

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Biomedicína

Studijní program: Biologie patologie buňky



Mgr. Pavol Szabo

Glykobiologie nádorů hlavy a krku

Glycobiology of the head and neck cancer

Typ závěrečné práce: Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Karel Smetana ml., DrSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

Souhlasím – Nesouhlasím *

V Praze, 26.01.2012

Pavol Szabo

Podpis

*Nehodící se škrtně

Identifikační záznam:

SZABO, Pavol, *Glykobiologie nádorů hlavy a krku. [Glycobiology of the head and neck cancer]*. Praha, 2012. Počet stran 32, bez příloh. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Anatomický ústav. Školitel Smetana, Karel.

Abstrakt:

Povrch buněk je bohatě pokryt oligosacharidy, které jsou v plazmalemě ukotvené pomocí proteinů a lipidů. Oligosacharidy zprostředkují vzájemnou vazbu mezi buňkami nebo vazbu buněk k složkám extracelulární matrix. Galektiny jsou živočišné lektiny které mají afinitu k oligosacharidům obsahujícím β -galaktózu. Jsou to multifaktoriální proteiny, které se účastní řady reakcí v organismu, jako jsou mezibuněčné interakce, interakce buněk s mezibuněčnou hmotou, proliferace i apoptóza a sestřih pre-mRNA. Proteiny po translaci procházejí různými strukturálními úpravami, které mají vliv na jejich funkci. Galektin-3 je možný prognostický ukazatel u nádorů vycházejících z vrstevnatých dlaždicových epitelů je fosforylován na N-konci. Prokázali jsme, že tato posttranslační modifikace nemá vliv na jeho vazebnou reaktivitu. Jiný endogenní lektin, galektin-1 je charakteristickou molekulou nádorového stromatu a granulační tkáň hojícího se poranění. Zjistili jsme, že galektin-1 indukuje na TGF- β nezávislý *in vitro* přechod normálních fibroblastů na myofibroblasty včetně produkce sítě extracelulární matrix bohaté fibronectinem a galektinem-1. Tento poznatek je využitelný v terapii hojení ran a v tkáňovém inženýrství. Dnes je jasné, že nádorové stroma ovlivňuje i biologické vlastnosti nádoru (lokální agresivita, metastazování). V předložené disertaci demonstrujeme biologické vlastnosti fibroblastů izolovaných z lidského basaliomu, které jsou schopné indukovat vlastnosti mesenchymových kmenových buněk u myších 3T3 fibroblastů včetně jejich diferenciační plasticity. Dále jsme prokázali, že u lidských spinaliomů hlavy a krku se na vzájemné komunikaci mezi nádorovými buňkami a nádorově asociovanými fibroblasty podílejí CXCL-1, IL-6 a IL-8. Jejich blokace by mohla mít terapeutický efekt. Na závěr lze konstatovat, že galektiny mají vliv na nádory vycházející z dlaždicových epitelů. Zejména galektin-1 má vliv na vznik bioaktivního nádorového stromatu. Byly charakterizovány cytokiny podílející se na vzájemné interakci mezi nádorovými buňkami a buňkami stromatu.

Klíčová slova: galektin, nádorově asociované fibroblasty, cytokiny

Abstract:

The cell surface is covered by different oligosaccharides, which are anchored in the plasmatic membrane by proteins and lipids. Oligosaccharides mediate mutual interactions either between cells or between cells and components of extracellular matrix. Galectins are animal lectins with affinity to oligosaccharides containing β -galactosides. Furthermore, galectins are multifactorial lectins that participate in the regulation and modulation of various biological processes including cell-cell and cell-matrix interactions, cell proliferation and differentiation as well as apoptosis and pre-mRNA splicing. After translation, proteins undergo different structural modifications with direct impact on their function. For example, galectin-3 as possible prognostic marker, well recognize cells of squamos cell carcinomas, is phoshorylated on N-terminus. However, we showed that posttranslational phosphorylation of galectin-3 does not have a direct impact on its binding activity. Another endogenous lectin, galectin-1 is a typical protein of cancer stroma and wound granulation tissue. In this context we also detected, that galectin-1 induces a TGF- β 1 independent fibroblast-myofibroblast transition including production of a bioactive fibronectin and galectin-1 rich extracellular matrix *in vitro*. This knowledge can thus be used to improve both therapy of wound healing and methods used in tissue engineering. It is known that the tumor stroma is able to modulate biological properties of tumors (local aggressivness and metastatic potential). In this thesis we demonstrated biological properties of cancer-associated fibroblast isolated from basal cell carcinoma. We showed that these cancer-associated fibroblasts are able to induce mesenchymal stem-like cell properties in 3T3 mouse fibroblasts. Consecutively, we detected that chemokines, such as CXCL-1, IL-6, and IL-8, produced by tumor stroma participate in the formation of cancer microenvironment essential for carcinoma progression of head and neck squamous cell carcinoma. From this point of view their neutralization might present a new therapeutic approach in cancer treatment. Finally, we may conclude that galectins have modulatory impact on squamos cell carcinoma behavior. In particular, galectin-1 is responsible for the formation of the bioactive tumor stroma environment. We also described several chemokines that participated in cancer cell and tumor-stroma interactions.

Key words: galectin, cancer associated fibroblasts, cytokines

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli prof. MUDr. Karlu Smetanovi ml., DrSc. za neocenitelné připomínky, podnětné návrhy a podporu při vedení disertační práce.

Můj dík patří i mým nejbližším spolupracovníkům z Anatomického ústavu RNDr. Barboře Dvořánkové, PhD. a MUDr. Lukáši Lacinovi, PhD., z Ústavu molekulární genetiky AV ČR Ing. Hynku Strnadovi, PhD. a Mgr. Michalu Kolářovi, PhD.

Rukopis této práce laskavě přečetl a připomínkami opatřil prof. MUDr. Václav Seichert DrSc, za což mu patří můj dík.

Za vynikající technickou asistenci při zpracování materiálu děkuji Ivě Burdové a Bc. Vítu Hajduchovi.

Finančně byly tyto studie podporovány grantovými agenturami GAČR, IGA, výzkumnými záměry MŠMT, Evropskou komisí Marie Curie Research Training Network grant.

Seznam zkratek:

BM – *basal membrane*

BMP-4, -6 - *bone morphogenetic protein*

CAF - *cancer-associated fibroblast*

CRD - *carbohydrate recognition domain*

CXCL1/GRO α - *cytokine*

ECM - *extracelular matrix*

EMT - *epithelial-mesenchymal transition*

FGF7 - *fibroblast growth factor*

GFP – *green flourescent protein*

IGF-2 - *insulin-like growth factor*

IL-1, -6, -8 - *interleukin*

K-8, -18, -19, -14 - *keratin*

LEP - *leptin*

MSC - *mesenchymal stem cell*

NGF - *nerve growth factor*

TGF- β - *transforming growth factor β*

TNF α - *tumor necrosis factor α*

α -SMA - *α smooth muscle acti*

Obsah

Prohlášení	ii
Abstrakt	iii
Poděkování.....	v
Seznam zkratk	vi
1. Úvod	2
2. Glykokód.....	2
3. Lektíny	3
4. Galektiny.....	4
5. Nádorové stroma	6
5.1. Interakce mezi nádorovým parenchymem a podpůrným stromatem	8
5.2. Cytokiny a chemokiny.....	9
6. Cíle práce	11
7. Materiál a metody.....	11
8. Výsledky	13
8.1. Vliv posttranslačních modifikací (fosforylace) galektinu-3 na jeho vazbu na reaktivní glykoepitopy zejména u nádorů hlavy a krku.....	15
8.2. Sledování biologické aktivity nádorově asociovaných fibroblastů izolovaných ze spinocelulárního karcinomu, bazaliomu, maligního melanomu, kožní metastazy karcinomu prsu a dermatofibromu v podmínkách <i>in vitro</i> a jejich potenciál měnit fenotyp zdravého epitelu i fibroblastů	16
8.3. Sledování účinku galektinu-1 jako faktoru indukujícího tvorbu myofibroblastů a komponentů extracelulární matrix	21
9. Splnění cílu disertační práce	23
10. Použitá literatura	24

1. Úvod

Studium interakce sacharidů a proteinů je stále více se rozšiřující oblastí buněčné biologie. V předložené disertaci jsou sledovány lidské endogenní lektiny galektiny a jejich vazebné epitopy v normálních dlaždicových epitelech a nádorech z nich vycházejících s důrazem na vzájemné interakce nádorové buňky a nádorového epitelu.

2. Glykokód

Dlouhé období se buněčná a molekulární biologie soustřeďovaly zejména na studium proteinů a nukleových kyselin. Sacharidy byly dlouho opomíjeny a považovány spíše za molekuly hrající roli pouze v metabolických dějích, eventuálně jim byla přiznávána role stavebních elementů určitých buněčných součástí, například rostlinných buněčných stěn.

Sacharidy jsou při tom v přírodě nejpočetnější skupinou organických molekul a téměř všechny organismy je potřebují k svému životu (Wade, 1999). Nověji byla přijata představa, že sacharidy mohou strukturně modifikovat jiné molekuly (Hironobu, 2007; Allahverdian et al., 2006). Tato strukturní modifikace ale může následně významně ovlivňovat, či dokonce i měnit funkci základní molekuly a podílet se tak na regulaci buněčných dějů (Varki et al., 2008). Pro vysokou komplexnost své molekuly a možnost dalších stereochemických úprav představují pro tento účel právě sacharidy nesmírně vhodný, jemný a vysoce variabilní nástroj. Heterogenita sacharidů v živých systémech je dána několika jejich charakteristickými vlastnostmi: schopností cukerných reziduí různého typu se vázat glykosidickou vazbou s dalšími; strukturální charakteristikou molekul; anomerickým efektem a pozicí vazby (Mody et al., 1995; Gorelik et al., 2001).

Tím, že sacharidové oligomery a polymery nejsou přímo kódovány pomocí genomu, unikala dlouhou dobu ze zorného pole molekulární biologie možnost, že by se sacharidy mohly podílet na předávání informace při buněčných dějích a tato schopnost zůstávala rezervována v základním dogmatu DNA, RNA a proteinům. Nicméně již výše uvedená rozmanitost struktury sacharidů a možnost jejich dalšího řetězení z nich činí velmi variabilní nástroj pro kódování, uchovávání a realizaci informací při buněčných dějích.

Pro ilustraci nárůstu komplexnosti řetězených sacharidů si za příklad můžeme vzít molekulu jednoduchého disacharidu složenou ze dvou identických šestiuhlíkatých monosacharidů, například glukózy. Pro porovnání zvolme dipeptid tvořený dvěma identickými aminokyselinami. Vazebnými kombinacemi dostaneme celkem 11 různých disacharidů, ale jenom jeden dipeptid. Při krátkém řetězení čtyři odlišné aminokyseliny utvoří 24 typů tetrapeptidů, ale čtyři odlišné hexózy potenciálně vytvoří až 35 560 unikátních tetrasacharidů (Sharon and Lis, 1989, 1993).

Sacharidy získaly na tomto poli pozornost až v relativně nedávné době, v souvislosti s rozvojem jejich zkoumání bylo definováno celé nové vědní odvětví – glykobiologie (Sharon et al., 2004).

Biologická úloha cukerných oligo-/polymerů není přímo kódována v genomu, je ale genomem nepřímo podmíněna. Cukerný polymer pak vzniká aktivitou proteinů glykosyltransferáz a glykosidázy v endoplazmatickém retikulu, Golgiho aparátu a na povrchu buňky (Sharon, 1980; Opdenakker et al., 1993). Není však zatím úplně jasné, jak je kódováno pořadí monosacharidů v řetězci.

Na základě výše uvedených skutečností jsou cukerné polymery považovány za média vhodná pro uložení biologické informace a do literatury byl proto zaveden pojem glykokód (Gabiuss, 2009).

3. Lektiny

Aby mohla být biologická informace uložená v glykokódu dekodována, musí existovat receptorový systém, který je schopen ji specificky přečíst, a tím jsou lektiny. Lektiny jsou definovány jako proteiny, které přesně rozeznávají sacharidové struktury. Termín lektin je odvozen z latinského slova *legere*, což v překladu znamená „vybrat si, zvolit si“ a odkazuje právě na schopnost jemné diskriminace při vazbě na sacharidové motivy. Mechanismus této vazby je odlišný od reakce antigen-protilátka a nejedná se ani o enzymatickou vazbu (Mody et al., 1995; Bies et al., 2004; Minko, 2004). Vazba lektin-monosacharid je relativně slabá s disociační konstantou v rozmezí 10^{-3} – 10^{-6} mol. (Bouckaert et al., 2005; Rabinovich et al., 2007). Vazba karbohydrátového komplexu na povrchu molekul glykolipidů a hlavně glykoproteinů je silnější.

Začátek lektinologie můžeme datovat do roku 1888, kdy Herrmann Stillmark popsal aglutinační schopnosti ricinu přidaného k erytrocytům (odkaz v Sharon and Lis, 2004). Moderní éra lektinologie začala ale skoro o 100 let později. První lektiny byly popsány u rostlin a v rostlinných extraktech. Později se podařilo izolovat rozmanité lektiny z mikroorganismů a také ze živočichů (Bies et al., 2004). Společným znakem rostlinných i živočišných lektinů je specifická afinita k sacharidům. Po poznání primárních struktur různých lektinů se pomocí 3D modelů zjistila jistá homologie i v jejich terciárních strukturách (Sharon and Lis, 2004).

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. Například lektin concavalin A se specificky váže s α - anomerem glukózy a manózy, ale nevytvoří již vazbu s jejich β - anomerem (Mody et al., 1995). Lektiny tedy můžeme chápat jako překladače „glykokódu“ (Gabiuss, 2002). Lektinů lze relativně jednoduše využít při histochemických a cytochemických technikách a jejich význam v této oblasti vzrůstá (Smetana and André, 2008). Nejdůležitějším úkolem ale zůstává porozumění funkci lektinů přímo v savčích buňkách.

4. Galektiny

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 tvořená 135 aminokyselinami). Původní název rodiny byl S-lektiny, což souviselo s přítomností SH-sulfhydrylové skupiny (Lobsanov et al., 1993). Zájem o lektiny vycházel z představy, že povrch buněk obsahuje množství karbohydrátů, které slouží k adhezi buněk navzájem nebo ke složkám extracelulární matrix. Pomocí metody separace na kolonách s navázanými β -galaktosidy se podařilo potvrdit přítomnost hledaných molekul zodpovědných za tuto vazbu. S postupem sekvenování genomu se skupina původně funkčně definovaných živočišných galektinů a galektinům podobných proteinů zúžila na 14 člennou rodinu. Porovnaním CRD mezi ortology je struktura většiny galektinů konzervována na stejné úrovni jako u hemoglobinů (80% homologie mezi člověkem a myší). Galektin-2 a -9 jsou

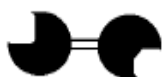
mírně variabilnější (70% identita člověk-myš), galektin-1 a -3 jsou nepatrně konzervovanější (87% identita). Výjimku s 99% identitou, stejně vysokou jako u tubulinů, představuje HSCP159 (Talbot et al., 1983).

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

I) „*prototype*“ – s jednou CRD doménou (Galektin-1,-2,-5,-7,-10,-13,-14)



II) „*tandem repeat*“ – obsahuje dvě různé CRD domény na témže polypeptidovém řetězci, kterou jsou vzájemně odlišné a jsou odlišné i od jiných galektinů (Galektin-4,-6,-8,-9,-12)



III) „*chimera*“ – obsahuje kromě CRD ještě jinou doménu (Galektin-3) (Cooper, 2002).



Toto zařazení do podskupin vychází pouze z jejich struktury, nevypovídá o sekvenční homologii, ani o detailech vazby na specifické motivy (Houzelstein et al., 2004).

Galektiny mají charakter cytosolových proteinů. Jsou syntetizovány na ribozomech v cytosolu postrádají signální sekvence a mají acetylovaný N-konec. Z cytosolu mohou být galektiny transportovány do jádra, nebo být secernovány na buněčný povrch. Způsob transportu není klasický (cestou vezikul Golgiho aparátu), ale probíhá pomocí zatím přesněji neobjasněného mechanismu. Na základě své lokalizace se podílejí na různorodých intra- a extra- celulárních procesech. Ovlivňují buněčný cyklus, apoptózu (Nakahara et al., 2005), buněčnou adhezi (Brewer, 2002), signální transdukcii (Shalom-Feuerstein et al., 2005), ale i složité děje jako navození autoimunity (Buzas et al., 2006) nebo maligní bujení (Lahm et al., 2004). Význam lokalizace galektinů v jádře byl studován zejména na příkladech galektinu-1 a galektinu-3 (Wang et al., 2004), kde byl ukázán jejich podíl na sestřihu pre-mRNA.

Je patrné, že galektiny mohou mít i přes relativně konzervovanou strukturu v organismu rozdílné funkce. Divergence byla zjištěna například při regulaci růstu neuroblastomu a nádoru

pankreatu nebo při aktivaci T-buněk (Kopitz et al., 2001, 2010; Sturm et al., 2004; Sanchez-Ruderisch et al., 2010).

Přítomnost extracelulárně secernovaného galektinu ve stromatu může být použita jako prognostický znak progresu nádorů. Například kombinace výskytu galektinu-1 a galektinu-4 znamená špatnou prognózu u nádoru tlustého střeva (Nagy et al., 2003), obdobně výskyt galektinu-3 u karcinomu prsu (Moisa et al., 2007). Bylo zjištěno, že postupná diferenciaci epitelových buněk směrem od bazální vrstvy k povrchovějším vrstvám epidermis je doprovázená změnou „glykokódu“ tj. změnou glykokonjugátového motivu (Villalobo et al., 1998). Galektin-3 a jeho reaktivní epitopy jsou přítomny striktně v suprabazální vrstvě na rozdíl od cukerných epitopů galektinu-1 a galektinu-7, které se vyskytují jak v buňkách bazální vrstvy tak i v suprabazální vrstvě (Plzák et al., 2000). Klinická studie studující přežívání pacientů s dlaždicovým karcinomem hlavy a krku zaměřená na detekci diferenciálního stavu glykosylace potvrdila, že přítomnost volných vazebných míst pro galektin-3 může sloužit jako prognostický ukazatel u nádorů vycházejících z vrstevnatých dlaždicových epitelů (Plzák et al., 2004). Výskyt určitých typů galektinů v nádorovém stromatu nás vedl k zájmu o toto mikroprostředí.

5. Nádorové stroma

U nádorů nevytváří transformovaný buněčný klon zcela autonomně se vyvíjející celek, ale tato buněčná populace je životně závislá na svém okolí – nádorovém stromatu. V případě karcinomů tvoří nádorový parenchým transformované epitelové buňky a podpůrnou funkci stromatu plní mesenchym s infiltrujícími leukocyty a novotvořenými cévami. Před více než 100 lety postuloval anglický chirurg Stephen Paget hypotézu „*seed and soil*“ – tedy nádoru jako semene, které potřebuje k růstu vhodnou úrodnou půdu - nádorové stroma (citováno v Fidler, 2003). Zjednodušeně řečeno se nádorové stroma skládá z buněčné a extracelulární složky (anglicky *extracelullar matrix*, dále: ECM). Poměr a složení buněčné a extracelulární části stromatu není u všech nádorů stejné.

Většina parenchymatózních orgánů za normálních podmínek je formována jako velmi kompaktní celek s minimem mezibuněčného prostoru, naproti tomu v pojivové tkáni převládá ECM. Na povrchu buněk jsou receptory – např. integriny, které interagují s komponentami

extracelulární matrix. Nejpočetněji jsou v ECM zastoupeny tři složky: (I) proteoglykany, (II) fibrily tvořené kolagenem a (III) rozpustné multiadhesivní proteiny (např. fibronectin). Vlastnosti ECM (pevnost, pružnost, adheze) jsou ovlivňovány interakcí buněk s okolním prostředím a podléhají neustálým změnám. Obecně lze říci, že ECM má podpůrnou mechanickou funkci. Představuje ale velice dynamickou populaci, kde dochází k permanentní remodelaci, degradaci poškozených částí a syntéze nových (Watt et al., 2011). Stejně jako u zdravé tkáně, jsou nejpočetněji zastoupenou buněčnou složkou nádorového stromatu fibroblasty. Množství stromatu je u některých nádorů větší než množství vlastního nádorového parenchymu. Nádorově asociované fibroblasty (anglicky: *cancer-associated fibroblasts*, dále: CAF) se liší od zdravých fibroblastů jak svojí funkcí, tak i fenotypem (Räsänen et al., 2010). Jejich fenotyp se blíží aktivovaným fibroblastům v hojící se ráně (tedy myofibroblastům), které exprimují α -SMA (*smooth muscle actin*) (Chatzistamou et al., 2010). Fyziologicky aktivované fibroblasty v ráně ale nejsou aktivované permanentně, vracejí se do původního stavu, nebo podléhají eliminaci a apoptóze. Naproti tomu CAF této regulaci nepodléhají (Li et al., 2007). Je známa jisté podobnost mezi organizací nádorového stromatu a granulační tkáň hojící se rány (Dvorak, 1986). Existuje nejspíš hned několik způsobů, kterými mohou nádorově asociované fibroblasty vzniknout: 1) aktivací lokálních fibroblastů; 2) epitelově mesenchymovým přechodem (anglicky: *epithelial-mesenchymal transition*, dále: EMT) vlastních nádorových buněk; 3) diferenciací z migrujících mesenchymových kmenových buněk pocházejících z kostní dřeně atrahovaných do místa nádoru (Mishra et al., 2009). Původ CAF nebude u všech nádorů identický. Připustit lze pravděpodobně i kombinaci různých mechanismů vzniku v závislosti na buněčném typu a signálech okolí (Li et al., 2007). Jedním z faktorů, který indukuje proměnu fibroblastů na myofibroblasty v ráně i v stromatu spinocelulárního karcinomu *in situ*, je TGF- β (anglicky: *transforming growth factor*) (Brenmoehl et al., 2009).

Řada typů nádorů obsahuje buňky, které exprimují znaky typické pro pluripotentní kmenové buňky (například Nanog, Oct-4). Jejich funkce v nádoru není zcela objasněna, zdá se však, že jejich výskyt je mnohdy negativním prognostickým znakem (Downs-Kelly et al., 2009). Ve stromatu nádoru prsu byly popsány buňky, které vykazovaly znaky podobné MSC (anglicky: *mesenchymal stem cell*) a které po transplantaci společně s nádorovými buňkami do těla myši signifikantně stimulovaly potenciál buněk k uchycení a k tvorbě metastáz v těle hostitele (Hall et al., 2007; Karnoub et al., 2007). Ve stromatu některých karcinomů u pacientů s velmi špatnou prognózou byl vzácně pozorován i ektopický výskyt kostní nebo chrupavčité tkáně.

Tuto skutečnost lze interpretovat i tak, že dokazuje v nádoru přítomnost buněk s vlastnostmi mesenchymových kmenových buněk a jejich diferenciační potenciál (Yoichi et al., 2009).

V současné době je široce akceptováno, že se v nádorovém parenchymu vyskytují také buňky s vlastnostmi buněk kmenových – tzv. nádorové kmenové buňky, které se aktivně podílejí na formování a šíření nádoru (Cordon-Cardo, 2010). Protože je známo, že normální tkáňové buňky potřebují specifické mikroprostředí – tak zvané „*niche*“, které sehrává zásadní roli při udržování jejich kmenových vlastností, je vysoce pravděpodobné, že specifické mikroprostředí budou vyžadovat i nádorové kmenové buňky. Tímto mikroprostředím by mohlo být právě nádorové stroma. Zvláštní vlastnosti nádorového stromatu podporují přežívání nádorových buněk a stimulují růst a šíření nádoru (Li and Neaves, 2006). CAF vzniklé z lokálního mesenchymového ložiska nebo z cirkulujících mesenchymových kmenových buněk kostní dřeně (Mishra et al., 2009) tvoří *niche*, které je vhodné pro udržování kmenovosti embryonálních, mesenchymových a nádorových kmenových buněk (DeWever and Mareel, 2003; Motlík et al., 2007).

5.1. Interakce mezi nádorovým parenchymem a podpůrným stromatem

Epitel je od svého podpůrně působícího mesenchymového okolí oddělen selektivně propustnou bazální membránou (BM), která zabraňuje volnému přechodu buněk. Pro malé solubilní molekuly (včetně cytokinů/chemokinů) je ale BM volně prostupná. BM je přirozenou překážkou, která je dynamicky odbourávána a rekonstruována v průběhu morfogeneze. Důležitou roli hraje při regeneraci tkáně po poranění i při embryonálním vývoji, kdy podél ní migrují různé buněčné typy (Frisch and Ruoslahti, 1997). Struktura BM není ve všech tkáních stejná. Laminin, jeden z hlavních proteinů bazální laminy, má vliv na stav diferenciace epitelů. Prostorová interakce mezi lamininem a kolagenem IV ji dává charakteristický tvar rohože s tloušťkou 60 až 120 nm. Na základní osnovu se pak vážou ostatní proteoglykany (entaktin – napomáhá inkorporovat další komponenty do membrány, perlekan – váže se se složkami ECM i molekulami na povrchu buněk). BM umožňuje výměnu i signálních molekul mezi vzájemně interagujícími buněčnými populacemi (Timpl, 1996). Oligo/polysacharidové složky membrány včetně heparansulfátu a manózy jsou rozpoznávány

endogenními lektiny a reagují i s rostlinnými lektiny, např. concavalinem A (Labský et al., 2003).

Nádorové stroma ovlivňuje epitelově-mesenchymový přechod, děj, při němž v nádorovém parenchymu dochází k de-diferenciaci buněk, které získávají migrační a proinvasivní vlastnosti (Thiery et al., 2009). Některé velké studie poukazují na fakt, že právě snižující se exprese keratinů (K8, K18 a K19) u karcinomů prsu a naopak větší exprese vimentinu je u některých skupin pacientů asociována s vyšší agresivitou nádoru (Willipinski Stapelfeld et al., 2005).

5.2. Cytokiny a chemokiny

Možnými molekulárními kandidáty odpovědnými za vzájemnou interakci nádorových a stromálních buněk jsou cytokiny. Cytokiny mají pleiotropní účinky na organismus. Jeden může působit na více funkcí u různých buněčných typů a naproti tomu více druhů cytokinů má podobný efekt na jednu buňku. Navzájem jsou schopné působit synergicky nebo antagonisticky, takže plní funkci inhibitorů nebo stimulátorů pro buněčné děje. Z výše uvedených faktů vyplývá, že síť vzájemných interakcí cytokinů je velice složitým a propojeným komplexem (Rakesh and Agrawal, 2005). Velkou rodinu cytokinových chemoatraktantů představují chemokiny. Dělíme je podle polohy rezidui aminokyselin cysteinu při N-konci na 4 vysoce konservativní skupiny: CXC, CC, C a CX₃C. Chemokiny s CXC motivem mají účinek především na polymorfonukleární leukocyty a T-lymfocyty. Monocyty a lymfocyty jsou citlivé na chemokiny s CC strukturou (Kulbe et al., 2004). Ty jsou secernovány buňkami různých typů včetně leukocytů, endotelových buněk, fibroblastů a epitelových buněk (Bendall, 2005). Senzitivita buněk na cytokiny/chemokiny je rozdílná u tkáně zdravé a maligně transformované (Douglas et al., 2004). TNF α (anglicky: *tumor necrosis factor*) podporuje produkci několika dalších chemokinů, které mají vliv na neoangiogenezi a metastatický potenciál nádorů (Li et al., 2009). Hladina IL-1 β (interleukin) je zvýšena u pacientů s nádory žaludku a jater (Sakurai et al., 2008; Glas et al., 2004), u myši potencuje tumorigenezi u fibrosarkomu a hepatocelulárního karcinomu (Krelin et al., 2007; Shchors et al., 2006). Pronádorový účinek IL-6 (interleukin) byl prokázán u nádorů prsu, ovarií, prostaty a plic (Bromberg and Wang, 2009). BMP-4 (*bone morphogenetic protein*) a

IGF-2 (*insulin-like growth factor*) mají vliv na změnu fenotypu i zdravých keratinocytů, které získávají vlastnosti podobné keratinocytům vyskytujícím se v hojící ráně a nádoru (Strnad et al.,2010).

6. Cíle disertační práce

Ve své práci jsem se zaměřil na následující okruhy otázek:

- Specifikovat vliv posttranslačních modifikací (fosforylace) galektinu-3 na jeho vazbu na reaktivní glykoepitopy zejména u nádorů hlavy a krku.
- Sledovat účinek galektinu-1 jako faktoru indukujícího tvorbu myofibroblastů a komponentů extracelulární matrix.
- Sledovat biologickou aktivitu nádorově asociovaných fibroblastů izolovaných z dlaždicového karcinomu hlavy a krku, bazaliomu a dermatofibromu v podmínkách *in vitro* a jejich potenciál měnit fenotyp zdravých epitelů.
- Sledovat specifitu účinku nádorově asociovaných fibroblastů izolovaných z různých typů nádorů na epitelové buňky.

7. Materiál a metody

V této části jsou shrnuty pouze hlavní metodické principy využité při řešení vytčených úkolů, detailní popis metodik je uveden v jednotlivých článcích, které tvoří součást této disertační práce. V předložené disertační práci byly analyzovány normální tkáně (sliznice hlavy a krku, kůže) a z nich vycházející nádory, tedy bazaliom, spinaliom, benigní a maligní histiocytom a dále i karcinomu prsu - jak buněčná linie izolovaná z primárního nádoru, tak buňky získané z metastázy do kůže. Veškerý materiál byl získán na základě informovaného souhlasu pacienta, jehož text byl revidován příslušnou etickou komisí spolupracujícího zdravotnického zařízení (VFN a FNM Praha) v souladu s principy bioetiky ve smyslu Helsinské konvence. Tyto tkáně byly buď zmrazeny a histologicky zpracovány, nebo byly použity jako zdroj buněk pro kulturační experimenty. Kromě toho byly použity i standardní komerčně dostupné buněčné linie (NIH 3T3, HaCaT, FaDu, EM-G3). Zjišťované proteiny byly znázorňovány metodou nepřímé imunofluorescence. Použité protilátky byly buď komerčně dostupné, nebo byly připraveny v laboratoři spolupracujícího pracoviště (Hans-Joachim Gabius, Universita Ludwiga Maximiliana, Mnichov). Kontrolní reakce pro ověření specifity použitých protilátek prvního kroku byly provedeny nahrazením isotypovou protilátkou proti antigenu, který se

v příslušných buňkách/tkáních nevyskytuje, čímž bylo vyloučeno riziko falešně pozitivní reakce podmíněné interakcí Fc fragmentu protilátky s Fc receptorem. Kromě toho bylo jako kontroly užito i úplné vynechání protilátky prvního kroku. Vazebná místa pro galektiny byla znázorněna pomocí biotinylovaných rekombinantních galektinů rovněž připravených v laboratoři H.-J. Gabiuse. V nezačtené podobě byly tyto galektiny použity i při studiu jejich vlivu na normální lidské fibroblasty. Kontrolní reakce spočívala ve využití kompetitivního inhibitoru laktózy. Transkriptom byl analyzován pomocí mikročipové analýzy (Illumina) a výsledky byly ověřovány pomocí RT-PCR a imunocytochemicky. Produkce proteinů do kultivačního média byla analyzována jak pomocí ELISA, tak kuličkovým systémem Luminex. Statistické metody jsou detailně popsány v příložených studiích.

8. Výsledky

Seznam publikací, v nichž jsou uvedeny výsledky disertace:

1. Dvořánková, B., Szabo, P., Lacina, L., Gal, P., Uhrova J., Zima, T., Kaltner, H., André, S., Gabius, H-J, Syková, E., Smetana, K., Jr.: Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. *Cells Tissues Organs* 194: 469-480 (2011) **(IF 2.302)**
2. Dvořánková, B., Szabo, P., Lacina, L., Kodet, O., Matoušková, E., Smetana, K., Jr.: Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. *Histochem. Cell Biology* DOI: 10.1007/s00418-012-0918-3 (2012) **(IF 4.727)**
3. Kideryová, L., Lacina, L., Dvořánková, B., Štork, J., Čada, Z., Szabo, P., André, S., Kaltner, H., Gabius, H.-J., Smetana K., Jr.: 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: 18-26 (2009) **(IF 2.515)**
4. Smetana, K., Jr., Gabius, H.-J., Dvořánková, B., Kalter, H., Lacina, L., André, S., Szabo, P., Valach, J., Zima, T., Syková, E., Jendelová, P.: Použití galektinů a způsob přípravy myofibroblastů a nanovláken extracelulární matrix. Český národní patent č.. 302505, 2011
5. Smetana, K., Jr., Szabo, P., Lacina, L., Dvořánková, B., Plzák, J., Čada, Z., Chovanec, M., Betka, J., Strnad, H., Kolář, M., Vlček, Č., Motlík, J., Kovářová, H., Jarkovská, K.: Terapeutické použití kombinace protilátek nebo jejich Fab fragmentů pro blokáci bioaktivních proteinů produkovaných nádorově-asociovanými fibroblasty. PV 2011-222
6. Szabo, P., Dam, T., K., Smetana, K., Jr., Dvořánková, B., Kübler, D., Brewer, C., F., Gabius, H.-J.: Phosphorylated human lectin galectin-3: Analysis of ligand binding by histochemical monitoring of normal/malignant squamous epithelia and by isothermal titration calorimetry. *Anat. Histol. Embryol.* 38: 67-75, 2009 **(IF 0.554)**
7. Szabo, P., Kolář, M., Dvořánková, B., Lacina, L., Štork, J., Vlček, Č., Strnad, H., Tvrdek, M., Smetana, K., Jr.: 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: 233-248 (2011) **(IF 4.898)**

Část výsledků je shrnuta v přehledném článku

1. Plzák, J., Lacina, L., Chovanec, M., Dvořánková, B., Szabo, P., Čada, Z., Smetana, K., Jr.: Epithelial – stromal interaction in squamous cell epithelium – derived tumors: an important new player in the control of tumor biological properties. *Anticancer Res.* 30: 455-462 (2010) **(IF 1.428)**

8.1. Vliv posttranslačních modifikací (fosforylace) galektinu-3 na jeho vazbu na reaktivní glykoepitopy zejména u nádorů hlavy a krku

Szabo, P., Dam, T., K., Smetana, K., Jr., Dvořánková, B., Kübler, D., Brewer, C., F., Gabius, H.-J.: Phosphorylated human lectin galectin-3: Analysis of ligand binding by histochemical monitoring of normal/malignant squamous epithelia and by isothermal titration calorimetry. *Anat. Histol. Embryol.* 38: 67-75, 2009 (IF 0.554)

Značený endogenní lektin galektin-3 užitý jako sonda rozeznává mezibuněčné kontakty zejména v diferencovaných suprabazálních vrstvách zdravé epidermis stejně jako diferencované nádorové buňky. Může tak sloužit jako nezávislý prognostický znak (Plzák et al., 2004). Intracelulární lokalizace galektinu-3 v jádře či cytoplasmě je závislá na posttranslační modifikaci (fosforylaci) na N-konci molekuly lektinu (Hufleijt et al., 1993; Mazurek et al., 2000). V této studii jsme se zaměřili na stanovení rozdílu vazebné reaktivity nefosforylovaného a fosforylovaného galektinu-3 ve vrstevnatém dlaždicovém epitelu za normálních a patologických podmínek. Potvrdili jsme přítomnost galektinu-3 a jeho reaktivních epitopů v suprabazální vrstvě epidermis a jeho absenci v bazální vrstvě epitelu. *Stratum corneum* a *stratum spinosum* epidermis byly pozitivní i na fosforylovaný galektin-3. Přítomnost laktózy vedla k drastickému snížení intenzity signálu u obou sledovaných typů sond. Vazba galektinu-3 a jeho fosforylované formy nebyla prokázána u bazaliomů, tedy nádorů, jejichž buňky si zachovávají nízký stupeň diferenciací. Pozitivní kolokalizace přítomnosti galektinu-3 a vazby jeho fosforylované formy byla prokázána na kryostatových řezech z dlaždicového karcinomu jazyka. Tyto nálezy svědčí o kvalitativním i kvantitativním rozdílu v expresi glykoligandů u lidského bazaliomu a dlaždicového karcinomu u člověka. Zároveň můžeme konstatovat, že fosforylace galektinu-3 použitého jako sonda nemá vliv na jeho reaktivitu a vazbu na lidské tkáně.

8.2. Sledování biologické aktivity nádorově asociovaných fibroblastů izolovaných ze spinocelulárního karcinomu, bazaliomu, maligního melanomu, kožní metastázy karcinomu prsu a dermatofibromu v podmínkách *in vitro* a jejich potenciál měnit fenotyp zdravého epitelu i fibroblastů

Kideryová, L., Lacina, L., Dvořánková, B., Štork, J., Čada, Z., Szabo, P., André, S., Kaltner, H., Gabius, H.-J., Smetana K., Jr.: 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: 18-26 (2009) (IF 2.515)

V předchozích studiích vycházejících z naší laboratoře jsme prokázali, že CAF izolované z lidského bazaliomu a dlaždicového karcinomu jsou biologicky aktivní a jsou schopny významně ovlivnit fenotyp kokultivovaných normálních keratinocytů (Lacina et al., 2007a,b; Strnad et al., 2010). CAF zejména stimulovaly expresi keratinu-19, jednoho ze znaků kmenové buňky epidermis přirozeně se nacházejících se ve ztluštění „bulge“ vlasového folikulu a keratinu-8, který se v epidermis vyskytuje pouze prenatalně a postnatalně je přítomen v buňkách dlaždicových karcinomů se špatnou prognózou (Fillies, 2006).

Výše popsané výsledky jsme ověřili u kožního nádoru benigního fibrózní histiocytomu (*seu dermatofibrom*). Tento nádor dle historických představ o histogenezi vychází z atypických tkáňových makrofágů- histiocytů - nepodobných fibroblastům. Tento mesenchymový nádor je lokalizován do oblasti dermis, ale zajímavá je hyperplastická epidermis nad nádorovým nodulem. Ta vykazuje určitou podobnost s bazaliomem. Pod tímto epitelem je navíc bohatě přítomen deponovaný galektin-1, podobně jako tomu je u bazaliomu. Buňky námi izolované z dermatofibromu jsou fenotypově velmi podobné fibroblastům připraveným z bazaliomu a jako ony indukují u zdravých lidských keratinocytů vysokou expresi keratinu-19. Maligní fibrózní histiocytom, další kožní mesenchymový nádor, jehož histogeneze je ale nejspíše odlišná, není spojen s hyperplazií povrchové epidermis *in vivo*. Kokultivace zdravých keratinocytů s fibroblasty izolovanými z maligního fibrózního histiocytomu nevyvolává změnu jejich fenotypu, což koreluje s předchozími histopatologickými poznatky (Han, 2001).

Za velmi důležitou považujeme skutečnost, že fibroblasty připravené z benigního fibrózního hystiocytomu produkují i *in vitro* extracelulární matrix bohatou na galektin-1.

**Smetana, K., Jr., Szabo, P., Lacina, L., Dvořánková, B., Plzák, J., Čada, Z., Chovanec, M., Betka, J., Strnad, H., Kolář, M., Vlček, Č., Motlík, J., Kovářová, H., Jarkovská, K.:
Terapeutické použití kombinace protilátek nebo jejich Fab fragmentů pro blokaci
bioaktivních proteinů produkovaných nádorově-asociovanými fibroblasty. PV 2011-222**

Již dříve bylo prokázáno, že CAF izolované z lidského dlaždicového karcinomu ovlivňují normální lidské keratinocyty. Jejich aktivita není podmíněna přímým kontaktem obou populací buněk (Lacina et al., 2007b, Strnad et al., 2010). V dalších experimentech jsme pomocí studie transkriptomu na celogenomové úrovni (ILLUMINA), imunocytochemicky a metodami Luminex a ELISA sledovali druhý pól téže interakce, tedy vliv různých typů keratinocytů (normální, nádorové-FaDu) na zdravé lidské fibroblasty. Výsledky byly porovnávány s analýzou transkriptomu získanou u 72 pacientů trpících dlaždicovým karcinomem hlavy a krku a imunohistochemickým vyšetřením těchto vzorků. Při této komparativní analýze byla zjištěna jak v nádorech tak u kokultivovaných fibroblastů pod vlivem buněk FaDu vysoká exprese prozánětlivého cytokinu IL-6 a chemokinů IL-8 a CXCL1/GRO α . Oba typy receptorů pro IL-8 byly navíc významně přítomny v nádorech a to jak v buňkách nádorového epitelu (receptory typu R1, R2), tak i v endotelu stromálních kapilár (pouze typ R2). Kondicionovaná média z kultur, v nichž byly pěstovány zdravé fibroblasty spolu s nádorovými buňkami FaDu, významně stimulovala u zdravých lidských keratinocytů expresi keratinu-8, tedy často užívaného znaku špatné biologické prognózy pacientů. Médium z kultury samotných buněk FaDu mělo na keratinocyty efekt signifikantně nižší. Blokáda jednotlivých faktorů protilátkami (IL-6, IL-8, CXCL-1/GRO α) částečně inhibovala expresi keratinu-8 u kultury normálních keratinocytů. Společná blokáda všech tří proteinů expresi keratinu inhibovala úplně. Tyto výsledky ukazují, že vzájemná komunikace nádorových buněk a buněk stromálních by mohla být potenciálním cílem pro nové typy protinádorové biologické terapie, při níž by byla protilátkou, či kombinací protilátek, inhibována aktivita faktorů podílejících se na této mutuální interakce. V úvahu by připadalo i použití malých blokačních molekul inhibujících aktivitu receptorů či cytokinů. Pro jistý terapeutický potenciál byla na základě výše uvedených výsledků podána patentová přihláška.

Dvořánková, B., Szabo, P., Lacina, L., Kodet, O., Matoušková, E., Smetana, K., Jr.:
Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. Histochem. Cell Biology
DOI: 10.1007/s00418-012-0918-3 (2012) (IF 4.727)

CAF vykazují značný účinek na biologické chování různých typů nádorů včetně karcinomu prsu. V předchozích pracích jsme sledovali účinek CAF izolovaných z dlaždicového karcinomu hlavy a krku a kožního bazaliomu na zdravé keratinocyty, které pod jejich vlivem měnily svůj fenotyp a exprimovaly následně keratin-8 a -19 (Lacina et al., 2007a,b). V další námi publikované studii jsme zjistili, že CAF pocházející z bazaliomu navozují i změnu fenotypu kokultivovaných NIH 3T3 myších fibroblastů, které získaly a následně si i po určitou dobu udržovaly vlastnosti multipotentních kmenových buněk podobných MSC. Tato pozorování dokládají, že nejen epitelově-mesenchymová interakce může sehrávat důležitou roli v biologii nádorů, ale že interakce mezi buněčnými populacemi v nádoru jsou ještě komplexnější. V dalším zkoumání jsme proto věnovali pozornost specifitě těchto interakcí, tedy otázce, zda interakce je specifická pro určitý typ nádoru, nebo zda má obecnější charakter. Kokultivovali jsme proto nádorovou linii EM-G3 pocházející z K-19 pozitivního karcinomu prsu s různými CAF pocházejícími z nádorů s odlišnou i podobnou histogenezí (jmenovitě z dlaždicového karcinomu hlavy a krku, kožního bazaliomu a melanomu a z kožní metastázy karcinomu prsu; jako kontroly bylo užito normálních dermálních fibroblastů). CAF uniformně, bez ohledu na typ nádoru z něhož byly izolovány, indukovaly v buňkách EM-G3 na rozdíl od kontroly expresi keratinu-8. Positivita keratinu-14, tedy znaku myoepitelové/bazální diferenciaci, byla prokázána u buněk pod vlivem jak kontrolních fibroblastů, tak i CAF. Přítomnost obou intermediálních filament (K-8+, K14+), tedy znaků prekurzorových buněk, byla navozena pouze kokultivací EM-G3 s CAF. CAF neměnily ani proliferativní aktivitu nádorových epitelových buněk (Ki67 negativní), ani nedošlo k reexpresi *in vivo* přítomného kmenového znaku K-19. Z těchto pozorování usuzujeme, že zvolený model *in vitro* testování vlivu různých CAF nezahrnuje jistě všechny bioaktivní komponenty, které jsou obsaženy ve specifickém nádorovém mikroprostředí *in vivo*. Přes to, s ohledem na naše předchozí práce, ale opět poukazujeme na pozoruhodnou plasticitu fenotypu, kterou normální keratinocyty odpovídají na environmentální vlivy vyvolané CAF. Závěrem můžeme říci, že efekt CAF izolovaných i z různých typů karcinomů není striktně specifický podle jejich původu, ale že vykazuje určité vlastnosti platné i u ostatních typů nádorů. Určení

nádorově specifických faktorů jako cílů pro potenciální onkologickou léčbu by jistě mohlo přispívat k individualizované onkologické léčbě.

Szabo, P., Kolář, M., Dvořánková, B., Lacina, L., Štork, J., Vlček, Č., Strnad, H., Tvrdek, M., Smetana, K., Jr.: 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: 233-248 (2011) (IF 4.898)

V předchozí práci vycházející z naší laboratoře (Lacina et al., 2007a) byl zjištěn výrazný biologický potenciál CAF izolovaných z bazaliomu na kokultivované normální keratinocyty, které následně měnily svůj fenotyp a exprimovaly intermediální filamentum keratin-19, znak kmenových buněk epidermis. Otázkou však zůstává, zda mohou tyto CAF také ovlivňovat fibroblasty, tedy zatím normální tkáňové fibroblasty, které jsou v zóně prospektivního šíření nádoru. Na rozdíl od kokultivačních pokusů se zdravými keratinocyty, které lze snadno odlišit na základě fenotypu od CAF, neumožňuje kokultivace CAF se zdravými fibroblasty zjistit, která populace představuje CAF a která sledované normální fibroblasty. Mezi oběma populacemi jsou totiž pouze funkční, nikoli morfologické rozdíly. Protože jsme se chtěli vyhnout možným negativním vlivům navozeným značením buněk pomocí GFP, zvolili jsme systém, v němž jsme kokultivovali s lidskými CAF dobře etablovanou linií pocházející z jiného živočišného druhu, tedy myši NIH 3T3 fibroblasty. Odlišný druhový původ bylo možno spolehlivě sledovat pomocí imunocytochemie. Během přímé kokultivace jsme zjistili, že NIH 3T3 díky rychlejší kinetice buněčného cyklu během 3 týdnů úplně numericky dominovaly ve směsné populaci a lidské CAF tvořily pouze marginální zlomek populace. Vysoká čistota populace fibroblastů byla ověřena imunocytochemicky a sekvenačně, což umožnilo pohlížet na sledované buňky na konci experimentálního období jako na populaci čistě murinního původu. Během společné kultivace získaly fibroblasty NIH 3T3 některé znaky kmenových buněk, např. Oct-4, Nanog a Sox-2. Vzhledem k tomu, že tyto znaky byly původně u NIH 3T3 negativní, je možno navozenou změnu připisovat vlivu kokultivovaných CAF, jakkoli byla jejich numerická denzita na konci sledovaného experimentu zanedbatelná, či nulová. Zároveň NIH 3T3 získaly schopnost diferencovat se do adipocytů a chondroblastů. Schopnost diferenciaci do osteoblastů vykazovaly NIH 3T3 i bez předchozí kokultivace s CAF. Pomocí ILLUMINA analýzy transkriptomu jsme detekovali skupinu růstových faktorů (TGFβ3, NGF, FGF7, IGF2, BMP6, LEP), které by mohly hrát roli při získávání

výsledného multipotentního charakteru NIH 3T3 fibroblastů. Transkriptom CAF potvrdil změny v několika regulačních drahách oproti normálním fibroblastům. Tyto regulační dráhy se uplatňují při buněčném cyklu, zrání buněk, ve drahách genu p53 nebo genů zapojených do produkce složek ECM. Výsledky korelují s poznatky o důležitosti stromatu při modulaci proinvasivního chování maligních nádorů i pro jejich potenci metastazovat do vzdálenějších oblastí (Condon, 2005; Lacina et al., 2007a,b). Naše závěry potvrzují důležitou roli mesenchymové kmenové buňky při formování bioaktivního stromatu (Mishra et al., 2009), jako i její nezastupitelný podíl na biologickém chování nádorů včetně metastazování (Karnoub et al., 2007). Za velmi důležité považujeme zjištění, že CAF se mohou minimálně podílet na podpoře mikroprostředí, které umožňuje existenci kmenových buněk v nádorovém stromatu.

8.3. Sledování účinku galektinu-1 jako faktoru indukujícího tvorbu myofibroblastů a komponentů extracelulární matrix.

Dvořánková, B., Szabo, P., Lacina, L., Gal, P., Uhrova J., Zima, T., Kaltner, H., André, S., Gabius, H-J, Syková, E., Smetana, K., Jr.: Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. *Cells Tissues Organs* 194: 469-480 (2011) (IF 2.302)

Smetana, K., Jr., Gabius, H.-J., Dvořánková, B., Kalter, H., Lacina, L., André, S., Szabo, P., Valach, J., Zima, T., Syková, E., Jendelová, P.: Použití galektinů a způsob přípravy myofibroblastů a nanovláken extracelulární matrix. Český národní patent č. 302505, 2011

Bylo prokázáno, že galektin-1 je bohatě zastoupen v nádorovém stromatu (Lacina et al., 2007a; Suassuez et al., 2009). Kromě toho byla popsána jeho vysoká exprese i v granulační tkáni hojící se rány prasete domácího (Klíma et al., 2009) a potkana (Gál et al., 2011). Galektin-1 podporuje vzájemnou vazbu mezi buňkami nebo interakci buňky s glykoproteiny matrix (André et al., 1999; Chang et al., 2004; Kadri et al., 2005). Interaguje totiž s $\alpha 5\beta 1$ integrinem, který je spojen nejen s buněčnou adhezí, ale i například růstem (André et al., 2007; Wang et al., 2009). Potenciál galektinu-1 reprogramovat diferenciaci buněk modulací jejich genové exprese byl zjištěn u mesenchymových kmenových buněk a kůže plodu, kde exprese kolagenu (COL1A2) přes TGF- β /Smad3 signální dráhu vede ke konverzi buněk směrem ke svalovým buňkám (Goldring et al., 2002; Fischer et al., 2005; Chan et al., 2006; Okano et al., 2008). Jak bylo demonstrováno v kapitole o nádorovém stromatu, přítomnost CAF expresí α -SMA blízkých myofibroblastů je typická pro stroma nádoru i pro hojící se ránu. Tato skutečnost vyvolává otázku, zda se galektin-1 nemůže podílet na vzniku myofibroblastu, jako buněčného elementu typického pro oba uvedené patologické stavy. Rekombinantní galektiny jak normální, tak s alterovanou strukturou tedy byly přidávány ke kultuře normálních lidských dermálních fibroblastů. Bylo zjištěno, že galektin-1 a v menší míře i galektin-3, -4 a -7 indukují konverzi fibroblastů na myofibroblasty. Účinek galektinů je synergický s účinkem TGF- $\beta 1/3$, který je známým induktorem tohoto procesu (De Wever et

al., 2003), ale není na něm závislý. Po stimulaci galektinem-1, -4 a -7 tvoří fibroblasty a myofibroblasty trojrozměrné sítě extracelulární matrix s tloušťkou vlákna 140 ± 60 nm. Tyto sítě jsou vždy tvořeny zejména fibronectinem a galektinem-1, bez ohledu na typ stimulujícího galektinu. Interfolikulární keratinocyty pěstované na takto připravených sítích mění svoji morfologii i fenotyp. Jsou velmi malé a exprimují keratin-19, který je znakem nízce diferenciovaných keratinocytů (Dvořánková et al., 2005). Aplikace galektinu-1 na poraněnou kůži laboratorního potkana významně zlepšují hojení, zejména indukci kontrakce rány.

Výše uvedené nálezy ukazují, že galektin-1 by mohl být použitelný při podpoře hojení, biotechnologické přípravě extracelulární matrix i přípravě myofibroblastů. Tyto biotechnologické postupy byly pro možný komerční přesah již námi patentovány.

9. Splnění cílů disertační práce

- Průkaz glykoepitopů reaktivních pro galektin-3 a to i fosforylovaný se jeví jako vhodný prognostický marker pro další osud pacientů s dlaždicovým karcinomem hlavy a krku. Posttranslační modifikace - fosforylace galektinu-3 nemá účinek na vazbu lektinu na buňky normální ani nádorové tkáně.
- Nádorově asociované fibroblasty izolované z různých karcinomů vycházejících z dlaždicových epitelů vykazují účinek na fenotyp zdravých keratinocytů. Určitý analogický biologický efekt mohou vykazovat ale i fibroblasty z jiných epitelových nádorů (např. karcinom prsu), či dokonce z mesenchymových nádorů (benigní fibrózní histiocytom). Biologická aktivita CAF v různých typech nádorů se zdá být jevem nádorově nespecifickým, ačkoli molekulární mediátory, či jejich sítě mohou být u různých typů nádorů odlišné. Pomocí analýzy transkriptomu jsme detekovali skupinu genů, které jsou odlišně exprimované u stromálních fibroblastů a zdravých fibroblastů. Biologický účinek produktů daných genů jsme testovali na zdravých keratinocytech a výsledek ověřili použitím příslušných blokačních protilátek. IL-6, IL-8 a CXCL1 jsou kandidáty odpovědnými za biologickou aktivitu CAF u dlaždicového karcinomu v oblasti hlavy a krku. CAF z bazaliomu mají potenciál utvářet vhodné nádorové mikroprostředí stimulující výskyt buněk se znaky mezenchymových kmenových buněk. Celogenomová analýza pomohla určit kandidátní růstové faktory, které se mohou podílet na této aktivitě. Tento bod považujeme za hlavní výsledek disertace. Část výsledků je shrnuta ve vyžádaném přehledném článku (Plzák et al., 2010).
- Zjistili jsme, že galektin-1 a v menší míře i další zástupci této rodiny jsou schopny transformovat fibroblasty na myofibroblasty nezávisle (avšak synergisticky) na přítomnosti TGF- β 1/3. Galektin-1 stimuluje fibroblasty/myofibroblasty k masivní produkci extracelulární matrix bohaté na fibronectin a galektin-1. Vzniklá 3D síť je vhodná ke kultivaci buněk, zejména keratinocytů. Galektin-1 aplikovaný do rány podporuje hojení.
- Domníváme se, že některé výsledky by mohly být prakticky použitelné, proto byly podány celkem 3 patentové přihlášky, ve 2 případech byl patent již udělen.

10. Použitá literatura

Allahverdian S., Patchell B.J., Dorscheid D.R (2006) Carbohydrates and epithelial repair more than just posttranslational modification. *Curr Drug Targets* 7(5): 597-606

André S., Kojima N., Yamazaki C., Fink H., Kaltner H., Kayser K., Gabius H.-J (1999) Galectins-1 and -3 and their ligands in tumor biology. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 461–474

André S., Sanchez-Ruderisch H., Nakagawa H., Buchholz M., Kopitz J., Forberich P., Kemmner W., Böck C., Deguchi K., Detjen K.M., Wiedenmann B., von Knebel Doeberitz M., Gress T.M., Nishimura S.-I., Rosewicz S., Gabius H.-J (2007) Tumor suppressor p16 INK4a : modulator of glycomic profile and galectin-1 expression to increase susceptibility to carbohydrate-dependent induction of anoikis in pancreatic carcinoma cells. *FEBS J* 274: 3233–3256

Bendall L (2005) Chemokines and their receptors in disease. *Histol Histopathol* 20: 907–26

Bies C., Lehr C.M., Woodley J.F (2004) Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 425–35

Bouckaert J., Berglund J., Schembri M., De Genst E., Cools L.,Wuhrer M (2005) Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the Escherichia coli FimH adhesion. *Mol Microbiol* 55: 441–55

Brenmoehl J., Miller S.N., Hofmann C., Vogl D., Falk W., Schölmerich J., Rogler G (2009) Transforming growth factor- β 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration. *World J Gastroenterol* 15: 1431–1442

Brewer C.F (2002) Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim Biophys Acta* 1572(2-3): 255-62

Bromberg J., Wang T.C (2009) Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell* 15: 79–80

Buzás E.I., György B., Pásztói M., Jelinek I., Falus A., Gabius H.J (2006) Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. *Autoimmunity* 39(8): 691-704

- Condon M.S (2005) The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Semin Cancer Biol* 15: 132–137
- Cooper D.N (2002) Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta* 1572(2-3): 209-31
- Cordon-Cardo C (2010) Cancer stem cells. *Ann Oncol* 21 Suppl 7:vii93-4
- De Wever O., Mareel M (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* Jul 200(4): 429-47
- Douglas W.G., Tracy E., Tan D., et al (2004) Development of head and neck squamous cell carcinoma is associated with altered cytokine responsiveness. *Mol Cancer Res* 2: 585–93
- Downs-Kelly E., Nayeemuddin K.M., Albarracin C., Wu Y., Hunt K.K., Gilcrease M.Z (2009) Matrix-producing carcinoma of the breast: an aggressive subtype of metaplastic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 33(4): 534-41
- Dvorak H.F (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New Engl J Med* 315: 1650-1659
- Dvořánková B., Smetana K.Jr., Chovanec M., Lacina L., Štork J., Plzáková Z., Galovičová M., Gabius H.-J (2005) Transient expression of keratin K19 is induced in originally negative interfollicular epidermal cells by adhesion of suspended cells. *Int J Mol Med* 16: 525–53
- Fidler I.J (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nature Rev Cancer* 3: 453-458
- Fillies T., Werkmeister R., Packeisen J., Brandt B., Morin P., Weingart D., Joos U., Berger H (2006) Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer* 6: 10
- Fischer C., Sanchez-Ruderisch H., Welzel M., Wiedenmann B., Sakai T., André S., Gabius H.-J., Khachigian L., Detjen K.M., Rosewicz S (2005) Galectin-1 interacts with the α 5 β 1 fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *J Biol Chem* 280: 37266–37277
- Frisch S.M., Ruoslahti E (1997) Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 9: 701–706

- Gabius H.-J., André S., Kaltner H., Siebert H.C (2002) The sugar code: functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta* 1572(2-3): 165-77
- Gabius H.-J (ed) (2009) *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*. Weinheim, Wiley-VCH.
- Gál P., Vasilenko T., Kostelníková M., Jakubco J., Kovác I., Sabol F., André S., Kaltner H., Gabius H.J., Smetana K. Jr (2011) Open Wound Healing In Vivo: Monitoring Binding and Presence of Adhesion/Growth-Regulatory Galectins in Rat Skin during the Course of Complete Re-Epithelialization. *Acta Histochem Cytochem* 26;44(5): 191-9
- Glas J., Torok H.P., Schneider A., Brunner G., Kopp R., Albert E.D., Stolte M., Folwaczny C (2004) Allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early gastric cancer. *J Clin Oncol* 22: 4746–4752
- Goldring K., Jones G.E., Thiagarajah R., Watt D.J (2002) The effect of galectin-1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts in vitro. *J Cell Sci* 115: 355–366
- Gorelik E., Galili U., Raz A (2001) On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 20: 245–77
- Hall B., Andreeff M., Marini F (2007) The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol* 180: 263–283
- Han K.-H., Huh C.-H., Cho K.-H (2001) Proliferation and differentiation of the keratinocytes in hyperplastic epidermis overlying dermatofibroma: immunohistochemical characterization. *Am J Dermatopathol* 23: 90-98
- Hirabayashi J., Kasai K (1993) The family of metazoan metal-independent betagalactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 3(4): 297-304
- Hironobu H., Yoshiaki N (2007) Recent progress in the field of glycopeptide synthesis *Peptide Science* 88: 308-324
- Houzelstein D., Gonçalves I.R., Fadden A.J., Sidhu S.S., Cooper D.N., Drickamer K., Leffler H., Poirier F (2004) Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol* 21(7): 1177-87

Hufleijt M.E., Turck C.W., Lindstedt R., Barondes S.H., Leffler H (1993) L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I *J Biol Chem* 268: 26712–26718

Chan J., O'Donoghue K., Gavina M., Torrente Y., Kennea N., Mehmet H., Stewart H., Watt D.J., Morgan J.E., Fisk N.M (2006) Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. *Stem Cells* 24: 1879–1891

Chang Y.-Y., Cheb S.-J., Liang H.-C., Sung H.-W., Lin C.-C., Juany R.-R (2004) The effect of galectin-1 on 3T3 cell proliferation on chitosan membrane. *Biomaterials* 25: 3603–3611

Chatzistamou I., Dioufa N., Trimis G., Sklavounou A., Kittas C., Kiaris H., Papavassiliou A.G (2010) p21/waf1 and smooth-muscle actin alpha expression in stromal fibroblasts of oral cancers. *Cell Oncol* 34(5): 483-8

Kadri T., Lataillade J.-J., Doucet C., Marie A., Ernou I., Bourin P., Joubert-Caron R., Caron M., Lutomski D (2005) Proteomic study of galectin-1 expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 14: 204–212

Karnoub A.E., Dash A.B., Vo A.P., Sullivan A., Brooks M.W., Bell G.W., Richardson A.L., Polyak K., Tubo R., Weinberg R.A (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449: 557–565

Klima J., Motlík J., Gabius H.-J., Smetana K. Jr (2007) Phenotypic characterization of porcine interfollicular keratinocytes separated by elutriation: a technical note. *Folia Biol* 53(1): 33-6

Kopitz J., Bergmann M., Gabius H.-J (2010) How adhesion/growth-regulatory galectins-1 and -3 attain cell specificity: case study defining their target on neuroblastoma cells (SK-N-MC) and marked affinity regulation by affecting microdomain organization of the membrane. *IUBMB Life* 62: 624–628

Kopitz J., von Reitzenstein C., André S., Kaltner H., Uhl J., Ehemann V., Cantz M., Gabius H.-J (2001) Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. *J Biol Chem* 276: 35917–3523

- Krelin Y., Voronov E., Dotan S., Elkabets M., Reich E., Fogel M., Huszar M., Iwakura Y., Segal S., Dinarello C.A (2007) Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer Res* 67: 1062–1071
- Kulbe H., Levinson N.R., Balkwill F., Wilson J.L (2004) The chemokine network in cancer—much more than directing cell movement. *Int J Dev Biol* 48(5-6): 489-96
- Labsky J., Dvořankova B., Smetana K. Jr., Holikova Z., Brož L., Gabius H.-J (2003) Mannosides as crucial part of bioactive supports for cultivation of human epidermal keratinocytes without feeder cells. *Biomaterials* 24: 863-872
- Lacina L., Smetana K. Jr., Dvořankova B., Pytlik R., Kideryova L., Kucerova L., Plzakova Z., Štork J., Gabius H.-J. and Andre S (2007) Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *Br J Dermatol* 156: 819-829 (b)
- Lacina L., Dvořankova B., Smetana K. Jr., Chovanec M., Plzák J., Tachezy R., Kideryová L., Kucerová L., Cada Z., Boucek J., Kodet R., André S., 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): 837-48 (a)
- Lahm H., André S., Hoeflich A., Kaltner H., Siebert H.C., Sordat B., von der Lieth C.W., Wolf E., Gabius H.-J (2004) Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj J* 20(4): 227-38
- Li H., Fan X., Houghton J.-M (2007) Tumor Microenvironment: The Role of the Tumor Stroma in Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 101: 805–815
- Li L., Neaves W.B (2006) Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res* 66: 4553–4557
- Li B., Vincent A., Cates J., Brantley-Sieders D.M., Polk D.B., Young P.P (2009) Low levels of tumor necrosis factor alpha increase tumor growth by inducing an endothelial phenotype of monocytes recruited to the tumor site. *Cancer Res* 69: 338–348
- Lobsanov et al (1993) X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J Biol Chem* 268(36): 27034-8

- Mazurek N., Conklin J., Byrd J.C., Raz A., Bresalier R.S (2000) Phosphorylation of the b-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J Biol Chem* 275: 36311–36315
- Minko T (2004) Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 491–509
- Mishra P.J., Mishra P.J., Glod J.W., Banerjee D (2009) Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res* 69: 1255–1258
- Mody R., Joshi S., Chaney W (1995) Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J Pharmacol Toxicol Methods* 33: 1–10
- Moisa A., Fritz P., Eck A., Wehner H.-D., Mürdter T., Simon W., Gabius H.-J (2007) Growth/adhesion-regulatory tissue lectin galectin-3: stromal presence but not cytoplasmic/nuclear expression in tumor cells as a negative prognostic factor in breast cancer. *Anticancer Res* 27: 2131–2140
- Motlík J., Klíma J., Dvořánková B., Smetana Jr. K (2007) Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation. *Theriogenol* 67: 105–111
- Nagy N., Legendre H., Engels O., André S., Kaltner H., Wasano K., Zick Y., Pector J.C., Decaestecker C., Gabius H.-J., Salmon I., Kiss R (2003) Refined prognostic evaluation in colon cancer using immunohistochemical galectin fingerprinting. *Cancer* 97: 1849–1858
- Nakahara S., Oka N., Raz A (2005) On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* 10(2): 267-75
- Okano K., Uchida K., Nitta K., Hayashida T (2008) Galectin-1 suppresses 2(I) collagen through Smad3 in renal epithelial cells. *Cell Mol Life Sci* 65: 3304–3311
- Opdenakker G., Rudd P.M., Ponting C.P., Dwek R.A (1993) Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J* 7: 1330–7
- Plzak J., Smetana K. Jr., Betka J., Kodet R., Kaltner H., Gabius H.-J (2000) Endogenous lectins (galectins-1 and -3) as probes to detect differentiation-dependent alterations in human squamous cell carcinomas of the oropharynx and larynx. *Int J Mol Med* 5(4): 369-72

Plzák J., Smetana K. Jr., Hrdlicková E., Kodet R., Holíková Z., Liu F.T., Dvoránková B., Kaltner H., Betka J., Gabius H.-J (2004) Expression of galectin-3-reactive ligands in squamous cancer and normal epithelial cells as a marker of differentiation. *Int J Oncol* 19(1): 59-64

Rabinovich G.A., Toscano M.A., Jackson S.S., Vasta G.R (2007) Functions of cell surface galectin–glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol* 17: 513–20

Rakesh K., Agrawal D.K (2005) Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochem Pharmacol*

Räsänen K., Vaheri A (2010) Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* 15;316(17): 2713-22

Sakurai T., He G., Matsuzawa A., Yu G.Y., Maeda S., Hardiman G., Karin M (2008) Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell* 14: 156–165

Sanchez-Ruderisch H., Fischer C., Detjen K. M., Welzel M., Wimmel A., Manning J. C., André S., Gabius H.-J (2010) Tumor suppressor p16 INK4a : downregulation of galectin-3, an endogenous competitor of the pro-apoptosis effector galectin-1, in a pancreatic carcinoma model. *FEBS J* 277: 3552–3563

Saussez S., Decaestecker C., Cludts S., Ernoux P., Chevalier D., Smetana K. Jr., Andre S., Leroy X. and Gabius H.-J (2009) Adhesion/growth – regulatory tissue lectin galectin-1 in relation to angiogenesis/lymphocyte infiltration and prognostic relevance of stromal up-regulation in laryngeal carcinomas. *Anticancer Res* 29: 59-65

Shalom-Feuerstein R., Cooks T., Raz A., Kloog Y (2005) Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 65(16): 7292-300

Sharon N (1980) Carbohydrates. *Sci Am* 243: 90–116

Sharon N., Lis H (1989) Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246: 227–34

Sharon N., Lis H (1993) Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am* 268: 82–9

- Sharon N., Lis H (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14: 53–62
- Sharon N., Glick M.C., Hughes R.C (2008) In memory of Roger W. Jeanloz, a pioneer glycobiologist. *Glycobiology* 18(3): 206-8
- Shchors K., Shchors E., Rostker F., Lawlor E.R., Brown-Swigart L., Evan G.I (2006) The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1beta. *Genes Dev* 20: 2527–2538
- Smetana K. Jr., André S (2008) Mammalian lectin as tool in glycochemistry and histochemistry with relevance for diagnostic procedure. *Methods Mol Biol* 418: 171-86
- Strnad H., Lacina L., Kolár M., Cada Z., Vlcek C., Dvoránková B., Betka J., Plzák J., Chovanec M., Sáčková J., Valach J., Urbanová M., 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): 201-11
- Sturm A., Lensch M., André S., Kaltner H., Wiedenmann B., Rosewicz S., Dignass A.U., Gabius H.-J (2004) Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *J Immunol* 173: 3825–3837
- Talbot K., MacLeod A.R (1983) Novel form of non-muscle tropomyosin in human fibroblasts. *J Mol Biol* 15;164(1): 159-74
- Thiery J.P., Acloque H., Ruby Y.J.H., Nieto M.A (2009) Epithelial-Mesenchymal transitions in development and disease *cell* 139: 871-890
- Timpl R (1996) Macromolecular organization of basement membranes. *Current Op Cell Biol* 8 : 618–624
- Varki A., Freeze H.H., Manzi A.E (2009) Overview of glycoconjugate analysis. *Curr Protoc Protein Sci*. Chapter 12:12.1 12.1.1-8
- Villalobo A., Gabius H.-J (1998) Signaling pathways for transduction of the initial message of the glycode into cellular responses. *Acta Anat* 161(1-4): 110-29
- Wade Jr. L.G (1999) Organic chemistry. Prentice-Hall Inc.

Watt F.M., Fujiwara H (2011) Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *1*;3(4) pii: a005124. doi:10.1101/cshperspect.a005124

Willipinski-Stapelfeldt B., Riethdorf S., Assmann V., Woelfle U., Rau T., Sauter G., Heukeshoven J., Pantel K (2005) Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* *11*(22): 8006-14

Yoichi T., Nagashima T., Yagata H., Yoshida K., Suzuji M., Fujimori T., Sangai T., Nakatani Y., Miyazaki M (2009) Breast cancer with cartilaginous and/or osseous metaplasia. *Breast Cancer* *16*: 234–237

