

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Glykobiologie nádorů hlavy a krku

Pavol Szabo

2012

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Biologie a patologie buňky

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc.

Školící pracoviště: Anatomický ústav 1.LF UK

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

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Souhrn	4
Summary	4
1. Úvod	6
2. Cíle práce	7
3. Materiál a metodika	8
4. Výsledky	9
4.1. Vliv posttranslačních modifikací (fosforylace) galektinu-3 na jeho vazbu na reaktivní glykoepitopy zejména u nádorů hlavy a krku.....	9
4.2. Sledování biologické aktivity nádorově asociovaných fibroblastů izolovaných ze spinocelulárního karcinomu, bazaliomu a dermatofibromu v podmínkách <i>in vitro</i> a jejich potenciál měnit fenotyp zdravého epitelu i fibroblastů.....	10
4.3 Sledování účinku galektinu-1 jako faktoru indukujícího tvorbu myofibroblastů a komponentně extracelulární matrix	13
5. Závěry	15
6. Použitá literatura	16

Souhrn

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 účastňují 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 tkáňe 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.

Summary

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.

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 ohledem na vzájemné interakce nádorové buňky a nádorového epitelu.

Nádory hlavy a krku tvoří kolem 5 % všech nádorů. Ročně je zaznamenáno 500 000 celosvětově nových případů. V České republice je to 1000 nových pacientů za rok. Osmdesát až devadesát procent těchto nádorů je představováno dlaždicovými karcinomy, nejčastěji oblasti orofaryngu a laryngu. Jedním z nejvíce rizikových faktorů pro vznik těchto nádorů je kouření. I přes rozvoj chirurgických metod včetně onkologických léčebných režimů, je terapie těchto tumorů svízelná a pětileté přežití u pokročilých nádorů je stále velmi nízké. Pro nádory jsou kromě lokální agresivity a metastatického potenciálu typické i časné recidivy spojené s vysokou frekvencí výskytu duplicitního ložiska. 60% pacientů umírá na lokoregionální recidivu. Řešením situace je hledání nových znaků (markérů), které by lépe charakterizovaly tyto nádory a napomohly tak při upřesnění léčebné strategie. Jedním z těchto znaků by mohly být endogenní lektiny zvané galektiny a jejich ligandy (Plzák et al., 2004). Galektiny představují malou a strukturně poměrně konservovanou skupinu proteinů, která má afinitu k β -galaktosidům. Jejich schopnost „číst“ velice variabilní non-genomovou informaci uchovanou v strukturní podobě sacharidů byla dlouhé léta opomíjená. 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).

Galektiny se uplatňují v široké škále biologických dějů, kde se podílejí na regulaci proliferace, diferenciaci, apoptózy a modulaci mezibuněčné interakce a interakce extracelulární matrix, a to jak v normálních, tak i za patologických stavů. Zvýšená exprese některých galektinů byla prokázána ve stromatu nádorů vycházejících z dlaždico-buněčného epitelu a granulační tkáni hojící se rány (Klima et al., 2007; Lacina et al., 2007b). Jsou známé jisté podobnosti mezi organizací nádorového stromatu a granulační tkáni hojící se rány (Dvorak, 1986). Galektiny můžou sloužit jako vhodné prognostické markéry pro prožívání pacientů ale i jako důležité komponenty při utváření reaktivního nádorového stromatu. Dnešní poznatky ukazují, že chování nádoru nebude záviset jenom na vlastním nádorovém parenchymu ale hlavně i na jeho „podpůrném“ stromatu. Tvoří niche pro progresi a migraci

nádorových buněk, ale i substrát pro nidaci metastazujících buněk. Je zdrojem adhezivních/signálních molekul, růstových a regulačních faktorů a bioaktivních molekul. Aktivně se podílí na ovlivňování stavu diferenciaci nádorových buněk a jejich následném biologickém chování. Nádorově asociovaná fibroblasty představují hlavní producenty komponentů extracelulární matrix a stejně jsou i nejpočetnější buněčnou složkou nádorového stromatu. Z toho důvodu se jeví jako nejideálnější cíle pro výzkum a ovlivňování chování nádoru.

Doposud byla léčba nádorů zaměřená hlavně na zkoumání samotného nádorového parenchymu. Každý pacient ale představuje individuální a jedinečný cíl, kde kvůli absenci komplexnosti a univerzálnosti vlastností nádorů je často terapie drahá a bohužel neúčinná. Právě chování nádorového stromatu se zdá být více obecné a tím i lépe terapeuticky zasažitelné.

2. Cíle 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, 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.

3. Materiál a metodika

V této části jsou shrnuty pouze hlavní metodické principy využití při řešení vytčených úkolů, detailní popis metodik je uveden v jednotlivých člácích, které tvoří součást této dizertační 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 zdravotnického zařízení v souladu s principy bioetiky ve smyslu Helsinské konvence. Tyto tkáně byly buď zmrazeny a histologicky zpracovány, nebo byly použity jako zdroj buněk pro kultivační 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 neznačené 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.

4. Výsledky

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

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/cytoplazmě je závislá na posttranslační modifikaci (fosforylaci) na N-konci lektinu (Hufleijt et al., 1993; Mazurek et al., 2000). Ve studii jsme se zaměřili na stanovení rozdílu vazebné reaktivity nefosforylovaného a fosforylovaného galektinu-3 ve vícevrstevnatém 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 diference. 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.

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

V předchozích studiích vycházejících z naší laboratoře jsme ukázali, 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 dermatofibroma). 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 nejspíše odlišná, není spojen s hyperplazií povrchové epidermis. 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 histiocytomu produkují i *in vitro* extracelulární matrix bohatou na galektin-1.

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 metodou Luminex a ELISA sledovali druhý pól téže interakce, tedy vliv různých typů

keratinocytů (normální, nádorové-FaDu) na zdravé lidské fibroblasty. Získané 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 mnohem nižší. Blokace jednotlivých faktorů protilátkami (IL-6, IL-8, CXCL-1/GRO α) částečně inhibovala expresi keratinu-8 u kultury normálních keratinocytů. Společná blokace všech tří proteinů expresi keratinu úplně inhibovala. Tyto výsledky ukazují, že vzájemná komunikace nádorových buněk a buněk stromálních by mohla být potencionálním cílem pro nové typy protinádorové biologické terapie, při níž by byla protilátkou, či kombinací protilátek, inhibována aktivita faktorů podílejících se na této mutuální interakci. 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.

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 naší 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 určité době 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 histogenezi

(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 diferenciace, 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*. Přesto s ohledem na naše předchozí práce ale opět poukazujeme na pozoruhodnou plasticitu fenotypu, kterou zdravé 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.

V předchozí práci vycházející z naší laboratoře (Lacina et al., 2007a) byl zjištěn výrazný biologický potenciál CAF izolovaných z bazaliomu na kokultivované zdravé 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 jednoduše 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 kokultury s CAF. Pomocí ILLUMINA analýzy transkriptomu jsme detekovali skupinu růstových faktorů (TGF β 3, 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 zdravým 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 proinvasivním chování maligních nádorů a pro jejich invazivitu 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 biologické aktivitě nádorů včetně jeho 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.

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

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 α 5 β 1 integrinem, který je spojen nejen s buněčnou adhesí, 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 vyvolala 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- β 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 tvořené zejména fibronektinem 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 níže 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 nálezy byly pro možný komerční přesah patentovány.

5. Závěry

- 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 a nádorové tkáně.
- Nádorově asociované fibroblasty izolované z různých karcinomů odvozených 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 masivně produkovat extracelulární matrix bohatou na fibronektin 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 udělen.

6. Použitá literatura

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

Condon M.S (2005) The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Semin Cancer Biol* 15: 132–137

De Wever O., Mareel M (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* Jul 200(4): 429-47

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

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 -5-1 fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *J Biol Chem* 280: 37266–37277

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

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

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

- 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
- 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
- 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., Dvoránková 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)
- 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
- 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
- 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
- Plzák J., Smetana K. Jr., Hrdlicková E., Kodet R., Holíková Z., Liu F.T., Dvořankova 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
- 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

Sharon N., Lis H (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14: 53–62

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

Wang J., Lu Z.-H., Gabius H.-J., Rohowsky-Kochan C., Ledeen R.W., Wu G (2009) Crosslinking of GM1 ganglioside by galectin-1 mediates regulatory T cell activity involving TRPC5 channel activation: possible role in suppressing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 182: 4036–4045

Seznam publikací

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

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(6):469-80 (2011) **IF 2.302**

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**

Kideryová, L., Lacina, L., Dvořánková, B., Stork, 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(1):18-26 (2009) **IF 2.973**

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 research.* 30: 455-462 (2010) **IF 1.41**

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(1):68-75 (2009) **IF 0.573**

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**

Smetana, K., Jr., Gabius, H.-J., Dvořánková, B., Kaltner, 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

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

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

Novotný, M., Vasilenko, T., Varinská, L., Smetana, K., Jr., **Szabo, P.**, Sarišský, M., Dvořánková, B., Mojžiš, J., Bobrov, N., Toporcerová, S., Sabol, F., Matthews, B., J., Gál, P.:

ER- α agonist induces conversion of fibroblasts into myofibroblasts, while ER- β agonist increases ECM production and wound tensile strength of healing skin wounds in ovariectomised rats, *Exp Dermatol.* DOI: 10.1111/j.1600-0625.2011.01284 (2011) **IF 4.159**