních kapilár ve stromální tkáni

obklopené SMA pozitivními myofibroblasty bez přítomnosti desmin-pozitivních svalových buněk. Specifická primární protilátka proti lidskému vimentinu neodhalila pozitivní buňky v tumorech a okolní pojivové tkáni původem z FaDu a HT-29 linií na rozdíl od protilátky proti lidskému a myším vimentinu (Obrázek 14). Tvarově atypické malé buňky z transplantátu Sw620 linie v cytoplasmě obsahovaly filamenta detekované protilátkou proti lidskému vimentinu. Z tumorů FaDu a HT-29 izolované v podmínkách *in vitro* buňky morfologii připomínající fibroblasty neměly cytoskeletární vlákna rozpoznané protilátkou proti lidskému vimentinu. Pozitivita se potvrdila až po aplikaci protilátky lidský/myší vimentin. Studie prokázala, že subkutánně aplikované lidské nádorové buňky nejsou zdrojem CAF a stroma tumoru má původ v mezenchymových buňkách hostitele. Lidské maligní buňky mají schopnost stimulovat tvorbu funkčně relevantního stromatu z lokálních myších buněk. Desmoplastické nádorové stroma je paralelou k fibrotické tkáni, ve které v procesu fibrózy, důsledkem EMT, vznikají myofibroblasty velice podobné CAF. V úvahu se musí brát použití imunodeficientního zvířecího modelu, který může zapříčinit absenci CAF transformovaných procesem EMT z maligních buněk.



Obrázek 13. Lidské nádorové buňky aplikované do podkoží imunokomprimované myši vytvářejí bohaté stroma (šipka). Hematoxylin a eosin.

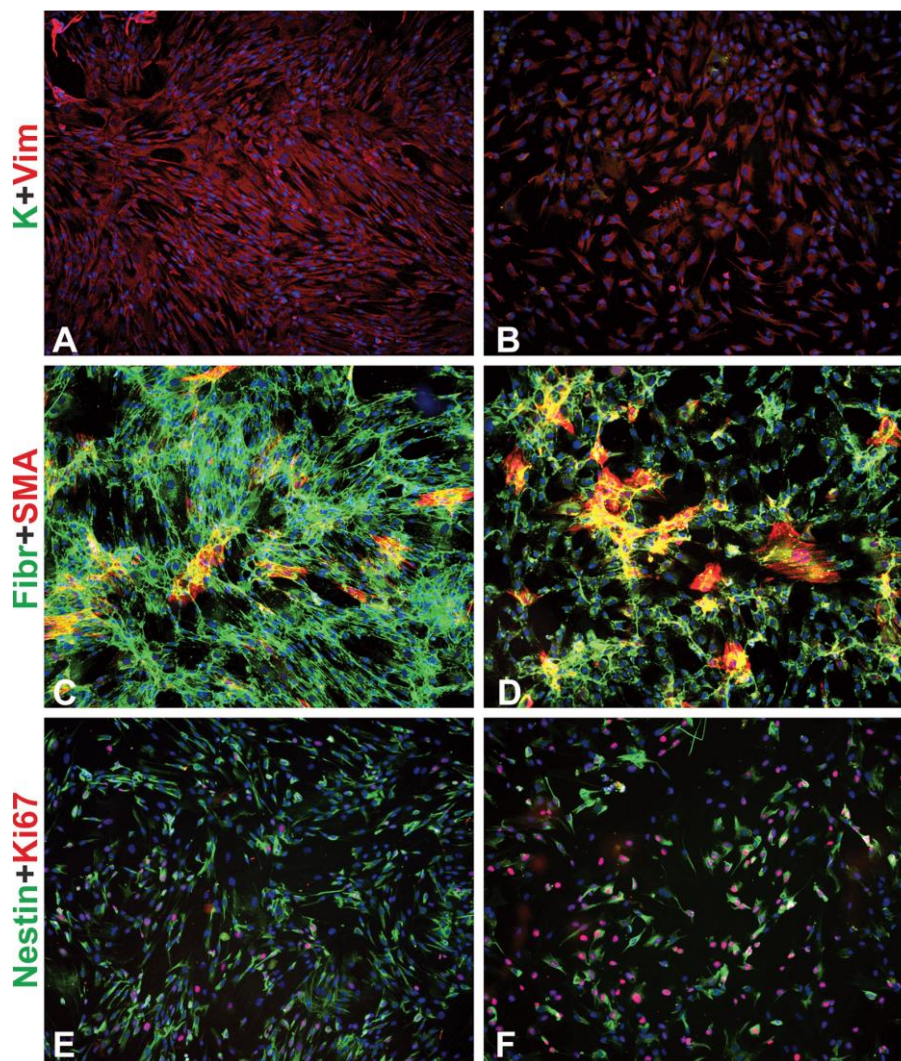


Obrázek 14. Imunoflourescenční detekce stromatu v nádoru vzniklém aplikací lidských buněk FaDu a HT-29 myšiu příjemci. Silná pozitivita pro fibronektin, α -SMA, CD-31 je patrná. Nebyly pozorovány žádné desmin pozitivní buňky. Stromální fibroblasty v tumorech FaDu a HT-29 exprimovaly lidský/myší vimentin. Specifický průkaz lidského vimentinu byl negativní.

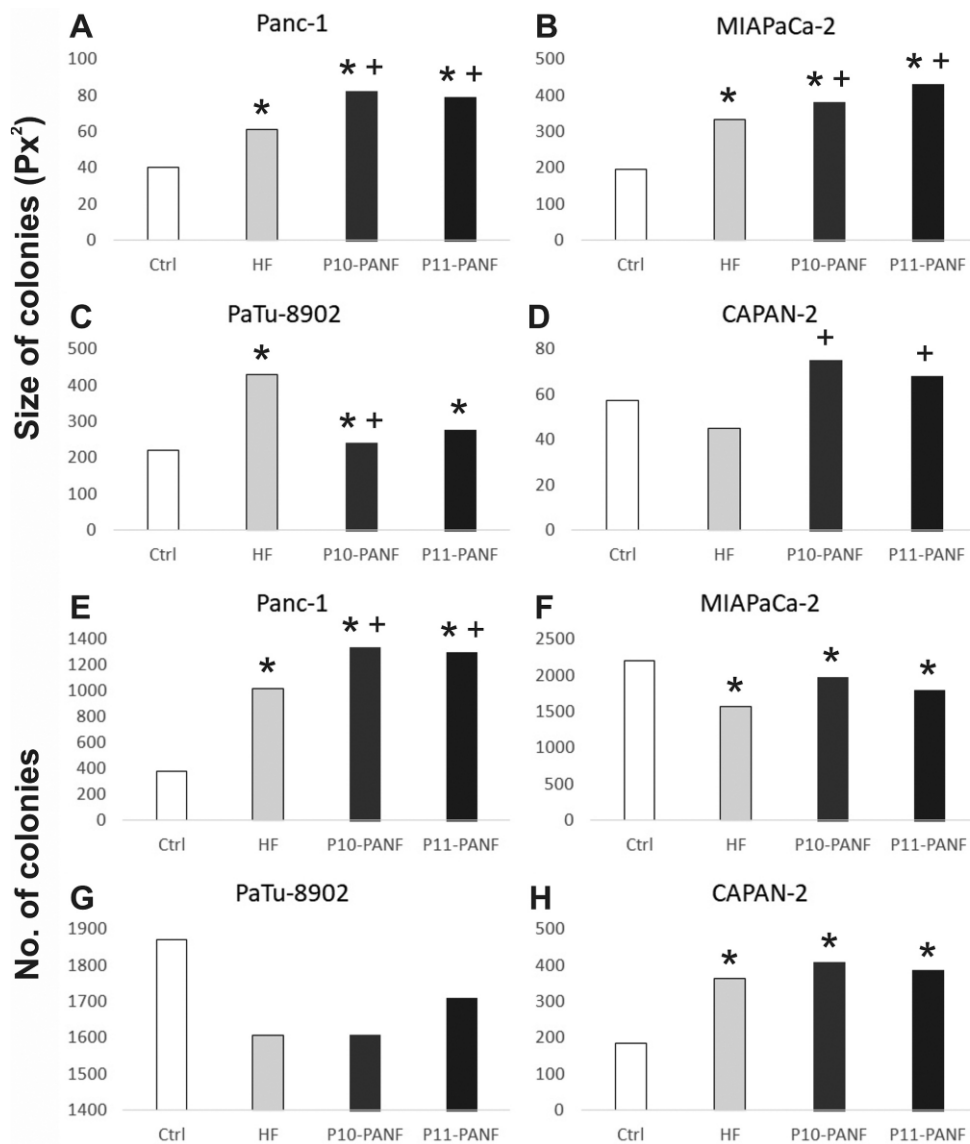
Novák, Š., Kolář, M., Szabó, A., Vernerová, Z., Lacina, L., Strnad, H., Šáchová, J., Hradilová, M., Havránek, J., Španko, M., Čoma, M., Urban, L., Kaňuchová, M., Melegová, N., Gürlich, R., Dvořák, J., Smetana, K, Jr., Gál, P., Szabo, P.: Desmoplastic Crosstalk in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Is Reflected by Different Responses of Panc-1, MIA PaCa-2, PaTu-8902, and CAPAN-2 Cell Lines to Cancer-associated/Normal Fibroblasts. *Cancer Genomics & Proteomics*. May-Jun 2021;18(3):221-243 doi: 10.21873/cgp.20254 (2021)

PDAC reprezentuje jeden z nejagresivnějších maligních onemocnění. Mortalita vzhledem k incidenci výskytu, navzdory intenzivnímu výzkumu, nezaznamenala za poslední dekády skoro žádný pokles. Pětileté přežití zůstává kolem 5 % a počet nově diagnostikovaných případů se má do roku 2030 zdvojnásobit (Foucher et al., 2018). Absence účinných neinvazivních screeningových markerů, pozdní diagnóza a vysoká rezistence PDAC přispívá k vysoké letalitě. Porozumět interakci mezi maligními buňkami a stromatem, tvořeným hlavně CAF, je klíčové v unikátním desmoplastickém modelu PDAC, který je tvořen pouze z 10 %

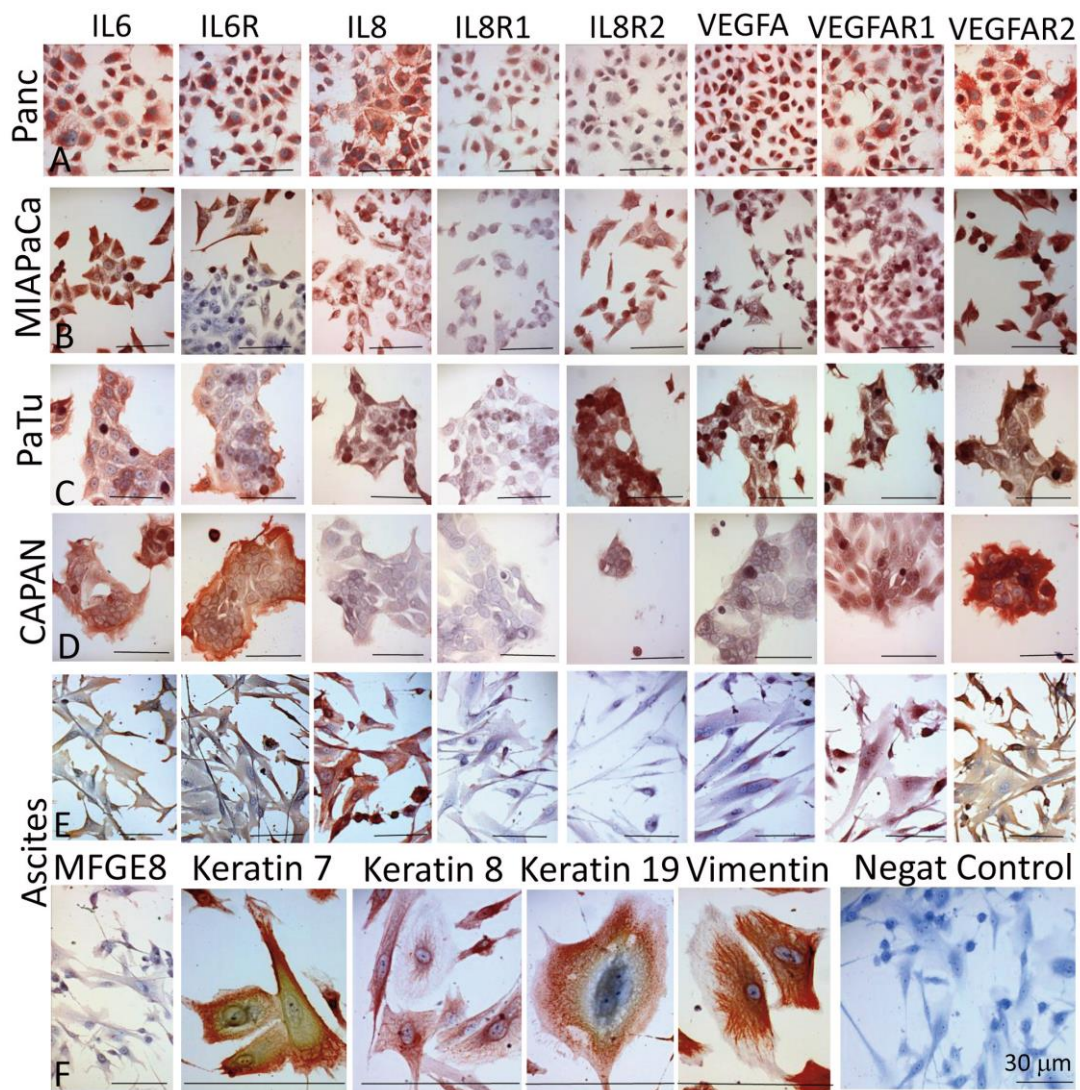
nádorovou tkání. Podařilo se nám izolovat a charakterizovat primokulturu CAF z tkáně tumoru a následně porovnat reciproční komunikaci se čtyřmi komerčními buněčnými nádorovými liniemi z PDAC (Panc-1, CAPAN-2, MIA PaCa-2 a PaTu8902) v podmínkách *in vitro* (Obrázek 15). Kondiciované médium z CAF ve většině případů zvýšilo počet a velikost kolonií formovaných PDAC buněčnými liniemi (Obrázek 16). Vliv obohaceného média z CAF na faktory spojené s EMT (Slug, Snail, E/N cadherin) se prokázal jenom u Panc-1 a MIA PaCa-2, zatímco PaTu-8902 a CAPAN-2 byl negativní. Heterogenní reakce buněčných linií na kondiciované médium z CAF může odrážet různou citlivost už zavedených, liniově specifických PDAC buněk na solubilní faktory a je v souladu s dříve publikovanými experimentálními a klinickými studii. Cirkulující hladina IL-6 významně vzroste u pacientů se špatnou prognózou PDAC (Kim et al., 2017). Pro-zánětlivý a pro-migrativní efekt IL-6 a IL-8 a jejich receptorů byl imunohistochemicky prověřován na nádorových řezech, PDAC buněčných linií a primární kultuře odvozené z ascitické tekutiny pacientů trpících PDAC. Potvrdila se silná pozitivita pro IL-6 a IL-6R v maligní tkáni a buňkách z ascitické tekutiny v kontrastu s absencí exprese IL-8 a IL-8R1/R2 na histologických řezech primárního tumoru (Obrázek 17-18). Naměřené hodnoty provedené *in vitro* funkční ko-kultivací naznačují vzájemné zapojení CAF a nádorových buněk PDAC do regulace produkce IL-6. Kondiciovaná média z fibroblastů nemají vliv na tvorbu IL-8 nádorovými buňkami. Genomický přístup a srovnávací molekulární analýza vzorků CAF a zdravých kožních fibroblastů prokázala dysregulaci v několika KEGG drahách zapojených do TGF- β kaskády, fokální adheze a ECM-receptor signalizace. Detekce hladiny mRNA pro keratiny-8 a -18 se proteinově nepotvrdila. Vysvětlení nabízí představu, že fibroblasty se v patologických stavech spíše rekrutují z lokálního mezenchymu, případně z mezenchymových kmenových buněk než procesem EMT z nádorových buněk. Kriticky odlišně exprimované geny na mRNA úrovni odhalené molekulárním rozborem IL-6, IL-8, MFGE8 (Milk fat globule-EGF factor 8 protein), VEGFA a periostin jsou schopné přispět k agresivnímu chování tumoru (Obrázek 19). Studie prokázala vyšší stabilitu CAF ve srovnání s nádorovými buňkami. Možná účinná kombinace protinádorových léků a cílená terapie zaměřena na nádorové stroma se u pacientů s tímto onemocněním jeví jako nadějná.



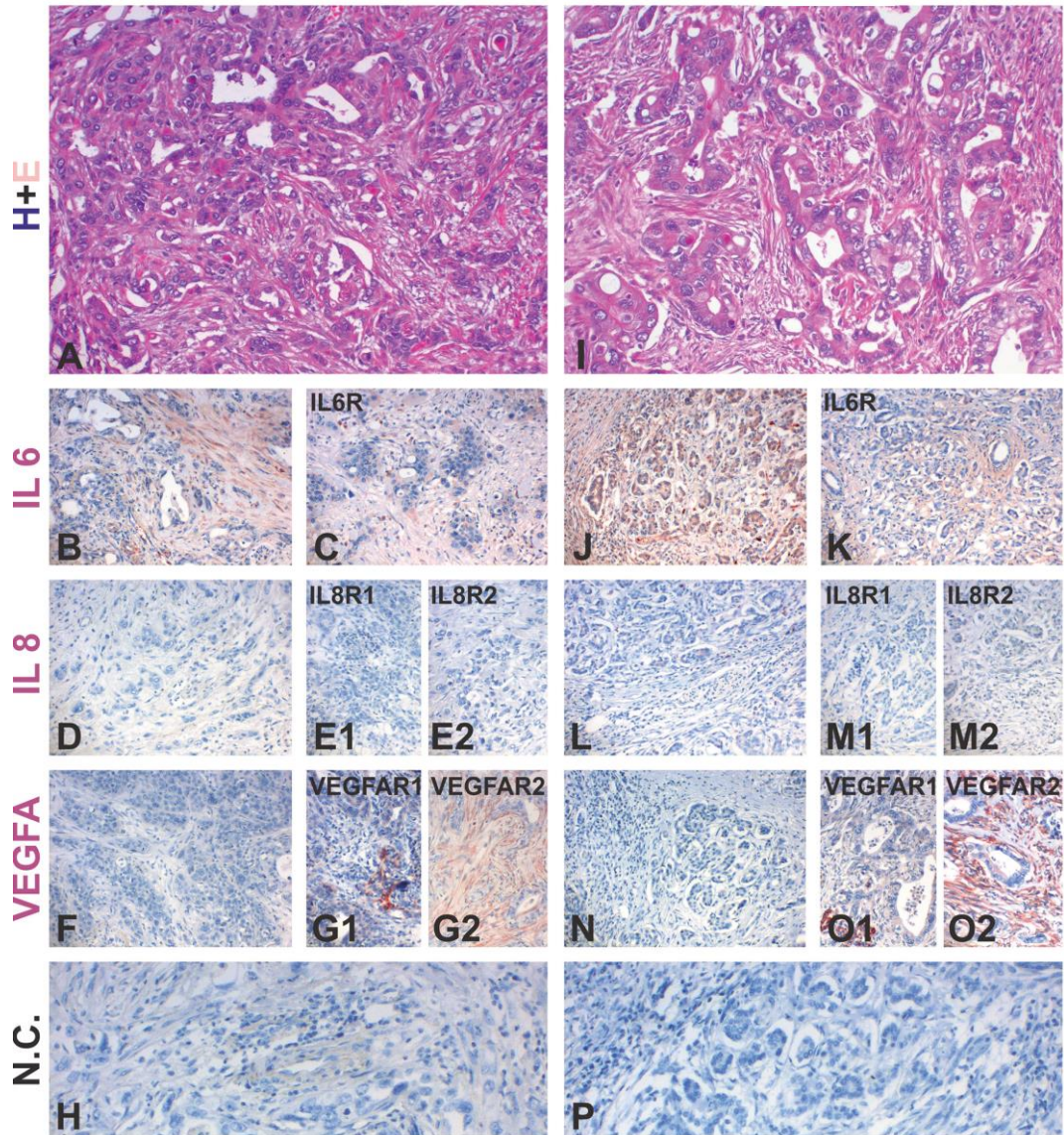
Obrázek 15. Imunofluorescenční analýza izolovaných primárních kultur CAF z PDAC. CAF exprimovaly vimentin (červený signál) a byly negativní při průkazu keratinu (zelený signál) (A, B). Proliferační marker Ki67 (červený signál; E, F), fibronektin (Fibr, zelený signál; byly také detekovány C, D) a α -aktin hladkého svalstva (SMA, červený signál; C, D). CAF exprimovaly nestin (zelený signál; E, F). Zvětšení 200x.



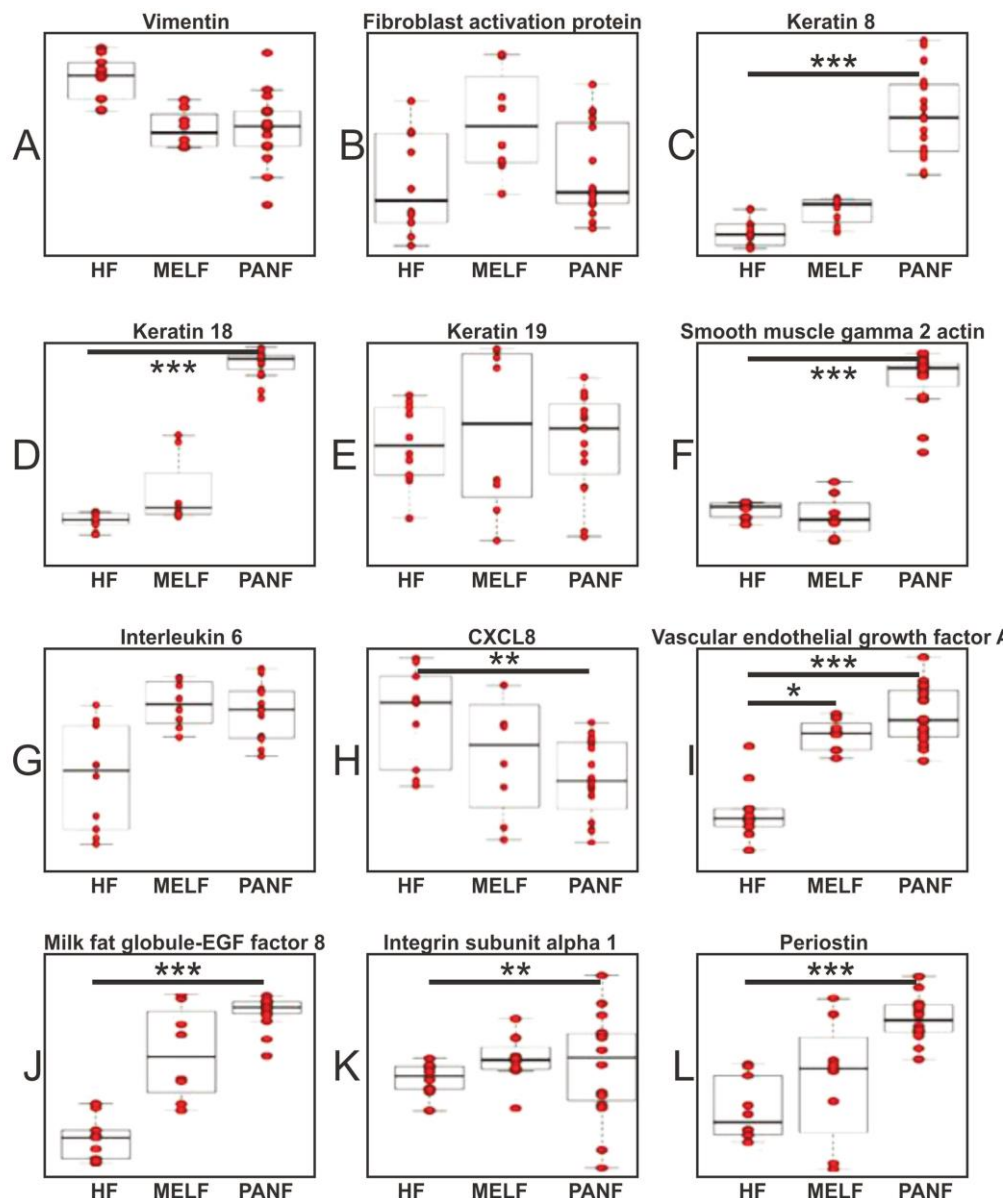
Obrázek 16. Kondicionované médium z PANF (CAF z PDAC, pacienti P10 a P11) pozitivně modulovalo velikost kolonií v Panc-1 (A), MIA PaCa-2 (B) a CAPAN-2 (D) buňky, ale ne v buňkách PaTu-8902 (C). Kondicionované médium z HF (dermální fibroblasty) zvýšilo velikost kolonií v Panc-1 (A), MIA PaCa-2 (B) a PaTu-8902 (C) a v CAPAN-2 mírně snížilo velikost kolonií (D). Počty kolonií Panc-1 a CAPAN-2 pod vlivem PANF/HF kondiciovaných médií byly vyšší ve srovnání s kontrolou (E, H). Pouze u Panc-1 byl účinek obohaceného média z CAF vyšší než účinek obohaceného média z HF (E). Inhibiční aktivity testovaných médií byly zaznamenány v buněčných liniích MIA PaCa-2 a PaTu-8902 (F, G).



Obrázek 17. Srovnání buněčných linií PDAC a primárních nádorových buněk izolovaných z ascitické tekutiny pomocí imunocytochemického značení. Všechny čtyři buněčné linie PDAC exprimovaly VEGFA a oba proteinové receptory VEGFAR1 a VEGFAR2 a také IL-6 a IL-8 receptory typu 2 (R2). Pouze buněčná linie Panc-1 byla mírně pozitivní pro IL-8R1. Nedostatek signálů pro IL-6R a IL-8 byl prokázán v buněčných liniích MIA PaCa-2 a CAPAN-2. Buňky izolované z ascitické tekutiny byly pozitivní na keratin-7, -8, -19, vimentin, IL-6, IL-6R, IL-8, VEGFAR1 a VEGFAR2.



Obrázek 18. Hematoxylin/eozin a imunohistochemická analýza parafinových řezů tumoru s PDAC ukazuje rozšířený objem stromatu (A, I). Pozitivní signál pro IL-6 (B, J), IL-6R (C, K), VEGFR1 (G1, O1) a VEGFR2 (G2, O2) byl pozorován v buňkách tumoru i nádorového stromatu. Byla prokázána slabá exprese pro VEGFA (F, N), IL-8 (D, L) a oba jeho receptory IL-8R1 (E1, M1) a IL-8-R2 (E2, M2). Zvětšení 100x

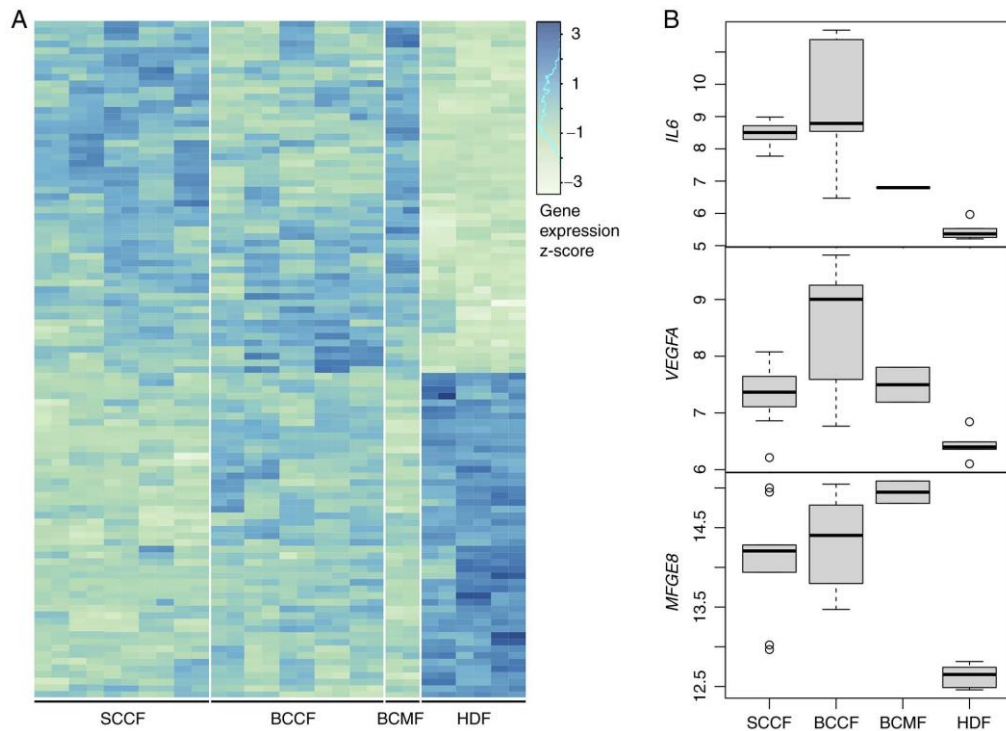


Obrázek 19. Molekulární analýza odlišně exprimovaných genů v CAF z melanomu (MELF), PDAC (PANF) ve srovnání s dermálními fibroblasty (HF). Nejvyšší úroveň mRNA pro vimentin dosáhly dermální fibroblasty (A). Přítomnost mRNA pro FAP a K-19 byla detekovaná u všech fibroblastů (B, E). PANF prokázaly nejvyšší transkriptové hladiny pro keratin-8, -18, SMA, MFGE8 a periostin v srovnání s ostatními studovanými fibroblasty (C, D, F, J, L). PANF a MELF exprimovaly vyšší množství transkriptu IL-6, VEGFA a integrinu $\alpha 1$ než HF. Nejvyšší hladiny IL-8 mRNA byla pozorována u HF, zatímco nejnižší u PANF (G-I, K).

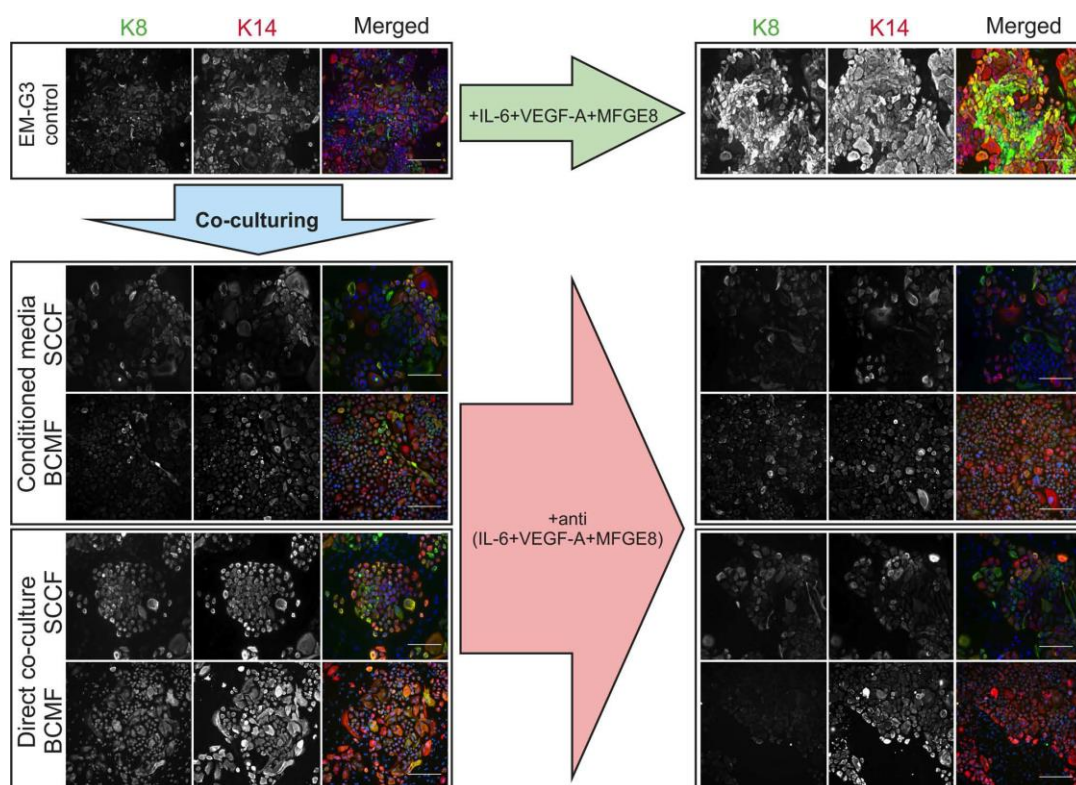
Urban, L., Novák, Š., Čoma, M., Dvořánková, B., Lacina, L., Šáchová, J., Hradilová, M., Svatoňová, P., Kolář, M., Strnad, H., Březinová, J., Smetana, K. Jr., Gál, P., Szabo, P.: Unravelling heterogeneous effects of cancer-associated fibroblasts on poor prognosis markers in breast cancer EM-G3 cell line: In vitro-targeted treatment (anti-IL-6, anti-VEGFA, anti-MFGE8) based on transcriptomic profiling. Onco Reports doi: 10.3892/or.2023.8662 (2024)

Nádory prsu představují celosvětově nejčastější diagnostikované zhoubné onemocnění u žen. CAF reprezentují aktivní složku nádorového mikroprostředí regulující ekosystém karcinomu prsu. CAF produkcí solubilních molekul v podobě cytokinů a chemokinů a reorganizací vláken ECM intenzivně působí na okolní buňky, což má za následek nádorovou/metastatickou progresi, lékovou rezistenci a tvorbu nových krevních kapilár (Sahai et al., 2020). Předchozí srovnávací analýza CAF izolovaných z různých typů nádorů (kožní metastáza karcinomu prsu, kožní bazaliom, spinocelulární karcinom vznikající ze sliznice ústní dutiny a melanom) prokázala spíše nádorově nespecifický účinek CAF na EM-G3 (Brozova et al., 2007). Všechny studované CAF bez ohledu na typ nádoru indukovala koexpresi keratinů-8/-14 v buňkách EM-G3 (Dvorankova et al., 2012). Studie se zaměřila na hodnocení biologického účinku CAF z různých typů nádorů (kožní metastáza karcinomu prsu, kožní bazaliom, spinocelulární karcinom vznikající ze sliznice ústní dutiny) na EM-G3, které jsou schopné exprimovat společné znaky progenitorů luminálních a myoepiteliálních buněk. Srovnávací analýza transkriptomu tří populací CAF a kontrolních dermálních fibroblastů identifikovala kandidátní molekuly IL-6, VEGFA a MFGE8 hrající důležitou roli v regulaci TME u nádoru prsu (Obrázek 20). Western blot prokázal heterogenní efekt CAF/dermálních fibroblastů na expresi keratinů u EM-G3 buněk. Kondicované médium z dermálních fibroblastů deregulovalo expresi keratinů-14 a -19, zatímco kondicované médium z bazaliomu snížilo signál pro keratiny -8 a -14. Stimulací pro přítomnost keratinů-14 a -8/-18 v EM-G3 byla kondicovaná média ze spinocelulárního karcinomu a kožní metastázy karcinomu prsu. Byly prokázány transkripční faktory Slug, Snail a TWIST1 asociované s EMT. Vimentin, mezenchymální marker, byl slabě exprimován v buňkách EM-G3. Přímá i nepřímá kokultivace EM-G3 s CAF/dermálními fibroblasty vedla k zvýšení počtu dvojité pozitivních keratin-8/-14 buněk. Efekt se zdál výraznější v kokultúrách s CAF ve srovnání s dermálními fibroblasty. Přidáním neutralizačních protilátek (aIL-6, aVEGFA, aMFGE8) došlo k výraznému poklesu počtu buněk keratin-8/-14 pozitivních. Přidáním rekombinantních proteinů (IL-6, VEGFA,

MFGE8) do kultivačního média vedlo k razantnímu zvýšení množství keratin-8/-14 pozitivních EM-G3 buněk (Obrázek 21). Nezávisle na svém původu, CAF formují prozánětlivé prostředí napomáhající šíření tumoru a zvýšenou aktivitu. Tento nálezn by mohl mít i terapeutický potenciál, protože použití kombinovaných neutralizačních protilátek s tlumícím modulačním efektem na aktivitu CAF se k tomu přímo nabízí.



Obrázek 20. Transkriptomická analýza HDF (dermální fibroblasty), BCCF (CAF z bazaliomu), SCCF (CAF ze spinocelulárního karcinomu) a BCMF (fibroblasty z kožní metastazy karcinomu prsu) zobrazuje expresní profily všech odlišně exprimovaných genů. Aktivita genů *IL-6*, *VEGFA* a *MFGE8* signifikantně zvýšena u CAF na rozdíl od HDF.

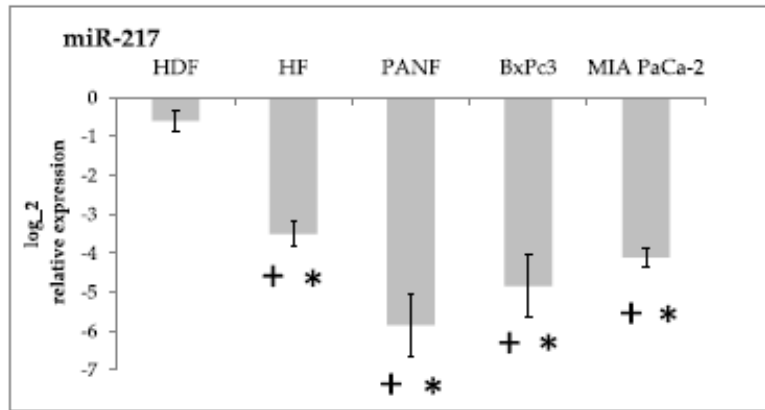


Obrázek 21. Imunofluorescenční analýza EM-G3 buněk. Zvýšená pozitivita EM-G3 buněk pro keratin-8/-14 byla zaznamenána při přímé a nepřímé (kondiciované média) kultivaci s CAF (BCMF-CAF z kožní metastázy karcinomu prsu, SCCF-CAF ze spinocelulárního karcinomu). Přidání neutralizačních protilátek proti IL-6, VEGFA a MFGE8 zeslabilo pozitivitu keratinů-8/-14 v buňkách. Pozitivní kontrola zahrnovala suplementaci kultivačních médií s lidským rekombinantním IL-6, VEGFA a MFGE8, které vedlo k výrazné koexpresi keratinů-8/-14 v EM-G3 buňkách. Zvětšení 200x.

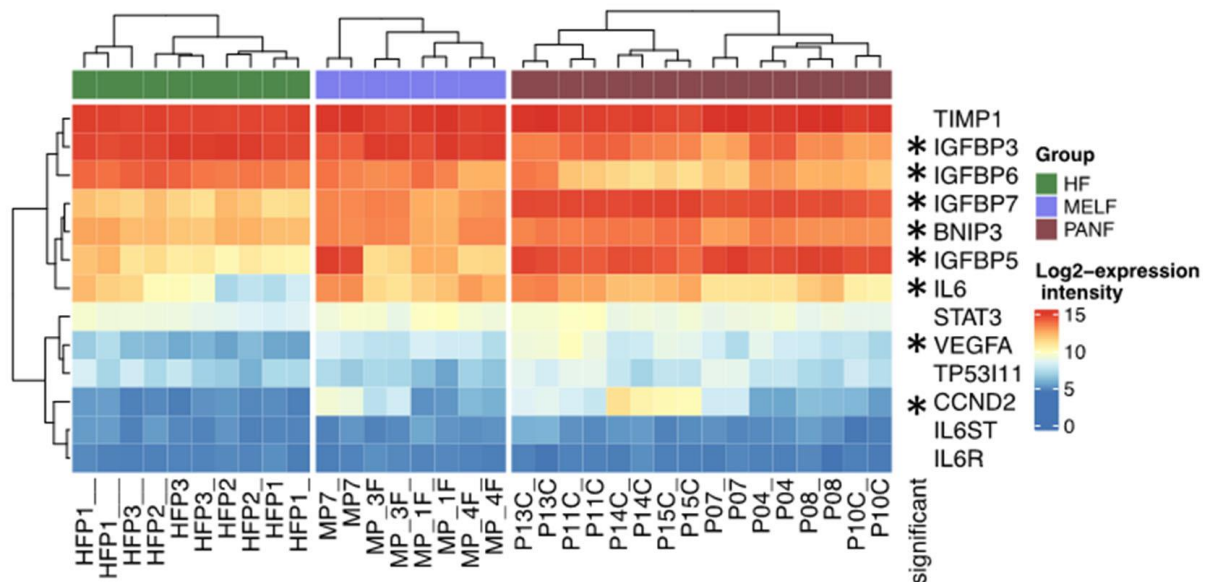
Mandys, V., Popov, A., Gürlich, R., Havránek, J., Pfeiferová, L., Kolář, M., Vránová, J., Smetana, K., Jr., Lacina, L., Szabo, P.: Expression of Selected miRNAs in Normal and Cancer-Associated Fibroblasts and in BxPc3 and MIA PaCa-2 Cell Lines of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Int J Mol Sci. 24(4): 3617.doi:10.3390/ijms24043617 (2023)

Desmoplastické jizvě podobné stroma, které obsahuje hojné zastoupení extracelulární matrix produkované CAF, je typickým znakem PDAC. Parakrinní produkcí růstových faktorů, cytokinů a chemokinů CAF společně s buňkami imunitního systému formují chronické zánětlivé mikroprostředí nezbytné pro extrémně zhoubný charakter PDAC. Nádorové buňky pomocí exosomů nesoucími náklad bioaktivních proteinů a miRNA stimulují biologické vlastnosti CAF. Malé nekódující miRNA se podílejí na mnoha regulačních procesech ve zdravé

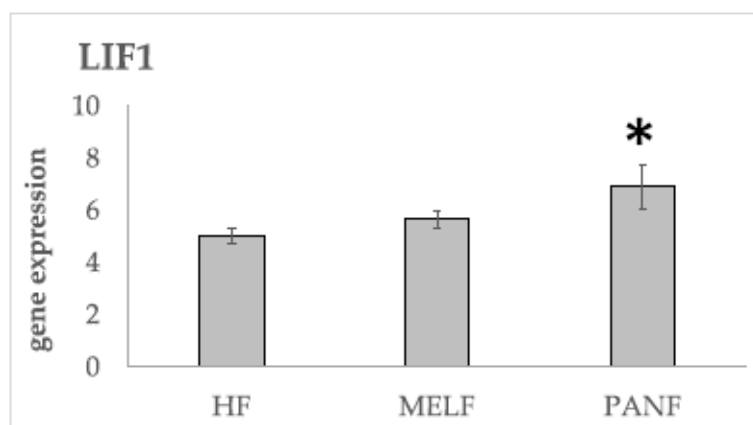
i maligní tkáni s potenciálem koordinovat buněčné interakce v nádorovém ekosystému. Nádorová progrese, morfologie a klinické výsledky PDAC vyseletovaly 5 možných klíčových miRNA (miR-21, miR-96, miR-196a, miR-210, miR-217). Primokultura CAF z PDAC a nádorové linie BxPC3, MIA PaCa-2 a částečně i kontrolní dermální fibroblasty, vykazovaly vysokou expresi miR-21 a miR-210 ve srovnání se zdravou kontrolou tkáně pankreatu. Odlišný fenotyp nádorových buněk BxPC3 a MIA PaCa-2 je zřejmě dán rozdílnou úrovní produkce miR-21 a miR-210. Hypoxické podmínky často přítomné v tumorech a hojící se ráně aktivují syntézu miR-21 a miR-210. Snížená exprese miR-21 a miR-210 inhibuje buněčnou migraci a invazi pankreatických hvězdicových buněk a CAF (Ali et al., 2015). miR-217 zaznamenala výrazný pokles hlavně u CAF a nádorových linií (Obrázek 22). Přítomnost miR-217 byla detekována ve zdravém pankreatu a koreluje se stárnutím a indukci senescence u zdravých fibroblastů (Chang et al., 2017; B. Wang et al., 2017). Zjištěné množství miR-96 a miR-196a ve všech buňkách *in vitro* bylo blízko úrovně v normálním pankreatu. Srovnávací analýza mRNA mezi CAF a dermálními fibroblasty identifikovala 1327 odlišně exprimovaných transkriptů (Obrázek 23). Kooperace mezi HIF-1 α (nebyl význačně zvýšen), miR-21, miR-210 a VEGFA (signifikantně zvýšen u CAF) ukazuje na silnou podporu vaskularizace a růstu nádoru. Výrazná exprese transkriptu mRNA pro PLOD2 (procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2) protein, kritického pro síťování vláken kolagenu korelovala s potlačením produkce mRNA MMP3 a MMP12 podílejících se na degradaci ECM. CAF s vysokou prezencí miR-21 a miR-210 vykazovaly vyšší aktivitu genu pro IL-6. Statistické významnosti nedosáhla skupina podobně exprimovaných genů kódující receptor IL-6R, gen transmembránového proteinu gp130 a genu kódujícího protein STAT3. Gen pro další cytokin z IL-6 rodiny, LIF byl výrazně upregulován u CAF z PDAC ve srovnání s kontrolními fibroblasty (Obrázek 24). Výsledky podporují hypotézu o účinku miR-21 a miR-210 na produkci IL-6 s nejasnou citlivostí buněk na interleukin. miR-21, miR-210, miR-217 participují na utváření nádorového mikroprostředí s možným klinickým potenciálem pro diagnostiku a prognózu PDAC.



Obrázek 22. Snížená exprese miR-217 v lidských fibroblastech (HDF, HF), CAF z pankreatu (PANF) a linií pankreatu (BxPC3 a MIA PaCa-2) ve srovnání se zdravým pankreatem.



Obrázek 23. Expresse vybraných genů v normálních fibroblastech (HF), CAF z melanomu (MELF) a CAF z PDAC (PANF). Statisticky významné rozdíly mezi PANF a HF jsou označeny hvězdičkami.

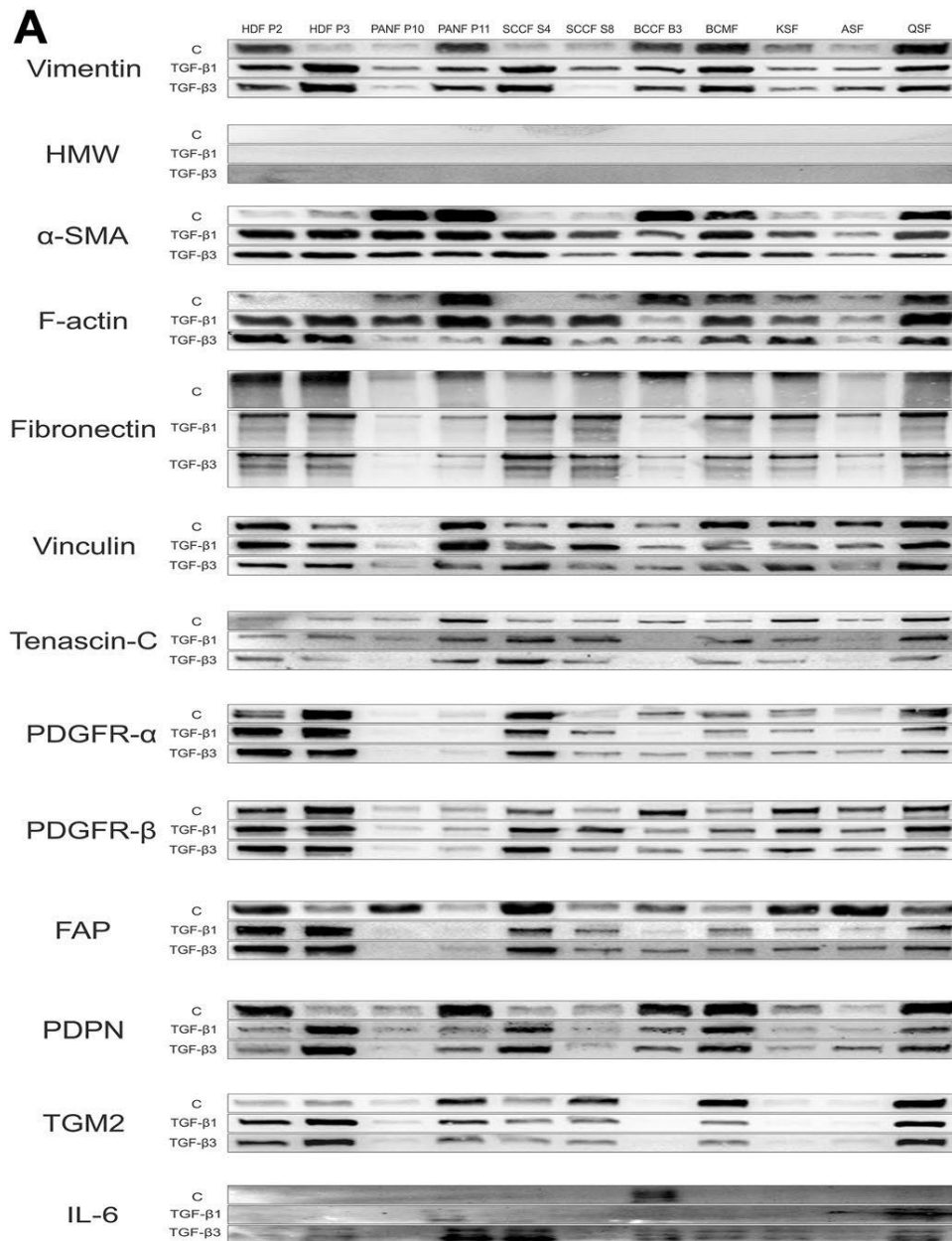


Obrázek 24. Srovnání genové aktivity LIF v normálních fibroblastech (HF) a CAF z melanomu (MELF) a PDAC (PANF).

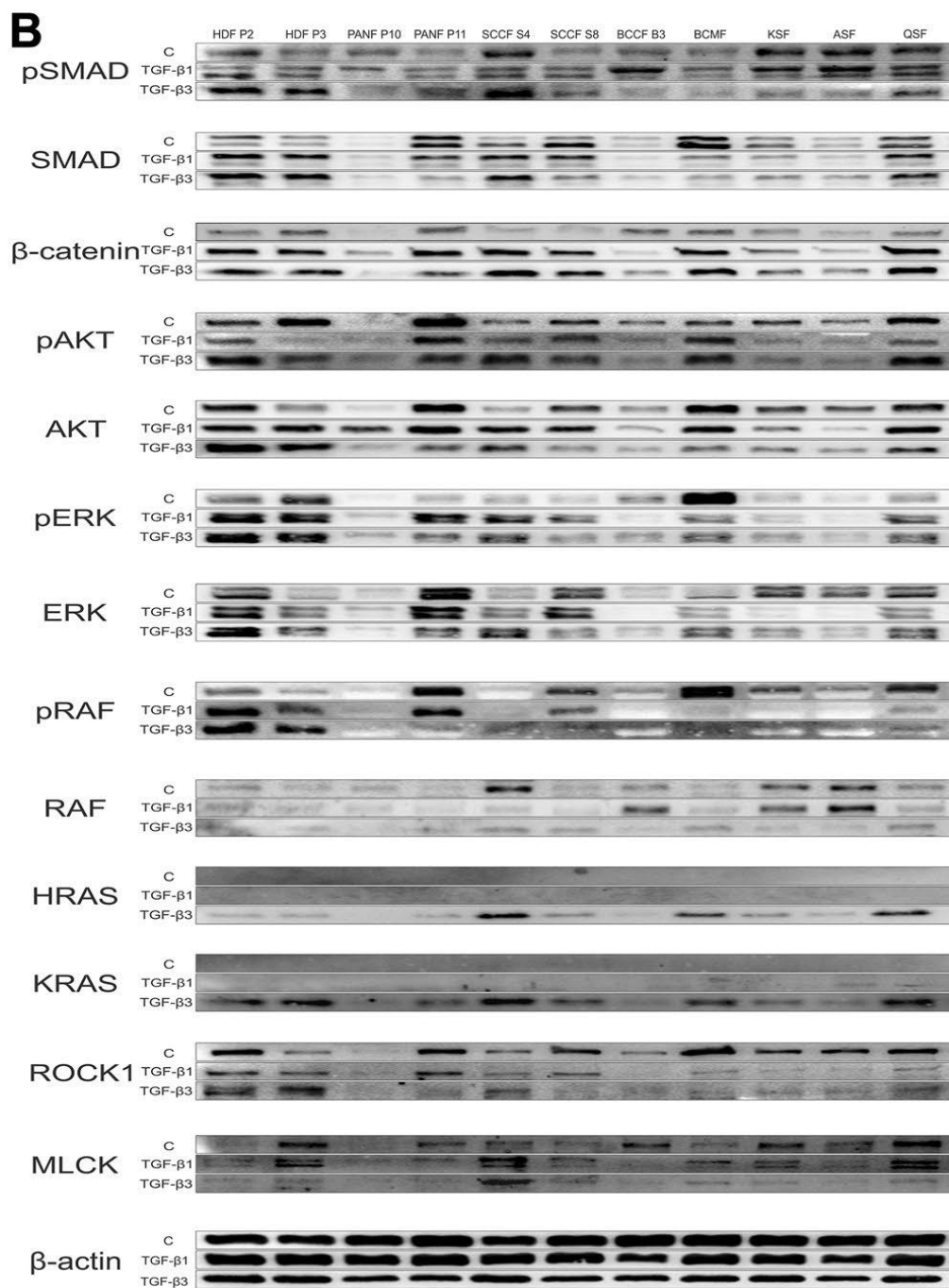
Urban, L., Čoma, M., Lacina, L., Szabo, P., Sabová, J., Urban, T., Šuca, H., Lukačín, Š., Zajíček, R., Smetana, K. Jr., Gál, P.: Heterogeneous response to TGF- β 1/3 isoforms in fibroblasts of different origins: implications for wound healing and tumorigenesis. *Histochem Cell Biol* doi: 10.1007/s00418-023-02221-5 (2023)

Regulační molekulu hojící se rány, TGF- β , lze považovat za kritický prvek s nejširším spektrem účinků řídící ukládání vláken ECM, fibrózu a EMT (Bielefeld et al., 2013; Hao et al., 2019). Koncept jednoduché neamplifikované signalizace TGF- β je lépe reprezentován komplexními kanonickými (SMAD2/3) a nekanonickými (Erk1/2, JNK, p38, Akt, ROCK) dráhami (Y. E. Zhang, 2017). TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3 se podílejí na kontrakci rány a jizvení. Analogie mezi hojící se ránou a nádorem byla motivací sledovat buněčnou odpověď fibroblastů izolovaných z různých neoplastických (CAF z PDAC, kožní metastázy karcinomu prsu, spinocelulárního karcinomu, bazaliomu), hojících (keloidní, aktivní a klidové jizvy) a normálních tkání (dermální fibroblasty) na TGF- β . Primokultura CAF z bazaliomu jediná exprimovala IL-6. V reakci na stimulaci TGF- β 3 výrazně stoupla hladina IL-6 ve většině fibroblastů, zejména ve skupině CAF. Výsledek naznačuje potenciální aktivitu TGF- β 3 při řízení přechodu na iCAF fenotyp. Secernovaná forma IL-6 není detekovatelná standardní analýzou Western blot. Detekovaná exprese IL-6 je spojena s předpokladem akumulace interleukinu v buněčné cytoplazmě v důsledku nadprodukce. Přestože je FAP považován za specifický znak CAF, v normálních dermálních fibroblastech a fibroblastech z jizev dosahoval vysoké hodnoty. Přidání TGF- β 1/ β 3 do kultivačního média mělo za následek snížení positivity

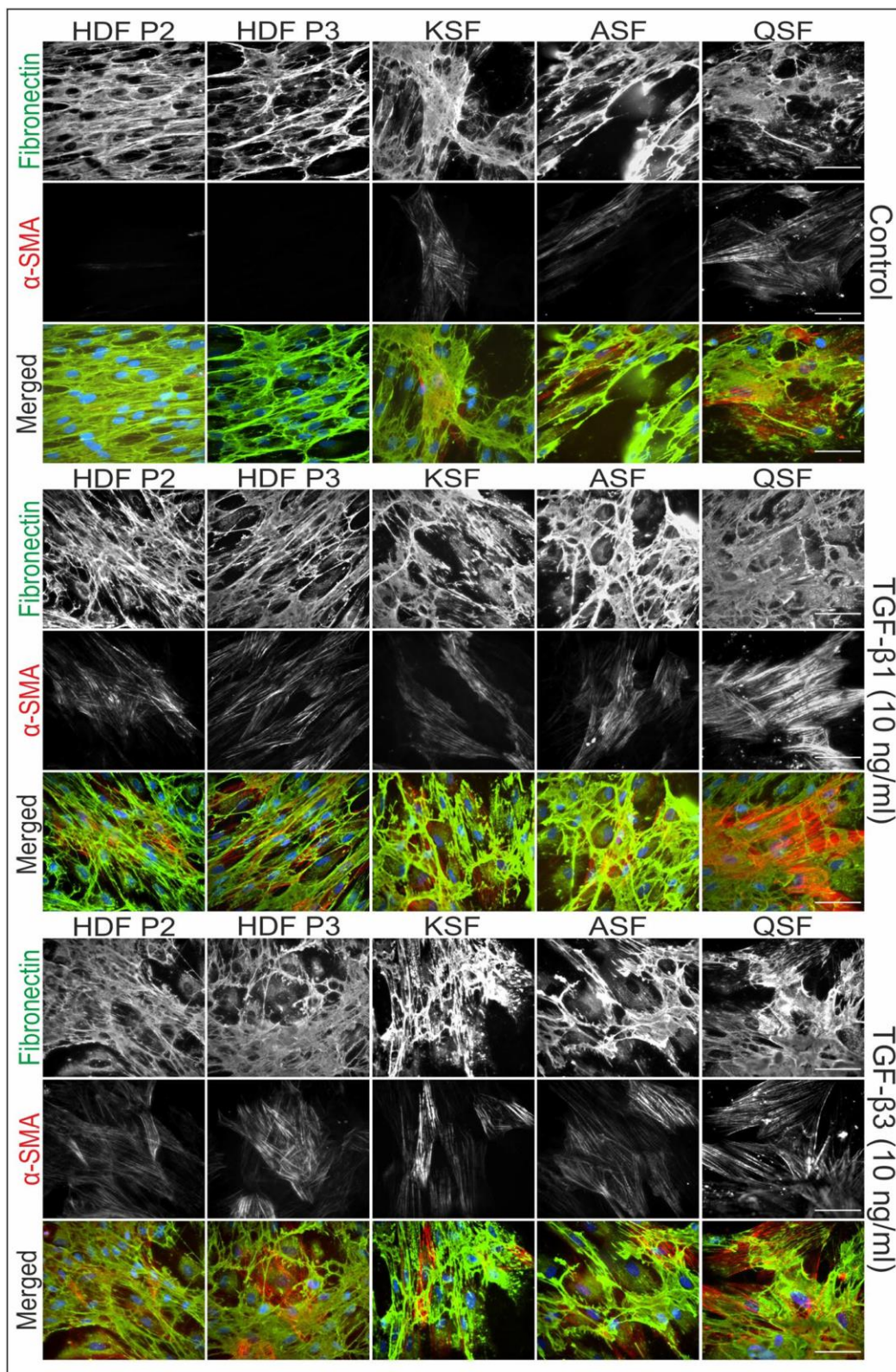
na FAP u fibroblastů z jizev i CAF z PDAC (Obrázek 25-26). I když v různém rozsahu, intracelulární aktivita SMAD2/3 byla detekovaná napříč všemi typy studovaných fibroblastů. Zejména dermální fibroblasty mimo SMAD2/3 využily alternativní Akt, Erk, RAF a ROCK kaskády potvrzené na proteinové úrovni. CAF vykazovaly heterogenní odpověď na TGF- β 1/ β 3 suplementaci. V celkovém srovnání obou polypeptidů, TGF- β 1 prokázal silnější aktivaci signalizace v konfrontaci s TGF- β 3. Variabilita hladiny pro α -SMA, fibronectin a tenascin C se mezi různými fibroblasty lišila. Zvýšené hodnoty dosahovaly v přítomnosti TGF- β 1/ β 3, opět s větším efektem pod vlivem TGF- β 1. Za všech kultivačních podmínek zůstala pozitivita pro vimentin poměrně stabilní (Obrázek 27-28). V různých klinických souvislostech se chování fibroblastů může lišit s možným dopadem na terapeutické výsledky. Pochopení TGF- β signalizace u fibroblastů rozmanitého původu je zásadní pro vývoj cílených intervencí a optimalizaci léčebné strategie.



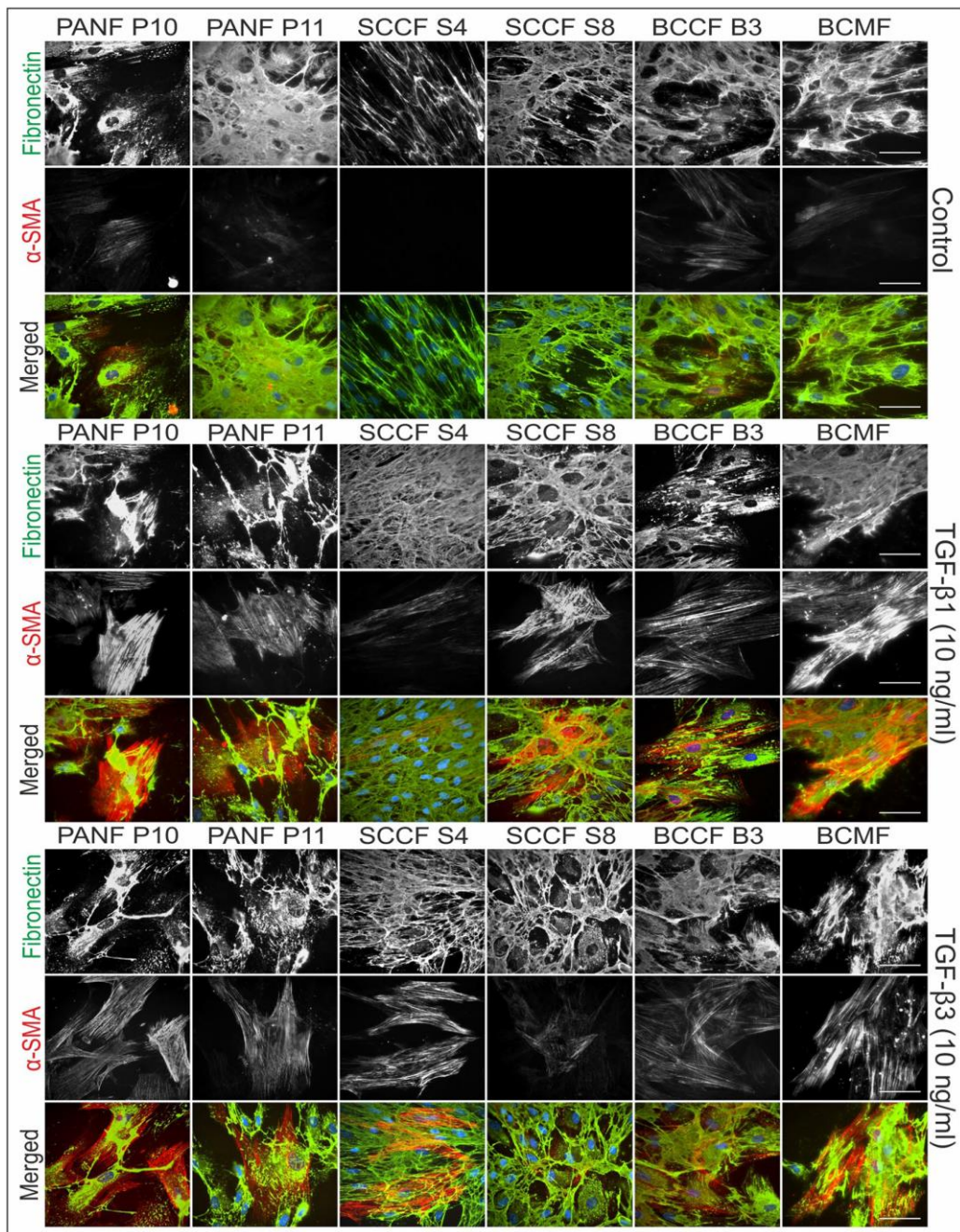
Obrázek 25. Western blot analýza vlivu TGF-β1 a TGF-β3 na fenotyp studovaných fibroblastů (HDF-dermální fibroblasty, PANF-CAF z PDAC, SCCF-CAF ze spinocelulárního karcinomu, BCCF-CAF z bazaliomu, KSF-fibroblasty z keloidní jizvy, ASF-fibroblasty z aktivní jizvy, QFS-fibroblasty z klidové jizvy).



Obrázek 26. Western blot analýza vlivu TGF-β1 a TGF-β3 na fenotyp studovaných fibroblastů (HDF-dermální fibroblasty, PANF-CAF z PDAC, SCCF-CAF ze spinocelulárního karcinomu, BCCF-CAF z bazaliomu, KSF-fibroblasty z keloidní jizvy, ASF-fibroblasty z aktivní jizvy, QSF-fibroblasty z klidové jizvy).



Obrázek 27. Imunofluorescenční analýza vlivu TGF- β 1 a TGF- β 3 na fenotyp studovaných fibroblastů (HDF-dermální fibroblasty, PANF-CAF z PDAC, SCCF-CAF ze spinocelulárního karcinomu, BCCF-CAF z bazaliomu, KSF-fibroblasty z keloidní jizvy, AFS-fibroblasty z aktivní jizvy, QFS-fibroblasty z klidové jizvy). Zvětšení 600x.



Obrázek 28. Imunofluorescenční analýza vlivu TGF- β 1 a TGF- β 3 na fenotyp studovaných fibroblastů (HDF-dermální fibroblasty, PANF-CAF z PDAC, SCCF-CAF ze spinocelulárního karcinomu, BCCF-CAF z bazaliomu, KSF-fibroblasty z keloidní jizvy, AFS-fibroblasty z aktivní jizvy, QFS-fibroblasty z klidové jizvy). Zvětšení 600x.

6 Diskuse

Z důvodu lepší přehlednosti budu provedené experimenty diskutovat v tom pořadí, jak byly uvedeny v kapitole “Cíle práce“.

Studium utváření reaktivního mikroprostředí spojené s biologickou aktivitu nádorově asociovaných fibroblastů

Nádorové stroma se skládá z různých typů fibroblastů s výrazně odlišným fenotypem a biologickými vlastnostmi (Belle & DeNardo, 2019). Na tvorbě pronádorového mikroprostředí se podílejí CAF různého původu. Epitelové buňky tumoru a budoucí stromální buňky, včetně CAF, jsou ovlivněny stejnými onkogenními vlivy, a tak je vysoká pravděpodobnost tvorby podobných genetických změn u obou buněčných populací (Kurose et al., 2001). Akumulace mutací v mnoha genech detekovaných v CAF může být ovlivněná koevolucí nádorového stromatu s maligními buňkami (Polyak et al., 2009). V práci jsme prokázali, že subkutánně aplikované lidské nádorové buňky nu/nu myším nebyly schopné procesem EMT utvářet CAF. Zdrojem stromálních CAF byly mezenchymové buňky hostitele. Myofibroblasty ve fibrotické tkáni, které jsou fenotypově podobné CAF v desmoplastických tumorech vznikají i EMT (Wynn, 2008). Námí publikovaný výsledek mohl být ovlivněn i použitím imunodeficientního zvířete.

Pro PDAC je typické bohatě zastoupené stroma, které výrazně převyšuje samotné nádorové buňky. Použitím kondiciovaných médií z CAF izolovaných z primárního nádoru pankreatu naše experimenty prokázaly specifické rozdíly v růstu, šíření, klonogenitě a fenotypu mezi čtyřmi testovanými komerčními PDAC liniemi. Heterogenní reakce PDAC linií na solubilní faktory produkované CAF odráží individuální variabilitu nádorů, z nichž byly linie etablovány, a je v souladu s publikovanými studiemi (Erdogan et al., 2017; Ding et al., 2018). Znaky EMT (Slug, Snail, N cadherin) byly zvýšené u linií Panc-1 a MIA PaCa-2, zatímco u buněk PaTu-8902 a CAPAN-2 se neprokázaly.

TGF- β 1 je důležitým faktorem indukujícím EMT, čímž ovlivňuje vznik CAF. Je produkován řadou buněčných typů v nádorovém ekosystému. EMT může být odpovědí PDAC linií na různé exogenní faktory (Principe et al., 2017; Ligorio et al., 2019). Bylo prokázáno, že hladina cirkulujícího IL-6 významně vzroste u pacientů s PDAC s horší prognózou a blokáce IL-6R na zvířecích modelech zvýšila účinnost anti-PDAC chemoterapie (Kim et al., 2017; Long

et al., 2017). IL-8 řídí neovaskularizaci a invazivitu nádorových buněk (Matsuo et al., 2009). V našem experimentu jsme pozorovali na čase závislou syntézu IL-6 a IL-8 u CAF. Analýza řezů tumoru, PDAC linií a buněk z ascitické tekutiny odhalila silný signál pro IL-6 a jeho receptor. Zdá se, že syntéza IL-6 je vzájemně regulovaná jak CAF, tak i maligními buňkami, kde zvýšená produkce IL-6 u CAF působí inhibičně na produkci cytokinu nádorovými buňkami. Tento nálezn považujeme za významný, neboť ukazuje zpětnovazebnou regulaci produkce tohoto významného cytokinu v nádorovém ekosystému. Expres IL-8 a obou receptorů měla spíše opačný efekt a nebyla pozorována na histologických řezech nádorové tkáně. CAF produkují další kritické molekuly PDAC ekosystému MFGE8, periostinu, VEGFA, ale jejich exprese byla v použitých experimentálních modelech variabilní.

Studium účinku vybraných chemokinů, cytokinů a miRNA produkovanými buňkami nádorového ekosystému

CAF představují nejpočetnější stromální buněčnou populaci v TME nádorů prsu (Romano et al., 2022). Protinádorová terapie zaměřená na CAF nabízí nové léčebné přístupy (Hanley & Thomas, 2021). Bez ohledu na původ, CAF použité v experimentu vykazovaly vysoké aktivity genů pro *IL-6*, *VEGFA* a *MFGE8*, které přispívají ke vzniku pro-zánětlivého mikroprostředí, podporují vaskularizaci, iniciaci a růst tumoru (Setiawan et al., 2023). Produkty vybraných genů selektované na základě analýzy transkriptomu CAF (*IL-6*, *VEGFA*, *MFGE8*) měly v přímé a nepřímé kokultivaci CAF s EM-G3 za následek nárůst populace keratin-8/-14 pozitivních buněk. Přidání rekombinantních proteinů do čistého média a neutralizačních primárních protilátek do kondiciovaného média z CAF efekt vybraných molekul potvrdilo. Přítomnost keratin-8/-18 pozitivních nádorových buněk koreluje s méně invazivním fenotypem ve srovnání s keratin-14 pozitivními buňkami spojených s agresivitou buněk tumoru prsu (Iyer et al., 2013; Hanley et al., 2020). V experimentu jsme pozorovali výraznou stimulaci exprese vimentinu pod vlivem CAF, který je spojen s migrací a špatnou prognózou maligního onemocnění (M. H. Chen et al., 2008). Užití kombinace neutralizačních protilátek proti *IL-6*, *VEGFA*, *MFGE8* mělo inhibiční účinek na detekci znaků EMT (*SLUG*, *ZEB1*) v buňkách EM-G3, které jsou asociované s horším průběhem onemocnění (Soini et al., 2011; Z. Zhang et al., 2022). Byla pozorována i změna exprese E a N cadherinu v EM-G3 pod vlivem CAF ve prospěch N cadherinu, které souvisí s vyšší schopností maligních buněk migrovat a adherovat k endotelovým buňkám (Hazan et al., 2000).

Jedním z typických znaků CAF/myofibroblastů je přítomnost aktinových cytoskeletálních vláken, které v našem experimentu měly CAF izolované z PDAC (Vokurka et al., 2022). Zvýšená hladina miR-21 a miR-210, která byla prokázána v naší *in vitro* studii podporuje migraci a invazivitu CAF a hvězdicových buněk pankreatu (Ali et al., 2015). Exprese miR-217 často přítomná ve zdravém pankreatu, byla snížena v experimentálních modelech u CAF (Chang et al., 2017). IL-6 se zdá být klíčový regulátor interakce mezi maligními buňkami a stromatem. Je popsána zvýšená exprese miR-21 v CAF po indukci exozomem nesoucím IL-6 (Bumrunghthai et al., 2015). miR-21 a miR-210 se v hypoxických podmínkách účastní řízení STAT3, kritické složky signální dráhy IL-6 (Q. Zhao et al., 2021). V práci jsme prokázali zvýšenou expresi genů v CAF spojených s hypoxií, PLOD2, cytokiny IL-6 a LIF.

Generace myofibroblastů a depozice vláken ECM je indukována faktorem TGF- β -1/3, který představuje klíčovou molekulu regulující tkáňovou fibrózu a aktivaci fibroblastů v nádorovém stromatu (Brenmoehl et al., 2009; Pakshir et al., 2020). V našem experimentu s fibroblasty různého původu pod vlivem TGF- β 1 jsme pozorovali aktivaci pSMAD2/3 zásadní pro kanonickou TGF- β signalizaci (Turati et al., 2023). Byla zaznamenána spíše snížená odezva fibroblastů na účinek TGF- β 3. Kanonická TGF- β signalizace se podílí na proliferaci fibroblastů a hladina TGF- β 1 koreluje se závažností zjizvení (Meran et al., 2008; C. C. Deng et al., 2021). Kromě toho vedl účinek TGF- β 1/ β 3 k aktivaci i několika nekanonických drah (AKT, ERK, RAF a ROCK), nejvýrazněji v normálních kožních fibroblastech. Nekanonická signalizace může aktivovat fibroblasty na myofibroblasty nezávisle na SMAD v podobě fosforylace MAP-kinázy ERK1/2, která podpoří diferenciaci fibroblastů prostřednictvím transkripčního faktoru FRA2 (Carthy et al., 2015). Studie prezentovala podíl TGF- β nekanonické dráhy na rezistenci myofibroblastů vůči apoptóze spojených s fibrózou (Kalluri, 2016).

7 Závěr

Cíle vytyčené na začátku habilitační práce byly plně splněny a prokázaly užitečnost klasické normální morfologie ve spolupráci s metodami buněčné biologie a genomiky pro onkologický výzkum.

Prezentované výsledky doplňují poznatky o vysoce komplexní organizaci nádorového ekosystému. Tato práce prokazuje jedinečnou funkci CAF podporující maligní chování tumoru spojené s remodelací ECM a produkcí biologicky aktivních signálních molekul udržujících prozánětlivý charakter nádorového mikroprostředí.

Původ CAF je odpovědný za heterogenitu populace stromálních buněk a determinuje roli, s jakou budou vystupovat při utváření nádorového mikroprostředí. Potvrdili jsme, že největší zdroj pro CAF představuje aktivace lokálního mezenchymu. Pomocí srovnávací celogenomové analýzy transkriptomu CAF různého původu s dermální fibroblasty jsme identifikovali kandidátní molekuly (IL-6, MFGE8, VEGFA) podporující agresivitu nádorových buněk. Biologická aktivita CAF v různých typech tumorů je pravděpodobně jevem nádorově nespecifickým, přestože molekulární mediátory, či jejich sítě mohou být u různých typů malignit odlišné. Aktivita genů *IL-6*, *VEGFA* a *MFGE8* u CAF izolovaných z rozdílných nádorů je možnou signaturou CAF bez rozdílu původu. Produkty těchto genů parakrinně secernované do nádorového mikroprostředí se zdají být zásadní pro vznik agresivního fenotypu nádorových buněk. Tato skutečnost může být prakticky využitelná, protože inhibice interakce mezi CAF a nádorovými buňkami se jeví být uniformní u rozdílných typů nádorů a má tak terapeutický potenciál.

Podobně jsme zjistili propojení mezi nadprodukcí IL-6, LIF, miR-21, miR-210, genů asociovaných s hypoxií a formováním ECM u buněk nádorového ekosystému v PDAC. Jeho cílem se zdá být podpora agresivity buněk PDAC. Na druhé straně miR-217 detekovaná ve zdravém pankreatu byla výrazně potlačena v PDAC.

Růstový faktor TGF- β svou aktivitou vyvolává transdiferenciaci fibroblastů v nádorech a hojící se ráně na myofibroblasty. Prokázali jsme, že TGF- β signalizace zapojuje kanonickou ale i několik nekanonických drah se společným výsledkem, jímž je exprese α -SMA, tvorba mezibuněčné hmoty a produkce zánět podporujícího IL-6. Pochopení konkrétních regulací u různých populací fibroblastů může mít vliv na vývoj cílených intervencí v protinádorové terapii a inhibici jizvení.

Předkládané publikace mají i některá specifická omezení. Většina experimentů je prováděna v podmínkách *in vitro* s absencí buněk imunitního systému, které jsou neoddělitelnou součástí nádorového stromatu. Zároveň je nemožné nasimulovat složitou síť buněčných interakcí typickou pro *in vivo* pokusy. Avšak obecné molekulární mechanismy by měly být podobné.

8 Seznam použité literatury

- Acharyya, S., Oskarsson, T., Vanharanta, S., Malladi, S., Kim, J., Morris, P. G., . . . Massague, J. (2012). A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell*, *150*(1), 165-178. doi:10.1016/j.cell.2012.04.042
- Ala-aho, R., Ahonen, M., George, S. J., Heikkila, J., Grenman, R., Kallajoki, M., & Kahari, V. M. (2004). Targeted inhibition of human collagenase-3 (MMP-13) expression inhibits squamous cell carcinoma growth in vivo. *Oncogene*, *23*(30), 5111-5123. doi:10.1038/sj.onc.1207678
- Albregues, J., Bertero, T., Grasset, E., Bonan, S., Maiel, M., Bourget, I., . . . Gaggioli, C. (2015). Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat Commun*, *6*, 10204. doi:10.1038/ncomms10204
- Ali, S., Suresh, R., Banerjee, S., Bao, B., Xu, Z., Wilson, J., . . . Sarkar, F. H. (2015). Contribution of microRNAs in understanding the pancreatic tumor microenvironment involving cancer associated stellate and fibroblast cells. *Am J Cancer Res*, *5*(3), 1251-1264. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26046003>
- Ando, R., Shiraki, Y., Miyai, Y., Shimizu, H., Furuhashi, K., Minatoguchi, S., . . . Enomoto, A. (2024). Mefflin is a marker of pancreatic stellate cells involved in fibrosis and epithelial regeneration in the pancreas. *J Pathol*, *262*(1), 61-75. doi:10.1002/path.6211
- Arnoletti, J. P., Reza, J., Rosales, A., Monreal, A., Fanaian, N., Whisner, S., . . . Litherland, S. A. (2022). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) circulating tumor cells influence myeloid cell differentiation to support their survival and immunoresistance in portal vein circulation. *PLoS One*, *17*(3), e0265725. doi:10.1371/journal.pone.0265725
- Assuncao, M., Yiu, C. H. K., Wan, H. Y., Wang, D., Ker, D. F. E., Tuan, R. S., & Blocki, A. (2021). Hyaluronic acid drives mesenchymal stromal cell-derived extracellular matrix assembly by promoting fibronectin fibrillogenesis. *J Mater Chem B*, *9*(35), 7205-7215. doi:10.1039/d1tb00268f
- Astorgues-Xerri, L., Riveiro, M. E., Tijeras-Raballand, A., Serova, M., Neuzillet, C., Albert, S., . . . Faivre, S. (2014). Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat Rev*, *40*(2), 307-319. doi:10.1016/j.ctrv.2013.07.007
- Balsamo, M., Scordamaglia, F., Pietra, G., Manzini, C., Cantoni, C., Boitano, M., . . . Vitale, M. (2009). Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(49), 20847-20852. doi:10.1073/pnas.0906481106
- Belle, J. I., & DeNardo, D. G. (2019). A Single-Cell Window into Pancreas Cancer Fibroblast Heterogeneity. *Cancer Discov*, *9*(8), 1001-1002. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0576
- Berndt, A., Richter, P., Kosmehl, H., & Franz, M. (2015). Tenascin-C and carcinoma cell invasion in oral and urinary bladder cancer. *Cell Adh Migr*, *9*(1-2), 105-111. doi:10.1080/19336918.2015.1005463
- Bernsmeier, C., van der Merwe, S., & Perianin, A. (2020). Innate immune cells in cirrhosis. *J Hepatol*, *73*(1), 186-201. doi:10.1016/j.jhep.2020.03.027
- Bielefeld, K. A., Amini-Nik, S., & Alman, B. A. (2013). Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci*, *70*(12), 2059-2081. doi:10.1007/s00018-012-1152-9
- Biffi, G., Oni, T. E., Spielman, B., Hao, Y., Elyada, E., Park, Y., . . . Tuveson, D. A. (2019). IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGFbeta to Shape CAF

- Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov*, 9(2), 282-301. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0710
- Binenbaum, Y., Fridman, E., Yaari, Z., Milman, N., Schroeder, A., Ben David, G., . . . Gil, Z. (2018). Transfer of miRNA in Macrophage-Derived Exosomes Induces Drug Resistance in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res*, 78(18), 5287-5299. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0124
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S33-40. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.017
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(12), 786-801. doi:10.1038/nrm3904
- Brenmoehl, J., Miller, S. N., Hofmann, C., Vogl, D., Falk, W., Scholmerich, J., & Rogler, G. (2009). Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration. *World J Gastroenterol*, 15(12), 1431-1442. doi:10.3748/wjg.15.1431
- Brozova, M., Kleibl, Z., Netikova, I., Sevcik, J., Scholzova, E., Brezinova, J., . . . Matouskova, E. (2007). Establishment, growth and in vivo differentiation of a new clonal human cell line, EM-G3, derived from breast cancer progenitors. *Breast Cancer Res Treat*, 103(2), 247-257. doi:10.1007/s10549-006-9358-x
- Bruns, H., Buttner, M., Fabri, M., Mougiakakos, D., Bittenbring, J. T., Hoffmann, M. H., . . . Gerbitz, A. (2015). Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci Transl Med*, 7(282), 282ra247. doi:10.1126/scitranslmed.aaa3230
- Bumrunghai, S., Ekalaksananan, T., Evans, M. F., Chopjitt, P., Tangsiriwatthana, T., Patarapadungkit, N., . . . Pientong, C. (2015). Up-Regulation of miR-21 Is Associated with Cervicitis and Human Papillomavirus Infection in Cervical Tissues. *PLoS One*, 10(5), e0127109. doi:10.1371/journal.pone.0127109
- Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C., & Marini, F. C. (2016). Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res*, 18(1), 84. doi:10.1186/s13058-016-0740-2
- Camenisch, T. D., Spicer, A. P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. L., Calabro, A., Jr., . . . McDonald, J. A. (2000). Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest*, 106(3), 349-360. doi:10.1172/JCI10272
- Carthy, J. M., Sundqvist, A., Heldin, A., van Dam, H., Kletsas, D., Heldin, C. H., & Moustakas, A. (2015). Tamoxifen Inhibits TGF-beta-Mediated Activation of Myofibroblasts by Blocking Non-Smad Signaling Through ERK1/2. *J Cell Physiol*, 230(12), 3084-3092. doi:10.1002/jcp.25049
- Casazza, A., Laoui, D., Wenes, M., Rizzolio, S., Bassani, N., Mambretti, M., . . . Mazzone, M. (2013). Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity. *Cancer Cell*, 24(6), 695-709. doi:10.1016/j.ccr.2013.11.007
- Cassetta, L., & Pollard, J. W. (2018). Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 17(12), 887-904. doi:10.1038/nrd.2018.169
- Cazet, A. S., Hui, M. N., Elsworth, B. L., Wu, S. Z., Roden, D., Chan, C. L., . . . Swarbrick, A. (2018). Targeting stromal remodeling and cancer stem cell plasticity overcomes chemoresistance in triple negative breast cancer. *Nat Commun*, 9(1), 2897. doi:10.1038/s41467-018-05220-6

- Cedeno-Laurent, F., & Dimitroff, C. J. (2012). Galectins and their ligands: negative regulators of anti-tumor immunity. *Glycoconj J*, 29(8-9), 619-625. doi:10.1007/s10719-012-9379-0
- Comito, G., Giannoni, E., Di Gennaro, P., Segura, C. P., Gerlini, G., & Chiarugi, P. (2012). Stromal fibroblasts synergize with hypoxic oxidative stress to enhance melanoma aggressiveness. *Cancer Lett*, 324(1), 31-41. doi:10.1016/j.canlet.2012.04.025
- Conklin, M. W., Eickhoff, J. C., Riching, K. M., Pehlke, C. A., Eliceiri, K. W., Provenzano, P. P., . . . Keely, P. J. (2011). Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am J Pathol*, 178(3), 1221-1232. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.076
- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., . . . Lyden, D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol*, 17(6), 816-826. doi:10.1038/ncb3169
- Davidson, S., Efremova, M., Riedel, A., Mahata, B., Pramanik, J., Huuhtanen, J., . . . Teichmann, S. A. (2020). Single-Cell RNA Sequencing Reveals a Dynamic Stromal Niche That Supports Tumor Growth. *Cell Rep*, 31(7), 107628. doi:10.1016/j.celrep.2020.107628
- de Sostoa, J., Fajardo, C. A., Moreno, R., Ramos, M. D., Farrera-Sal, M., & Alemany, R. (2019). Targeting the tumor stroma with an oncolytic adenovirus secreting a fibroblast activation protein-targeted bispecific T-cell engager. *J Immunother Cancer*, 7(1), 19. doi:10.1186/s40425-019-0505-4
- DeNardo, D. G., Brennan, D. J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S. L., Madden, S. F., . . . Coussens, L. M. (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov*, 1(1), 54-67. doi:10.1158/2159-8274.CD-10-0028
- Deng, C. C., Hu, Y. F., Zhu, D. H., Cheng, Q., Gu, J. J., Feng, Q. L., . . . Yang, B. (2021). Single-cell RNA-seq reveals fibroblast heterogeneity and increased mesenchymal fibroblasts in human fibrotic skin diseases. *Nat Commun*, 12(1), 3709. doi:10.1038/s41467-021-24110-y
- Deng, T., Zhang, H., Yang, H., Wang, H., Bai, M., Sun, W., . . . Ba, Y. (2020). Exosome miR-155 Derived from Gastric Carcinoma Promotes Angiogenesis by Targeting the c-MYB/VEGF Axis of Endothelial Cells. *Mol Ther Nucleic Acids*, 19, 1449-1459. doi:10.1016/j.omtn.2020.01.024
- Di Pietro, C., Ragusa, M., Barbagallo, D., Duro, L. R., Guglielmino, M. R., Majorana, A., . . . Purrello, M. (2009). The apoptotic machinery as a biological complex system: analysis of its omics and evolution, identification of candidate genes for fourteen major types of cancer, and experimental validation in CML and neuroblastoma. *BMC Med Genomics*, 2, 20. doi:10.1186/1755-8794-2-20
- Ding, S. M., Lu, A. L., Zhang, W., Zhou, L., Xie, H. Y., Zheng, S. S., & Li, Q. Y. (2018). The role of cancer-associated fibroblast MRC-5 in pancreatic cancer. *J Cancer*, 9(3), 614-628. doi:10.7150/jca.19614
- Djurec, M., Grana, O., Lee, A., Troule, K., Espinet, E., Cabras, L., . . . Barbacid, M. (2018). Saa3 is a key mediator of the protumorigenic properties of cancer-associated fibroblasts in pancreatic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(6), E1147-E1156. doi:10.1073/pnas.1717802115
- Dorayappan, K. D. P., Wanner, R., Wallbillich, J. J., Saini, U., Zingarelli, R., Suarez, A. A., . . . Selvendiran, K. (2018). Hypoxia-induced exosomes contribute to a more aggressive and chemoresistant ovarian cancer phenotype: a novel mechanism linking STAT3/Rab proteins. *Oncogene*, 37(28), 3806-3821. doi:10.1038/s41388-018-0189-0

- Duluc, C., Moatassim-Billah, S., Chalabi-Dchar, M., Perraud, A., Samain, R., Breibach, F., . . . Bousquet, C. (2015). Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO Mol Med*, 7(6), 735-753. doi:10.15252/emmm.201404346
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 315(26), 1650-1659. doi:10.1056/NEJM198612253152606
- Dvorankova, B., Smetana, K., Jr., Rihova, B., Kucera, J., Mateu, R., & Szabo, P. (2015). Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice. *Histochem Cell Biol*, 143(5), 463-469. doi:10.1007/s00418-014-1293-z
- Dvorankova, B., Szabo, P., Lacina, L., Gal, P., Uhrova, J., Zima, T., . . . Smetana, K., Jr. (2011). Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. *Cells Tissues Organs*, 194(6), 469-480. doi:10.1159/000324864
- Dvorankova, B., Szabo, P., Lacina, L., Kodet, O., Matouskova, E., & Smetana, K., Jr. (2012). Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. *Histochem Cell Biol*, 137(5), 679-685. doi:10.1007/s00418-012-0918-3
- Egeblad, M., Nakasone, E. S., & Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*, 18(6), 884-901. doi:10.1016/j.devcel.2010.05.012
- Elyada, E., Bolisetty, M., Laise, P., Flynn, W. F., Courtois, E. T., Burkhart, R. A., . . . Tuveson, D. A. (2019). Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov*, 9(8), 1102-1123. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0094
- Erdogan, B., Ao, M., White, L. M., Means, A. L., Brewer, B. M., Yang, L., . . . Webb, D. J. (2017). Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *J Cell Biol*, 216(11), 3799-3816. doi:10.1083/jcb.201704053
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S. T., & Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*, 17(2), 135-147. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.041
- Erler, J. T., Bennewith, K. L., Nicolau, M., Dornhofer, N., Kong, C., Le, Q. T., . . . Giaccia, A. J. (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 440(7088), 1222-1226. doi:10.1038/nature04695
- Espinosa Gonzalez, M., Volk-Draper, L., Bhattarai, N., Wilber, A., & Ran, S. (2022). Th2 cytokines IL-4, IL-13, and IL-10 promote differentiation of pro-lymphatic progenitors derived from bone marrow myeloid precursors. *Stem Cells Dev*. doi:10.1089/scd.2022.0004
- Falleni, M., Savi, F., Tosi, D., Agape, E., Cerri, A., Moneghini, L., & Bulfamante, G. P. (2017). M1 and M2 macrophages' clinicopathological significance in cutaneous melanoma. *Melanoma Res*, 27(3), 200-210. doi:10.1097/CMR.0000000000000352
- Fang, M., Yuan, J., Peng, C., & Li, Y. (2014). Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumour Biol*, 35(4), 2871-2882. doi:10.1007/s13277-013-1511-7
- Fang, T., Lv, H., Lv, G., Li, T., Wang, C., Han, Q., . . . Wang, H. (2018). Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer. *Nat Commun*, 9(1), 191. doi:10.1038/s41467-017-02583-0
- Feig, C., Jones, J. O., Kraman, M., Wells, R. J., Deonarine, A., Chan, D. S., . . . Fearon, D. T. (2013). Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts

- synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(50), 20212-20217. doi:10.1073/pnas.1320318110
- Feng, X., Clark, R. A., Galanakis, D., & Tonnesen, M. G. (1999). Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of α v/ β 3 mRNA by fibrin1. *J Invest Dermatol*, 113(6), 913-919. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00786.x
- Filippi, I., Saltarella, I., Aldinucci, C., Carraro, F., Ria, R., Vacca, A., & Naldini, A. (2018). Different Adaptive Responses to Hypoxia in Normal and Multiple Myeloma Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem*, 46(1), 203-212. doi:10.1159/000488423
- Fillies, T., Werkmeister, R., Packeisen, J., Brandt, B., Morin, P., Weingart, D., . . . Buerger, H. (2006). Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer*, 6, 10. doi:10.1186/1471-2407-6-10
- Fingleton, B. (2008). MMPs as therapeutic targets--still a viable option? *Semin Cell Dev Biol*, 19(1), 61-68. doi:10.1016/j.semcdb.2007.06.006
- Foucher, E. D., Ghigo, C., Chouaib, S., Galon, J., Iovanna, J., & Olive, D. (2018). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Strong Imbalance of Good and Bad Immunological Cops in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, 9, 1044. doi:10.3389/fimmu.2018.01044
- Francisco, L. M., Sage, P. T., & Sharpe, A. H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*, 236, 219-242. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123(Pt 24), 4195-4200. doi:10.1242/jcs.023820
- Gabius, H. J., Andre, S., Jimenez-Barbero, J., Romero, A., & Solis, D. (2011). From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends Biochem Sci*, 36(6), 298-313. doi:10.1016/j.tibs.2011.01.005
- Gal, P., Brabek, J., Holub, M., Jakubek, M., Sedo, A., Lacina, L., . . . Smetana, K., Jr. (2022). Autoimmunity, cancer and COVID-19 abnormally activate wound healing pathways: critical role of inflammation. *Histochem Cell Biol*, 158(5), 415-434. doi:10.1007/s00418-022-02140-x
- Ganguly, D., Chandra, R., Karalis, J., Teke, M., Aguilera, T., Maddipati, R., . . . Ligorio, M. (2020). Cancer-Associated Fibroblasts: Versatile Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*, 12(9). doi:10.3390/cancers12092652
- Geiger, B., & Yamada, K. M. (2011). Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(5). doi:10.1101/cshperspect.a005033
- Giannoni, E., Bianchini, F., Masieri, L., Serni, S., Torre, E., Calorini, L., & Chiarugi, P. (2010). Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res*, 70(17), 6945-6956. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0785
- Givel, A. M., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Sirven, P., Cardon, M., Pelon, F., . . . Mehta-Grigoriou, F. (2018). miR200-regulated CXCL12 β promotes fibroblast heterogeneity and immunosuppression in ovarian cancers. *Nat Commun*, 9(1), 1056. doi:10.1038/s41467-018-03348-z
- Goulet, C. R., Champagne, A., Bernard, G., Vandal, D., Chabaud, S., Pouliot, F., & Bolduc, S. (2019). Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling. *BMC Cancer*, 19(1), 137. doi:10.1186/s12885-019-5353-6
- Gray, A., Grushchak, S., Mudaliar, K., Kliethermes, S., Carey, K., & Hutchens, K. A. (2017). The microenvironment in primary cutaneous melanoma with associated spontaneous tumor regression: evaluation for T-regulatory cells and the presence of an

- immunosuppressive microenvironment. *Melanoma Res*, 27(2), 104-109.
doi:10.1097/CMR.0000000000000331
- Greaves, D., & Calle, Y. (2022). Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) and Associated Invasive Adhesions in Solid and Haematological Tumours. *Cells*, 11(4).
doi:10.3390/cells11040649
- Griffioen, A. W., & Thijssen, V. L. (2014). Galectins in tumor angiogenesis. *Ann Transl Med*, 2(9), 90. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.01
- Guo, S., Chen, X., Guo, C., & Wang, W. (2022). Tumour-associated macrophages heterogeneity drives resistance to clinical therapy. *Expert Rev Mol Med*, 24, e17.
doi:10.1017/erm.2022.8
- Ham, S., Lima, L. G., Chai, E. P. Z., Muller, A., Lobb, R. J., Krumeich, S., . . . Moller, A. (2018). Breast Cancer-Derived Exosomes Alter Macrophage Polarization via gp130/STAT3 Signaling. *Front Immunol*, 9, 871. doi:10.3389/fimmu.2018.00871
- Han, W., Chen, S., Yuan, W., Fan, Q., Tian, J., Wang, X., . . . Liu, L. (2016). Oriented collagen fibers direct tumor cell intravasation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(40), 11208-11213. doi:10.1073/pnas.1610347113
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322.
doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022
- Hanley, C. J., Henriët, E., Sirka, O. K., Thomas, G. J., & Ewald, A. J. (2020). Tumor-Resident Stromal Cells Promote Breast Cancer Invasion through Regulation of the Basal Phenotype. *Mol Cancer Res*, 18(11), 1615-1622. doi:10.1158/1541-7786.MCR-20-0334
- Hanley, C. J., & Thomas, G. J. (2021). Targeting cancer associated fibroblasts to enhance immunotherapy: emerging strategies and future perspectives. *Oncotarget*, 12(14), 1427-1433. doi:10.18632/oncotarget.27936
- Hao, Y., Baker, D., & Ten Dijke, P. (2019). TGF-beta-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*, 20(11). doi:10.3390/ijms20112767
- Hara, A., Kobayashi, H., Asai, N., Saito, S., Higuchi, T., Kato, K., . . . Enomoto, A. (2019). Roles of the Mesenchymal Stromal/Stem Cell Marker Mefflin in Cardiac Tissue Repair and the Development of Diastolic Dysfunction. *Circ Res*, 125(4), 414-430.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.314806
- Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L., & Aaronson, S. A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol*, 148(4), 779-790. doi:10.1083/jcb.148.4.779
- Hegde, P. S., Jubb, A. M., Chen, D., Li, N. F., Meng, Y. G., Bernaards, C., . . . Chen, D. S. (2013). Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. *Clin Cancer Res*, 19(4), 929-937.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2535
- Herbst, R. S., Giaccone, G., de Marinis, F., Reinmuth, N., Vergnenegre, A., Barrios, C. H., . . . Spigel, D. R. (2020). Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med*, 383(14), 1328-1339.
doi:10.1056/NEJMoa1917346
- Herrera, M., Berral-Gonzalez, A., Lopez-Cade, I., Galindo-Pumarino, C., Bueno-Fortes, S., Martin-Merino, M., . . . De Las Rivas, J. (2021). Cancer-associated fibroblast-derived gene signatures determine prognosis in colon cancer patients. *Mol Cancer*, 20(1), 73.
doi:10.1186/s12943-021-01367-x
- Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., & Kishimoto, T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 63(6), 1149-1157.
Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2261637>

- Hiramatsu, R., Matsuoka, T., Kimura-Yoshida, C., Han, S. W., Mochida, K., Adachi, T., . . . Matsuo, I. (2013). External mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos. *Dev Cell*, 27(2), 131-144. doi:10.1016/j.devcel.2013.09.026
- Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., . . . Kishimoto, T. (1985). Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(16), 5490-5494. doi:10.1073/pnas.82.16.5490
- Holmer, R., Watzig, G. H., Tiwari, S., Rose-John, S., & Kalthoff, H. (2015). Interleukin-6 trans-signaling increases the expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules 5 and 6 in colorectal cancer cells. *BMC Cancer*, 15, 975. doi:10.1186/s12885-015-1950-1
- Huang, J., Zhang, L., Wan, D., Zhou, L., Zheng, S., Lin, S., & Qiao, Y. (2021). Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1), 153. doi:10.1038/s41392-021-00544-0
- ChallaSivaKanaka, S., Vickman, R. E., Kakarla, M., Hayward, S. W., & Franco, O. E. (2022). Fibroblast heterogeneity in prostate carcinogenesis. *Cancer Lett*, 525, 76-83. doi:10.1016/j.canlet.2021.10.028
- Chang, X., Yu, C., Li, J., Yu, S., & Chen, J. (2017). hsa-miR-96 and hsa-miR-217 Expression Down-Regulates with Increasing Dysplasia in Pancreatic Intraepithelial Neoplasias and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Int J Med Sci*, 14(5), 412-418. doi:10.7150/ijms.18641
- Chavez-Galan, L., Olleros, M. L., Vesin, D., & Garcia, I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front Immunol*, 6, 263. doi:10.3389/fimmu.2015.00263
- Chen, G., Huang, A. C., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., . . . Guo, W. (2018). Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*, 560(7718), 382-386. doi:10.1038/s41586-018-0392-8
- Chen, H. F., Huang, C. H., Liu, C. J., Hung, J. J., Hsu, C. C., Teng, S. C., & Wu, K. J. (2014). Twist1 induces endothelial differentiation of tumour cells through the Jagged1-KLF4 axis. *Nat Commun*, 5, 4697. doi:10.1038/ncomms5697
- Chen, J. L., Wang, L., Li, R., Jiao, Y. F., & Yu, W. F. (2020). High expression of endothelial progenitor cell-induced angiogenic markers is associated with bile acid levels in HCC. *Oncol Lett*, 20(3), 2729-2738. doi:10.3892/ol.2020.11815
- Chen, M. H., Yip, G. W., Tse, G. M., Moriya, T., Lui, P. C., Zin, M. L., . . . Tan, P. H. (2008). Expression of basal keratins and vimentin in breast cancers of young women correlates with adverse pathologic parameters. *Mod Pathol*, 21(10), 1183-1191. doi:10.1038/modpathol.2008.90
- Chen, R., Li, Q., Xu, S., Ye, C., Tian, T., Jiang, Q., . . . Ruan, J. (2022). Modulation of the tumour microenvironment in hepatocellular carcinoma by tyrosine kinase inhibitors: from modulation to combination therapy targeting the microenvironment. *Cancer Cell Int*, 22(1), 73. doi:10.1186/s12935-021-02435-4
- Chen, Y., McAndrews, K. M., & Kalluri, R. (2021). Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Clin Oncol*, 18(12), 792-804. doi:10.1038/s41571-021-00546-5
- Cheng, N., Bai, X., Shu, Y., Ahmad, O., & Shen, P. (2021). Targeting tumor-associated macrophages as an antitumor strategy. *Biochem Pharmacol*, 183, 114354. doi:10.1016/j.bcp.2020.114354

- Cheng, Y., Song, S., Wu, P., Lyu, B., Qin, M., Sun, Y., . . . Zhang, Q. (2021). Tumor Associated Macrophages and TAMs-Based Anti-Tumor Nanomedicines. *Adv Healthc Mater*, 10(18), e2100590. doi:10.1002/adhm.202100590
- Cheung, B. C. H., Hodgson, L., Segall, J. E., & Wu, M. (2022). Spatial and temporal dynamics of RhoA activities of single breast tumor cells in a 3D environment revealed by a machine learning-assisted FRET technique. *Exp Cell Res*, 410(2), 112939. doi:10.1016/j.yexcr.2021.112939
- Choi, Y. P., Lee, J. H., Gao, M. Q., Kim, B. G., Kang, S., Kim, S. H., & Cho, N. H. (2014). Cancer-associated fibroblast promote transmigration through endothelial brain cells in three-dimensional in vitro models. *Int J Cancer*, 135(9), 2024-2033. doi:10.1002/ijc.28848
- Ichihara, R., Shiraki, Y., Mizutani, Y., Iida, T., Miyai, Y., Esaki, N., . . . Enomoto, A. (2022). Matrix remodeling-associated protein 8 is a marker of a subset of cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *Pathol Int*, 72(3), 161-175. doi:10.1111/pin.13198
- Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M. D., & Okada, Y. (1997). Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J*, 322 (Pt 3), 809-814. doi:10.1042/bj3220809
- Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol*, 42, 11-55. doi:10.1016/j.matbio.2015.02.003
- Ito, K., Stannard, K., Gabutero, E., Clark, A. M., Neo, S. Y., Onturk, S., . . . Ralph, S. J. (2012). Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4), 763-778. doi:10.1007/s10555-012-9388-2
- Iyer, S. V., Dange, P. P., Alam, H., Sawant, S. S., Ingle, A. D., Borges, A. M., . . . Vaidya, M. M. (2013). Understanding the role of keratins 8 and 18 in neoplastic potential of breast cancer derived cell lines. *PLoS One*, 8(1), e53532. doi:10.1371/journal.pone.0053532
- Jablonska-Trypuc, A., Matejczyk, M., & Rosochacki, S. (2016). Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(sup1), 177-183. doi:10.3109/14756366.2016.1161620
- Jayatilaka, H., Tyle, P., Chen, J. J., Kwak, M., Ju, J., Kim, H. J., . . . Wirtz, D. (2017). Synergistic IL-6 and IL-8 paracrine signalling pathway infers a strategy to inhibit tumour cell migration. *Nat Commun*, 8, 15584. doi:10.1038/ncomms15584
- Jaynes, J. M., Sable, R., Ronzetti, M., Bautista, W., Knotts, Z., Abisoye-Ogunniyan, A., . . . Rudloff, U. (2020). Mannose receptor (CD206) activation in tumor-associated macrophages enhances adaptive and innate antitumor immune responses. *Sci Transl Med*, 12(530). doi:10.1126/scitranslmed.aax6337
- Jia, Q., Wang, A., Yuan, Y., Zhu, B., & Long, H. (2022). Heterogeneity of the tumor immune microenvironment and its clinical relevance. *Exp Hematol Oncol*, 11(1), 24. doi:10.1186/s40164-022-00277-y
- Jobe, N. P., Rosel, D., Dvorankova, B., Kodet, O., Lacina, L., Mateu, R., . . . Brabek, J. (2016). Simultaneous blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness. *Histochem Cell Biol*, 146(2), 205-217. doi:10.1007/s00418-016-1433-8
- Johnson, D. E., O'Keefe, R. A., & Grandis, J. R. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 15(4), 234-248. doi:10.1038/nrclinonc.2018.8

- Jones, S. A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N., & Fuller, G. M. (2001). The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J*, *15*(1), 43-58. doi:10.1096/fj.99-1003rev
- Josefsson, A., Adamo, H., Hammarsten, P., Granfors, T., Stattin, P., Egevad, L., . . . Bergh, A. (2011). Prostate cancer increases hyaluronan in surrounding nonmalignant stroma, and this response is associated with tumor growth and an unfavorable outcome. *Am J Pathol*, *179*(4), 1961-1968. doi:10.1016/j.ajpath.2011.06.005
- Joseph, R., Soundararajan, R., Vasaikar, S., Yang, F., Allton, K. L., Tian, L., . . . Mani, S. A. (2021). CD8(+) T cells inhibit metastasis and CXCL4 regulates its function. *Br J Cancer*, *125*(2), 176-189. doi:10.1038/s41416-021-01338-5
- Jostock, T., Mullberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., . . . Rose-John, S. (2001). Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem*, *268*(1), 160-167. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.01867.x
- Junttila, M. R., & de Sauvage, F. J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, *501*(7467), 346-354. doi:10.1038/nature12626
- Kai, F., Laklai, H., & Weaver, V. M. (2016). Force Matters: Biomechanical Regulation of Cell Invasion and Migration in Disease. *Trends Cell Biol*, *26*(7), 486-497. doi:10.1016/j.tcb.2016.03.007
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, *16*(9), 582-598. doi:10.1038/nrc.2016.73
- Kang, N., Shah, V. H., & Urrutia, R. (2015). Membrane-to-Nucleus Signals and Epigenetic Mechanisms for Myofibroblastic Activation and Desmoplastic Stroma: Potential Therapeutic Targets for Liver Metastasis? *Mol Cancer Res*, *13*(4), 604-612. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0542
- Kidd, S., Spaeth, E., Watson, K., Burks, J., Lu, H., Klopp, A., . . . Marini, F. C. (2012). Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One*, *7*(2), e30563. doi:10.1371/journal.pone.0030563
- Kideryova, L., Lacina, L., Dvorankova, B., Stork, J., Cada, Z., Szabo, P., . . . Smetana, K., Jr. (2009). Phenotypic characterization of human keratinocytes in coculture reveals differential effects of fibroblasts from benign fibrous histiocytoma (dermatofibroma) as compared to cells from its malignant form and to normal fibroblasts. *J Dermatol Sci*, *55*(1), 18-26. doi:10.1016/j.jdermsci.2009.03.009
- Kieffer, Y., Hocine, H. R., Gentric, G., Pelon, F., Bernard, C., Bourachot, B., . . . Mechta-Grigoriou, F. (2020). Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Clusters Linked to Immunotherapy Resistance in Cancer. *Cancer Discov*, *10*(9), 1330-1351. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1384
- Kim, H. W., Lee, J. C., Paik, K. H., Kang, J., Kim, J., & Hwang, J. H. (2017). Serum interleukin-6 is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma progression pattern. *Medicine (Baltimore)*, *96*(5), e5926. doi:10.1097/MD.00000000000005926
- Kobayashi, H., Gieniec, K. A., Wright, J. A., Wang, T., Asai, N., Mizutani, Y., . . . Woods, S. L. (2021). The Balance of Stromal BMP Signaling Mediated by GREM1 and ISLR Drives Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, *160*(4), 1224-1239 e1230. doi:10.1053/j.gastro.2020.11.011
- Kodet, O., Dvorankova, B., Bendlova, B., Sykorova, V., Krajsova, I., Stork, J., . . . Lacina, L. (2018). Microenvironmentdriven resistance to BRAf inhibition in a melanoma patient is accompanied by broad changes of gene methylation and expression in distal fibroblasts. *Int J Mol Med*, *41*(5), 2687-2703. doi:10.3892/ijmm.2018.3448

- Kodet, O., Dvorankova, B., Krejci, E., Szabo, P., Dvorak, P., Stork, J., . . . Lacina, L. (2013). Cultivation-dependent plasticity of melanoma phenotype. *Tumour Biol*, 34(6), 3345-3355. doi:10.1007/s13277-013-0905-x
- Kolar, M., Szabo, P., Dvorankova, B., Lacina, L., Gabius, H. J., Strnad, H., . . . Smetana, K., Jr. (2012). Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biol Cell*, 104(12), 738-751. doi:10.1111/boc.201200018
- Komohara, Y., Morita, T., Annan, D. A., Horlad, H., Ohnishi, K., Yamada, S., . . . Jinushi, M. (2015). The Coordinated Actions of TIM-3 on Cancer and Myeloid Cells in the Regulation of Tumorigenicity and Clinical Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Cancer Immunol Res*, 3(9), 999-1007. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0156
- Kourea, H. P., Dimitrakopoulos, F. I., Koliou, G. A., Batistatou, A., Papadopoulou, K., Bobos, M., . . . Fountzilias, G. (2021). Clinical Significance of Major Angiogenesis-Related Effectors in Patients with Metastatic Breast Cancer Treated with Trastuzumab-based Regimens. *Cancer Res Treat*. doi:10.4143/crt.2021.748
- Kubota, Y., Takubo, K., Shimizu, T., Ohno, H., Kishi, K., Shibuya, M., . . . Suda, T. (2009). M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Exp Med*, 206(5), 1089-1102. doi:10.1084/jem.20081605
- Kumar, V., & Gabrilovich, D. I. (2014). Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment. *Immunology*, 143(4), 512-519. doi:10.1111/imm.12380
- Kurose, K., Hoshaw-Woodard, S., Adeyinka, A., Lemeshow, S., Watson, P. H., & Eng, C. (2001). Genetic model of multi-step breast carcinogenesis involving the epithelium and stroma: clues to tumour-microenvironment interactions. *Hum Mol Genet*, 10(18), 1907-1913. doi:10.1093/hmg/10.18.1907
- Lacina, L., Dvorankova, B., Smetana, K., Jr., Chovanec, M., Plzak, J., Tachezy, R., . . . Gabius, H. J. (2007). Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture. *Int J Radiat Biol*, 83(11-12), 837-848. doi:10.1080/09553000701694343
- Lacina, L., Plzak, J., Kodet, O., Szabo, P., Chovanec, M., Dvorankova, B., & Smetana, K., Jr. (2015). Cancer Microenvironment: What Can We Learn from the Stem Cell Niche. *Int J Mol Sci*, 16(10), 24094-24110. doi:10.3390/ijms161024094
- Lacina, L., Smetana, K., Jr., Dvorankova, B., Pytlik, R., Kideryova, L., Kucerova, L., . . . Andre, S. (2007). Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *Br J Dermatol*, 156(5), 819-829. doi:10.1111/j.1365-2133.2006.07728.x
- Ladanyi, A. (2015). Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 28(5), 490-500. doi:10.1111/pcmr.12371
- Lee, J. W., Stone, M. L., Porrett, P. M., Thomas, S. K., Komar, C. A., Li, J. H., . . . Beatty, G. L. (2019). Hepatocytes direct the formation of a pro-metastatic niche in the liver. *Nature*, 567(7747), 249-252. doi:10.1038/s41586-019-1004-y
- Lee, K. W., Yeo, S. Y., Sung, C. O., & Kim, S. H. (2015). Twist1 is a key regulator of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res*, 75(1), 73-85. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0350
- Lendeckel, U., Venz, S., & Wolke, C. (2022). Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts*, 8(2), 12. doi:10.1007/s40828-022-00163-4

- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., . . . Weaver, V. M. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, *139*(5), 891-906. doi:10.1016/j.cell.2009.10.027
- Li, F., Li, X. J., Qiao, L., Shi, F., Liu, W., Li, Y., . . . Liu, W. (2014). miR-98 suppresses melanoma metastasis through a negative feedback loop with its target gene IL-6. *Exp Mol Med*, *46*, e116. doi:10.1038/emmm.2014.63
- Li, P., Shan, J. X., Chen, X. H., Zhang, D., Su, L. P., Huang, X. Y., . . . Zhu, Z. G. (2015). Epigenetic silencing of microRNA-149 in cancer-associated fibroblasts mediates prostaglandin E2/interleukin-6 signaling in the tumor microenvironment. *Cell Res*, *25*(5), 588-603. doi:10.1038/cr.2015.51
- Li, W., Zhang, X., Wang, J., Li, M., Cao, C., Tan, J., . . . Gao, Q. (2017). TGFbeta1 in fibroblasts-derived exosomes promotes epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells. *Oncotarget*, *8*(56), 96035-96047. doi:10.18632/oncotarget.21635
- Li, X., Wang, Y., Han, C., Li, P., & Zhang, H. (2014). Colorectal cancer progression is associated with accumulation of Th17 lymphocytes in tumor tissues and increased serum levels of interleukin-6. *Tohoku J Exp Med*, *233*(3), 175-182. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24990228>
- Li, Y. Y., Tao, Y. W., Gao, S., Li, P., Zheng, J. M., Zhang, S. E., . . . Zhang, Y. (2018). Cancer-associated fibroblasts contribute to oral cancer cells proliferation and metastasis via exosome-mediated paracrine miR-34a-5p. *EBioMedicine*, *36*, 209-220. doi:10.1016/j.ebiom.2018.09.006
- Ligorio, M., Sil, S., Malagon-Lopez, J., Nieman, L. T., Misale, S., Di Pilato, M., . . . Ting, D. T. (2019). Stromal Microenvironment Shapes the Intratumoral Architecture of Pancreatic Cancer. *Cell*, *178*(1), 160-175 e127. doi:10.1016/j.cell.2019.05.012
- Lin, T. Y., Yang, C. H., Chou, H. C., Cheng, C. M., Liu, Y. W., Wang, J. Y., . . . Chen, Y. R. (2022). EGFR Mutation-Harboring Lung Cancer Cells Produce CLEC11A with Endothelial Tropic and Tumor-Promoting Activities. *Cancers (Basel)*, *14*(5). doi:10.3390/cancers14051356
- Liu, M., Tolg, C., & Turley, E. (2019). Dissecting the Dual Nature of Hyaluronan in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, *10*, 947. doi:10.3389/fimmu.2019.00947
- Liu, R., Li, H., Liu, L., Yu, J., & Ren, X. (2012). Fibroblast activation protein: A potential therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther*, *13*(3), 123-129. doi:10.4161/cbt.13.3.18696
- Locati, M., Curtale, G., & Mantovani, A. (2020). Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol*, *15*, 123-147. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718
- Loh, J. J., Li, T. W., Zhou, L., Wong, T. L., Liu, X., Ma, V. W. S., . . . Ma, S. (2021). FSTL1 Secreted by Activated Fibroblasts Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis and Stemness. *Cancer Res*, *81*(22), 5692-5705. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-4226
- Long, K. B., Tooker, G., Tooker, E., Luque, S. L., Lee, J. W., Pan, X., & Beatty, G. L. (2017). IL6 Receptor Blockade Enhances Chemotherapy Efficacy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*, *16*(9), 1898-1908. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0899
- Lu, C., Tilan, J. U., Everhart, L., Czarnecka, M., Soldin, S. J., Mendu, D. R., . . . Kitlinska, J. (2011). Dipeptidyl peptidases as survival factors in Ewing sarcoma family of tumors: implications for tumor biology and therapy. *J Biol Chem*, *286*(31), 27494-27505. doi:10.1074/jbc.M111.224089
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *3*(12). doi:10.1101/cshperspect.a005058

- Luo, H., Tu, G., Liu, Z., & Liu, M. (2015). Cancer-associated fibroblasts: a multifaceted driver of breast cancer progression. *Cancer Lett*, *361*(2), 155-163. doi:10.1016/j.canlet.2015.02.018
- Malik, R., Lelkes, P. I., & Cukierman, E. (2015). Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol*, *33*(4), 230-236. doi:10.1016/j.tibtech.2015.01.004
- Mao, Y., Wang, Y., Dong, L., Zhang, Y., Zhang, Y., Wang, C., . . . Fu, Z. (2019). Hypoxic exosomes facilitate angiogenesis and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma through altering the phenotype and transcriptome of endothelial cells. *J Exp Clin Cancer Res*, *38*(1), 389. doi:10.1186/s13046-019-1384-8
- Martinez-Bosch, N., Manero-Ruperez, N., Moreno, M., & Navarro, P. (2022). Exploring the Role of Galectins in Cancer : In Vitro and In Vivo Approaches. *Methods Mol Biol*, *2442*, 685-711. doi:10.1007/978-1-0716-2055-7_37
- Mathieson, L., O'Connor, R. A., Stewart, H., Shaw, P., Dhaliwal, K., Williams, G. O. S., . . . Akram, A. R. (2022). Fibroblast Activation Protein Specific Optical Imaging in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol*, *12*, 834350. doi:10.3389/fonc.2022.834350
- Matsuo, Y., Ochi, N., Sawai, H., Yasuda, A., Takahashi, H., Funahashi, H., . . . Guha, S. (2009). CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1alpha co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, *124*(4), 853-861. doi:10.1002/ijc.24040
- McAndrews, K. M., Miyake, T., Ehsanipour, E. A., Kelly, P. J., Becker, L. M., McGrail, D. J., . . . Kalluri, R. (2022). Dermal alphaSMA(+) myofibroblasts orchestrate skin wound repair via beta1 integrin and independent of type I collagen production. *EMBO J*, *41*(7), e109470. doi:10.15252/embj.2021109470
- Medrek, C., Ponten, F., Jirstrom, K., & Leandersson, K. (2012). The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*, *12*, 306. doi:10.1186/1471-2407-12-306
- Meran, S., Thomas, D. W., Stephens, P., Enoch, S., Martin, J., Steadman, R., & Phillips, A. O. (2008). Hyaluronan facilitates transforming growth factor-beta1-mediated fibroblast proliferation. *J Biol Chem*, *283*(10), 6530-6545. doi:10.1074/jbc.M704819200
- Mezawa, Y., Daigo, Y., Takano, A., Miyagi, Y., Yokose, T., Yamashita, T., . . . Orimo, A. (2019). CD26 expression is attenuated by TGF-beta and SDF-1 autocrine signaling on stromal myofibroblasts in human breast cancers. *Cancer Med*, *8*(8), 3936-3948. doi:10.1002/cam4.2249
- Mezawa, Y., & Orimo, A. (2022). Phenotypic heterogeneity, stability and plasticity in tumor-promoting carcinoma-associated fibroblasts. *FEBS J*, *289*(9), 2429-2447. doi:10.1111/febs.15851
- Midgley, A. C., Rogers, M., Hallett, M. B., Clayton, A., Bowen, T., Phillips, A. O., & Steadman, R. (2013). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. *J Biol Chem*, *288*(21), 14824-14838. doi:10.1074/jbc.M113.451336
- Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., & Shiina, M. (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, *122*(4), 143-159. doi:10.1042/CS20110340
- Millul, J., Bassi, G., Mock, J., Elsayed, A., Pellegrino, C., Zana, A., . . . Cazzamalli, S. (2021). An ultra-high-affinity small organic ligand of fibroblast activation protein for tumor-targeting applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *118*(16). doi:10.1073/pnas.2101852118

- Mirzaei, S. A., Dinmohammadi, F., Alizadeh, A., & Elahian, F. (2019). Inflammatory pathway interactions and cancer multidrug resistance regulation. *Life Sci*, 235, 116825. doi:10.1016/j.lfs.2019.116825
- Miyai, Y., Sugiyama, D., Hase, T., Asai, N., Taki, T., Nishida, K., . . . Enomoto, A. (2022). Meflin-positive cancer-associated fibroblasts enhance tumor response to immune checkpoint blockade. *Life Sci Alliance*, 5(6). doi:10.26508/lsa.202101230
- Mizutani, Y., Kobayashi, H., Iida, T., Asai, N., Masamune, A., Hara, A., . . . Takahashi, M. (2019). Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Res*, 79(20), 5367-5381. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0454
- Muiznieks, L. D., & Keeley, F. W. (2013). Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochim Biophys Acta*, 1832(7), 866-875. doi:10.1016/j.bbadis.2012.11.022
- Mujal, A. M., Combes, A. J., Rao, A. A., Binnewies, M., Samad, B., Tsui, J., . . . Krummel, M. F. (2022). Holistic Characterization of Tumor Monocyte-to-Macrophage Differentiation Integrates Distinct Immune Phenotypes in Kidney Cancer. *Cancer Immunol Res*, 10(4), 403-419. doi:10.1158/2326-6066.CIR-21-0588
- Nakahara, Y., Hashimoto, N., Sakamoto, K., Enomoto, A., Adams, T. S., Yokoi, T., . . . Hasegawa, Y. (2021). Fibroblasts positive for meflin have anti-fibrotic properties in pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 58(6). doi:10.1183/13993003.03397-2020
- Neubert, N. J., Schmittnaegel, M., Bordry, N., Nassiri, S., Wald, N., Martignier, C., . . . Speiser, D. E. (2018). T cell-induced CSF1 promotes melanoma resistance to PD1 blockade. *Sci Transl Med*, 10(436). doi:10.1126/scitranslmed.aan3311
- Nishi, Y., Sano, H., Kawashima, T., Okada, T., Kuroda, T., Kikkawa, K., . . . Shirai, K. (2007). Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. *Allergol Int*, 56(1), 57-65. doi:10.2332/allergolint.O-06-449
- Nunez Abad, M., Calabuig-Farinas, S., Lobo de Mena, M., Torres-Martinez, S., Garcia Gonzalez, C., Garcia Garcia, J. A., . . . Camps Herrero, C. (2022). Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) as Immunotherapy Biomarker in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 14(2). doi:10.3390/cancers14020307
- O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 16(3), 151-167. doi:10.1038/s41571-018-0142-8
- Ohlund, D., Elyada, E., & Tuveson, D. (2014). Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*, 211(8), 1503-1523. doi:10.1084/jem.20140692
- Ohlund, D., Handly-Santana, A., Biffi, G., Elyada, E., Almeida, A. S., Ponz-Sarvisse, M., . . . Tuveson, D. A. (2017). Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med*, 214(3), 579-596. doi:10.1084/jem.20162024
- Ohno, Y., Toyoshima, Y., Yurino, H., Monma, N., Xiang, H., Sumida, K., . . . Kitamura, H. (2017). Lack of interleukin-6 in the tumor microenvironment augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci*, 108(10), 1959-1966. doi:10.1111/cas.13330
- Ostman, A., & Augsten, M. (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev*, 19(1), 67-73. doi:10.1016/j.gde.2009.01.003
- Osuala, K. O., Sameni, M., Shah, S., Aggarwal, N., Simonait, M. L., Franco, O. E., . . . Sloane, B. F. (2015). Il-6 signaling between ductal carcinoma in situ cells and carcinoma-associated fibroblasts mediates tumor cell growth and migration. *BMC Cancer*, 15, 584. doi:10.1186/s12885-015-1576-3

- Paget, S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*, 8(2), 98-101. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2673568>
- Pakshir, P., Noskovicova, N., Lodyga, M., Son, D. O., Schuster, R., Goodwin, A., . . . Hinz, B. (2020). The myofibroblast at a glance. *J Cell Sci*, 133(13). doi:10.1242/jcs.227900
- Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., Gomez-Puerto, M. C., & Ten Dijke, P. (2017). TGF-beta-Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. *Int J Mol Sci*, 18(10). doi:10.3390/ijms18102157
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 252-264. doi:10.1038/nrc3239
- Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., . . . Weaver, V. M. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8(3), 241-254. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.010
- Peiris-Pages, M., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2015). Chemotherapy induces the cancer-associated fibroblast phenotype, activating paracrine Hedgehog-GLI signalling in breast cancer cells. *Oncotarget*, 6(13), 10728-10745. doi:10.18632/oncotarget.3828
- Pelon, F., Bourachot, B., Kieffer, Y., Magagna, I., Mermet-Meillon, F., Bonnet, I., . . . Mechta-Grigoriou, F. (2020). Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms. *Nat Commun*, 11(1), 404. doi:10.1038/s41467-019-14134-w
- Peng, D., Fu, M., Wang, M., Wei, Y., & Wei, X. (2022). Targeting TGF-beta signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Mol Cancer*, 21(1), 104. doi:10.1186/s12943-022-01569-x
- Perillo, N. L., Pace, K. E., Seilhamer, J. J., & Baum, L. G. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378(6558), 736-739. doi:10.1038/378736a0
- Perzelova, V., Varinska, L., Dvorankova, B., Szabo, P., Spurny, P., Valach, J., . . . Gal, P. (2014). Extracellular matrix of galectin-1-exposed dermal and tumor-associated fibroblasts favors growth of human umbilical vein endothelial cells in vitro: a short report. *Anticancer Res*, 34(8), 3991-3996. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075021>
- Pessolano, E., Belvedere, R., Bizzarro, V., Franco, P., Marco, I., Porta, A., . . . Petrella, A. (2018). Annexin A1 May Induce Pancreatic Cancer Progression as a Key Player of Extracellular Vesicles Effects as Evidenced in the In Vitro MIA PaCa-2 Model System. *Int J Mol Sci*, 19(12). doi:10.3390/ijms19123878
- Plava, J., Burikova, M., Cihova, M., Trnkova, L., Smolkova, B., Babal, P., . . . Miklikova, S. (2021). Chemotherapy-triggered changes in stromal compartment drive tumor invasiveness and progression of breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 40(1), 302. doi:10.1186/s13046-021-02087-2
- Plzak, J., Lacina, L., Chovanec, M., Dvorankova, B., Szabo, P., Cada, Z., & Smetana, K., Jr. (2010). Epithelial-stromal interaction in squamous cell epithelium-derived tumors: an important new player in the control of tumor biological properties. *Anticancer Res*, 30(2), 455-462. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20332454>
- Polyak, K., Haviv, I., & Campbell, I. G. (2009). Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet*, 25(1), 30-38. doi:10.1016/j.tig.2008.10.012
- Principe, D. R., Diaz, A. M., Torres, C., Mangan, R. J., DeCant, B., McKinney, R., . . . Grippo, P. J. (2017). TGFbeta engages MEK/ERK to differentially regulate benign and malignant pancreas cell function. *Oncogene*, 36(30), 4336-4348. doi:10.1038/onc.2016.500
- Puram, S. V., Tirosh, I., Parikh, A. S., Patel, A. P., Yizhak, K., Gillespie, S., . . . Bernstein, B. E. (2017). Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor

- Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell*, 171(7), 1611-1624 e1624.
doi:10.1016/j.cell.2017.10.044
- Qiu, W., Hu, M., Sridhar, A., Opeskin, K., Fox, S., Shipitsin, M., . . . Campbell, I. G. (2008). No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Nat Genet*, 40(5), 650-655. doi:10.1038/ng.117
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 19(11), 1423-1437. doi:10.1038/nm.3394
- Quaranta, V., Rainer, C., Nielsen, S. R., Raymant, M. L., Ahmed, M. S., Engle, D. D., . . . Schmid, M. C. (2018). Macrophage-Derived Granulin Drives Resistance to Immune Checkpoint Inhibition in Metastatic Pancreatic Cancer. *Cancer Res*, 78(15), 4253-4269. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3876
- Rhim, A. D., Oberstein, P. E., Thomas, D. H., Mirek, E. T., Palermo, C. F., Sastra, S. A., . . . Stanger, B. Z. (2014). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 25(6), 735-747. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.021
- Rhodes, J. M., & Simons, M. (2007). The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med*, 11(2), 176-205. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00031.x
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(1), a004978. doi:10.1101/cshperspect.a004978
- Ricklefs, F. L., Alayo, Q., Krenzlin, H., Mahmoud, A. B., Speranza, M. C., Nakashima, H., . . . Chiocca, E. A. (2018). Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles. *Sci Adv*, 4(3), eaar2766. doi:10.1126/sciadv.aar2766
- Richards, K. E., Zeleniak, A. E., Fishel, M. L., Wu, J., Littlepage, L. E., & Hill, R. (2017). Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 36(13), 1770-1778. doi:10.1038/onc.2016.353
- Riching, K. M., Cox, B. L., Salick, M. R., Pehlke, C., Riching, A. S., Ponik, S. M., . . . Keely, P. J. (2014). 3D collagen alignment limits protrusions to enhance breast cancer cell persistence. *Biophys J*, 107(11), 2546-2558. doi:10.1016/j.bpj.2014.10.035
- Rimal, R., Desai, P., Daware, R., Hosseinnejad, A., Prakash, J., Lammers, T., & Singh, S. (2022). Cancer-associated fibroblasts: Origin, function, imaging, and therapeutic targeting. *Adv Drug Deliv Rev*, 189, 114504. doi:10.1016/j.addr.2022.114504
- Ringuette Goulet, C., Bernard, G., Tremblay, S., Chabaud, S., Bolduc, S., & Pouliot, F. (2018). Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGFbeta Signaling. *Mol Cancer Res*, 16(7), 1196-1204. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0784
- Rognoni, E., & Watt, F. M. (2018). Skin Cell Heterogeneity in Development, Wound Healing, and Cancer. *Trends Cell Biol*, 28(9), 709-722. doi:10.1016/j.tcb.2018.05.002
- Rohringer, S., Schneider, K. H., Eder, G., Hager, P., Enayati, M., Kapeller, B., . . . Bergmeister, H. (2022). Chorion-derived extracellular matrix hydrogel and fibronectin surface coatings show similar beneficial effects on endothelialization of expanded polytetrafluorethylene vascular grafts. *Mater Today Bio*, 14, 100262. doi:10.1016/j.mtbio.2022.100262
- Rokavec, M., Oner, M. G., Li, H., Jackstadt, R., Jiang, L., Lodygin, D., . . . Hermeking, H. (2014). IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J Clin Invest*, 124(4), 1853-1867. doi:10.1172/JCI73531
- Romano, V., Ruocco, M. R., Carotenuto, P., Barbato, A., Venuta, A., Acampora, V., . . . Arcucci, A. (2022). Generation and Characterization of a Tumor Stromal Microenvironment and Analysis of Its Interplay with Breast Cancer Cells: An In Vitro

- Model to Study Breast Cancer-Associated Fibroblast Inactivation. *Int J Mol Sci*, 23(12). doi:10.3390/ijms23126875
- Ruffell, B., & Coussens, L. M. (2015). Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell*, 27(4), 462-472. doi:10.1016/j.ccell.2015.02.015
- Ruvolo, P. P. (2016). Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta*, 1863(3), 427-437. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.08.008
- Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., . . . Werb, Z. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*, 20(3), 174-186. doi:10.1038/s41568-019-0238-1
- Sanchez-Ruderisch, H., Detjen, K. M., Welzel, M., Andre, S., Fischer, C., Gabius, H. J., & Rosewicz, S. (2011). Galectin-1 sensitizes carcinoma cells to anoikis via the fibronectin receptor alpha5beta1-integrin. *Cell Death Differ*, 18(5), 806-816. doi:10.1038/cdd.2010.148
- Sato, H., Naito, T., Ishida, T., & Kawakami, J. (2016). Relationships between oxycodone pharmacokinetics, central symptoms, and serum interleukin-6 in cachectic cancer patients. *Eur J Clin Pharmacol*, 72(12), 1463-1470. doi:10.1007/s00228-016-2116-z
- Sato, S., Vasaikar, S., Eskaros, A., Kim, Y., Lewis, J. S., Zhang, B., . . . Weaver, A. M. (2019). EPHB2 carried on small extracellular vesicles induces tumor angiogenesis via activation of ephrin reverse signaling. *JCI Insight*, 4(23). doi:10.1172/jci.insight.132447
- Scully, S., Francescone, R., Faibish, M., Bentley, B., Taylor, S. L., Oh, D., . . . Shao, R. (2012). Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas. *J Neurosci*, 32(37), 12950-12960. doi:10.1523/JNEUROSCI.2017-12.2012
- Setiawan, T., Sari, I. N., Wijaya, Y. T., Julianto, N. M., Muhammad, J. A., Lee, H., . . . Kwon, H. Y. (2023). Cancer cachexia: molecular mechanisms and treatment strategies. *J Hematol Oncol*, 16(1), 54. doi:10.1186/s13045-023-01454-0
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78, 929-958. doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833
- Schaper, F., & Rose-John, S. (2015). Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26(5), 475-487. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.004
- Scheller, J., Garbers, C., & Rose-John, S. (2014). Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin Immunol*, 26(1), 2-12. doi:10.1016/j.smim.2013.11.002
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813(5), 878-888. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
- Schoumacher, M., Goldman, R. D., Louvard, D., & Vignjevic, D. M. (2010). Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol*, 189(3), 541-556. doi:10.1083/jcb.200909113
- Schwarzbauer, J. E. (1991). Identification of the fibronectin sequences required for assembly of a fibrillar matrix. *J Cell Biol*, 113(6), 1463-1473. doi:10.1083/jcb.113.6.1463
- Singh, P., Carraher, C., & Schwarzbauer, J. E. (2010). Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26, 397-419. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104020
- Smetana, K., Jr., Dvorankova, B., & Lacina, L. (2013). Phylogeny, regeneration, ageing and cancer: role of microenvironment and possibility of its therapeutic manipulation. *Folia Biol (Praha)*, 59(6), 207-216. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24485302>

- Smetana, K., Jr., Dvorankova, B., Lacina, L., Cada, Z., & Vonka, V. (2008). Human hair follicle and interfollicular keratinocyte reactivity to mouse HPV16-transformed cells: an in vitro study. *Oncol Rep*, *20*(1), 75-80. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18575721>
- Soini, Y., Tuhkanen, H., Sironen, R., Virtanen, I., Kataja, V., Auvinen, P., . . . Kosma, V. M. (2011). Transcription factors *zeb1*, *twist* and *snai1* in breast carcinoma. *BMC Cancer*, *11*, 73. doi:10.1186/1471-2407-11-73
- Solis, D., Bovin, N. V., Davis, A. P., Jimenez-Barbero, J., Romero, A., Roy, R., . . . Gabius, H. J. (2015). A guide into glycosciences: How chemistry, biochemistry and biology cooperate to crack the sugar code. *Biochim Biophys Acta*, *1850*(1), 186-235. doi:10.1016/j.bbagen.2014.03.016
- Song, S., Ji, B., Ramachandran, V., Wang, H., Hafley, M., Logsdon, C., & Bresalier, R. S. (2012). Overexpressed galectin-3 in pancreatic cancer induces cell proliferation and invasion by binding Ras and activating Ras signaling. *PLoS One*, *7*(8), e42699. doi:10.1371/journal.pone.0042699
- Song, T., Dou, C., Jia, Y., Tu, K., & Zheng, X. (2015). TIMP-1 activated carcinoma-associated fibroblasts inhibit tumor apoptosis by activating SDF1/CXCR4 signaling in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, *6*(14), 12061-12079. doi:10.18632/oncotarget.3616
- Spaeth, E. L., Labaff, A. M., Toole, B. P., Klopp, A., Andreeff, M., & Marini, F. C. (2013). Mesenchymal CD44 expression contributes to the acquisition of an activated fibroblast phenotype via TWIST activation in the tumor microenvironment. *Cancer Res*, *73*(17), 5347-5359. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0087
- Spanko, M., Strnadova, K., Pavlicek, A. J., Szabo, P., Kodet, O., Valach, J., . . . Lacina, L. (2021). IL-6 in the Ecosystem of Head and Neck Cancer: Possible Therapeutic Perspectives. *Int J Mol Sci*, *22*(20). doi:10.3390/ijms222011027
- Spill, F., Reynolds, D. S., Kamm, R. D., & Zaman, M. H. (2016). Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Curr Opin Biotechnol*, *40*, 41-48. doi:10.1016/j.copbio.2016.02.007
- Steele, N. G., Biffi, G., Kemp, S. B., Zhang, Y., Drouillard, D., Syu, L., . . . Pasca di Magliano, M. (2021). Inhibition of Hedgehog Signaling Alters Fibroblast Composition in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*, *27*(7), 2023-2037. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-3715
- Stefanius, K., Servage, K., de Souza Santos, M., Gray, H. F., Toombs, J. E., Chimalapati, S., . . . Orth, K. (2019). Human pancreatic cancer cell exosomes, but not human normal cell exosomes, act as an initiator in cell transformation. *Elife*, *8*. doi:10.7554/eLife.40226
- Strnad, H., Lacina, L., Kolar, M., Cada, Z., Vlcek, C., Dvorankova, B., . . . Smetana, K., Jr. (2010). Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. *Histochem Cell Biol*, *133*(2), 201-211. doi:10.1007/s00418-009-0661-6
- Strnadova, K., Pfeiferova, L., Prikryl, P., Dvorankova, B., Vlcek, E., Frydlova, J., . . . Lacina, L. (2022). Exosomes produced by melanoma cells significantly influence the biological properties of normal and cancer-associated fibroblasts. *Histochem Cell Biol*, *157*(2), 153-172. doi:10.1007/s00418-021-02052-2
- Sun, L. L., Lei, F. R., Jiang, X. D., Du, X. L., Xiao, L., Li, W. D., & Li, X. Q. (2020). LncRNA GUSBP5-AS promotes EPC migration and angiogenesis and deep vein thrombosis resolution by regulating FGF2 and MMP2/9 through the miR-223-3p/FOXO1/Akt pathway. *Aging (Albany NY)*, *12*(5), 4506-4526. doi:10.18632/aging.102904

- Szabo, P., Kolar, M., Dvorankova, B., Lacina, L., Stork, J., Vlcek, C., . . . Smetana, K., Jr. (2011). Mouse 3T3 fibroblasts under the influence of fibroblasts isolated from stroma of human basal cell carcinoma acquire properties of multipotent stem cells. *Biol Cell*, *103*(5), 233-248. doi:10.1042/BC20100113
- Takahashi, M., Kobayashi, H., Mizutani, Y., Hara, A., Iida, T., Miyai, Y., . . . Enomoto, A. (2021). Roles of the Mesenchymal Stromal/Stem Cell Marker Meflin/Isr in Cancer Fibrosis. *Front Cell Dev Biol*, *9*, 749924. doi:10.3389/fcell.2021.749924
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, *139*(5), 871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
- Thijssen, V. L., & Griffioen, A. W. (2014). Galectin-1 and -9 in angiogenesis: a sweet couple. *Glycobiology*, *24*(10), 915-920. doi:10.1093/glycob/cwu048
- Togo, S., Polanska, U. M., Horimoto, Y., & Orimo, A. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts are a promising therapeutic target. *Cancers (Basel)*, *5*(1), 149-169. doi:10.3390/cancers5010149
- Turati, M., Mousset, A., Issa, N., Turtoi, A., & Ronca, R. (2023). TGF-beta mediated drug resistance in solid cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, *71-72*, 54-65. doi:10.1016/j.cytogfr.2023.04.001
- Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*, *125*(2 Suppl 2), S24-32. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.016
- Uhler, C., & Shivashankar, G. V. (2017). Regulation of genome organization and gene expression by nuclear mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *18*(12), 717-727. doi:10.1038/nrm.2017.101
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., & Lotvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, *9*(6), 654-659. doi:10.1038/ncb1596
- Valach, J., Fik, Z., Strnad, H., Chovanec, M., Plzak, J., Cada, Z., . . . Kolar, M. (2012). Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *Int J Cancer*, *131*(11), 2499-2508. doi:10.1002/ijc.27550
- Vokurka, M., Lacina, L., Brabek, J., Kolar, M., Ng, Y. Z., & Smetana, K., Jr. (2022). Cancer-Associated Fibroblasts Influence the Biological Properties of Malignant Tumours via Paracrine Secretion and Exosome Production. *Int J Mol Sci*, *23*(2). doi:10.3390/ijms23020964
- Wan, S., Zhao, E., Kryczek, I., Vatan, L., Sadovskaya, A., Ludema, G., . . . Welling, T. H. (2014). Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal via STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells. *Gastroenterology*, *147*(6), 1393-1404. doi:10.1053/j.gastro.2014.08.039
- Wang, B., Du, R., Xiao, X., Deng, Z. L., Jian, D., Xie, H. F., & Li, J. (2017). MicroRNA-217 modulates human skin fibroblast senescence by directly targeting DNA methyltransferase 1. *Oncotarget*, *8*(20), 33475-33486. doi:10.18632/oncotarget.16509
- Wang, H., Wei, H., Wang, J., Li, L., Chen, A., & Li, Z. (2020). MicroRNA-181d-5p-Containing Exosomes Derived from CAFs Promote EMT by Regulating CDX2/HOXA5 in Breast Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*, *19*, 654-667. doi:10.1016/j.omtn.2019.11.024
- Wang, K., Zhu, X., Zhang, K., Yin, Y., Chen, Y., & Zhang, T. (2018). Interleukin-6 contributes to chemoresistance in MDA-MB-231 cells via targeting HIF-1alpha. *J Biochem Mol Toxicol*, *32*(3), e22039. doi:10.1002/jbt.22039
- Weizman, N., Krelin, Y., Shabtay-Orbach, A., Amit, M., Binenbaum, Y., Wong, R. J., & Gil, Z. (2014). Macrophages mediate gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma

- by upregulating cytidine deaminase. *Oncogene*, 33(29), 3812-3819.
doi:10.1038/onc.2013.357
- Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S., & Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest*, 123(8), 3190-3200.
doi:10.1172/JCI70212
- Wolf, J., Rose-John, S., & Garbers, C. (2014). Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*, 70(1), 11-20. doi:10.1016/j.cyto.2014.05.024
- Wu, C. H., Silvers, C. R., Messing, E. M., & Lee, Y. F. (2019). Bladder cancer extracellular vesicles drive tumorigenesis by inducing the unfolded protein response in endoplasmic reticulum of nonmalignant cells. *J Biol Chem*, 294(9), 3207-3218.
doi:10.1074/jbc.RA118.006682
- Wu, J., & Cai, J. (2021). Dilemma and Challenge of Immunotherapy for Pancreatic Cancer. *Dig Dis Sci*, 66(2), 359-368. doi:10.1007/s10620-020-06183-9
- Wu, Y., Yi, M., Niu, M., Mei, Q., & Wu, K. (2022). Myeloid-derived suppressor cells: an emerging target for anticancer immunotherapy. *Mol Cancer*, 21(1), 184.
doi:10.1186/s12943-022-01657-y
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 214(2), 199-210. doi:10.1002/path.2277
- Xiao, L., Li, X., Cao, P., Fei, W., Zhou, H., Tang, N., & Liu, Y. (2022). Interleukin-6 mediated inflammasome activation promotes oral squamous cell carcinoma progression via JAK2/STAT3/Sox4/NLRP3 signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, 41(1), 166. doi:10.1186/s13046-022-02376-4
- Xiong, Y., McDonald, L. T., Russell, D. L., Kelly, R. R., Wilson, K. R., Mehrotra, M., . . . LaRue, A. C. (2015). Hematopoietic stem cell-derived adipocytes and fibroblasts in the tumor microenvironment. *World J Stem Cells*, 7(2), 253-265.
doi:10.4252/wjsc.v7.i2.253
- Xu, Z., Chen, Y., Ma, L., Chen, Y., Liu, J., Guo, Y., . . . Shu, Y. (2022). Role of exosomal non-coding RNAs from tumor cells and tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. *Mol Ther*, 30(10), 3133-3154. doi:10.1016/j.ymthe.2022.01.046
- Yamada, K., Maishi, N., Akiyama, K., Towfik Alam, M., Ohga, N., Kawamoto, T., . . . Hida, K. (2015). CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property. *Int J Cancer*, 137(12), 2825-2836. doi:10.1002/ijc.29655
- Yamada, K., Uchiyama, A., Uehara, A., Perera, B., Ogino, S., Yokoyama, Y., . . . Motegi, S. (2016). MFG-E8 Drives Melanoma Growth by Stimulating Mesenchymal Stromal Cell-Induced Angiogenesis and M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Res*, 76(14), 4283-4292. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2812
- Yan, H., Shi, J., Dai, Y., Li, X., Wu, Y., Zhang, J., . . . Leng, J. (2022). Technique integration of single-cell RNA sequencing with spatially resolved transcriptomics in the tumor microenvironment. *Cancer Cell Int*, 22(1), 155. doi:10.1186/s12935-022-02580-4
- Yan, Y., Huang, L., Liu, Y., Yi, M., Chu, Q., Jiao, D., & Wu, K. (2022). Metabolic profiles of regulatory T cells and their adaptations to the tumor microenvironment: implications for antitumor immunity. *J Hematol Oncol*, 15(1), 104. doi:10.1186/s13045-022-01322-3
- Yang, H., Zhang, H., Ge, S., Ning, T., Bai, M., Li, J., . . . Ba, Y. (2018). Exosome-Derived miR-130a Activates Angiogenesis in Gastric Cancer by Targeting C-MYB in Vascular Endothelial Cells. *Mol Ther*, 26(10), 2466-2475. doi:10.1016/j.ymthe.2018.07.023
- Yang, Y., Li, C. W., Chan, L. C., Wei, Y., Hsu, J. M., Xia, W., . . . Hung, M. C. (2018). Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth. *Cell Res*, 28(8), 862-864.
doi:10.1038/s41422-018-0060-4

- Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., . . . Kishimoto, T. (1993). Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *EMBO J*, *12*(4), 1705-1712. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8467812>
- Yi, M., Li, T., Niu, M., Wu, Y., Zhao, Z., & Wu, K. (2022). TGF-beta: A novel predictor and target for anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Front Immunol*, *13*, 1061394. doi:10.3389/fimmu.2022.1061394
- Yin, M., Li, X., Tan, S., Zhou, H. J., Ji, W., Bellone, S., . . . Min, W. (2016). Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *J Clin Invest*, *126*(11), 4157-4173. doi:10.1172/JCI87252
- Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., . . . Kishimoto, T. (1996). Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(1), 407-411. doi:10.1073/pnas.93.1.407
- You, J., Li, M., Cao, L. M., Gu, Q. H., Deng, P. B., Tan, Y., & Hu, C. P. (2019). Snail1-dependent cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells via exosomes. *QJM*, *112*(8), 581-590. doi:10.1093/qjmed/hcz093
- Young, H. L., Rowling, E. J., Bugatti, M., Giurisato, E., Luheshi, N., Arozarena, I., . . . Hurlstone, A. (2017). An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. *J Exp Med*, *214*(6), 1691-1710. doi:10.1084/jem.20160855
- Yu, D., Li, Y., Wang, M., Gu, J., Xu, W., Cai, H., . . . Zhang, X. (2022). Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Mol Cancer*, *21*(1), 56. doi:10.1186/s12943-022-01509-9
- Yu, J., Du, W., Yan, F., Wang, Y., Li, H., Cao, S., . . . Ren, X. (2013). Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol*, *190*(7), 3783-3797. doi:10.4049/jimmunol.1201449
- Zhang, L., Li, Z., Skrzypczynska, K. M., Fang, Q., Zhang, W., O'Brien, S. A., . . . Yu, X. (2020). Single-Cell Analyses Inform Mechanisms of Myeloid-Targeted Therapies in Colon Cancer. *Cell*, *181*(2), 442-459 e429. doi:10.1016/j.cell.2020.03.048
- Zhang, Y., & Ertl, H. C. (2016). Depletion of FAP+ cells reduces immunosuppressive cells and improves metabolism and functions CD8+T cells within tumors. *Oncotarget*, *7*(17), 23282-23299. doi:10.18632/oncotarget.7818
- Zhang, Y. E. (2017). Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-beta Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *9*(2). doi:10.1101/cshperspect.a022129
- Zhang, Z., Fang, T., & Lv, Y. (2022). Prognostic and clinicopathological value of Slug protein expression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol*, *20*(1), 361. doi:10.1186/s12957-022-02825-6
- Zhao, J., Schlosser, H. A., Wang, Z., Qin, J., Li, J., Popp, F., . . . Zhao, Y. (2019). Tumor-Derived Extracellular Vesicles Inhibit Natural Killer Cell Function in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, *11*(6). doi:10.3390/cancers11060874
- Zhao, Q., Huang, L., Qin, G., Qiao, Y., Ren, F., Shen, C., . . . Zhang, Y. (2021). Cancer-associated fibroblasts induce monocytic myeloid-derived suppressor cell generation via IL-6/exosomal miR-21-activated STAT3 signaling to promote cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*, *518*, 35-48. doi:10.1016/j.canlet.2021.06.009

Zhu, Y., Yang, J., Xu, D., Gao, X. M., Zhang, Z., Hsu, J. L., . . . Qin, L. X. (2019). Disruption of tumour-associated macrophage trafficking by the osteopontin-induced colony-stimulating factor-1 signalling sensitises hepatocellular carcinoma to anti-PD-L1 blockade. *Gut*, 68(9), 1653-1666. doi:10.1136/gutjnl-2019-318419

Galectin Inhibitor (GR-MD-02) and Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02117362> (accessed on 19 October 2017)

UZIS: Novotvary 2019–2021 ČR, UZIS, Praha, České republika, str. 1-33: 2023

9 Soubor publikovaných prací

1. Dvorankova, B., Smetana, K., Jr., Rihova, B., Kucera, J., Mateu, R., & Szabo, P. (2015). Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice. *Histochem Cell Biol*, 143(5), 463-469. doi:10.1007/s00418-014-1293-z

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25387587/>

2. Novak, S., Kolar, M., Szabo, A., Vernerova, Z., Lacina, L., Strnad, H., . . . Szabo, P. (2021). Desmoplastic Crosstalk in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Is Reflected by Different Responses of Panc-1, MIAPaCa-2, PaTu-8902, and CAPAN-2 Cell Lines to Cancer-associated/Normal Fibroblasts. *Cancer Genomics Proteomics*, 18(3), 221-243. doi:10.21873/cgp.20254

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33893076/>

3. Urban, L., Novak, S., Coma, M., Dvorankova, B., Lacina, L., Sachova, J., . . . Szabo, P. (2024). Unravelling heterogeneous effects of cancer-associated fibroblasts on poor prognosis markers in breast cancer EM-G3 cell line: In vitro-targeted treatment (anti-IL-6, anti-VEGF-A, anti-MFGE8) based on transcriptomic profiling. *Oncol Rep*, 51(1). doi:10.3892/or.2023.8662

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37975220/>

4. Mandys, V., Popov, A., Gurlich, R., Havranek, J., Pfeiferova, L., Kolar, M., . . . Szabo, P. (2023). Expression of Selected miRNAs in Normal and Cancer-Associated Fibroblasts and in BxPc3 and MIA PaCa-2 Cell Lines of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci*, 24(4). doi:10.3390/ijms24043617

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36835029/>

5. Urban, L., Coma, M., Lacina, L., Szabo, P., Sabova, J., Urban, T., . . . Gal, P. (2023). Heterogeneous response to TGF-beta1/3 isoforms in fibroblasts of different origins: implications for wound healing and tumorigenesis. *Histochem Cell Biol*, 160(6), 541-554. doi:10.1007/s00418-023-02221-5

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37707642/>