

A) PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY

1. Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku

Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku (Head and Neck Squamous Cell Carcinomas, **HNSCC**) jsou zhoubné novotvary epitelů sliznic horní části dýchacího a trávicího systému. Tvoří 85-90% všech karcinomů hlavy a krku. Každým rokem je celosvětově registrováno na 500 000 nových případů a představují tak kolem 5% z nově diagnostikovaných malignit (Jemal et al., 2003).

Z biologického hlediska je pro ně charakteristická značná lokální agresivita, tendence k zakládání regionálních lymfatických a méně často vzdálených metastáz, sklon k časným lokálním a regionálním recidivám a vysoká frekvence výskytu mnohočetných nádorů. Jsou-li včas diagnostikovány a odpovídajícím způsobem léčeny, jsou šance na přežití a vyléčení poměrně vysoké. Bohužel značný podíl pacientů přichází až v pokročilém stádiu. Navzdory pokrokům v diagnostice a léčbě v posledních třech dekadách nedošlo k výraznému zlepšení prognózy. A tak i nadále patří mezi onemocnění s největší mortalitou vůbec.

Navzdory diagnostickým i terapeutickým pokrokům zůstává prognóza HNSCC pacientů vážná. Prognostické informace jsou nezbytné pro zhodnocení a výběr optimálního léčebného postupu s cílem dosáhnout co nejvyšší kvality života a nejdelšího přežití. Je nutné zachování dostatečné radikality léčby a zároveň ochrana před zbytečně agresivními postupy, které zhoršují funkční výsledky (Chiesa et al., 1999). Na prognostické markery je možno nahlížet z různého hlediska a podle toho je též klasifikovat (faktory rizikové, diagnostické, prognostické

v užším slova smyslu, prediktivní). Jiný náhled představuje jejich dělení na faktory týkající se pacienta a faktory popisující vlastnosti nádoru.

V současnosti je enormní pozornost věnována molekulárnímu podkladu nádorových onemocnění, včetně HNSCC. Nové poznatky napomáhají porozumět dějům spojeným s jejich vznikem a progresí, zpřesňují informace o biologickém chování a prognóze a některé ve svém důsledku přispívají k zavádění nových, efektivnějších léčebných postupů. Hlavními studovanými parametry jsou markery chromozomální/genové a jejich proteinové produkty (Califano et al., 2003). V současnosti však začíná být zřejmé, že ke vzniku a progresi zhoubných nádorů přispívají též kvantitativní a kvalitativní aberace sacharidových molekul (buněčných glykokonjugátů) a je rozpoznávajících proteinových molekul (lektinů). Na tuto doposud méně studovanou část buněčné a nádorové biologie je zaměřena tato práce.

2. Glykobiologie

Glykobiologie je jednou z nejvíce se rozvíjejících podoborů buněčné biologie. Je zaměřena na studium sacharidů a jejich konjugátů, je rozpoznávajících molekul lektinů, a jejich úlohy za fyziologických a patologických stavů. Pod pojem **glykofenotyp** můžeme zahrnout soubor glykobiologických parametrů (sacharidů a lektinů) zjišťovaných v buňkách či tkáni.

Sacharidové molekuly jsou specificky rozpoznávány řadou proteinů s různými biologickými funkcemi (enzymy, protilátky, transportní proteiny a lektiny). **Lektiny** jsou proteiny, které jsou schopné interagovat a vázat sacharidové struktury, které nejsou enzymy, protilátkami či proteiny akumulujícími volné mono- a disacharidy (transportní nebo

chemotaktické receptory) (Gabiuss et al., 2002). Z funkčního hlediska je nejdůležitější součástí molekuly každého lektinu, doména rozpoznávající sacharidy (Carbohydrate Recognition Domain, CRD), která určuje specifitu biologické aktivity.

Význam rostlinných lektinů pro glykobiologii spočívá v možnosti užití jejich specifické vazby k vybranému typu oligosacharidu. S jejich užitím lze efektivně zkoumat glykokonjugáty po kvalitativní i kvantitativní stránce.

Živočišné lektiny (endogenní) rozpoznávají a váží vlastní (endogenní) glykokonjugáty. Na základě strukturního uspořádání rozlišujeme pět tříd živočišných lektinů: (1) C-lektiny, (2) I-lektiny, (3) galektiny (dříve S-lektiny), (4) P-lektiny a (5) pentraxiny. Každá z rodin je dále klasifikována do podskupin.

Galektiny jsou rodinou vývojově vysoce konzervativních živočišných lektinů. Pro zařazení mezi galektiny musí lektin splňovat tato kritéria: (1) vykazovat vazebnou afinitu k β -galaktosidům, (2) v CRD obsahovat specifické konzervativní sekvenční elementy pro galektiny charakteristické (Barondes et al., 1994). U savců bylo doposud popsáno čtrnáct členů této rodiny a klasifikováno do podrodin dle počtu a organizace CRDs (prototypní, tandemově se opakující a chimérní).

S galektiny se setkáváme extracelulárně (na buněčném povrchu či v extracelulární matrix), v buněčném jádře, v submembranosní lokalizaci a v cytosolu. Mají charakteristiky cytoplazmatických proteinů. Chybí jim signální sekreční sekvence a k jejich extracelulárnímu transportu dochází mechanismy odlišnými od vezikulami zprostředkované exocytózy. K interakci galektinů s glykoligandy není na rozdíl od jiných typů endogenních lektinů nutná přítomnost Ca^{2+} iontů.

Galektiny jsou zapojeny do různých biologických procesů vyžadujících rozpoznávání sacharidových motivů: (1) adheze buněk (interakce buněk navzájem a interakce buněk s komponentami extracelulární matrix), (2) regulace buněčné proliferace a apoptozy, (3) sestřih pre-mRNA, (4) úloha v imunitních procesech (Liu et al., 2002).

Langerin (CD207) obsahuje ve své struktuře jednu CRD, pomocí které rozpoznává a váže manosu obsahující glykokonjugáty. Náleží do jedné z podrodin C-lektinů (manosové receptory). Jeho exprese je charakteristická pro specifický typ dendritických buněk – Langerhansovy buňky, které se účastní prezentace antigenů (Antigen Presenting Cells, APCs) (Hunger et al., 2004).

Manosylované antigeny jsou v porovnání s nemanosylovanými APCs prezentovány mnohem efektivněji. Při prezentaci manosylovaných antigenů sehrává hlavní roli **manosový receptor** (CD206) (Linehan et al., 1999). S tímto C-lektinem se setkáváme u řady nematurovaných dendritických buněk a makrofágů, nikoliv však u Langerhansových buněk.

Glykobiologické parametry v nádorové biologii. Některé z charakteristických rysů nádorových buněk (invazivní chování, metastatická aktivita, únik před imunitními mechanizmy jsou spojeny s kvalitativními či kvantitativními odchylkami oligosacharidových sekvencí buněčného povrchu (Dall'Olivo a Chiricolo, 2001). K nejčastějším alteracím patří zvýšená exprese hypersialylovaných N-vázaných oligosacharidových řetězců. Exprese α 2,3/6-NeuNAc glykoepitopů je v lidských tkáních pod vlivem onkofetální regulace (Holíková, et al., 2002). Sialylované epitopy mohou být rozpoznávány specifickými lektinovými receptory. NeuNAc též vykazují maskující efekt na rozpoznávání subterminálně lokalizovaných galaktosových reziduí

glykokonjugátů některými z galektinů (galektin-3) (Hirabayashi et al., 2002).

Řada studií též ukazuje na vztah některých z lektinů k malignímu chování rozličných nádorů. Velká pozornost je věnována především galektinům. Obdobně jako v netransformovaných buňkách tkání jsou jejich aktivity rozmanité a závislé na tkáni původu (Danguy et al., 2002;).

Počet prací zaměřených na **glykobiologické parametry dlaždicobuněčných epitelů a karcinomů** je v současnosti omezený. Jsou užívány techniky lektinové histochemie (značené rostlinné a rekombinantní endogenní lektiny) a imunohistochemie k popisu exprese endogenních lektinů a jimi rozpoznávaných glykoligandů (Smetana et al., 2003).

B) CÍLE PRÁCE

Disertační práce je zaměřena na glykobiologické aspekty (glykofenotyp) dlaždicobuněčných epitelů a karcinomů hlavy a krku, epidermis a buněčných kultur keratinocytů. Cíle práce lze shrnout do následujících bodů:

- **Stanovení exprese endogenních lektinů, jejich vazebných míst a užití rostlinných lektinů pro hodnocení exprese jimi rozpoznávaných glykokonjugátů.**
- **Zhodnocení významu glykobiologických parametrů a jejich zavedení do buněčné a nádorové biologie dlaždicobuněčných epitelů.**

C) METODIKA

1. Studované materiály

- vzorky normálních dlaždicobuněčných epitelů sliznic horní části dýchacího a trávicího systému (dutina ústní: spodina ústní, orální část jazyka; orofarynx: kořen jazyka, patrová mandle; hypofarynx; larynx: hlasivka)
- vzorky dlaždicobuněčných karcinomů a jejich regionálních lymfatických metastáz (dutina ústní; orofarynx: patrová mandle, kořen jazyka; hypofarynx; larynx)
- buňky linie FaDu - dlaždicobuněčného karcinomu hypofaryngu
- dlaždicobuněčné epitely lidské i zvířecí (prasečí dospělé a fetální) epidermis, kožních nádorů (basocelulárních karcinomů, trichoepiteliom)

- buňky kultur lidských a prasečích folikulárních a interfolikulárních keratinocytů
- kultury stromálních buněk kostní dřeně, 3T3 myších fibroblastů a linií gliomů: Hs683, T98G, U87, U373
- bezbuněčný systém: syntetické kuličky pokryté molekulami histonu H3

2. Užití metody a studované znaky

V práci byly využívány cyto- a histochemické techniky:

- imunocyto- a imunohistochemie: sloužily k detekci příslušných endogenních lektinů či jiných sledovaných proteinových markerů
- lektinová cyto- a histochemie - s užitím rostlinných a značených endogenních lektinů sloužila k detekci jejich sacharidových ligandů odpovídající vazebným místům pro dané sondy
- reverzní lektinová cyto- a histochemie - užívající neoglykokonjugáty k průkazu endogenních vazebných míst pro užití sacharidové znaky

Uvedené techniky byly užity při zpracování zmrazených řezů z odebraných biopsií a buněk tkáňových kultu. Zpracování zmrazených vzorků je doporučováno pro lektinové histochemické studie, neboť minimalizuje ztrátu a alterace zkoumaných sacharidových skupin v průběhu zpracování tkání (Kannan et al., 1997). K vizualizaci proběhlých histochemických reakcí byly užity fluorescenční metody pro jejich výhodu možnosti dvojitého a vícenásobného simultánního značení. K počítačové analýze snímaného obrazu byl užíván systém LUCIA GF Magic 4.31, který dovoluje podrobnější zpracování získaného obrazu

včetně měření profilu fluorescenčních intenzit. Ke statistickému zpracování dat bylo užito programu STATISTICA 6.0.

V rámci imunocyto- a imunohistochemických reakcí byly studovány tyto proteinové znaky:

- cytokeratiny: 8, 10, 14, 19, 20, cytokeratin peptid pCK 37, panel cytokeratinů s výjimkou cytokeratinu 1, 8, 18 (protilátka CK1/LP34)
- proliferační marker pKi67, transkripční faktor Δ Np63 α , splicing faktor SC35
- β 1-integrin (CD29), desmoplakiny 1 a 2, E-cadherin, β -katenin, transferinový receptor (CD71)
- endogenní lektiny: galektin-1, galektin-2, galektin-3, galektin-7, langerin, 175 kDa-manosový receptor, heparin vážící lektin

V rámci imunocyto- a imunohistochemických reakcí byly užity tyto rostlinné a rekombinantní endogenní lektiny:

- *Maackia amurensis* agglutinin (isolektin typ II) (MAA)
- *Sambucus nigra* agglutinin (SNA)
- Galektiny -1, -2, -3, -7

V rámci reverzních imunocyto- a imunohistochemických reakcí byly užity tyto biotinem značené neoglykokonjugáty:

- glykosaminoglykany (heparin, heparan-sulfát, chondroitin-sulfát, hyaluronová kyselina, *Fucus vesiculosus* fukoidan)

D) VÝSLEDKY A JEJICH ZHODNOCENÍ

1. Exprese N-acetylneuraminových epitopů (α 2,3/ α 2,6–NeuNAc)

Dlaždicobuněčné epitely:

- Na základě studovaných proteinových a glykobiologických markerů lze definovat normálně se vyskytující fenotypy buněk dlaždicobuněčných epitelů sliznic horní části dýchacího a trávicího traktu:

(1) mitoticky aktivní buňky stratum bazale: pKi67⁺ Δ Np63 α ⁺ pCK37⁺ α 2,6-NeuNAc⁺

(2) postmitotické, terminálně diferencované buňky suprabazálních vrstev: CK10⁺ α 2,3-NeuNAc⁺

(3) postmitotické buňky stratum bazale (buňky na počátku řetězce diferenciacce): pCK37⁺ α 2,3-NeuNAc⁺

Dlaždicobuněčné karcinomy:

- Exprese α 2,3-NeuNAc obsahujících glykoepitopů je typická pro morfologicky dobře vyztřálé okrsky nádorů. Lze říci, že naprostá většina dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku je schopna exprimovat tento diferenciacční marker.

- Exprese α 2,6-NeuNAc obsahujících glykokonjugátů je typická pro morfologicky méně diferencované buňky v nejinvazivnějších částech nádorových čepů.

- Ve tkáni karcinomů se vedle fenotypů běžně pozorovaných u mitoticky aktivních buněk stratum bazale (tedy: pKi67⁺ Δ Np63 α ⁺ pCK37⁺ α 2,6-NeuNAc⁺) a u postmitotických, terminálně diferencovaných buněk suprabazálních vrstev (tedy: CK10⁺ α 2,3-NeuNAc⁺) setkáváme s buňkami s atypickým fenotypem, jež převažují v populaci proliferačně aktivních buněk: pCK37⁺ pKi67⁺ Δ Np63 α ⁺ α 2,3-NeuNAc⁺ α 2,6-NeuNAc⁺, která je bohatě zastoupena ve tkáni lymfatických metastáz.

- Ve vyšetřovaných verkozních karcinomech nebyla exprese $\alpha 2,3/2,6$ -NeuNAc epitopů zjištěna.

N-acetylneuraminovou kyselinu v terminálních pozicích obsahující oligosacharidové řetězce jsou běžnou součástí přirozených glykokonjugátů buněčného povrchu. Exprese $\alpha 2,3/2,6$ -NeuNAc vykazuje v řadě tkání charakter onkofetální regulace (Holíková et al., 2002). Kvalitativní a kvantitativní aberace těchto struktur může přispívat k některými charakteristikami biologického chování HNSCC.

2. Exprese galektin-3-reaktivních glykoepitopů

Dlaždicobuněčné epitely:

- Buňky exprimující na svém povrchu galektin-3-reaktivní glykoepitopy zjišťujeme v suprabazálních vrstvách epitelů. Je pro ně charakteristická absence exprese jaderných proteinů pKi67 a $\Delta Np63\alpha$, intermediálních filament obsahujících cytokeratin peptid 37, a naopak bohatá exprese cytokeratinu 10.

Dlaždicobuněčné karcinomy:

- Ve tkáních primárních a regionálně metastatických HNSCC byla zjištěna variabilní dostupnost galektinem-3 rozpoznávaných glykokonjugátů buněčného povrchu. Hojně u verukozních karcinomů a dalších dobře diferencovaných, keratinizujících karcinomech. V nádorech nerohovějících, špatně diferencovaných byla vzácná.
- Exprese galektin-3-reaktivních epitopů koreluje s příznivějším histopatologickým gradingem, rohověním a absencí regionálních lymfatických metastáz.
- Tkáňová reaktivita pro galektin-3 korelovala s účinností standardně užívaného léčebného postupu. Při multiparametrové analýze

sledovaných znaků dosahovala galektin-3-reaktivita nezávislého prognostického vztahu k celkovému přežití i přežití bez známek relapsu onemocnění.

Vzhledem k definovanému vztahu mezi přítomností galektin-3-reaktivních epitopů a biologickým/klinicko-patologickým charakteristikám, je možné glykobiologické profilování zařadit mezi výhledové prediktivní prognostické markery HNSCC.

3. Galektin-7-dependentní parametry

Dlaždicobuněčné epitel, basocelulární karcinom, trichoepiteliom, dlaždicobuněčné karcinomy a kultura keratinocytů:

- Exprese galektinu-7 byla detekována v buňkách všech vrstev dlaždicobuněčných epitelů.
- Ve tkáních basocelulárních karcinomů nebyla exprese tohoto endogenního lektinu pozorována. V trichoepiteliomu byla exprese snížena.
- Ve dlaždicobuněčných karcinomech hrtanu a kůže byla pozorována významná redukce exprese galektinu-7.
- V kulturách keratinocytů byla exprese galektinu-7 pozorována ve stádiu formace mnohvrstevných kolonií ve vyšších vrstvách mnohvrstevných oblastí.
- Přítomnost galektin-7-reaktivních glykoepitopů nebyla ve studovaných tkáních a kulturách zjištěna.

Galektin-7 je charakteristickým galektinem vrstevnatých dlaždicobuněčných epitelů. Pozorovaná absence exprese galektinu-7 v jednovrstevné fázi růstu kultury keratinocytů a epiteliálních malignitách

může odrážet neschopnost vytvářet mnohvrstevnou strukturu typickou pro netransformované dlaždicobuněčné epitely (Magnaldo et al., 1998).

4. Langerin a vazba manosy

Epidermis a basocelulární karcinomy:

- Langerin-pozitivní buňky (Langerhansovy buňky) byly ve zdravé kůži detekovány v oblasti epidermis. Dendritické buňky exprimující 175 kDa-manosový receptor byly lokalizovány v dermis. V oblasti dermoepidermální junkce byly v omezeném počtu pozorovány buňky vykazující přítomnost obou znaků.
- Langerhansovy buňky byly pozorovány ve tkáni 2/3 studovaných basocelulárních karcinomů. Buňky exprimující 175 kDa-manosový receptor byly pozorovány v oblasti stroma/dermis v sousedství čepů karcinomů. V 1/3 případů byly detekovány Langerin-pozitivní buňky mimo oblast karcinomů, které byly zpravidla v těsném kontaktu s buňkami exprimujícími 175 kDa-manosový receptor.

V porovnání s netransformovanou epidermis byl ve tkáních basocelulárních karcinomů pozorován snížený počet Langerin-pozitivních buněk, jakož i ektopická lokalizace. Kolokalizace signálu buněk v oblasti dermoepidermální junkce a dermis/stromatu karcinomů pro 175 kDa-manosový receptor a Langerin poukazuje na jejich význam v imunitních pochodech zde se odehrávajících. Jejich selhání pak může výrazně ovlivňovat vznik a progresi nádorového bujení.

5. Fenotypová charakterizace keratinocytů vlasového folikulu, interfolikulární epidermis a basocelulárních karcinomů

- Exprese galektinu-1 a galektin-1-reaktivních glykoepitopů je zjišťována v cytoplazmě buněk všech vrstev interfolikulární epidermis a pochev vlasových folikulů.
- Velikost keratinocytů exprimujících cytokeratin 19 v oblasti „bulge“ a cytokeratin 19-negativních buněk stratum bazale interfolikulární epidermis byla prakticky shodná.
- Buňky stratum bazale exprimují cytokeratin peptid 37 a keratinocyty suprabazálních vrstev cytokeratin 10. Cytoplazmatická reaktivita protilátky CK1/LP34 je zjišťována v keratinocytech všech vrstev epidermis.
- Exprese galektinu-3 a galektin-3-reaktivních glykoepitopů je omezena na oblast buněčného povrchu keratinocytů především suprabazálních vrstev.
- Keratinocyty basocelulárních karcinomů vykazují cytoplazmatickou expresi galektinu-1 i galektin-1-reaktivních glykoligandů. Přítomnost galektin-3-reaktivních glykoepitopů ve vzorcích karcinomů pozorována nebyla.

6. Fenotypové charakteristiky kultivovaných keratinocytů

Fenotypová charakterizace folikulárních keratinocytů, interfolikulární epidermis a basocelulárních karcinomů:

- Lidské folikulární keratinocyty při třídenní kultivaci vykazují bohatou jadernou vazbu a cytoplazmatickou reaktivitu pro galektin-1. 10-30% těchto buněk exprimuje intermediární filamenta s cytokeratinem 19 a v jádře galektin-1-reaktivní epitopy.

- V kultuře prasečích folikulárních keratinocytů pěstovaných v přítomnosti 3T3 fibroblastového „feederu“ tvoří buňky kolonie podél celé délky vlasového folikulu. Kolonie těchto buněk jsou v porovnání s koloniemi interfolikulárních keratinocytů výrazně menší.
- Folikulární keratinocyty jednotlivých kolonií vykazují uniformní fenotyp, ve vztahu ke galektin-1-dependentním parametrům. V případech, kdy v buňkách kolonií nebyly intranukleárně detekovány ligandy galektinu-1, byla prokázána jeho jaderná exprese. Exprese galektin-1-reaktivních glykoepitopů koreluje s expresí $\Delta Np63\alpha$.
- Při kultivaci folikulárních keratinocytů v mediu bez „feederu“ vytvářejí buňky sférické útvary o 30-100 buňkách v počtu cca 3-4 na jeden vlasový folikul. Buňky vykazují cytoplazmatickou reaktivitu s protilátkou CK1/LP34 a s galektinem-1. Přibližně 1/3 sféroidů je tvořena keratinocyty s povrchovou reaktivitou s lektinem MAA a 1/2 sféroidů pak vykazuje analogní reaktivitu s lektinem SNA. 1/3 sféroidů je schopna adherovat k povrchu prekolonizovanému buňkami „feederu“ a dát vznik normálně rostoucím koloniím. Po adhezi vykazují buňky expresi $\Delta Np63\alpha$ a intranukleárních galektin-1-reaktivních epitopů.

Vztah fenotypu buněk blízkých kmenovým k délce kultivace a

vliv udržování interfolikulárních keratinocytů v suspenzi na kinetiku růstu:

- Optimálního vycestování folikulárních keratinocytů z do dermis invaginovaných vlasových folikulů je dosaženo kolem 3. dne kultivace. Buňky v této fázi vykazují intenzivní jadernou expresi galektin-1-reaktivních epitopů. Exprese cytokeratinu 19 je zjišťována u 25% a cytokeratinu peptidu 37 u cca 3/4 buněk. Exprese cytokeratinu peptidu 37 je prakticky homogenní. Při dalším prodloužení kultivace (7 dní) cytokeratin 19 pozitivních a galektin-1-jaderně reaktivních buněk ubývá.

- Exprese cytokeratinu peptidu 37 je zjišťována v naprosté většině buněk za podmínek krátkodobé i dlouhodobé kultivace. Keratinocyty neexprimují cytokeratiny 10 a 20.
- Morfologicky dlouhodobě kultivované a opakovaně pasážované cytokeratin 19 pozitivní buňky vykazují známky terminální diferenciace (keratohyalinová granula) a nezdědka též degenerace (vakuolizace cytoplazmy – především interfolikulární buňky).
- V podmínkách dlouhodobého udržování buněk v suspenzi exprese β 1-integrinu perzistuje. Počet β 1-integrin pozitivních keratinocytů s délkou inkubace v suspenzi klesá, ale růstový potenciál kultury při znovunasazení zůstává nezměněn.

Multiparametrová analýza kultivovaných FaDu buněk a prasečích folikulárních keratinocytů:

- V subkonfluentní fázi růstu kultury FaDu buňky exprimují v cytoplazmě β -katenin. Jaderná akumulace β -kateninu není zjišťována. Je též sledována exprese β 1-integrinových řetězců. Exprese pKi67, na rozdíl od Δ Np63 α (nebyl detekovatelný), není ovlivněna délkou kultivace. Exprese transferinového receptoru (CD71) není pozorována. Galektin-1 je pozorován v oblasti jader a v extranukleolární lokalizaci, kde kolokalizuje s expresí „splicing“ faktoru SC35 a v cytoplazmě. Přítomnost galektin-1-reaktivních glykoepitopů není zjišťována. Je zjišťována bohatá exprese galektinu-2 v jádrech. Galektin-3 je detekován v oblasti jádra a cytoplazmy, a galektin-3-reaktivní epitopy v cytoplazmě. Exprese galektinu-7 není prokazatelná.
- V konfluentní fázi růstu jsou u FaDu buněk zjišťovány znaky typické při vytváření intercelulárních kontaktů (desmoplakiny 1 a 2, E-kadherin, membránový β -katenin). S utvářením souvislého porostu buněk mizí

exprese cytokeratinů 8 a 19, a naopak se začíná objevovat exprese cytokeratinu 14. Buňky exprimující cytokeratin 14 vykazují homogenní morfologii a jsou uspořádány do okrsků obklopených buňkami tento cytokeratin neexprimujícími. Počet buněk exprimujících galektin-1 v jádře a cytoplasmě s utvářením konfluentního porostu a mnohvrstevných oblastí klesá, naopak je prokazatelný v oblastech intercelulárních kontaktů. Přítomnost galektin-1-reaktivních glykoepitopů není zjišťována. U buněk subkonfluentních na počátku utváření souvislého porostu a v oblastech s mnohvrstevným uspořádáním je sledován galektin-2 v jádře, cytoplasmě a místech v intercelulárních kontaktů. Reaktivita galektinu-2 je pozorována v jádře i cytoplasmě, přičemž exprese reaktivních epitopů klesá s délkou kultivace. Galektin-3 je zjišťován v oblastech intercelulárních kontaktů. Jaderná reaktivita není v této fázi zjišťována a s formací mnohvrstevného porostu je pozorována bohatá exprese galektin-3-reaktivních glykoligandů v oblastech utváření intercelulárních kontaktů.

- Prasečí keratinocyty vykazují v sub- i konfluentní fázi růstu epiteloidní morfologii jakož i citlivost ke kontaktní inhibici. Expresse galektinu-1 je pozorována v buněčných jádrech (prominentně v jadércích) a perinukleární cytoplasmě v subkonfluentním a časném konfluentním stádiu. Cytoplazmatická exprese galektinu-3 je detekována pouze u proliferujících buněk. Přítomnost galektin-1-reaktivních ligandů v jádře a cytoplasmě je pozorována ve stádiu subkonfluentním a na počátku utváření splývajícího porostu. Bohatá exprese galektin-3-reaktivních epitopů je opět v místech utváření mezibuněčných kontaktů buněk na periferii velkých kolonií v konfluentním stádiu růstu, naopak buňky v centru kolonií jsou areaktivní.

Z hlediska současného pojetí je na nádorová onemocnění nahlíženo jako na onemocnění kmenových buněk (Sell, 2004). Doposud však nemáme v rukou znaky je bezpečně identifikující. Z tohoto hlediska se zdají být slibným studie současně vyšetřující větší počet z potenciálních markerů.

Kultivované buňky spinocelulárního karcinomu (FaDu) exprimovaly na počátku kultivace řadu znaků, které byly popsány u buněk kmenových. V dalším průběhu růstu kultury tyto buňky „kmenové znaky“ ztrácely a získávaly charakter diferencovaných epitelových buněk.

7. Jaderná vazba glykosaminoglykanů

- Ve všech buňkách zdravých i maligně transformovaných epitelů sliznic horní části dýchacího a trávicího systému je zjišťována specifická jaderná vazba heparinu, kterou bylo možné zcela inhibovat preinkubací tkáně s nezačleněným heparinem. V epidermis a z ní vycházejících nádorech je též zjišťována jaderná vazba fukoidanu.
- U všech studovaných buněčných typů (epidermální keratinocyty, stromální buňky kostní dřeně, 3T3 myší fibroblasty a linie gliomů: Hs683, U87, U373) s výjimkou linie gliomu T98G je pozorována jaderná vazba heparinu. U T98G linie gliomu je na rozdíl od ostatních pozorována jaderná vazba chondroitin-sulfátu. U všech studovaných buněčných typů s výjimkou stromálních buněk kostní dřeně je zjišťována jaderná vazba fukoidanu.
- Extrakce histonů H2A, H3 a H4 vede ke kompletní inhibici zjišťovaných jaderných interakcí.
- U keratinocytů je pozorována intenzivní internalizace heparinu do buněčných jadérek buněk vytvářejících malé kolonie. Jev není ovlivněn přidáním FGF-2.

- V bezbuněčném systému syntetických kuliček pokrytých molekulami histonu H3 vede přidání značeného heparinu k uvolnění molekul DNA z vazby k histonovému proteinu, a naopak navázání heparinových molekul.

Zde prezentované výsledky ukazují na pravděpodobnou existenci odlišných transportních mechanismů či existenci odlišných vazebných partnerů glykosaminoglykanů u jednotlivých buněčných typů. Dále též nasvědčují úloze glykosaminoglykanů na ovlivnění interakcí mezi DNA a histony. Tyto děje by mohli sehrávat významnou úlohu v průběhu regulace organizace struktury chromatinu (Watson et al., 1999).

E) ZÁVĚR

Tato disertační práce se zabývá některými z glykobiologických aspektů dlaždicobuněčných epitelů sliznic horní části dýchacího a trávicího traktu a kůže. Značná část práce byla věnována problematice endogenních lektinů, galektinů a sialylace. Informace, které jsme studiem získali, se zdají být velmi slibné na poli buněčné i nádorové biologie. Z hlediska potenciálního klinického uplatnění se zdá být velmi přínosné další studium galektin-dependentních parametrů ve vztahu ke kmenovým buňkám dlaždicobuněčných epitelů, jakož i jejich potenciálního uplatnění při hodnocení biologického chování nádorů. Vyšetřování cukerných epitopů, vedle parametrů proteinových a molekulárně genetických, může na poli onkologie podávat cenné prognostické informace. Část práce se též věnovala problematice transportu glykosaminoglykanů do buněčného jádra. Informace o jejím významu a fyziologické úloze těchto molekul pro procesy zde se odehrávající jsou zatím omezené a bezesporu si zaslouží další pozornost.

F) LITERATURA

Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem.* 1994;269:20807-10.

Califano JA, Sidransky D. *Molecular Biology of Head and Neck Cancer.* In: Harrison LB et al., eds. *Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach.* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2003, 973-84.

Dall'Olio F, Chiricolo M. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J.* 2001;18:841-50.

Danguy A, Camby I, Kiss R. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572:285-93.

Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Siebert HC. The sugar code: functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572:165-77.

Holiková Z, Hrdličková-Cela E, Plzák J, Smetana K Jr, Betka J, Dvořánková B, Esner M, Wasano K, Andre S, Kaltner H, Motlík J, Hercogová J, Kodet R, Gabius HJ. Defining the glycophenotype of squamous epithelia using plant and mammalian lectins. Differentiation-dependent expression of alpha2,6- and alpha2,3-linked N-acetylneuraminic acid in squamous epithelia and carcinomas, and its differential effect on binding of the endogenous lectins galectins-1 and -3. *APMIS.* 2002;110:845-56.

Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1572:232-54.

Hotchin NA, Watt FM. Transcriptional and post-translational regulation of beta 1 integrin expression during keratinocyte terminal differentiation. *J Biol Chem*. 1992;267:14852-8.

Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH, Brennan PJ, Belisle JT, Blauvelt A, Porcelli SA, Modlin RL. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest*. 2004;113:701-8.

Chiesa F, Mauri S, Tradati N, Calabrese L, Giugliano G, Ansarin M, Andrlé J, Zurrida S, Orecchia R, Scully C. Surfing prognostic factors in head and neck cancer at the millennium. *Oral Oncol*. 1999;35:590-6.

Choufani G, Nagy N, Saussez S, Marchant H, Bisschop P, Burchert M, Danguy A, Louryan S, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R, Hassid S. The levels of expression of galectin-1, galectin-3, and the Thomsen-Friedenreich antigen and their binding sites decrease as clinical aggressiveness increases in head and neck cancers. *Cancer*. 1999;86:2353-63.

Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin*. 2003;53:5-26.

Kannan S, Nair MK. Lectins and neoglycoproteins in histopathology. In: Gabius HJ, Gabius S, eds.: Glycoscience: Status and Perspectives. Chapman&Hall, London and Weinheim 1997, 564-583.

Linehan SA, Martinez-Pomares L, Stahl PD, Gordon S. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J Exp Med.* 1999;189:1961-72.

Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572:263-73.

Magnaldo T, Fowles D, Darmon M. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation.* 1998;63:159-68.

Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;51:1-28.

Smetana K Jr, Plzák J, Dvořánková B, Holiková Z. Functional consequences of the glyco-phenotype of squamous epithelia-practical employment. *Folia Biol (Praha).* 2003;49:118-27.

Watson K, Gooderham NJ, Davies DS, Edwards RJ. Nucleosomes bind to cell surface proteoglycans. *J Biol Chem.* 1999;274:21707-13.

G) PŘÍLOHA – SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

- (1) Plzáková Z, Chovanec M, Smetana K Jr, Plzák J, Štork J, Saeland S. Comparison of the expression of Langerin and 175 kD mannose receptor in antigen-presenting cells in normal human skin and basal cell carcinoma. *Folia Biol (Praha)*. 2004;50:71-3.
- (2) Chovanec M, Smetana K Jr, Purkrábková T, Holíková Z, Dvořánková B, André S, Pytlík R, Hozák P, Šedo A, Vacík J, Gabius HJ. Detection of cell type and marker specificity of nuclear binding sites for anionic carbohydrate ligands. *Biotech Histochem*. 2004;79:139-50.
- (3) Chovanec M, Plzák J, Betka J, Brabec J, Kodet R, Smetana K Jr. Comparative analysis of alpha 2,3/2,6-linked N-acetylneuraminic acid and cytokeratin expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2004;12:297-301.
- (4) Plzák J, Betka J, Smetana K Jr, Chovanec M, Kaltner H, André S, Kodet R, Gabius HJ. Galectin-3 – an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *Eur J Cancer*. 2004;40:2324-30.
- (5) Chovanec M, Smetana K Jr, Dvořánková B, Plzáková Z, André S, Gabius HJ. Decrease of nuclear reactivity to growth-regulatory galectin-1 in senescent human keratinocytes and detection of non-uniform staining profile alterations upon prolonged culture for galectin-1 and -3. *Anat Histol Embryol*. 2004;33:348-54.
- (6) Klíma J, Smetana K Jr, Motlík J, Plzáková Z, Liu FT, Štork J, Kaltner H, Chovanec M, Dvořánková B, André S, Gabius HJ. Comparative phenotypic characterization of keratinocytes originating from hair follicles. *J Mol Histol*. 2005;36:89-96. (IF 0.671)

- (7) Plzák J, Smetana K Jr, Chovanec M, Betka J. Glycobiology of head and neck squamous epithelia and carcinomas. *ORL* . 2005;67:61-9. (IF 1.300)
- (8) Chovanec M, Smetana K Jr, Betka J, Plzák J, Brabec J, Álvarez VM, André S, Kodet R, Gabius HJ. Correlation of expression of nuclear proteins pKi67 and p63 with lectin histochemical features in head and neck squamous cell cancer. *Int. J. Oncol.* 2005;27:409-415. (IF 3.056)
- (9) Chovanec M, Smetana K Jr, Plzák J, Betka J, Plzáková Z, Štork J, Hrdličková E, Kuwabar I, Dvořánková B, Liu FT, Kaltner H, Gabius HJ. Detection of new diagnostic markers in pathology by focus on growth-regulatory endogenous lectins. The case study of galectin-7 in squamous epithelia. *Prague Med. Rep.* 2005; 106:209-216.
- (10) Dvořánková B, Smetana K Jr, Chovanec M, Lacina L, Štork J, Plzáková Z, Galovičová M, Gabius HJ. Transient expression of keratin 19 is induced in originally negative interfollicular epidermal cells by adhesion of suspended cells. *Int J Mol. Med.* 2005;16: 525-531. (IF 3.190)
- (11) Smetana K Jr, Dvořánková B., Chovanec M, Bouček J, Klíma J, Motlík J, Lensch M, Kaltner H, André S, Gabius H-J. Nuclear presence of adhesion-/ growth-regulatory galectins in normal/malignant cells of squamous epithelial origin. *Histochem. Cell Biol.* 2006;125:171-182. (2.594)

H) PŘÍLOHA – CITAČNÍ OHLAS PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

(1) Plzáková Z, Chovanec M, Smetana K Jr, Plzák J, Štork J, Saeland S. Comparison of the expression of Langerin and 175 kD mannose receptor in antigen-presenting cells in normal human skin and basal cell carcinoma. *Folia Biol (Praha)*. 2004;50:71-3.

Citováno:

Al-Daraji WI, Hafejee A, Calonje E, Coulson IH, Howat AJ. Multiple purpuric lesions on the lower limbs: an unusual presentation of a rare condition at an unusual age. *Clin Exp Dermatol*. 2005;30:603-604.

(2) Plzák J, Betka J, Smetana K Jr, Chovanec M, Kaltner H, André S, Kodet R, Gabius HJ. Galectin-3 – an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *Eur J Cancer*. 2004;40:2324-30.

Citováno:

Rout UK, Saed GM, Diamond MP. Expression pattern and regulation of genes differ between fibroblasts of adhesion and normal human peritoneum. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:1.

Szöke T, Kayser K, Baumhäkel JD, Trojan I, Furak J, Tiszlavicz L, Horvath A, Szluha K, Gabius H-J, Andre S. Prognostic significance of endogenous adhesion/growth-regulatory lectins in lung cancer. *Oncology*. 2005;69:167-174.

Saal I, Nagy N, Lensch M, Lohr M, Manning JC, Decaestecker C, Andre S, Kiss R, Salmon I, Gabius HJ. Human galectin-2: expression profiling by RT-PCR/immunohistochemistry and its introduction as a

histochemical tool for ligand localization. *Histol Histopathol.* 2005;20:1191-208.

Smilek P, Dušek L, Veselý K, Kostřica R, Rottenberg J. Význam mitoticko-apoptického indexu a DNA flow-cytometrie v prognóze karcinomů hlavy a krku. *Otorinolaryngologie a foniatrie (Praha)* 2005; 54:199-205.

Kayser K, Trott J, Bohm G, Huber M, Kaltner H, Andre S, Gabius HJ. Localized fibrous tumors (LFTs) of the pleura: Clinical data, asbestos burden, and syntactic structure analysis applied to newly defined angiogenic/growth-regulatory effectors. *Pathol Res Pract.* 2005;201:791-801.

Fowler M, Thomas RJ, Atherton J, Roberts IS, High NJ. Galectin-3 binds to *Helicobacter pylori* O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to H-pylori adhesion. *Cell Microbiol.* 2006; 8:44-54.

Gabius HJ. Cell surface glycans: The why and how of their functionality as biochemical signals in lectin-mediated information transfer. *Crit Rev Immunol.* 2006;26: 43-79.

(3) Chovanec M, Smetana K Jr, Dvořánková B, Plzánková Z, André S, Gabius HJ. Decrease of nuclear reactivity to growth-regulatory galectin-1 in senescent human keratinocytes and detection of non-uniform staining profile alterations upon prolonged culture for galectin-1 and -3. *Anat Histol Embryol.* 2004;33:348-54.

Citováno:

Plzáková Z, Smetana K Jr., Štork J. Kmenová buňka epidermis. Česko-slovenská dermatologie 2006;81:12-19.

Vodička P, Smetana K Jr, Dvořánková B, Emerick T, Xu YZ, Ouředník J, Ouředník V, Motlík J. The miniature pig as an animal model in biomedical research. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES 2005;1049:161-171.

(4) Klíma J, Smetana K Jr, Motlík J, Plzáková Z, Liu FT, Štork J, Kaltner H, Chovanec M, Dvořánková B, André S, Gabius HJ. Comparative phenotypic characterization of keratinocytes originating from hair follicles. J Mol Histol. 2005;36:89-96.

Citováno:

Vodička P, Smetana K Jr, Dvořánková B, Emerick T, Xu YZ, Ouředník J, Ouředník V, Motlík J. The miniature pig as an animal model in biomedical research. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES 2005;1049:161-171.

(5) Chovanec M, Smetana K Jr, Betka J, Plzák J, Brabec J, Álvarez VM, André S, Kodet R, Gabius HJ. Correlation of expression of nuclear proteins pKi67 and p63 with lectin histochemical features in head and neck squamous cell cancer. Int. J. Oncol. 2005;27:409-415.

Citováno:

Smilek P, Dušek L, Veselý K, Kostřica R, Rottenberg J. ýznam mitoticko-apoptotického indexu a DNA flow-cytometrie v prognóze karcinomů hlavy a krku. Otorinolaryngologie a foniatrie (Praha) 2005; 54:199-205.

I) SUMMARY

The thesis deals with the glyco-phenotype analysis of normal squamous cell epithelia, and head and neck squamous cell carcinomas. Many research projects focus on improving patients prognosis studying biological properties of the tumor. The alterations of carbohydrate motives occur during cell differentiation and carcinogenesis.

Lectins are proteins that bind to specific carbohydrate structures. Animal lectins, including human lectins, consist of five subfamilies according to their binding specificity. Much attention is paid to the investigation of galectins - β -galactoside binding proteins. Their carbohydrate recognitive function is not dependent on the presence of Ca^{2+} ions, contrary to the other lectin types. Galectins play important roles in many biological processes, e.g. in adhesion, intercellular interactions, immunomodulation, inflammation, cell growth, apoptosis, pre-mRNA splicing. Alterations in any of these might contribute to the malignant transformation and cancer progression.

Endogenous lectins (galectins, Langerin, Manose receptor) were detected using immunohistochemistry, galectin-binding sites were localized by lectin histochemistry. Reverse lectin histochemistry was employed for the study of glycosaminoglycan binding sites. Human (squamous cell epithelia of the oral cavity, oropharynx and larynx, oral cavity, oropharyngeal, laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas including their regional lymph node metastases, corneal epithelium, epidermis, basocellular carcinomas, trichoepithelioma) were studied. Corresponding cytochemical methods were used to study phenotypic features in keratinocyte culture (human and porcine follicular and interfollicular cells, FaDu – hypopharyngeal carcinoma cell line) and

glioma cell lines. Glycophenotypic features in the cells of studied biopsies and cells lines were correlated with the immunohistochemical profile of markers assessing proliferation potential (pKi67, Δ Np63 α), differentiation level (pancytokeratin, cytokeratin peptide pCK37, cytokeratins 8, 10, 14, 19), and other molecules (E-cadherin, β -catenin, desmoplakin-1 and -2, transferin receptor, laminin, SC 35). Expression of the selected glycophenotypic characteristics (α 2,3/2,6 N-acetyl neuraminic acid residues and galectin-3-reactive epitopes) were correlated with pathological (grading, keratinization, extent of the primary tumor and lymph node metastases) and clinical (disease free and overall survival rates) characteristics of the examined head and neck squamous cell carcinomas.

The expression pattern of α 2,3/2,6 N-acetyl neuraminic acid residues of the sacharidic chains and galectin-3-reactive glycoepitopes is dependent on the level of cell differentiation in both squamous cell epithelias and carcinomas. Aberrations N-acetyl neuraminic acid expression are often seen in carcinomas and might contribute to their behavior. α 2,6 Nacetyl neuraminic residues influence the accessibility of glycoepitopes recognized by galectin-3.

The expression of galectin-3-binding represents prospective prognostic marker in head and neck squamous cell carcinomas with potential clinical application.

Galectin-7 is specifically expressed in squamous cell epithelia. Its expression pattern seems to be correlated with the process of stratification. Decreased expression in tumors originating from these epithelia might be explained by the loss of its organization.

Amount of Langerhans cells is reduced in basal cell cell carcinomas compared to the untransformed epidermis. Alterations of

their functions could participate in the development and progression of these tumors.

Glycobiological parameters seem to be promising tools for assessment of biological characteristics of keratinocytes (e.g. stem cell phenotype, differentiation postmitotic phenotype, senescent phenotype) in culture and *in situ*.

Cell nuclei harbor binding sites for anionic glycosaminoglycans. Nuclear transport and localisation of glycosaminoglycans is cell/tissue specific. Heparin interacts with histone proteins and could thus contribute to the level of chromatin organization.

Employment of lectin histochemical methods seem to be very attractive tools in the field of cell biology and cell oncology and their study is further warranted. Some of the glycobiological features bear the capacity for clinical application.