

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

*Studijní obor: Biomedicína*

*Studijní program: Experimentální chirurgie*



**Zdeněk Fík**

Nové trendy v buněčné a molekulární biologii karcinomů hlavy a krku

*New trends in cell and molecular biology of the head and neck cancer*

Typ závěrečné práce: Disertační práce

Školitel: As. MUDr. Martin Chovanec, Ph.D.

Školitel konzultant: Prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc.

Praha, 2014

## **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, 25. 2. 2014

Zdeněk Fík

Podpis

## **Identifikační záznam**

Fík, Zdeněk, *Nové trendy v buněčné a molekulární biologii karcinomů hlavy a krku. [New trends in cell and molecular biology of the head and neck cancer]*. Praha, 2014. **Počet stran 78**, bez příloh. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku Fakultní nemocnice v Motole, Anatomický ústav. Školitel Chovanec, Martin.

## Abstrakt

Dlaždicové karcinomy hlavy a krku jsou i přes pokroky medicíny v posledních desetiletích výzvou na poli onkologické léčby. Studium molekulární biologie umožňuje blíže charakterizovat vlastnosti nádorů a předpovědět prognózu pro postižené pacienty. Současně je vyvíjeno a klinicky testováno několik léků z kategorie cílené terapie.

Experimentální práce spočívala jak v *in vitro*, tak v *in situ* pokusech prováděných na základě spolupráce mezi několika pracovišti 1.LF UK, Akademie věd ČR, ÚHKT a Fakultou veterinární medicíny Ludwig-Maximilianovy univerzity.

Galektinu-1 je významným induktorem vzniku myofibroblastů/nádorově asociovaných fibroblastů. Tyto fibroblasty jsou, díky své schopnosti indukovat invazivní chování nádorových buněk, považovány za nositele špatné prognózy onemocnění.

Galektin-9 naopak není v karcinomu exprimován a v případě dysplastické tkáně, prokázané například aberantní expresi keratinu 14 a 19, dochází též k aberantní expresi gal-9. Kromě využití galektinů jako prognostických znaků je studován též jejich význam terapeutický. Prezentovaná práce s mutovanými variantami galektinu-2 ukázala možnosti ovlivnění jak farmakodynamiky, tak farmakokinetiky upravených galektinů. Výsledky ukázaly prodloužení biologického rozpadu PEGylovaného galektinu na úkor jeho schopnosti tlumit proliferaci některých nádorových kolonií (erythroleukémie)

Interleukiny IL-6, IL-8, CXCL-1 jsou významným zdrojem signálů v průběhu epitelomesenchymové interakce a jejich působení má za následek snižování diferenciac epitelových buněk. Vliv epitelomesenchymové interakce byl studován i z pohledu nádorových kmenových buněk a jejich vlastností v závislosti na odlišných typech prostředí.

Epitelomesenchymová interakce (EMI) v dlaždicových karcinomech je klíčová pro jejich chování. Studium EMI v kombinaci s glykobiologií a nádorovými kmenovými buňkami přináší nový pohled do nádorové biologie s cílem zlepšit diagnostiku, léčbu a v neposlední řadě i podpořit surveillance postižených pacientů.

**Klíčová slova:** galektin, nádorově asociované fibroblasty, nádorové stroma, nádorová kmenová buňka

## Abstract

Head and neck squamous cell carcinomas are still challenging despite progress in the oncological treatment. Study of the molecular biology allows to deeply characterize tumor properties and to predict the prognosis for affected patients. Nowadays there are many drugs clinically tested in the group of targeted therapy medicine

Experimental work comprised both *in vitro* and *in situ* assays, being performed thanks to the collaboration between a number of departments of the 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine of the Charles University in Prague, Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Hematology and Blood Transfusion and Faculty of Veterinary Medicine of the Ludwig-Maxmillian University Munich.

Galectin-1 is important inductor of the myofibroblasts/cancer associated fibroblasts. These fibroblasts are regarded as negative prognostic markers thanks to their capability of invasive cancer cells induction.

On the other hand, Galectin-9 is not present in the carcinoma and in the case of dysplasia, its expression indicate aberrant features together with aberrant expression of keratin 14 and 19. Except from galectins using as prognostic markers, we focused on the galectins as a therapeutics instruments as well. Presented work with mutant variants of galectin-2 proved their effect on both pharmacodynamics and pharmacokinetics of the modified galectin. The results showed an extension of the biological degradation of the PEGylated galectin to the detriment of its capability to inhibit proliferation of some tumor colonies (e.g. erythroleucaemia).

Interleukins IL-6, IIL-8, CXCL-1 are important source of the signals in the epithelial-mesenchymal interaction and their influence effects on the decreasing of the epithelial cell differentiation. Influence of the epithelial-mesenchymal interaction (EMI) was studied also in the cancer stem cells, focusing on their properties in case of the different kinds of the environment.

Epithelial-mesenchymal interaction in squamous cell carcinomas is crucial for their behavior. Research of the EMI combined with glycobiology and cancer stem cells provides new insight into the cancer biology with the aim to improve diagnosis, treatment and to support surveillance of the affected patients.

**Key words:** galectin, cancer associated fibroblasts, tumor stroma, cancer stem cell

## **Poděkování**

Dizertační práce by nemohla vzniknout bez fantastického vedení oběma školiteli, Martinem Chovancem a Karlem Smetanou.

Velmi důležitou roli v mé vědecké práci hráli spolupracovníci na Anatomickém ústavu – Jaroslav Valach, Pavol Szabo, Ondřej Kodet, Barbora Dvořánková a Lukáš Lacina – a na domovském klinickém pracovišti – Jan Plzák a Zdeněk Čada.

Poděkování patří též kolegům ze spolupracujících pracovišť, konkrétně z Ústavu molekulární genetiky AVČR – Martin Šteffl, Michal Kolář a Hynek Strnad – z Ústavu hematologie a krevní transfúze – Eva Foltynová – a konečně z Ústavu mikrobiologie AVČR – Jan Bouček a Jaroslav Betka.

Významnou měrou se o publikované výsledky zasloužil též Hans-Joachim Gabius z Ústavu fyziologické chemie při Veterinární fakultě Ludwig-Maximilianovy univerzity v Mnichově.

Ani jeden pokus by nakonec nemohl proběhnout bez skvělé asistence laboratorních pracovníků – Marie Jindráková, Radana Kavková, Iva Burdová a Vít Hajdúch.

## Seznam zkratek

- ABC – ATP binding cassette
- Akt – protein-kináza B
- ALCAM - activated leukocyte cell adhesion molecule
- ANGPTL (2, 4) – angiopoietin-like cytokin 4
- ATN-161 – non-RGD-based integrin binding peptide
- Bcl-2 – „B cell lymphoma“ - gen z rodiny bcl
- CAFs – cancer associated fibroblasts
- CCD – charge-coupled device
- CCL (2, 7, 18) – chemokine (C-C motif) ligand
- CD (1a, 4, 8, 11, 29, 34, 38, 44, 45, 83, 133, 166, 318) – cluster domain
- CDCP1 – Cub domain containing protein 1
- CRD – carbohydrate recognition domain
- CS – chondroitinsulfát
- CSCs – cancer stem cells
- CSF-1 – colony stimulated factor-1
- CXCL (1, 12) – CXC ligand
- CXCR (1, 2) – CXC receptor
- Cys – cystein
- DCs – dendritic cells
- ECM – extracelulární matrix
- EET – Epoxyeicosatrienic acid
- EGF – epidermal growth factor
- EGFR – epidermal growth factor receptor
- eIF4E – elevated eukaryotic initiation factor 4E
- EMI – epitelo-mezenchymové interakce
- EMT – epitelo-mezenchymová transformace
- FaDu – hypopharyngeal carcinoma cell line
- FAP – fibroblast activated protein
- FGF (2) – fibroblast growth factor
- Fizz1 – „found in inflammatory zone 1“
- FN – Fibronektin
- Fra-1 – fos-related antigen 1
- FUSIP1 – serine/arginine-rich splicing factor 10
- GAGs – glykosaminoglykany
- Gal (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14) – galektin
- Gal-(1,3)-BS – galectin binding sites
- GRP78 – glucose-regulated protein, 78kDa
- HA – kyselina hyaluronová
- HaCaT - immortal human keratinocyte line
- HER-2 – human epidermal growth factor receptor 2
- HF – human fibroblast
- HGF – hepatocyte growth factor
- HIF-1 – hypoxicko-inducibilní faktor
- HK – human keratinocytes
- HPV – human papillomavirus
- HS – heparansulfát
- IGF-1 – insulin-like growth factor-1
- IGF1-R – insulin-like growth factor-1 receptor
- IL – interleukin
- IMP-3 – insulin-like growth factor II messenger ribonucleic acid-binding protein 3
- iRNA – immune ribonucleic acid
- K (8, 10, 14, 17, 18, 19) – cytokeratin
- Ki67 – protein Ki67
- LAMP – lysosomal associated membrane protein
- Lec2 – mutace v transportéru kyseliny CMP-sialové
- LOX – lysyl oxidáza
- MAL (I,II) – Maackia amurensis lektin
- MAP3K2 – mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2
- MDR1 – multidrug resistance transporter 1

Met – methionin

MET – mezenchymo-epitelová transformace

MMPs (2, 3, 9, 10, 12) – metalloproteinázy

mRNA – messenger ribonucleic acid

mTOR – mammalian target of rapamycin

NeuNAc – kyselina N-acetyl-neuraminová

NG2-proteoglykan – Neuron-gliový proteoglykan 2

NKs – natural killers

NOD/SCID – non obese-diabetic/severe combined immunodeficiency

P4H – Prolyl 4-Hydroxyláza

p53 – protein 53

PDGF – platelet derived growth factor

PEG – polyethylenglykol

PI3K – phosphatidylinositol-3-kináza

PTPLAD1 – protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1

RHAMM – receptor for hyaluronan-mediated motility

SCCF – squamous cell cancer fibroblast

SDF-1 – stromal cell-derived factor 1

siRNA – small interfering ribonucleic acid

SLC25A40 – solute carrier family 25, member 40

SMA – smooth muscle actin

SNL – Sambucus nigra lektin

SP – side population

SPC-A-1 – linie buněk lidského adenokarcinomu plic

SPECTRUM – Study of Panitumumab Efficacy in Patients with Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Cancer

SPIN1 – spindlin 1

Stat3 – signal transducer and activator of transcription 3

TAMs – tumor associated macrophages

TGF ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) – tumor growth factor

TN – tenascin

TNF ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) – tumor necrosis factor

TRIM23 – tripartite motif-containing 23

UDP – glukuronyl-uridindifosfát

VEGF – vascular endothelial growth factor

VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor

VLA-4 – very late antigen-4,  $\alpha 4\beta 1$  integrin



# Obsah

Prohlášení .....	i
Identifikační záznam .....	ii
Abstrakt .....	iii
Abstract .....	iv
Poděkování .....	v
Seznam zkratek .....	vi
<b>1. Úvod.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Obecná onkologie.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Glykobiologie.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Dlaždicové epitelu.....</b>	<b>6</b>
1.3.1. Epitel .....	6
1.3.2. Bazální lamina .....	7
1.3.3. Stroma .....	9
1.3.4. Epitelové nádory .....	9
<b>1.4. Nádorové kmenové buňky a jejich mikroprostředí .....</b>	<b>10</b>
1.4.1. Kmenové buňky .....	10
1.4.2. Nádorové kmenové buňky .....	11
1.4.3. Niche .....	12
<b>1.5. Nádorové prostředí .....</b>	<b>13</b>
1.5.1. Stroma .....	13
1.5.2. Epitelo-mesenchymová interakce .....	17
1.5.3. Epitelo-mesenchymová transformace .....	19
1.5.4. Metastáza.....	20
<b>1.6. Nádory hlavy a krku .....</b>	<b>22</b>
<b>1.7. Cílená terapie.....</b>	<b>24</b>
<b>2. Hypotézy a cíle dizertační práce .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Materiál a metodika .....</b>	<b>28</b>
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Přehled .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2. Souhrn dosažených výsledků .....</b>	<b>30</b>
4.2.1. Galektiny, jakožto nositelé informace o normalitě epitelu, induktoři invazivního chování nádoru a prostředky k biologické léčbě (Publikace 1-3).....	30
4.2.2. Role chemokinů a interleukinů v EMI (Pubikace 4).....	33
4.2.3. Vliv prostředí na kmenové vlastnosti nádorových buněk (Pubikace 5).....	35
<b>5. Diskuze.....</b>	<b>36</b>
<b>6. Závěry.....</b>	<b>41</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>42</b>

# 1. Úvod

## 1.1. Obecná onkologie

Zhoubné novotvary se jako příčina úmrtí řadí na 2. místo za kardiovaskulární onemocnění (Heron, 2012). Pro významné pokroky v invazivní kardiologii se očekává v budoucnosti změna pořadí na prvních dvou místech a to i navzdory intenzivnímu zkoumání nových léčebných modalit v onkologii (Weisfeldt a Zieman, 2007).

V roce 2008 onemocnělo zhoubným onemocněním v ČR 54.000 lidí (vyloučeny kožní, nemelanomové nádory). Přibližně polovina nemocných ve stejném období nádorovému onemocnění podlehl. Nejčastější nádory bez ohledu na pohlaví jsou v pořadí podle sestupné incidence: kolorektální karcinom, karcinom prsu, karcinom plic, karcinom prostaty, zhoubné nádory ledviny (Ferlay et al., 2010).

Zatímco 5-ti leté přežití se v rámci všech zhoubných nádorů postupně zvyšuje, existují nádory, u kterých ani intenzivní výzkum v oblasti molekulární biologie nepřinesl výrazný pokrok (pankreas, hlava a krk) (Thomson a Forman, 2009; Plzak et al., 2010; Michl a Gress, 2013).

Maligní nádory jsou charakterizovány jako poškození buněk, které ztratily schopnost tvořit diferencované tkáně a naopak získaly schopnost nekontrolovaného růstu s potenciálem invazivního šíření mimo ložisko primárního nádoru (zakládání metastáz) (Kumar et al., 2012).

Příčina rozvoje onkologického onemocnění je multifaktoriální. Je předpokládáno, že k transformaci normální buňky v maligní nádorovou buňku je nezbytná alterace alespoň pěti klíčových genů vedoucí k narušení jejich funkce (Hahn a Weinberg, 2002). K nahromadění tohoto poškození může dojít jedině v prolifерujících buňkách, dlouhodobě přítomných v tkáních. Za tuto klíčovou populaci jsou považovány tzv. kmenové buňky a nádorové kmenové buňky (viz dále).

Mezi vlivy alterující genotyp poškozené buňky se řadí zevní podněty (cigaretový kouř, alkohol, některá infekční agens, radiace, chemické činitele) a vnitřní podněty (vrozené mutace, hormonální změny, patologická funkce imunitního systému, atd.) (Danaei et al., 2005; Galbiatti et al., 2013). Jak bude popsáno dále v textu, postupná ztráta diferenciace tkání vlivem působení zmíněných faktorů má za následek plynulý přechod z normálního stavu přes různorodé premaligní stavy až k definitivnímu invazivnímu nádoru.

Příčina úmrtí pacientů postižených zhoubným nádorem odvisí od lokalizace a agresivity nádoru. Nejčastějšími smrtelnými komplikacemi jsou infekce a tromboembolické příhody. Na dalším místě se nachází respirační a jaterní selhání. V neposlední řadě nemocní umírají z důvodu kachexie a selhání kardiovaskulárního aparátu (Ambrus et al., 1975).

Veliký význam pro výzkum na poli nádorových onemocnění má v současné době studium molekulární biologie, jejíž role se předpokládá jak v možnosti brzké detekce malignit, tak ve schopnosti lékařů lépe rozlišovat mezi vhodnými terapeutickými možnostmi a v neposlední řadě též přináší pokroky v podobě tzv. cílené léčby.

## 1.2. Glykobiologie

Jednou z možností, jak studovat procesy nádorové biologie, je studium tzv. glykokódu. Glykokód předpokládá uložení informace v molekulách sacharidů, která může být rozpoznávána a čtena specifickou rodinou proteinů - lektinů (Gabius et al., 2004; Cada et al., 2008). Tyto proteiny jsou charakteristické svou absencí enzymatické aktivity a neschopnosti účinkovat jako imunoglobuliny (Smetana et al., 2003). S lektiny se setkáváme v rostlinné i živočišné říši a pro všechny podtypy je společná přítomnost domény rozpoznávající sacharidy (*carbohydrate recognition domain* – CRD), jejíž afinita ke konkrétním cukrům se již mezidruhově liší (Smetana et al., 2003; Gabius et al., 2004).

Informace uložená v cukerných molekulách je definována třemi stupni diverzity, tedy v prvním stupni je rozlišována samotná sekvence jednotlivých monosacharidových podjednotek, ovlivňujících zároveň konformaci oligo- a polysacharidů. Druhý stupeň předpokládá rozdílné větvení polysacharidů a jejich topografické rozmístění. Konečně třetí způsob, jak se cukry odliší v předávané informaci, je jejich rozdílná přítomnost v čase (Gabius et al., 2002).

V nádorové biologii je zkoumána především role lektinů živočišných (endogenních) a to z třídy S, dnes nazývané galektiny (Cada et al., 2008). Na druhou stranu rostlinné lektiny, mohou být využity ke studiu vlastností epitelových tkání. Asi nejpoužívanějšími rostlinnými lektiny v nádorové biologii dlaždicových epitelů jsou *Maackia amurensis lektin* (MAL – I a – II) a *Sambucus nigra lektin* (SNL), jejichž selektivní rozpoznávání  $\alpha$ 2,3 (MAL) a  $\alpha$ 2,6 (SNL) vazby kyseliny N-acetyl-neuraminové

(NeuNAc) je využíváno při stanovení stavu sialylace biomolekul (Chovanec et al., 2004a).

Působením rodiny sialyltransferáz a sialové kyseliny je regulována celá řada fyziologických i patologických stavů, jmenovitě například *homing* periferních lymfocytů do lymfatických uzlin, vazbu virů ve tkáni hostitele a invaze nádorových buněk (Sata et al., 1991).

V dlaždicových epitelech je převaha  $\alpha 2,6$  sialylace především v bazální vrstvě a prvních suprabazálních vrstvách, zatímco  $\alpha 2,3$  vazbu lze prokázat čistě suprabazálně (Holikova et al., 2002). Analogicky lze sledovat vazbu sialových kyselin v dlaždicobuněčných karcinomech, kde  $\alpha 2,3$  vazba je pozorována především v lépe diferencovaných karcinomech, kdežto  $\alpha 2,6$  vazba je typická pro karcinomy níže diferencované (Holikova et al., 2002; Chovanec et al., 2004a). Taktéž v tlustém střevě je vazba  $\alpha 2,6$  vyhrazena pro tkáň nižší diference – dysplázie, karcinomy, zatímco  $\alpha 2,3$  sialylace je detekovatelná kromě karcinomů též v normální střevní sliznici (Sata et al., 1991).

Zajímavým příkladem mezidruhové variability exprese  $\alpha 2,3$  a  $2,6$  vazby je respirační epitel horních cest dýchacích, kdy u šimpanze jak epitel, tak produkovaný hlen jsou bohaté na  $\alpha 2,3$  vazbu, zatímco lidský respirační trakt produkuje hlen s  $\alpha 2,3$  vazbou, ale samotný epitel exprimuje  $\alpha 2,6$  vazbu. Z tohoto důvodu není lidský virus chřipky (rozpoznávající  $\alpha 2,6$  vazbu) u člověka vyvázan hlenem a může se tak navázat přímo na buňky respiračního epitelu. Naopak šimpanzi jsou díky absenci  $\alpha 2,6$  vazby vůči lidskému viru chřipky imunní tak, jako jsou lidé imunní vůči většině zvířecím virům, vyhledávajícím vazbu  $\alpha 2,3$  (Gagneux et al., 2003).

Z živočišných lektinů vystupuje do popředí rodina galektinů, tedy endogenních lektinů se specifickou CRD, mající afinitu k  $\beta$ -galaktosidům. Do dnešní doby bylo popsáno 15 různých galektinů u savců, ale jen 11 galektinů u lidí (Gal-1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14) (Cada et al., 2008; Cummings a Liu, 2009). V nádorové biologii jsou nejvíce diskutovány galektiny-1, 3, 7, 9 (Cada et al., 2009; Cedeno-Laurent a Dimitroff, 2012).

Působení galektinů bylo popsáno v řadě patologických i fyziologických stavů, jmenovitě například v regulaci diference, proliferace, apoptózy, modulaci interakce

buňka-buňka a buňka-extracelulární matrix a v regulaci řady imunitních dějů (Rabinovich et al., 2002; Cada et al., 2008).

Galektin-1 a jeho vazebná místa jsou bohatě exprimovány buňkami bazální a suprabazálních vrstev epidermis a to především v jejich cytoplazmě (Plzak et al., 2005). Jaderná exprese vazebných míst pro galektin-1 byla pozorována u buněk v nízkém diferenciačním stádiu, jejichž status je blízký kmenovým buňkám (Chovanec et al., 2004b). V dlaždicobuněčných nádorech je typická vysoká exprese galektinu-1 ve všech buňkách, jehož intenzita pozitivně koreluje s invazivitou buněk a metastazováním (Plzak et al., 2005; Kim et al., 2013). Ukázalo se, že galektin-1 stimuluje produkci nádorově asociovaných myofibroblastů, které právě zodpovídají za invazivní chování nádoru a že cílené blokování galektinu-1 v experimentu vede ke snížení agresivity nádoru (Wu et al., 2011; Valach et al., 2012).

Galektin-3 a jeho vazebná místa jsou exprimovány výhradně neproliferujícími suprabazálními buňkami normálního epitelu. Z tohoto pohledu nepřekvapí pozitivní korelace vysoké diferenciace nádoru s expresí galektinu-3 a jeho vazebných míst. Absence galektinu-3 je tak významným negativním prognostickým znakem (Plzak et al., 2004).

Galektin-7 je ve zdravém epitelu exprimován v celé tloušťce epitelu a to jak v cytoplazmě, tak i v jádře. V dlaždicobuněčných karcinomech je galektin-7 pozorován v centru nádorových čepů a jeho exprese pozitivně koreluje s keratinizací a diferenciací nádoru (Cada et al., 2009; Alves et al., 2011).

Galektin-9 a jeho exprese je diskutována ve výsledcích a diskuzi této disertační práce.

Z ostatních galektinů stojí ještě za zmínku galektin-8, jehož exprese je snížena u karcinomu hrtnu ve srovnání s normální tkání a stejné pozorování bylo učiněno zároveň u karcinomu kolorekta, pankreatu, kůže a jater (Danguy et al., 2001).

Kromě informačního přínosu galektinů je recentně studován též jejich terapeutický potenciál. Ukazuje se, že některé galektiny jsou schopny potlačit přemrštěnou imunitní reakci organismu při autoimunitních onemocněních a v určitých případech by mohly být též schopny blokovat růst nádorových buněk (Offner et al., 1990; Sanchez-Ruderisch et al., 2011).

### 1.3. Dlaždicové epitely

#### 1.3.1. Epitel

Epitel je nejčastěji zastoupenou tkání lidského těla, kryjící jeho povrch a vnitřek některých dutých orgánů. Obecně sestává z jedné či více řad epitelových buněk, oddělených od vazivové komponenty (dermis, stroma) basální laminou. Dalšími buněčnými typy, nacházejícími se v některých typech epitelů, jsou Langerhansovy a Merkelovy buňky, melanocyty a intraepitelové lymfocyty (Mescher, 2009).

**Langerhansovy buňky** jsou podtypem nezralých dendritických buněk (viz dále) s charakteristickým, neurony-připomínajícím vzhledem, pozorovatelným ve všech vrstvách epidermis (Igyarto a Kaplan, 2010). Dřívější představa Langerhansovy buňky jakožto antigen prezentující buňky (čistě imunostimulační efekt) je v současnosti doplňována o jejich regulační funkci, zajišťující tak komplexní imunitní bariéru kůže (Romani a Schuler, 1992; Clausen a Kel, 2010).

Teprve nedávno byl potvrzen původ **Merkelových buněk** z neurální lišty, které posléze migrují do bazální vrstvy epidermis, kde působí jako mechanoreceptory (Halata et al., 2003). Vzácně mohou být původcem karcinomu (Kressin a Kim, 2012).

Další skupinou buněk pocházející z neurální lišty jsou **melanocyty**. Pigmentové buňky, jejichž základní funkcí v epidermis je ochrana proti slunečnímu záření, mají své místo v bazální vrstvě a prostřednictvím svých výběžků jsou v kontaktu s okolními keratinocyty. Dále jsou ve vztahu k melanocytům diskutovány funkce neuroendokrinní a imunostimulační (Tsatmali et al., 2002). Melanocyty jsou studovány především ve vztahu k velmi agresivnímu zhoubnému nádoru kůže a sliznic – malignímu melanomu (Kodet et al., 2013).

Pro správnou funkci epitelu je zapotřebí jednak zabezpečení dostatečné pevnosti a to prostřednictvím mezibuněčných spojů a dále zajištění dostatečné mechanické stability samotných buněk, což mají na starost intermediální filamenta. Další funkce, kterými jsou buněčný transport a pohyb, jsou zprostředkovány cytoskeletálními proteiny (mikrotubuly, aktinová filamenta, akcesorní proteiny) (Mescher, 2009).

**Intermediární filamenta** sestávají z několika skupin, z nichž skupina cytokeratinů se nachází predilekčně v samotném epitelu. Další skupinou jsou vimentinová filamenta, nacházející se v buňkách v pojivové a svalové tkáni. Poslední skupinu tvoří neurofilamenta, které se podílejí na stavbě axonu (Alberts, 2008).

Nejstudovanějšími cytokeratiny (K), z nichž některé mají vztah též k nádorové biologii dlaždicových epitelů, jsou K-8, K-10, K-14, K-17 a K-19.

K-8 tvoří dimer spolu s K-18 a společně jsou bohatě exprimovány v lidských embryonálních kmenových buňkách (Matthias et al., 2008; Maurer et al., 2008). V normálních epitelech není exprese K-8 patrná a pozitivita pro tento keratin je pozorována až v dysplastických lézích a dlaždicobuněčných karcinomech (Matthias et al., 2008). Exprese K-8 je všeobecně považována za negativní prognostický znak karcinomů hlavy a krku a předpokládá se jeho podíl na invazi nádorových buněk cestou epitelomezenchymové transformace (EMT) (Chu et al., 1993; Fillies et al., 2006).

K-10 je znakem diferencovaného epitelu, a tudíž je minimálně exprimován v dlaždicobuněčných karcinomech (Maddox et al., 1999; Chovanec et al., 2004b). Na druhou stranu bývá považován za negativní prognostický znak u pacientů s hepatocelulárním karcinomem (Yang et al., 2008). Ve vícevrstevném dlaždicovém epitelu je lokalizován do suprabazálních vrstev (Fillies et al., 2006; Vaidya a Kanojia, 2007).

K-14 není přítomen v jednovrstevném epitelu a ve vícevrstevném epitelu je situován do bazální vrstvy (Chu et al., 2001). Dlaždicobuněčné karcinomy hojně exprimují K-14 a jejich pozitivita je detekovatelná bez závislosti na diferenciaci tumoru. Je také senzitivním markerem premaligních lézí (Harnden a Southgate, 1997; Fik et al., 2013).

K-19 je exprimován bazálními buňkami vícevrstevného nekeratinizujícího epitelu (Takeda et al., 2006), v keratinizujícím epitelu se nachází jen v raných fázích vývoje a s nástupem keratinizace se vytrácí. Dále je K-19 znakem jednovrstevného epitelu a je bohatě exprimován v bulge vlasového folikulu (Akiyama et al., 1995). V dlaždicobuněčných karcinomech negativně koreluje exprese K-19 s prognózou pacienta a v této souvislosti bylo zjištěno, že u pacientů s karcinomem jazyka i histologicky normální tkáň bukální sliznice již vykazuje aberantní expresi tohoto keratinu – jedná se tedy o citlivý marker maligní transformace (Copper et al., 1993; Fillies et al., 2006).

### 1.3.2. Bazální lamina

Základními složkami basální laminy jsou proteiny laminin, kolagen IV. typu, nidogen a perlecan, jejichž funkcí je zprostředkovat kontakt buněk s extracelulární matrix

(Ioachim et al., 2002; Franz et al., 2006; Hohenester a Yurchenco, 2013). Vazba buněk na bazální membránu je zprostředkována integriny, transmembránovými adhezivními molekulami, schopnými přenášet signály vně i do nitra buňky (Hohenester a Yurchenco, 2013).

**Laminin** je považován za důležitou molekulu v nádorové biologii. Jeho funkcí je zřejmě podpora růstu nádorových buněk a umožnění jejich úniku přes basální membránu (Ioachim et al., 2002). Laminin-332 (číslováno dle podjednotek  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 2$ ), jedna z izoform lamininu, byl nalezen v okrcích invadujících nádorových buněk (Franz et al., 2006). Stejná molekula je pravděpodobně zodpovědná za odolnost nádorových myofibroblastů vůči *anoikis* u karcinomu prsu (Kim et al., 2012a).

**Kolagen-IV** je základní složkou bazální membrány a může podlehnout štěpení pomocí matrix metalloproteináz (MMP-2 a MMP-9) v průběhu progresu nádorového onemocnění (Groblewska et al., 2012). Současně vazba nádorových buněk na kolagen-IV (ale i na kolagen-I a laminin) má za následek jejich zvýšenou odolnost vůči chemoterapeutikům (Ohlund et al., 2013). V karcinomu pankreatu interaguje kolagen-IV s nádorovými buňkami především prostřednictvím  $\beta 1$ -integrinů, které stimulují buněčný růst a migraci a inhibují apoptózu (Ohlund et al., 2013).

**Nidogen** je zodpovědný za vazbu kolagenu-IV a lamininu do trojrozměrné sítě bazální membrány (Ackley et al., 2003). Jeho interakce s rodinou integrinů ovlivňuje buněčné děje na úrovni diferenciaci, proliferace a apoptózy (Ulazzi et al., 2007). Absence nidogenu byla pozorována v gastrointestinálních tumorech, jakožto podklad defektu bazální membrány (Ulazzi et al., 2007). Přítomnost nidogenu-2 v cirkulaci - jednoho ze dvou podtypů nidogenu - je považováno za prognostický znak ovariálního karcinomu (Kuk et al., 2010).

**Perlecan** je základní složkou bazální membrány a stejně tak i extracelulární matrix. Jeho důležitou vlastností je vazba růstových faktorů. Jedním z vázaných růstových faktorů je Hedgehog, působící v signalizační kaskádě sonic-hedgehog, zodpovědné za progresi karcinomu prostaty (Datta et al., 2006). Současně působí například jako koreceptor pro FGF-2 (růstový faktor fibroblastů). Tato konsekvence zřejmě zodpovídá za schopnost perlecanu podílet se na nádorovém růstu a na stimulaci angiogenezy (Sharma et al., 1998). Depozicí perlecanu mezi epitelovými buňkami dysplázie je dosaženo snížení jejich vzájemné adherence. Stupeň dysplázie koreluje s přítomností perlecanu ve vyšších vrstvách epitelu (Ikarashi et al., 2004).



**Integriny** jsou proteiny buněčných povrchů, tvořící kontakty mezi buňkami nebo mezi buňkou a extracelulární matrix. Vazba integrinů slouží nejen ke stabilizaci tkáně, ale i intra- a extra-celulární signalizaci (Epifano a Perez-Moreno, 2012). Je známo 24 heterodimerů integrinů, lišících se ve svých vazebných schopnostech. Většina abnormálně fungujících heterodimerů je asociována s některými patologickými stavy, jako například autoimunitní choroby, fibróza, srdeční ischemie, nádorové bujení (Goodman a Picard, 2012). Zatímco ve zdravém epitelu je exprese integrinů lokalizována do oblasti bazální membrány a bazální vrstvy buněk, v dlaždicobuněčném karcinomu jsou integriny exprimovány nezávisle na poloze bazální membrány a mění se zároveň zastoupení jednotlivých typů (Janes a Watt, 2006).

### 1.3.3. Stroma

Podpůrnou složkou epitelů je tzv. stroma (v kůži je nazýváno dermis). Jedná se o málo buněčnou vrstvu, sestávající převážně z tzv. extracelulární matrix (ECM), která je produkována hlavně fibroblasty, ale i epitelovými buňkami (Metwaly et al., 2012). ECM obsahuje proteoglykany, glykosaminoglykany (GAGs), kolagenní a elastická vlákna, fibronectin, tenascin a dále různé růstové a mitogenní faktory (Klingberg et al., 2013). Z buněk jsou nejvíce zastoupeny fibroblasty a dále buňky imunitního systému (makrofágy, lymfocyty, mastocyty) (Becker et al., 2013).

### 1.3.4. Epitelové nádory

Epitelové nádory lze dělit na nádory benigní a maligní (karcinomy) podle schopnosti zakládat vzdálené metastázy. Karcinomy představují nejvíce zastoupenou skupinu zhoubných nádorů (80%) a dále se dělí podle svého původu v krycích epitelech (dlaždicobuněčné karcinomy) a žlázových epitelech (adenokarcinomy) (Kumar et al., 2012).

I v rámci jednoho orgánu se mohou vyskytovat jak adenokarcinomy, tak dlaždicobuněčné karcinomy a rozdíly mezi nimi v otázce biologického chování, prognózy a klinického vyjádření zcela ospravedlňují odlišný terapeutický přístup (Mariette et al., 2005). Contag se spolupracovníky popsal rozdílnou expresi několika genů mezi žlázovými a dlaždicobuněčnými nádory jak s maligním, tak benigním potenciálem (Contag et al., 2004). Pacienti s dlaždicobuněčným karcinomem jícnu a plic měli horší

prognózu ve srovnání s pacienty, postiženými adenokarcinomem stejných primárních lokalizací (Contag et al., 2004; Kawase et al., 2012).

Nádorový proces, vznikající ve zdravé tkáni, může projít cestou transformace přes hyperplastickou tkáň, dysplázii až ke konečné neoplázii. Posledním krokem je pak diseminace nádoru zakládáním metastáz. Dysplázie představuje přítomnost značného pleomorfismu buněk v epitelové nádorové tkáni, které ztrácejí svou uniformitu a nekoordinovaně mění své morfologické vlastnosti. Typické pro dysplázii je pozorování mitóz i ve vyšších vrstvách epitelu než pouze ve *stratum basale* (Crissman et al., 1993).

Na molekulární úrovni je v procesu karcinogeneze popsáno mnoho markerů, majících vztah k prognóze pacientů, kteří se iniciálně prezentují pouze dysplastickými lézemi v oblasti sliznic hlavy a krku. V dysplastických tkáních dutiny ústní je pozorována snížená membránová exprese E-cadherinu a  $\beta$ -catenin, jehož přítomnost naopak stoupá intracelulárně. Tento proces spolu s cytoplazmatickým nárůstem exprese CD166 (*ALCAM-activated leukocyte cell adhesion molecule*) pozitivně koreluje se špatnou prognózou postižených pacientů (Kaur et al., 2013). Odlišný charakter exprese CD29, fibronektinu a Bcl-2 je popisován ve tkáních zdravých epitelů dysplázií a dlaždicobuněčných karcinomů (Nunez et al., 2013). Dalším možným markerem sledujícím přechod dysplázie do karcinomu je translační iniciační faktor eIF4E, stimulant syntézy vaskulárního růstového faktoru (VEGF) a růstového faktoru pro fibroblasty (FGF-2), který je v průběhu karcinogeneze zvýšeně exprimován a podtrhuje tak důležitost procesu angiogeneze (Nathan et al., 1999). Na genetické úrovni je znakem suspektní progresy dysplázie v maligní nádor přítomnost chromozomálních polyzomií (Hittelman et al., 1993).

## **1.4. Nádorové kmenové buňky a jejich mikroprostředí**

### **1.4.1. Kmenové buňky**

Kmenové buňky lze izolovat z mnoha dospělých tkání. V průběhu buněčného dělení kmenové buňky dávají vznik dceřině kmenové buňce a buňce dočasně se dělící, která je schopna diferenciaci v závislosti na biologických vlastnostech prostředí. Konečným produktem dočasně se dělících buněk je specializovaná tkáň. Kmenové buňky zdravých tkání mohou být rozděleny na embryonální a dospělé. Jejich funkcí je obnova

poškozených či rychle se obnovujících tkání (Smetana et al., 2003; Bunnell et al., 2008; Graziano et al., 2008).

Širší definice kmenové buňky zahrnuje jak schopnost sebeobnovy, tak schopnost diferenciací v jednu či více terminálně specializovaných buněk (Alberts, 2008).

#### 1.4.2. Nádorové kmenové buňky

Podrobný popis problematiky nádorových kmenových buněk je uveden v publikačním výstupu, prezentovaném v rámci výsledků této disertační práce.

Již v roce 1963 Bruce a Van Der Gaag popsali malou populaci lymfomových buněk, schopných tvořit kolonie *in vivo*, ale významným milníkem studia biologie nádorového bujení se stal až postulát Hamburgera a kolektivu z konce osmdesátých let o existenci nádorové kmenové buňky (CSC - cancer stem cell) (Bruce a Van Der Gaag, 1963; Hamburger a Salmon, 1977). Postupem času byly publikovány práce, odhalující nádorovou kmenovou buňku u rozličných hematologických malignit i solidních tumorů (Singh et al., 2003; Grichnik, 2006; Wang et al., 2006; Zhang et al., 2006; O'Brien et al., 2007; Prince et al., 2007; Eramo et al., 2008).

Vlastnosti nádorové kmenové buňky se pravděpodobně neliší od vlastností kmenové buňky zdravé, včetně schopnosti migrovat do vzdálených tkání, nadto jsou však pravděpodobně schopné odolávat radiačnímu záření a chemoterapeutikům (Locke et al., 2005; Gangemi et al., 2009; Moncharmont et al., 2012).

Původ nádorových kmenových buněk nebyl dosud zcela přesně objasněn. Jedna teorie předpokládá nádorovou transformaci zdravých kmenových buněk, což bylo potvrzeno především u hematologických malignit, ale i u střevních dysplázií (Huntly a Gilliland, 2005; Schepers et al., 2012). Druhá teorie připouští transformaci diferencované buňky v nádorovou kmenovou buňku, která byla popsána u některých typů leukémií, kde zdrojem CSC není hematopoetická kmenová buňka, nýbrž některý z pokročilých stupňů progenitorové buňky (Krivtsov et al., 2006).

Zlatým standardem pro studium nádorových kmenových buněk *in vivo* se stala xenotransplantace nádorových buněk do NOD/SCID myši. Těch bylo použito i v pionýrské studii Bonnet a Dicka, kteří ukázali schopnost malé populace buněk akutní myeloidní leukémie, exprimujících CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> založit nádorové onemocnění (Bonnet a Dick, 1997). Kontroverzi používaného protokolu ukázala práce s myší, která ve srovnání s NOD/SCID postrádá navíc ještě *natural killer* T buňky (NOD/SCID/IL-2Rc-null). Až 28% melanomových buněk, transplantovaných do této myši je schopná založit nádorovou populaci (Shultz et al., 2005).

Pro *in vitro* studium CSCs je možno využít jejich schopnosti vylučovat ze svého nitra chemoterapeutika prostřednictvím membránových transportérů. Jeden z takových transportérů z ABC rodiny transmembránových proteinů je MDR1 (*multidrug resistance transporter 1*), prostřednictvím kterého jsou buňky schopné vyloučit cytotoxické barvivo Hoechst 33342. Tyto buňky vytváří tzv. *side population* (SP) a pravděpodobně tvoří významný *pool* nádorových kmenových buněk, což bylo dokumentováno v různých typech nádorů (Hadnagy et al., 2006; Yanamoto et al., 2011; Li et al., 2012; Zhang et al., 2012a). V lidské epidermis zatím nebyla nalezena souvislost mezi *side population* a nádorovou kmenovou buňkou, nicméně byla prokázána vyšší proliferační aktivita buněk *side population* oproti ostatním epidermálním epitelovým buňkám (Triel et al., 2004; Ambler a Maatta, 2009).

Překvapivě, jakkoliv podíl buněk, tvořících *side population* je asi 0,1%, podíl buněk exprimujících membránový protein MDR1 je asi 65% a nelze tedy využít expresi proteinu k izolaci nádorových kmenových buněk (Goodell et al., 1996; Hadnagy et al., 2006).

Lze předpokládat, že terapie cílená a eliminující tuto subpopulaci by mohla představovat novou a více efektivní strategii v protinádorové léčbě (Le Tourneau et al., 2007).

#### 1.4.3. Niche

Ke správné činnosti nádorových kmenových buněk je krucální podpora okolním prostředím, které je ve vztahu k CSCs označováno jako „*niche*“ (Oerbeck et al., 2012). Předpokládá se obdobná struktura *niche* jako u normálních kmenových buněk, tedy soustavu stromálních fibroblastů, doplněných o imunokompetentní buňky, síť kapilár, extracelulární matrix a četnou řadu signálních molekul (Mathiasen et al., 2011).

Funkcí *niche* je regulace biologického chování nádorové kmenové buňky a jedním z klíčových důsledků této kooperace je udržení jejího velmi nízkého proliferačního potenciálu. To má za následek parciální rezistenci vůči protinádorové léčbě (Sujata a Chaudhuri, 2008). Je tedy jasné, že samotná eliminace nádorové kmenové buňky nebude úspěšná, pokud cílený terapeutický zásah nezaměříme též na jejich mikroprostředí (Costea et al., 2006a; Sujata a Chaudhuri, 2008) .

## 1.5. Nádorové prostředí

### 1.5.1. Stroma

Stromální složka nádoru nese důležitou prognostickou informaci pro pacienty postižené karcinomem prsu, tlustého střeva, plic a jícnu. Vyšší objem stromatu (desmoplastické stroma) znamená též horší prognózu onemocnění (Mesker et al., 2007; de Kruijf et al., 2011; Wang et al., 2012; Wang et al., 2013).

Tak jako se liší struktura parenchymu normálního epitelu od karcinomu, taktéž se liší prostředí, v kterém epitelové buňky existují. Stroma nádoru obsahuje kromě extracelulární matrix dále fibroblasty, nádorově asociované fibroblasty/myofibroblasty, endotelové buňky, pericyty, hladké svalové buňky, adipocyty, makrofágy, mastocyty a lymfocyty (Polyak et al., 2009).

**Fibroblasty** jsou nejvíce zastoupenou buněčnou populací ve stromatu zdravých epitelů i nádorů. Jejich základní funkcí je produkce extracelulární matrix. Morfologicky se jedná o heterogenní skupinu buněk, která na rozdíl od epitelových buněk nevykazuje polaritu ve vztahu k bazální membráně (Mescher, 2009).

Vývojovým stupněm fibroblastu je tzv. myofibroblast, jehož dalším známým progenitorem jsou kromě fibroblastů ještě pericyty (Fligny a Duffield, 2013). Jedná se o buňky přirozeně se vyskytující v embryonálním období, kde se účastní remodelace vyvíjející se tkáně (Powell et al., 2005). V postembryonálním období je studován význam myofibroblastů především v procesu hojení, fibrózy a nádorového bujení (De Wever et al., 2008a).

**Myofibroblast** je vřetenovitého tvaru a od fibroblastu ho odlišuje přítomnost kontraktálních mikrofilament. Za spolehlivou kombinaci znaků, identifikujících myofibroblast jsou považovány hladký svalový aktin (SMA), P4H, vimentin a absence cytokeratinů (De Wever et al., 2008a; Klingberg et al., 2013). Významným induktorem

vzniku myofibroblastů je TGF- $\beta$  ve spolupráci s podpůrnými faktory jako heparan sulfát, galektin-1 a decorin, ale dále jsou popisovány další indukční cesty – Wnt, Hedgehog, Notch, Fizz1 (De Wever et al., 2008a; Dvorankova et al., 2011; Hu a Phan, 2013).

Myofibroblasty vznikají z fibroblastů v okrajích hojící se rány ve stadiu kontrakce (Grinnell, 1994). Je prokázáno, že myofibroblasty perzistují v poraněních zhojených jizvou, zatímco v ranách zhojených bez jizvy nejsou přítomné (Lee et al., 2012). Vystupňovaný proces jizvení může být pozorován u některých patologických stavů či po rozsáhlejším chirurgickém zákroku a může tak mít negativní vliv na funkčnost postižené tkáně a okolí. V tomto směru je studován vliv terapeutického zásahu do regulace vzniku a působení myofibroblastů (van Beurden et al., 2005).

Orgánová fibróza je odpovědí organismu na chronickou traumatizaci a ve větším rozsahu může významně zhoršit funkci postiženého orgánu. Významně prostudovanými orgány, postiženými fibrotickým procesem, jsou například plíce, játra a ledviny (Bataller a Brenner, 2005; Fligny a Duffield, 2013; Zhou et al., 2013). Klíčovým regulátorem fibrózy jsou myofibroblasty, vznikající z lokálních fibroblastů nebo pericytů následkem stimulace traumatizovanou tkání (TGF- $\beta$ ) (Coward et al., 2010; Fligny a Duffield, 2013).

V roce 1986 profesor Harold Dvorak publikoval práci, v níž přirovnal nádor k nehojící se ráně. Podrobnosti našel na úrovni reakce epitelu i stromatu a jednou ze stromálních složek byly určeny myofibroblasty (Dvorak, 1986). Dnes je přijímám fakt, že jednou ze zásadních složek nádorového prostředí jsou nádorově asociované fibroblasty (CAFs), jejichž původ není dosud přesně objasněn. Zvažuje se vznik z lokálních mezenchymových buněk (fibroblasty, pericyty, imunokompetentní buňky, atd.), z mezenchymové kmenové buňky kostní dřeně a do třetice z nádorové buňky cestou epitelu-mezenchymové transformace (EMT) (De Wever et al., 2008a). CAFs jsou někdy *promisqu*e zaměňovány za myofibroblasty, nicméně ne všechny nádorově asociované fibroblasty exprimují hladký svalový aktin, tudíž lze říci, že vedle sebe existují dvě skupiny nádorových fibroblastů – SMA<sup>-</sup> a SMA<sup>+</sup> (myofibroblasty *sui generis*) (De Wever et al., 2008a; Shimoda et al., 2010). Funkční rozdíl mezi těmito dvěma skupinami není v literatuře popisován, jakkoliv exprese SMA je považována za znak horší prognózy pacientů s karcinomem kolorekta, prsu, prostaty, pankreatu a dutiny ústní (Tsujino et al., 2007; Shimoda et al., 2010; Thode et al., 2011; Yamashita et al., 2012).

Je známo, že izolované fibroblasty z bazocelulárního karcinomu nebo dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku jsou schopny alterovat normální keratinocyty

*in vitro* a takové fibroblasty se liší od normálních fibroblastů jak v expresi několika stovek genů, tak v sekreci mnoha cytokinů (Lacina et al., 2007a; Lacina et al., 2007b; Strnad et al., 2010). Sekreční profil nádorově asociovaných fibroblastů čítá celou řadu biologicky aktivních látek, mj. komponenty extracelulární matrix (tenascin, laminin), matrix metaloproteinázy a jejich inhibitory, granulocytární chemotaktický protein-2, růstové faktory (HGF, EGF, VEGF), calreticulin, chemokin CXCL12 (Watnick, 2012; De Boeck et al., 2013).

Sekretom CAFs je zodpovědný za pestrou škálu biologických funkcí fibroblastů, jako podíl na imunitní odpovědi, regulace nádorového růstu, buněčný pohyb, mezibuněčná komunikace, angiogeneza (Watnick, 2012; De Boeck et al., 2013). Komunikace stromatu s nádorovými buňkami bude diskutována dále.

Druhou nejzastoupenější buněčnou populací stromatu jsou imunokompetentní buňky. Jejich role je vzhledem k heterogenitě nádorů nesourodá. Všeobecně se předpokládá, že přítomnost makrofágů a CD4<sup>+</sup> lymfocytů představuje pro pacienta zhoršení prognózy, zatímco přítomnost CD8<sup>+</sup> lymfocytů a dendritických buněk je asociováno s lepší prognózou (Talmadge et al., 2007).

**Makrofágy** se v nádoru mění pod vlivem signálů z nádorového parenchymu a vlivem stromálních signálů v tzv. nádorově asociované makrofágy (TAMs), které jsou zodpovědné za nádorový růst a invazi, angiogenezu, remodelaci extracelulární matrix (MMP-9) a modulaci imunitní odpovědi (Allavena et al., 2008; Tang, 2013).

Nezralé **dendritické buňky** (DCs), působící jako antigen prezentující bb., vznikají v kostní dřeni a posléze migrují do cílových orgánů, kde dozrávají a jsou schopny iniciovat T-buněčnou imunitní odpověď. V nádorech je větší zastoupení zralých DCs (CD83<sup>+</sup>, DC-LAMP<sup>+</sup>) ve stromatu, zatímco nezralé DCs (CD1a<sup>+</sup>) se vyskytují převážně v parenchymu tumoru (Bell et al., 1999; Gundacker et al., 2009). Exprimují-li nezralé DCs spolu s CD1a zároveň Langerin, jsou tyto buňky nazývány Langerhansovy buňky. Langerin<sup>+</sup> DCs jsou v nádorech zastoupeny méně ve srovnání s ostatními typy dendritických buněk (Plzakova et al., 2004).

Dendritické buňky mají schopnost fagocytovat nádorové buňky, nicméně nádor dokáže změnit vlastnost dendritických buněk, které jsou pak schopny stimulovat vznik interleukin-13 prezentujících T lymfocytů. Ty jsou zodpovědné za invazivní chování

nádorů. Jednou z možností ovlivnění růstu nádorů by bylo indukovat přesmyk pronádorového chování dendritických buněk na proti-nádorový (Palucka et al., 2011).

**Fibronektin** (FN), jakožto stromální glykoprotein, spojuje buněčné integriny s kolagenem extracelulární matrix a podílí se tak na buněčném pohybu a buněčné komunikaci. Jmenovitě se podílí na proliferaci fibroblastů, stimuluje chemotaxi imunokompetentních buněk, stimuluje produkci proteáz atd. (Ritzenthaler et al., 2008). V literatuře byla diskutována role FN v nádorech mozku, prsu, tlustého střeva, plic a dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku (Mhaweck et al., 2005; Jia et al., 2010).

V nádoru je fibronektin produkován endotelovými buňkami novotvořených cév, nádorově asociovanými fibroblasty a samotnými nádorovými buňkami (Mhaweck et al., 2005). V dlaždicobuněčném karcinomu dutiny ústní je přítomnost fibronektinu asociována s přítomností uzlinových metastáz a tudíž celkovou horší prognózou pro pacienta (Lyons et al., 2001; Mhaweck et al., 2005). Na příkladu plicního adenokarcinomu byl prokázán stimulační efekt fibronektinu na epitelo-mezenchymovou transformaci a přesmyk buněk z linie SPC-A-1 na agresivnější buňky schopné metastazování. Jedním z mechanismů působení fibronektinu v nádorech může být jeho schopnost modulovat signální cesty apoptózy ve prospěch přežívání nádorových buněk (Nunez et al., 2013). To se též prokázalo na příkladu leukemických buněk, kde fibronektin prostřednictvím stimulace integrinového receptoru VLA-4 zvyšoval resistenci nádorových buněk vůči *anoikis* (Matsunaga et al., 2003). Přesný mechanismus působení fibronektinu v invazivních nádorech však zůstává nejasný (Jia et al., 2010).

Dalším glykoproteinem extracelulární matrix je **tenascin** (TN). Je známo několik druhů tenascinu – TN-R, TN-W, TN-X, TN-Y a TN-C. Posledně jmenovaný je v současnosti detailně zkoumán pro svou roli v progresi nádorových onemocnění a ve fyziologických procesech embryogeneze, hojení a zánětlivé reakce (Guttery et al., 2010). V ECM se TN se svou hexamerní strukturou váže na fibronektin, perlecan a další proteiny matrix a tudíž poskytuje komplexní stimul k remodelaci tkání. S buňkami se TN váže pomocí integrinů, syndekanů, annexinů a dále se váže s receptorem pro epidermální růstový faktor (EGFR), který může patologicky stimulovat a působit jako onkogen. Vazbou se syndekane-4 ruší vazbu nádorové buňky na fibronektin a tudíž stimuluje proliferaci. Dalšími pro-nádorovými funkcemi TN jsou indukce angiogeneze a invazivity prostřednictvím up-regulace MMP-12 (Huang et al., 2001; Degen et al., 2008; Guttery et al., 2010). Tenascin-C je produkován fibroblasty, ale jeho mRNA je nalézána též



v nádorových buňkách v místech, kde dochází k jejich průniku přes bazální membránu (Franz et al., 2006).

Klíčovou složkou ECM jsou **glykosaminoglykany** (GAGs) sestávající z repetitivní sekvence disacharidu, obsahující různou kombinaci derivátů N-acetylhexosaminu a kyseliny uronové. V nádorové biologii se nejvíce diskutují tři typy GAGs: heparansulfát (HS), chondroitinsulfát (CS) a kyselina hyaluronová (HA) (Afratis et al., 2012). První dva jmenované GAGs jsou za fyziologických i patologických podmínek zodpovědné za biologickou dostupnost růstových faktorů, chemokinů a za aktivitu některých matrix metalloproteináz (MMPs). Tímto způsobem se v případě tumorigeneze podílejí na regulaci progresu a invazivity nádorových buněk (Vlodavsky et al., 1987; Hulett et al., 1999; Vlodavsky a Friedmann, 2001; Nikitovic et al., 2008).

**Kyselina hyaluronová** sestává ze sekvence N-acetylglucosaminu a kyseliny D-glukuronové. Od ostatních GAGs se liší absencí sulfátových skupin a nekovalentní vazbě k proteoglykanům (Afratis et al., 2012). V nádorové biologii hraje odlišnou úlohu v závislosti na histologickém typu, což lze demonstrovat na bohaté přítomnosti v adenokarcinomech a naopak chudé expresi v dlaždicobuněčných karcinomech a melanomech (Afratis et al., 2012). Zásadním faktorem působení HA je její vazba s různými receptory, v tumorigenezi především s CD44 a RHAMM (*receptor for hyaluronan-mediated motility*) (Turley et al., 2002; Kouvidi et al., 2011).

Komplex HA + CD44 interaguje s četnými receptory, napojenými na signalizační kaskádu PI3K/Akt a tudíž nepřímo ovlivňuje progresi nádorového onemocnění (Afratis et al., 2012). V neposlední řadě jsou GAGs aktivní v procesu epitelo-mezenchymové transformace (Itano a Kimata, 2002; Strutz et al., 2002; Bishop et al., 2007).

### 1.5.2. Epitelo-mezenchymová interakce

Jak bylo zmíněno výše, tkáň epitelového typu nádoru sestává z vlastní epitelové komponenty a vazivové složky (stroma), tvořící podpůrnou tkáň pro nádor. Komunikace mezi nádorem a stromatem probíhá i na základě epitelo-mezenchymové interakce (EMI), která je tak formou tzv. heterotypické signalizace, tedy parakrinní komunikace mezi odlišnými buněčnými typy (Elenbaas a Weinberg, 2001). Tato komunikace probíhá oběma směry a účastní se jí celá řada signálních molekul (Plzak et al., 2010).

Pro představu lze uvést dvě mezní situace. Pokud implantujeme samotné epitelové buňky karcinomu prsu do myši, úspěšnost vytvoření tumoru bude mnohem nižší než v případě, kdy implantujeme nádorové buňky spolu se stromální komponentou (fibroblasty). Růst nádoru bude zároveň pomalejší do té chvíle, než si k sobě epitelové buňky vytvoří dostatečné množství podpůrného prostředí (Elenbaas et al., 2001). Ukázalo se, že v nepřítomnosti fibroblastů přejímá nádorový parenchym dočasně roli tvůrce extracelulární matrix (Metwaly et al., 2012). Při pokusech *in vitro* jsou zdravé či nádorové keratinocyty schopny indukovat ve fibroblastech tvorbu interleukinů-6 a -8 (IL-6, IL-8) a CXCL1. Zmíněné chemokiny pak zpětně snižují diferenciační status keratinocytů (Kolar et al., 2012). V první fázi tedy dochází k signalizaci nádorových buněk směrem do okolí s cílem vytvoření nádorově asociovaných fibroblastů, které pak zpětně stimulují růst nádoru.

Naopak je v současné době známo, že pacienti, u kterých je odstraněn nádor, ale ponechány buňky jeho prostředí, jsou více náchylní k rekurenci onemocnění, jelikož ponechané fibroblasty jsou schopny transformovat zdravé epitelové buňky v buňky nádorové, eventuálně zvýšit resistenci nádorové kmenové buňky vůči onkologické léčbě (Costea et al., 2006b; Lacina et al., 2007a; Lacina et al., 2007b).

V počátcích tumorigeneze se předpokládá významný vliv prostaglandinu E2 a TNF $\alpha$ , jež jsou schopny indukovat transformaci zdravých buněk (popsáno v intestinálního epitelu, respektive u hepatocytů) (Pikarsky et al., 2004; Wang et al., 2004). Prostaglandin E2 je zároveň induktorem sekrece vaskulárního růstového faktoru (VEGF) v CAFs, a tudíž významným stimulatorem angiogeneze (Pietras a Ostman, 2010). V dalších fázích růstu nádoru je EMI zodpovědná za udržení proliferativního potenciálu nádoru a za přežívání nádorových buněk. Příkladem může být mechanismus pozitivní zpětné vazby, kdy nádorové buňky karcinomu produkují růstový faktor destiček (PDGF), který stimuluje v nádorových fibroblastech tvorbu insulinu podobného faktoru-1 (IGF-1). Ten zpětně podporuje přežívání a růst nádorových buněk (Lin et al., 2001; Roberts, 2004).

Klíčovým krokem progresu nádorového onemocnění je disrupce bazální membrány a invaze nádorových buněk do okolního stromatu. Celý proces invaze a metastazování nádoru je zprostředkován jevem, zvaným epitel-mezenchymová transformace (EMT), vysoce specializovaným důsledkem signalizačních okruhů v epitel-mezenchymové interakci (viz dále).

### 1.5.3. Epitelo-mesenchymová transformace

EMT je procesem, při kterém epitelová buňka ztrácí některé své charakteristiky a získává vlastnosti mezenchymových buněk. Nejprostudovanějšími markery EMT je ztráta E-cadherinu, některých cytokeratinů a naopak zvýšená exprese N-cadherinu (cadherinový *switch*), vimentinu a intranukleárního  $\beta$ -catenin (De Wever et al., 2008b).

Fyziologicky lze EMT pozorovat v průběhu ontogeneze, především v procesu gastrulace, tedy utvářením zárodečných listů a v průběhu formace neurální lišty (Miyazaki et al., 2008a). Byly identifikovány transkripční faktory, podílející se na EMT v embryonálním období – snail, slug, twist – a tyto faktory jsou též podrobně zkoumány v procesu karcinogeneze (Miller et al., 2008). V literatuře je popisováno mnoho induktorů EMT. Mezi klíčové aktivátory patří TGF- $\beta$  spolu s dalšími - TNF $\alpha$ , EGF, HGF, IGF-1, produkované nádorovými fibroblasty (Thiery a Sleeman, 2006; De Wever et al., 2008a).

Aby mohla nádorová buňka opustit své místo v parenchymu a byla schopná podniknout cestu mezenchymovou tkání k cévám, potřebuje některé vlastnosti získat a jiné ztratit. V prvé řadě musí buňka být schopná odolat buněčné smrti, vyvolané ztrátou mezibuněčných kontaktů (*anoikis*), čehož v obecné rovině dosáhne za pomoci „survival“ faktorů a potlačením činnosti proapoptoických faktorů (Harbrecht et al., 2008; Plzak et al., 2010).

Jedním z mechanismů vzniku odolnosti nádorové buňky vůči *anoikis* je regulační kaskáda, podílející se na EMT jako takové. Cadherinový *switch* je jedním z mechanismů získané resistance a to především díky zapojení transkripčních faktorů, regulujících expresi cadherinů (snail a twist), které jsou zapojeny též v signálních kaskádách pro přežívání buněk (Miyazaki et al., 2008b).

Další cestou, kterou si invazivní buňka zajistí nesmrtelnost je změna v integrinové výbavě a to u dlaždicobuněčných karcinomů jmenovitě *switch* z  $\alpha\beta 5$  integrinu na  $\alpha\beta 6$  integrin. Tím se buňka ochrání před proapoptoickými stimuly a naopak díky aktivaci PI3K-Akt kaskády je stimulováno přežívání buňky (Miyazaki et al., 2008b).

V neposlední řadě je nádorová buňka, podstupující EMT, schopna produkovat četné růstové faktory, eventuálně zvýšeně exprimovat receptory pro tyto faktory a touto autokrinní funkcí se udržet naživu (Miyazaki et al., 2008b).

K tomu, aby vycestovala buňka úspěšně metastazovala, potřebuje projít ještě několika významnými kroky, zakončenými reverzním dějem, zvaným mezenchymo-epitelová transformace (MET, viz dále).

#### 1.5.4. Metastáza

Až 90% úmrtí pacientů s nádorovým postižením je způsobeno přítomností metastáz (Wang, 2010). Biologická podstata metastázy je shrnuta pod pojmem invazivně metastatická kaskáda (Boissan et al., 2010). Vedle stimulace parenchymu k zahájení EMT dostávají nádorové buňky od fibroblastů též stimuly k zahájení invaze do okolí. Je popsána role mnoha cytokinů, jmenovitě například CXCL12 a CCL18 u karcinomu prsu (Peng et al., 2013). Důkazem pozitivní zpětné vazby v EMI je produkce interleukinu 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) buňkami dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní, který stimulací nádorových fibroblastů vyvolá zvýšení cytokinu CCL7, jež zpětně stimuluje nádorové buňky k invazivnímu chování (Jung et al., 2010). Obdobnou roli hrají TAMs, které po stimulaci pomocí IL-4, produkovaným buňkami karcinomu prsu, zpětně stimulují nádorové buňky k invazi (Valastyan a Weinberg, 2011).

Disrupce bazální membrány je dosud málo prozkoumaný proces, nicméně pionýrská studie Hagedorna a spolupracovníků definovala receptor pro netrin, jako jeden z regulátorů průniku buněk přes bazální laminu (Hagedorn et al., 2013). Poté, co nádorová buňka podstoupí EMT a vycestuje přes bazální membránu do okolní stromální tkáně, stávají se jejím cílem krevní nebo lymfatické cévy.

Klíčovým faktorem, který umožní projít nádorové buňce skrze stroma, jsou matrix metaloproteinázy (MMPs). Ukazuje se, že jejich role není čistě mechanistická. K funkci remodelace stromatu, která umožní průchod metastazujících buněk, se přidává ještě enzymatická aktivita, uvolňující z okolní ECM četné růstové faktory (FGF, TGF- $\beta$ ), které dále stimulují procházející nádorové buňky k aktivitě (McCawley a Matrisian, 2001). Cadherinový switch má kromě antiapoptoického efektu ještě další účinek, jímž je vyšší afinita metastazující buňky k ECM, která však neznemožňuje její pohyb (Haass et al., 2004).

Intravazace, neboli vstup nádorových buněk do krevních či lymfatických cév, je ulehčena mohutnou neoangiogenezi, probíhající v nádorovém stromatu. Takovéto cévy se vyznačují nedokonalou stavbou své stěny a proto přestup přes pericyty a endotelové

buňky je pro nádorové buňky snadnější. Současně intravazaci produkují faktory produkované nádorově asociovanými fibroblasty a makrofágy – TGF- $\beta$ , epidermální růstový faktor (EGF), kolonie stimulující faktor 1 (CSF-1) (Valastyan a Weinberg, 2011).

Nádorové buňky ztrácejí vstupem do cév stimulační impulsy dodávané stromatem a jsou tudíž náchylné k *anoikis*. Předpokládá se, že buňky, které uniknou *anoikis*, pravděpodobně velmi rychle dosahují kapilár a opustí tak cirkulaci. Tím pádem nedojde ke spuštění signalizačních kaskád apoptózy (Valastyan a Weinberg, 2011). Dalším důležitým mechanismem přežívání nádorových buněk v cirkulaci je jejich ochrana před aktivitou buněk imunitního systému (konkrétně *natural killers* - NKs), čehož dosáhnou vazbou s krevními destičkami. Ty znemožní interakci mezi nádorovou buňkou a makrofágem, odehrávající se prostřednictvím interelukinu-15 (IL-15) (Palumbo et al., 2002; Kobayashi et al., 2005).

Orgán, ve kterém metastazující buňka opustí cévu, je určen anatomickým uspořádáním odvodných cév z primárního nádoru, tloušťkou cév a krevním tlakem, jakož i fyzikálními a biochemickými vlastnostmi nádorové buňky (Psaila a Lyden, 2009).

Zatímco z jaterních sinusoid proniká do parenchymu nádorová buňka poměrně snadno, v plicích a mozku již stojí jejímu pohybu v cestě pericyty spolu s různě vyvinutou bazální membránou. V těchto případech je tedy zapotřebí specifických signálů a specifické molekulární výbavy nádorové buňky a hostitelské tkáně (Irmisch a Huelsken, 2013). Například v procesu extravazace buněk karcinomu prsu do plicního parenchymu je zapojen cytokin angiopoietin-like 4 (ANGPTL4), stimulovaný TGF- $\beta$ , jehož činností dochází k rozrušení bazální membrány plicních kapilár (Padua et al., 2008). Současně primární tumor produkuje faktory jako ANGPTL2, MMP-3 a MMP-10, které opět zvyšují permeabilitu v cílovém orgánu (Huang et al., 2009). Samotná nádorová buňka pravděpodobně usnadňuje průchod přes cévní stěnu zvýšenou expresí  $\beta$ 1-integrinu na své buněčné stěně a produkcí četných cytokinů VEGF, CCL2, SDF-1 (Kato et al., 2012; Garcia-Roman a Zentella-Dehesa, 2013).

Ukazuje se, že celý proces invazivně-metastatické kaskády je velmi neefektivní děj, jehož limitujícím krokem je proces kolonizace hostitelské tkáně, tedy „zahníždění“ nádorové buňky poté, co opustila cévní řečiště (Irmisch a Huelsken, 2013). Celý koncept kolonizace byl významně ozřejmen definováním dvou nově popsanych jevů – mezenchymo-epitelová transformace (MET) a existence premetastatického niche.

MET je proces *de facto* reverzní k EMT a předpokládá významnou stimulační roli adheze metastazujících buněk a vliv mikrofilament na postupnou přeměnu mezenchymové buňky v epitelovou (Thiery a Sleeman, 2006).

Dávná teze Stephena Pageta „seed and soil“ dala podnět ke zkoumání schopnosti primárního nádoru indukovat ve vzdáleném orgánu tvorbu takzvaného premetastatického niche, tedy „hnízda“, kam později přicestuje nádorová buňka (Paget, 1989). Jedním z regulujících faktorů bude zřejmě hypoxie nádoru, který v takovémto prostředí produkuje lysyl oxidázu (LOX), zodpovědnou právě za formaci niche v hostitelském orgánu. Významnými složkami extracelulárního prostředí premetastatického niche jsou pravděpodobně buňky myeloidní řady, exprimující CD11+ a dále fibronektin. (Psaila a Lyden, 2009).

Na konci kolonizace dochází tedy ke vzniku mikrometastáz, které mohou být diseminované v těle nemocného a nemusí se nikdy projevit. Pouhé 1% mikrometastáz vyrostou v klinicky patrné makrometastázy (Irmisch a Huelsken, 2013).

## 1.6. Nádory hlavy a krku

Zhoubné nádory hlavy a krku se zařadily na 9. místo mezi všemi malignitami v ČR (rok 2008; celkem 1881 nově nemocných; 3,5% všech malignit). Celosvětově bylo v roce 2008 postiženo celkem 634 760 lidí, což zařadilo nádory hlavy a krku na celkové 7. místo se zastoupením 5,1% mezi všemi malignitami. Incidence byla v průběhu prvního desetiletí 21. století stabilní. Do statistiky nejsou počítány nádory štítné žlázy, krční části jícnu a kožní nádory (Ferlay et al., 2010; Howlader et al., 2013).

V histopatologickém dělení dominují dlaždicobuněčné karcinomy (90%), vycházející ze sliznic horních dýchacích a polykacích cest a v textu je tak pro zjednodušení používán výraz „dlaždicobuněčné nádory hlavy a krku“, ve zkratce HNSCC (*head and neck squamous cell carcinoma*) (Licitra et al., 2009). Nejčastěji zastoupenými oblastmi jsou dutina ústní, oropharynx, hypopharynx a larynx. Méně často zastoupené bývají dlaždicobuněčné karcinomy nosohltanu, nosu a paranazálních dutin. Kontroverzní jsou primární dlaždicobuněčné karcinomy slinných žláz, u kterých je předpokládán spíše metastatický původ (Terhaard et al., 2004; Argiris et al., 2008).

Navzdory pokrokům v diagnostice a vytvoření nových léčebných algoritmů došlo za poslední dvě dekády jen k mírnému snížení mortality u většiny primárních lokalizací

(s výjimkou orofaryngu, kde byl naopak zaznamenán vzestup), která se stále pohybuje na hranici 40% při sledování pětiletého přežití. V rámci jednotlivých lokalizací existují velké rozdíly v pětiletém přežití – jazyk 90% vs hypopharynx 31% (Howlader et al., 2013).

Specifikum dlaždicobuněčných karcinomů je lokální agresivita a regionální šíření do spádových uzlin. V případě metastázy z oblasti hlavy a krku do jedné uzlin menší než 3 cm (N1) dochází ke snížení pětiletého přežití pacientů o 50% a v případě mnohočetných a větších metastáz je prognóza ještě horší (D'Souza et al., 2003; de Bondt et al., 2007).

Hematogenní rozsev je pozorován ve 4-26 % klinických případů, ale až u 37-57% pitvaných pacientů, postižených dlaždicobuněčným karcinomem hlavy a krku. Až na ojedinělé případy jsou pacienti se vzdálenými metastázami indikováni pouze k paliativní péči, ale všeobecně se předpokládá často asymptomatický průběh vzdálené metastázy (Ferlito et al., 2001). Vzhledem k socioekonomickým aspektům postižených pacientů a rizikovým faktorům jsou dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku zatíženy vysokým procentem recidiv a výskytem mnohočetných nádorů (riziko vzniku sekundárního nádoru je až 9%) (Jones et al., 1995; Cmelak, 2012).

Z rizikových faktorů jsou již tradičně diskutovány kouření cigaret a užívání tabáku v jiných formách (například žvýkání betelu), abusus alkoholu (především lihovin), které mají násobící aditivní efekt, dále dietní faktory (nedostatek vitamínu A a faryngolaryngeální reflex (Argiris et al., 2008; Cada et al., 2008). Expozice sérotypům 16 a 18 lidského papilomaviru (HPV) je v současnosti přijímána jako nezávislý rizikový faktor pro vznik dlaždicobuněčného karcinomu (Koslabova et al., 2013). Vzácně jsou popisované nádory zapříčiněny asociací s některými dědičnými syndromy (Li Fraumeni syndrom, Fanconioho anémie, atd.) (Trizna a Schantz, 1992).

Biologické chování nádorů hlavy a krku vykazuje značnou heterogenitu a nezdá se setkáváme s odlišnou odezvou pacientů na léčbu. Příčinou poměrně vysoké mortality, zmíněné výše, je jednak pozdní a málo specifická diagnostika a dále nedostačující léčebné protokoly.

Příčinu neuspokojivých výsledků léčby dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku je zapotřebí hledat nejen v nízkém sociálním statusu pacientů, kteří často přicházejí k lékaři v pokročilém stádiu onemocnění, nýbrž i v nedostatečné rozlišovací schopnosti

běžných histologických postupů při hodnocení biptovaných nebo excidovaných lézí. Na molekulární úrovni byla objevena řada markerů, jejichž aberantní exprese bývá pozorována ve tkáních, které jsou v běžném barvení hematoxylin-eosin hodnoceny jako normální. Jedná se například o keratiny-8 a -19, galektin-9, galektin-7, vazebná místa pro galektin-3, protein vázající mRNA inzulinu podobného růstového faktoru 3 (IMP-3), p53, proliferační znaky (Ki67), proteiny řídící buněčný cyklus (cyklíny, cyklin dependentní kinázy a jejich inhibitory, proteiny rodiny p53 apod.), komponenty extracelulární matrix a proteázy (např. matrix-metloproteinázy, hladký svalový aktin - SMA), růstové faktory a jejich receptory (EGFR, TGFβ apod.) (Plzak et al., 2004; Perez-Ordóñez et al., 2006; De Wever et al., 2008a; Bozec et al., 2009; Cada et al., 2009; Kim et al., 2012b; Fik et al., 2013).

Jedinými specifickými prognostickými znaky rutinně užívanými při plánování léčebného postupu jsou lokalizace a rozsah onemocnění spolu s patologickými charakteristikami. I v této oblasti existuje mnoho molekulárně-diagnostických znaků (kromě výše uvedených), které by mohly přispět k rozhodování o nejvhodnější léčebné modalitě. Aktuálně vysoce diskutovaným tématem je prognóza pacientů s HPV pozitivními dlaždicobuněčnými karcinomy hlavy a krku (Koslabova et al., 2013). Předpokládá se lepší prognóza HPV+ nádorů a existuje určitý předpoklad, že tyto pacienti by mohli podstoupit méně radikální léčbu, jakkoliv pro to zatím neexistují silná literární data (Klozar et al., 2008).

Konečně hlubší znalost signalizačních kaskád v nádorové biologii přináší možnost cíleně útočit na nádorové buňky pomocí tzv. cílené terapie.

### **1.7. Cílená terapie**

Klasickou triádou léčebných postupů u zhoubných nádorů jsou chirurgie, radioterapie a chemoterapie – samostatně či v kombinaci (Ogle Orett E. a Nikoyan Levon, 2013). V posledních dvou dekáдах se ke zmíněné trojici modalit postupně řadí tzv. hormonální terapie u hormon-dependentních nádorů (prs, prostata), imunoterapie, posilující imunitní odpověď vůči nádorovým buňkám, a konečně cílená terapie (*targeted therapy*), zaměřující se na konkrétní molekulární znaky nádorových buněk či konkrétní signální dráhy (Dougan a Dranoff, 2009; Murphy et al., 2012; Dorsey a Agulnik, 2013). Logické rozdíly v samotné nádorové populaci mezi nádory



jednotlivých pacientů se snaží popsat a ovlivnit nový směr tzv. terapie šité na míru (*tailored therapy*) (Rescigno P. et al., 2013).

Recentně je v oblasti karcinomů hlavy a krku testováno několik způsobů cílené léčby. Asi nejdále se nachází výzkum v případě inhibitorů EGFR, VEGF, IGF1-R a signalizační dráhy PI3/AKT (Dorsey a Agulnik, 2013). Konkrétně účinnost protilátky proti receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR, cetuximab) byla ve studiích potvrzena v součinnosti s chemoterapií u recidivujících a metastatických dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku, kdy byly vyčerpány chirurgické možnosti a dosažena maximální celková iradiační dávka (Vermorken J. B. a Specenier P., 2010). Nově je cetuximab používán jako primární léčebná modalita v kombinaci s radioterapií u pacientů, u kterých nelze použít chemoterapii (Bozec et al., 2013). Z dalších inhibitorů EGF receptoru prokázala ve studii SPECTRUM (Study of Panitumumab Efficacy in Patients with Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Cancer) slibné výsledky monoklonální protilátka panitumumab (Vermorken et al., 2013). Důležitým biomarkerem, určujícím odpověď nádoru vůči EGFR inhibitorům, je stanovení K-ras, jehož mutace snižuje citlivost nádorových buněk a pacienti s takto mutovaným nádorem neprofitují z biologické léčby cílené na epidermální růstový faktor (Karapetis et al., 2008).

Zvýšená aktivita cévního růstového faktoru a jeho receptoru (VEGF-R) byla prokázána ve většině nádorů včetně HNSCC, kde indukuje invazivní chování nádorů a koreluje s horší prognózou nemocných. Inhibitory VEGF-R signalizační kaskády (např. Bevacizumab, Sunitinib) svým inhibičním působením na angiogenezi představují základní směr protinádorové terapeutické strategie. Nicméně vedlejší účinky v podobě zvýšené krvácivosti zatím představují limity této léčby (Burgos-Tiburcio et al., 2011).

Komplexním přístupem k nádorové signalizační kaskádě by mohla být biologická léčba, zaměřená na PI3K/AKT/mTOR dráhu, zodpovědnou za přežívání buněk a proteosyntézu. Terapeutický zásah je veden buď přímo na serin/threoninovou proteinkinázu mTOR (Everolimus) nebo nepřímo inhibicí insulínu podobnému růstovému faktoru 1 (IGF1-R) prostřednictvím protilátky Figitumumab. Širším inhibitorem této kaskády jsou také již diskutované inhibitory EGFR (Dorsey a Agulnik, 2013).

Vzhledem ke komplexnosti a heterogenitě nádorového procesu jsou i studované terapeutické cíle velmi rozdílné. Kromě výše uvedených, více či méně prostudovaných monoklonálních protilátek, existuje celá řada směrů, kterým se dále cílená protinádorová strategie může ubírat.

Glykosaminoglykany se také jeví jako vhodný cíl protinádorové léčby. Konkrétně se zkoumají inhibitory enzymů degradujících heparansulfát (nízkomolekulární hepariny nebo daltaparin, jehož pozitivem je absence antikoagulačního účinku), eventuálně využití modifikovaného chondroitin sulfátu, schopného inhibovat růst nádoru. Další z možností cílení na GAGs je inhibice syntézy kyseliny hyaluronové, konkrétně použitím antagonisty k enzymu, syntetizujícímu UDP- $\alpha$ -D-glukuronové kyseliny. Jako slibná se jeví cesta inhibice komplexu HA-CD44 prostřednictvím CD44 siRNA doručené do nádorových buněk v plasmidu, obaleném nanočásticemi (Afratis N. et al., 2012). Je možné též přímo využít up-regulovaný receptor CD44, díky kterému se selektivně naváže terapeutické agens na nádorovou buňku (Song et al., 2004; Orian-Rousseau, 2010). V neposlední řadě cílení na receptor CD44 by mohl být využitelný v inhibici tzv. *homingu* leukemických buněk (Orian-Rousseau V., 2010).

Komplexnost funkce integrinů, jejich schopnost ovlivňovat intra- i extracelulární procesy, jakožto i interakce s četnými růstovými faktory a dalšími složkami ECM, předznamenává využití této skupiny jako slibného prostředku cílené léčby. V literatuře je popisováno přes dvě stovky klinických studií v oblasti integrinové cílené léčby a v oblasti hlavy a krku jsou recentně studovány inhibitory proti integrinům  $\alpha\beta3$  a  $\alpha\beta5$  (Cilengitide) a  $\alpha5\beta1$  (ATN-161, účinkuje i na předchozí dva integriny). Obě dvě látky jsou nyní ve 2. fázi klinické studie (Goodman S. L. a Picard M., 2012).

Zajímavá práce, nikoliv však z oblasti onkologie, přinesla zjištění, že blokováním tvorby fibronektinu a tenascin-C pomocí specifického rekombinantního imunoproteinu dojde ke snížení tvorby ECM v srdci a tím k ovlivnění tvorby perivaskulární a intersticiální fibrózy. Předpokládá se možný užitek v oblasti chlopenních vad a nemoci koronárních tepen (Franz et al., 2010). Cílená protinádorová léčba, zaměřená na tenascin-C je v současnosti v literatuře diskutována (Kim et al., 2012c). Fibronektin je pravděpodobně zodpovědný za resistenci buněk vůči cetuximabu (viz výše) a jeho inhibice prostřednictvím RNAi by mohla zvýšit účinnost protilátek proti EGFR (Eke I. et al., 2013).

Kromě již zmíněné PI3K/AKT/mTOR signalizační dráhy u solidních nádorů existuje několik dalších signalizačních kaskád, účastnících se na procesu kancerogeneze. Hedgehog kaskáda je vysoce aktivní v některých typech nádorů a dosud nejvíce je její potenciál prostudován v oblasti bazocelulárního karcinomu a meduloblastomu, kde jsou již studovány terapeutické možnosti (Gupta S. et al., 2010). V oblasti hlavy a krku se předpokládá efekt cyclopaminu na inhibici Hedgehog kaskády, a tudíž supresi dlaždicobuněčných karcinomů této lokalizace (Mozet et al., 2013). Hedgehog je navíc spolu s dalšími – notch a Wnt/ $\beta$ -catenin dráhy – zapojená do regulace nádorových kmenových buněk a to představuje další zajímavý přístup v protinádorové strategii (Gupta et al., 2010; Pannuti et al., 2010; Takahashi-Yanaga a Kahn, 2010). Další z potenciálních možností ovlivnění funkce CSCs je cílení na protein GRP78, klíčový regulátor funkce endoplasmatického retikula nádorových kmenových buněk (Wu et al., 2010).

Ze složek bazální laminy je studován perlecan, jehož degradace omezuje proliferaci melanomových buněk a buněk kolorektálního karcinomu (Ghiselli et al., 2001). Laminin je v cílené léčbě využíván jako receptor pro nosiče s terapeutickou látkou. Tak například laminin v metastatických buňkách je schopen navázat a transportovat endocytózou do buňky polymerní micely, obsahující chemoterapeutikum etoposid (Ukawala et al., 2012). Laminin67R receptor, bohatě exprimovaný v karcinomu prostaty se jeví jako efektivní cíl pro radioaktivní nanočástice, které jsou schopné doručit efektivní dávku záření přímo k nádorovým buňkám s minimem vedlejších účinků (Shukla et al., 2012). Naopak peptid, odvozený z kolagenu-IV, je přímo schopný inhibovat růst buněk gliomu (Rosca et al., 2012).

Jak vyplývá z textu výše, přímé cílení na nádorově asociované buňky (fibroblasty, makrofágy, dendritické buňky), především prostřednictvím některých jejich zvýšeně exprimovaných znaků (Legumain, Fra-1, Stat3, FAP, HER-2), by mohlo též přinést účinnou protinádorovou léčbu (Chen et al., 2005; Palucka a Banchereau, 2012; Reissfeld, 2013).

## 2. Hypotézy a cíle dizertační práce

Epitelo-mesenchymová interakce hraje klíčovou úlohu v procesu kancerogeneze. Předpokládá se, že pochopení molekulárních procesů na ose - **stroma - basální lamina - epitel** – přispěje ke zlepšení diagnostických a léčebných prostředků. Slibnými cestami tohoto výzkumu a zároveň cíli předkládané práce bylo studium:

1. prognostického potenciálu galektinů, jejich role v indukci invazivního chování nádoru a současně jejich využití jako prostředků biologické léčby.
2. vlivu vybraných chemokinů a interleukinů, produkovaných stromatem na regulaci diferenciac epitelu.
3. vlivu prostředí na kmenové vlastnosti nádorových buněk.

## 3. Materiál a metodika

Metody jednotlivých pokusů jsou detailně popsány v předkládaných publikacích. Odběr a zpracování vzorků k *in situ* pokusům proběhly na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole a Klinice ústní, obličejové a čelistní chirurgie 1. LF UK a VFN v souladu s Helsinskou deklarací. Po transportu na Anatomický ústav 1. LF UK byly zpracovány technikou zmrazených řezů a imunohistochemicky značeny (Plzak et al., 2004). Následná analýza výsledků probíhala za pomoci fluorescenčního mikroskopu (Nikon Eclipse 90i) vybaveného CCD chlazenou kamerou s vysokým rozlišením (Vosskübler) a počítačového programu LUCIA (Laboratory imaging, Praha, Česká republika).

K *in vitro* pokusům bylo použito několik modelů buněčných kultur. Linie buněk FaDu, pocházející z dlaždicobuněčného karcinomu hypopharyngu (ATCC® HTB-43<sup>TM</sup>) (Rangan, 1972). Dále nádorově asociované fibroblasty (SCCF), izolované z dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní, odebrané na Klinice ústní, obličejové a čelistní chirurgie 1. LF UK a VFN (Lacina et al., 2007a; Dvorankova et al., 2012). Zdravé lidské fibroblasty (HF) jsme získali od pacientů operovaných na Klinice plastické chirurgie 3. LF UK (Lacina et al., 2007a; Kodet et al., 2011; Kolar et al., 2012). Imortalizované keratinocyty HaCat byly získány od DKFZ, Heidelberg.

Buněčné linie byly následně využity ke kultivacím a kokultivacím za specifických podmínek dle potřeb jednotlivých pokusů. V kokultivačních studiích bylo využito přímých i inzertních systémů (Transwell Inserts, Corning, Acton, USA) (Lacina et al., 2007a).

Technikami analytické cytochemie prováděné v Mikrobiologickém ústavu, AV ČR, v.v.i., Oddělení imunologie a gnothobiologie (pod vedením Prof. RNDr. Blanky Říhové, DrSc.) byla z tkáňových kultur izolována tzv. *side population*, která byla dále zpracována kultivačními technikami.

Spolupráci s Ústavem molekulární genetiky AV, v.v.i., Oddělení genomiky a informatiky (pod vedením RNDr. Čestmíra Vlčka, CSc.) za pomoci systému Beadstation 500 (Illumina, USA) byl hodnocen transkripční profil všech studovaných buněk a tkání.

Ústav hematologie a krevní transfúze v Praze, Oddělení laboratorní virologie, Národní referenční laboratoř pro papillomaviry (pod vedením RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.) umožnil korelaci získaných dat s HPV statutem jednotlivých nádorů.

Prof. H.-J. Gabius z Ludwig-Maximilianovy univerzity v Mnichově, Fakulta veterinární medicíny, Institut fyziologické chemie, poskytl laboratoři jak protilátky proti jednotlivým galektinům, tak samotné galektiny a podílel se též na supervizi veškerých glykobiologických výstupů.

## 4. Výsledky

### 4.1. Přehled

Výsledky jsou detailně uvedeny a diskutovány v následujících publikacích:

1. Valach J, **Fík Z** (oba autoři se podíleli stejnou měrou), Strnad H, Chovanec M, Plzák J, Čada Z, Szabo P, Šáchová J, Hroudová M, Urbanová M, Šteffl M, Pačes J, Mazánek J, Vlček C, Betka J, Kaltner H, André S, Gabius HJ, Kodet R, Smetana K, Jr., Gál P, Kolář M. Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: Increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *Int J Cancer*. 2012; 131: 2499-508 (**IF-2012: 5,444**)
2. **Fík Z**, Valach J (oba autoři se podíleli stejnou měrou), Chovanec M, Mazánek J, Kodet R, Kodet O, Tachezy R, Foltynová E, André S, Kaltner H, Gabius HJ,

- Smetana K, Jr. Loss of adhesion/growth-regulatory galectin-9 from squamous cell epithelium in head and neck carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2013; 42:166-173. (IF-2012: 2,055)
3. Kopitz J, Fík Z, André S, Smetana K Jr., Gabius HJ. Single-Site Mutational Engineering and Following MonoPEGylation of the Human Lectin Galectin-2: Effects on Ligand Binding, Functional Aspects, and Clearance from Serum. *Mol Pharm.* 2013; 10: 2054-2061. (IF-2013: 5.841)
  4. Kolář M, Szabo P, Dvořánková B, Lacina L, Gabius HJ, Strnad H, Šáchová J, Vlček C, Plzák J, Chovanec M, Čada Z, Betka J, Fík Z, Pačes J, Kovářová H, Motlík J, Jarkovská K, Smetana K Jr. Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro, immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biol Cell.* 2012; 104: 738-51 (IF-2012: 3,488)
  5. Fík Z, Dvořánková B, Kodet O, Bouček J, Betka J.A., Betka J, André S, Gabius HJ, Šnajdr P, Smetana K Jr., Chovanec M. Towards dissecting molecular routes of intercellular communication in the tumour microenvironment: phenotypic plasticity of stem cell-associated markers in coculture (carcinoma cell/fibroblast) systems. *Fol Biol.* 2014; v tisku (IF-2012: 1,219)

## 4.2. Souhrn dosažených výsledků

### 4.2.1. Galektiny, jakožto nositelé informace o normalitě epitelu, induktoři invazivního chování nádoru a prostředky k biologické léčbě (Publikace 1-3).

#### A. Vliv galektinu-1 na vznik nádorově-asociovaných fibroblastů a biologické vlastnosti nádoru

Role nádorově asociovaných fibroblastů byla již diskutována, stejně jako jejich fenotypová charakteristika v podobě exprese SMA. Současně byl v úvodu zmíněn i negativní vliv CAFs na prognózu onemocnění. V této práci jsme studovali vliv galektinu-1 na tvorbu nádorově asociovaných fibroblastů *in vivo*. *In vitro* byl v předchozí studii

prokázán vliv galektinu-1, -3, -7 na zvýšenou tvorbu myofibroblastů a byl též prokázán aditivní efekt s TGF $\beta$  (Dvorankova et al., 2011).

Zpracovány byly vzorky od 31 pacientů a od každého pacienta byla získána část nádoru, část makroskopicky zdravého okraje nádoru a zdravé tkáně z bukální sliznice kontralaterálně.

Nebyl nalezen žádný vztah mezi TNM klasifikací a přítomností myofibroblastů. Největší zastoupení myofibroblastů bylo prokázáno ve tkáních karcinomu tonzily, ale překvapivě nebyl nalezen žádný vztah k HPV statusu pacientů.

V nádorech, které obsahovaly SMA pozitivní fibroblasty, byla pozorována vysoká exprese galektinu-1 ve stromatu a tato exprese se ztrácela spolu s absencí zmíněných fibroblastů nebo byla velmi slabá.

Na úrovni mRNA korelace vztahu mezi galektinem-1 a nádorově asociovanými myofibroblasty poněkud vymizela. Důvodem byla současná přítomnost aktinu hladké svaloviny v myoblastech novotvořených cév, což přirozeně ovlivnilo výsledky.

Vyhodnocením transkriptomu nádorů bylo ve skupině galektin-1<sup>+</sup>, SMA<sup>+</sup> identifikováno 6 transkriptů - MAP3K2, TRIM23, PTPLAD1, FUSIP1, SLC25A40 a SPIN1, u kterých byl již dříve prokázán negativní prognostický význam (Sun et al., 2003; Chung et al., 2006; Yuan et al., 2008; Arimoto et al., 2010; Bandyopadhyay et al., 2010). Zpětně jsme byli schopni imunohistochemicky prokázat korelaci mezi přítomností SMA pozitivních fibroblastů ve stromatu a zvýšenou expresí MAP3K2 v parenchymu nádoru.

Tato práce prokázala význam galektinu-1 v progresi nádorového onemocnění prostřednictvím nádorově asociovaných fibroblastů.

## B. Galektin-9 není exprimován v dysplastických epitelech a nádorech

Galektin-9 je znám jako moderátor buněčné adheze, proliferace a smrti. Současně je popisována jeho role v zánětu, konkrétně ve funkci antigen prezentujících buněk (Hirashima et al., 2004; Yamauchi et al., 2006).

Zaměřili jsme se na pozorování exprese galektinu-9 ve zdravých tkáních, makroskopicky zdravých tkáních při okraji nádoru a nakonec v karcinomech (vše dlaždicové epitely). Jako dobře prostudované, a tudíž referenční markery diferenciaci byly zvoleny keratin-14 a keratin-19 (K-14 a K-19) (Lane a McLean, 2004; Takeda et al.,

2006). K dodatečným pozorováním byly použity protilátky k detekci aktinu hladkých svalových buněk (SMA), keratinu-8 (K-8) a leukocytů (CD45).

Celkem bylo zkoumáno 62 vzorků dlaždicobuněčného karcinomu, 20 tkání z chirurgického okraje nádoru a 32 vzorků zdravých tkání, odebraných od operovaných pacientů (bukální sliznice kontralaterálně od tumoru). Jako kontrolní vzorek byly doplněny 4 zdravé tkáně od pacientů bez nádorového onemocnění, kterým byl extrahován 3. molár.

Tři čtvrtiny (n = 24) normálních epitelů, včetně všech 4 vzorků tkání od nenádorových pacientů, vykazovalo expresi galektinu-9 v celé délce bazální vrstvy. Všechny tyto tkáně měly současně fyziologické zastoupení sledovaných keratinů – 14 a 19. Zbývající zdravé tkáně exprimovaly galektin-9 buď mozaikovitě, tj. přerušovaně v oblasti bazální vrstvy, anebo vůbec a tomu odpovídala i aberantní exprese K-14 a K-19.

Naproti tomu pouze 1 vzorek chirurgického okraje nádoru byl pozitivní pro galektin-9 v celé délce bazální vrstvy s fyziologickou expresí K-14 a K-19. Zbývající tkáně byly svou expresí gal-9 buď negativní (n = 12) nebo mozaikovitě (n = 7) a tomu odpovídala ve všech případech aberantní exprese referenčních keratinů.

Žádný vzorek karcinomu nebyl pozitivní pro galektin-9 (n = 62).

Nebyl pozorován žádný vztah mezi užíváním tabáku a expresí galektinu-9. Totéž platí pro HPV-status.

Tyto výsledky napovídají, že by galektin-9 mohl sloužit jako citlivý marker v oblasti dysplázií dlaždicových epitelů.

### C. Farmakokinetické vlastnosti mutovaných variant Galektinu-2

Aplikace galektinů v klinické praxi byla diskutována výše. Potenciální využití galektinů ve farmakologii bylo studováno na modelu mutovaného galektinu-2. Tři varianty galektinu-2 – divoký typ, mutovaný typ Cys57Met substitucí a monoPEGylovaný derivát tohoto mutantního proteinu byly podrobeny biochemicko-histochemické a funkční analýze s cílem stanovit efekt substituce na aktivitu galektinu-2 a jeho poločas rozpadu.

Testování afinity jednotlivých tří proteinů ke glykoproteinům ukázalo její trojnásobný pokles u obou mutovaných variant ve srovnání s divokým typem galektinu-2. Vazba proteinů ke GM1-gangliosidu buněk neuroblastomu byla dvojnásobně silnější u



obou mutovaných variant. Na druhou stranu v případě buněk z linie adenokarcinomu tlustého střeva, které bohatě exprimují membránové glykoproteiny, byla afinita u mutovaných variant nižší. Pokud však byl použit systém s nižší sialylací buněčného povrchu (v tomto případě Lec2 mutované ovariální buňky čínské křečka), nejaktivnějším se ukázal mutovaný protein a ve srovnání s PEGylovanou formou.

Histochemická analýza ukázala významný pokles vazby PEGylovaného lektinu *in vivo* ve srovnání s divokým typem a jeho Cys57Met substituovanou variantou jak v normální, tak v nádorové tkáni. Tato část byla dělána v naší laboratoři.

Další fází pokusu byla alternativa k běžné lektinové studii (schopnost aglutinace erytrocytů), konkrétně aglutinace fixovaných králičích buněk. Zde se jako nejefektivnější ukázal mutovaný protein, následoval divoký typ a nejslabším aglutinačním efektem se prezentoval PEGylovaný galektin. Opačně, studiem stability takto spojených buněk přidáním laktózy byla zjištěna obdobná síla vazby divoké a mutované a přibližně 5-6x slabší v případě PEGylované.

Dalším studiem funkčních vlastností jednotlivých proteinů byla jejich schopnost inhibovat buněčnou proliferaci, konkrétně buněk neuroblastomu. Všechny tři typy proteinů redukovaly populaci buněk přibližně o 50%. Naproti tomu v linii buněk erythroleukemie byl divoký typ opět schopen za určité koncentrace zredukovat počet buněk o 50%, ale Cys57Met mutace tento efekt zcela vyrušila.

Sledováním clearance obou radioiodem značených mutovaných variant po intravenózním podání do Wisko-HAN potkana ukázala prodlouženou přítomnost v séru v případě PEGylované formy.

Tato práce prokázala vliv mutace a PEGylace galektinu-2 na jeho vazebnou charakteristiku a to buď pozitivně, nebo negativně v závislosti na podmínkách. Zároveň byl pozorován významný vliv mutace galektinu na jeho funkci ve vztahu k inhibici buněčné proliferace, která mutovanými variantami nebyla prakticky vůbec ovlivněna.

#### 4.2.2. Role chemokinů a interleukinů v EMI (Pubikace 4).

Nádorově asociované fibroblasty (CAFs) byly diskutovány výše. Jedním ze znaků, odlišujících je od normálních fibroblastů je jejich schopnost produkovat signální molekuly, které mají za následek změnu fenotypu zdravých lidských keratinocytů až k podobě nádorových buněk (exprese K-8) (Lacina et al., 2007a).

Tato práce se zaměřila na vliv epitelových buněk, zdravých i maligních, na zdravé lidské fibroblasty. Konkrétním směrem zájmu byly některé chemokiny (CXCL-1) a interleukiny (IL-6, IL-8) a jejich receptory (CXCR-1, CXCR-2), jakožto důležité signalizační molekuly v procesu epitelo-mezenchymové interakce (EMI).

K *in vitro* pokusům byly použity linie immortalizovaných nenádorových keratinocytů (HaCaT), dlaždicobuněčného karcinomu hypofaryngu (FaDu), dále zdravé fibroblasty (HF) a zdravé keratinocyty (HK). K *in vivo* pokusům bylo použito 20 vzorků nádoru a zdravé tkáně operovaných pacientů.

Vliv HaCaT a FaDu byl ve fibroblastech pozorován ve formě exprese hladkého svalového aktinu (SMA) a jaderného nukleosteminu. FaDu buňky nadto stimulovaly fibroblasty k tvorbě extracelulární matrix bohaté na fibronektin a galektin-1

Mikročipovou analýzou *in vivo* a *in vitro* vzorků bylo detekováno přes dvě desítky genů, kódujících signální molekuly, účastníci se ve výše zmíněných mezibuněčných interakcích. Z nich byly vybrány nejvýznamněji upregulované geny v dlaždicobuněčném karcinomu ve srovnání s normální sliznicí – CXCL-1, IL-6, IL-8.

*In vivo* byla studována exprese IL-8 v dlaždicových epitelech, která byla ve více než polovině případů výraznější v nádorech než v normálních tkáních. Receptory pro IL-8 a CXCL-1 byly v normálním epitelu nalezeny bazálně (CXCR-1 a CXCR-2) a suprabazálně (CXCR-1). V nádorech byly bohatě exprimovány oba receptory CXCR-1 a CXCR-2, které byly dále přítomny v endotelových buňkách cévních kapilár.

ELISA analýza kondiciovaných médií zdravých fibroblastů/CAF s FADU a HK buňkami potvrdila zvýšenou produkci IL-6, IL-8 a CXCL-1 v kokulturách *in vitro*. Zaměřili jsme se na expresi keratinu 8, který je považován za marker nízké diference a špatné prognózy nádorového onemocnění (Fillies et al., 2006).

Kondiciované médium z FaDu + HF a FaDu + CAFs bylo schopno indukovat expresi keratinu 8 v původně zdravých keratinocytech. Kondiciované médium ze samotných FaDu indukovalo v keratinocytech jen nízkou expresi K-8. Přidáním rekombinovaných IL-6, IL-8 a CXCL-1 do normálního kultivačního média mělo za následek silné zvýšení exprese K-8 a analogicky blokování těchto molekul vedlo k jejímu snížení.

Souhrnem lze říci, že k interakci mezi normálními keratinocyty a normálními fibroblasty nemusí docházet přímým kontaktem, ale pomocí molekul chemokinů,

signálních proteinů- IL-6, IL-8 a CXCL-1, které mají za následek změnu diferenciaci keratinocytů. Analogická situace je popisována u hojící se rány, a proto lze opět potvrdit postulát Dr. Harolda Dvoraka, že nádor je rána, která se nehojí (Dvorak, 1986).

#### 4.2.3. Vliv prostředí na kmenové vlastnosti nádorových buněk (Pubikace 5).

Předpoklad, že nádorové kmenové buňky jsou zodpovědné za relaps nádorového onemocnění a že klíčovým faktorem této vlastnosti je vliv okolního prostředí, nás vedl k provedení tohoto pokusu (Costea et al., 2006b).

Studovali jsme několik druhů buněčných linií: samostatnou linii FaDu, linii FaDu přímo ko-kultivovanou s nádorovými fibroblasty (SCCF) a lidskými fibroblasty (HF) a linii FaDu ko-kultivovanou se stejnými fibroblasty v insertním systému s vyloučením mezibuněčných spojů. V každé jednotlivé linii jsme 2., 7. a 9. den kultivace imunohistochemicky prokazovali vybrané potenciální znaky kmenových buněk a nízké diferenciaci tkání (CD29, CD44, K-8, K-19, jaderný Gal-1-BS). Vyjmenované znaky jsme prokazovali též v side population.

Z hlediska morfologie a uspořádání buněčných populací byl patrný vliv fibroblastů na zvýšení buněčnosti kolonií ve srovnání s izolovanou linií FaDu, která přirozeně rostla s časem kultivace. Zatímco forma kultivace (přímá x nepřímá) neměla na objem populací vliv, vliv SCCF byl silnější než u HF, a tudíž i kolonie byly pod působením nádorových fibroblastů bohatší. Buňky podobné fibroblastům (považované za nízké diferencované/prekurzorové buňky) se nacházely na periférii kolonií a v případě linie FaDu se jejich zastoupení s prodlužující se délkou kultivace proporcčně snižovalo. Kokultivací byla jejich denzita významně zvýšena.

Studované znaky (CD29, CD44, K-8, K-19, jaderný Gal-1-BS), byly v linii FaDu patrné pouze v počátečních stádiích kultivace a s rostoucí buněčností populace se postupně vytrácely. Jejich exprese byla prokázána bez predilekce v centru i na periférii kolonie.

Přímá ko-kultivace ovlivnila jak intenzitu exprese diferenciačních znaků, tak polohu pozitivních buněk. Zastoupení pozitivních buněk v pozdějších fázích kultivace bylo významně vyšší ve srovnání s izolovanou linií FaDu, současně tyto buňky byly pozorované na periférii kolonií v kontaktu s fibroblasty.

Nepřímá kokultivace nepřinesla rozdíl ve velikosti a charakteru kolonií ve srovnání s přímou kokultivací. Pozorovali jsme stabilní expresi diferenciačních znaků ve všech stádiích kultivace. Na rozdíl od přímé kokultivace se pozitivní buňky nacházely i v centru kolonií.

Buňky side population v nultém dni existence konstantně exprimovaly K-8, K-19, CD29 a jaderný Gal-1-BS).

Tato práce prokázala význam epitelu-mezenchymové interakce v biologii nádorových buněk. Zároveň ukázala jednu z možných cest k definici nádorových kmenových buněk.

## 5. Diskuze

Publikované práce přinesly komplexní informace z oblasti nádorové biologie. Byly diskutovány nové prognostické znaky, komplementární k recentně používaným histopatologickým charakteristikám. Dále byla detailně popsána funkce nádorového stromatu v oblasti nádorových kmenových buněk a úloha galektinů, interleukinů a chemokinů v procesu epitelu-mezenchymové interakce. V neposlední řadě jsme se zabývali vlastnostmi galektinů, jako možných terapeutických nástrojů, využitelných v pestré škále různých patologických stavů.

Klíčovou stromální složkou produkující galektin-1 jsou myofibroblasty, detekovatelné pomocí exprese hladkého svalového aktinu (SMA). Myofibroblasty jsou všeobecně považovány za marker špatné prognózy nádorového onemocnění (De Wever et al., 2008a). V naší práci jsme *in vivo* prokázali vztah mezi stromální expresí galektinu-1 s expresí četných transkriptů, zodpovědných za invazivní chování nádorových buněk. V přechodí práci jsme *in vitro* potvrdili indukční vliv galektinu-1 na vznik myofibroblastů aditivní k TGF $\beta$  (Dvorankova et al., 2011).

Nebyla shledána korelace mezi expresí galektinu-1 a klinicko-patologickými charakteristikami nádoru (stage, grade, HPV status). Zhong a spolupracovníci však prokázali negativní asociaci mezi diferenciací dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní a expresí galektinu-1 (Zhong et al., 2010). V práci Alveše a kolektivu byla pozorována korelace mezi expresí galektinu-1 a stádiem onemocnění (Alves et al., 2011).

Galektin-1 je negativním prognostickým znakem též u recidivujících dlaždicobuněčných karcinomů děložního čípku a jeho negativní role je diskutována též ve vztahu k expresi v chirurgických okrajích nádorového resektátu (de Carvalho et al., 2012; Huang et al., 2013). Předpokládá se možnost cílené terapie, zaměřené na blokování galektinu-1, která by měla za cíl potlačit invazivní chování dlaždicobuněčného karcinomu (Wu et al., 2011).

EMI je proces, hrající v postembryonálním období klíčovou úlohu v procesu hojení a karcinogeneze. Vzájemná komunikace mezi stromatem a epitelem probíhá oběma směry nejen na podkladě mezibuněčných kontaktů, ale též za pomoci parakrinní signalizace (Lacina et al., 2007a). V jedné z prací, která je podkladem dizertace, jsme popsali způsob, jakým dokáže EMI ovlivňovat diferenciaci epitelu. Klíčovými složkami parakrinní signalizace byly určeny IL-6, IL-8 a CXCL-1, které v této kombinaci významně snižovaly diferenciaci keratinocytů.

Výše zmíněné chemokiny byly již dříve dány do souvislosti s indukcí invazivního chování buněk karcinomů rozličných primárních lokalizací (Araki et al., 2007; Kanazawa et al., 2007; Hembruff a Cheng, 2009).

Dosud popisovaná role myofibroblastů a interleukinů v epitelo-mesenchymové interakci nádorového bujení je analogií k procesům probíhajícím v hojící se tkáni. Deregulace popsaných interelukinů a jejich receptorů je podrobně popsána u stavů s alterovaným hojením a tímto je podpořena paralela mezi nádorovým bujením a nehojící se ránou (Dvorak, 1986; Devalaraja et al., 2000; Spiekstra et al., 2007).

Morfologická studie epitelo-mesenchymové komunikace potvrdila význam prostředí a délky vzájemného působení na konzervaci určitého *poolu* nádorových buněk ve stádiu blízkému kmenovému. Tato schopnost je nejspíše příčinou nádorové resistance vůči iradiaci a systémové léčbě a předpokládá tak nutnost komplexního zásahu do nádorového prostředí spolu s cílenou eliminací nádorových kmenových buněk (Costea et al., 2006a; Malanchi et al., 2012).

Galektin-9 je ve zdravém epitelu rovnoměrně distribuován v celé délce bazální vrstvy. Naopak v karcinomech je jeho exprese zcela potlačena a ve tkáních, vykazujících dysplastické rysy, je pozorována aberantní (mozaikovitá) exprese.

Kasamatsu a spolupracovníci na pokusu s liniemi dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní ukázali pozitivní vliv galektinu-9 na mezibuněčnou adhezi a diskutovali negativní korelaci mezi expresí galektinu-9 a tendencí nádoru k metastazování

(Kasamatsu et al., 2005). Prognostický význam galektinu-9 byl prokázán u karcinomu děložního čípku, karcinomu prsu a maligního melanomu, kde je potvrzen též proapoptický efekt na melanomové buňky (Yamauchi et al., 2006; Liang et al., 2008; Wiersma et al., 2012). Antimetastatický potenciál a pozitivní korelace vysoké exprese galektinu-9 s prognózou onemocnění byla popsána též u hepatocelulárního karcinomu a karcinomu žaludku, nicméně zde na rozdíl od naší práce byla v liniích žaludečního karcinomu pozorována vyšší exprese galektinu-9 (Zhang et al., 2012b; Jiang et al., 2013).

V EBV-pozitivním nazofaryngeálním karcinomu byl naopak prokázán negativní vliv galektinu-9, vylučovaného z nádorových buněk ukrytého v exosomech. Takto vyloučený galektin-9 tlumí Th1 imunitní odpověď a negativně tak účinkuje v protinádorové imunitní odpovědi (Klibi et al., 2009).

Galektin-9, jakožto terapeutický cíl či samotný prostředek k cílené terapii, je diskutován u řady chronických zánětlivých a autoimunitních onemocnění, kdy se v případě plicní fibrózy, systémového lupus erythematoses a glomerulonefritidy předpokládá protektivní vliv galektinu-9, prostřednictvím regulace imunitní odpovědi (Moritoki et al., 2013; Vega-Carrascal et al., 2014; Zhang et al., 2014). Galektin-9 spolu s rapamycinem pravděpodobně zvyšuje toleranci hostitele k allogennímu srdečnímu transplantátu (Cai et al., 2013).

V nádorové biologii, přes oprávněný předpoklad pozitivního terapeutického vlivu galektinu-9, přetrvává určitá kontroverze ve vztahu k jeho přítomnosti v endoteliích nádorových cév, kde má pravděpodobně za následek resistenci nádorových buněk vůči imunitní odpovědi (Heusschen et al., 2013).

Cílená léčba, využívající galektiny jako cíle či samotné působky, byla částečně diskutována výše. Galektin-1 je na tomto poli zřejmě nejpodrobněji prozkoumán a to především v oblasti autoimunitních chorob, kdy experimentální aplikace purifikovaného galektinu-1 přinesla slibné výsledky u myasthenia gravis, autoimunní encefalomyelitis, systémového lupus erythematoses a diabetu 1. typu (Smetana et al., 2013).

V případě galektinu-3 je diskutována především možnost jeho inhibice pomocí specifických protilátek, a to u papilárního karcinomu štítné žlázy, prostaty a kolorekta (Lin et al., 2009; Wang et al., 2009; Lee et al., 2013).

Předpokladem úspěšného využití galektinů jako cílených léčiv je dosažení jejich optimální biologické dostupnosti. Jednou ze zkoumaných metod je konjugace

potenciálního léčiva s polyethylenglykolem (PEG), což má za následek stabilizaci koncentrace léčiva v oběhu a možnost regulace vazebných schopností v cílových tkáních (Harris et al., 2001). Vedle recentně studovaných galektinů, jakožto substrátů pro PEGylaci, je v současnosti využívána modifikace především protivirových léčiv (interferony), kde je kriticky důležité udržet stabilní sérovou hladinu aplikovaného léčiva (Bull et al., 1999). Další perspektivou je oblast genového inženýrství a protinádorové léčby, kde určité technické problémy při používání nosičů v podobě virových partikulí či nanočástic mohou být překlenuty právě použitím polyethylenglykolu (Kvigne et al., 1998; Oetting et al., 2014).

V prezentované práci jsme prokázali zlepšení farmakokinetiky PEGylovaného galektinu-2, nicméně na úkor snížení jeho biologické účinnosti. V literatuře jsou popsány limity tohoto typu modifikace u malých molekul (O'Donoghue et al., 2013). PEGylace galektinů vyžaduje z tohoto pohledu další zkoumání.

V naší další práci chceme pokračovat v postupném dekódování epitelomezenchymových interakcí v dlaždicobuněčných karcinomech. Recentně nejvíce zpracovaný projekt se týká role tenascinu v onkologii a glykobiologii hlavy a krku, jeho vztah k prognóze a progresi onemocnění. Dalšími slibnými molekulárními znaky jsou:

- 1) Neuron-gliový proteoglykan 2 (NG2-proteoglykan), detailně prostudovaný v oblasti glioblastomů a melaninů (Wang et al., 2011), se jeví jako významný regulátor angiogeneze v nádorovém bujení a je popsána jeho přítomnost v málo diferencovaných keratinocytech (Fukushi et al., 2004; Stallcup a Huang, 2008).
- 2) Cub doména obsahující protein 1 (CDCP1, CD318) je klíčovým faktorem, zajišťujícím resistenci buněk vůči *anoikis*. Prozatím byl popsán u melanomu, v nádorech plic, pankreatu, ledviny, střev, jater, žaludku, prsu a prostaty. Jeho zvýšená exprese je asociována s horší prognózou onemocnění. Fosforylace CDCP1, způsobená snížením vazby buněk na bazální lamínu, vede ke vzestupu některých metalloproteináz a tím se otevírá prostor k jejich metastazování (Uekita a Sakai, 2011). Vyšší exprese CDCP1 byla též pozorována v asociaci se stimulací buněk prostřednictvím EGF/EGFR signální kaskády (Dong et al., 2012). Některé práce dokonce přisuzují CDCP1 dílčí vlastnosti znaků kmenových buněk a to konkrétně v ezofageálním karcinomu a spolu s CD34 v hematopoetické kmenové buňce (Fujiwara et al., 2013).
- 3) Periostin je další z molekul mající pozitivní vztah k invazi nádorových buněk (Nuzzo et al., 2012). Jeho komplexní vztah k nádorové biologii potvrzuje vliv na

(lymf)angiogenezu, resistenci vůči apoptóze a EMT (Morra a Moch, 2011; Kudo et al., 2012). Jeho existence byla popsána u nádorů ovaria a tlustého střeva a prsu, kde byl rovněž popsán jeho vztah k nádorovým kmenovým buňkám (Xu et al., 2012).

- 4) Epoxyeicosatrienová kyselina (EET) je důležitým regulátorem angiogenezy v nádorech a zánětu. V literatuře je nyní hojně diskutována cílená léčba, zaměřující se na EET (*in vitro*), jakožto slibný prostředek protizánětlivé a protinádorové strategie (Panigrahy et al., 2011; Xu et al., 2011).

Předkládaná dizertační práce přináší přehled o rozmanitosti nádorové biologie a zapojení autora do jejího zkoumání. Předpokladem odevzdání textu není ukončení práce, ale naopak její intenzivní pokračování.



## 6. Závěry

V disertační práci jsme prokázali, že:

1. Galektin-1, exprimovaný ve stromatu nádoru je zodpovědný za tvorbu myofibroblastů a je asociován s aktivací genů v parenchymu, souvisejících se špatnou prognózu onemocnění. Zároveň exprese galektinu-9 je striktně vázána na fyziologický stav epitelu a není prokazována v tkáních dysplastických a v karcinomech. Zásahem do struktury galektinu-2 lze dosáhnout lepších farmakokinetických vlastností, v některých případech však za cenu snížení efektivity jeho působení.
2. IL-6, IL-8 a CXCL-1 produkované fibroblasty jsou schopny změnit diferenciační status keratinocytů směrem k nízcce diferencovaným buňkám nezávisle na existenci mezibuněčných spojů.
3. Stromální prostředí nádorových kolonií zvyšuje podíl nízcce diferencovaných buněk svou charakteristikou blízkým buňkám kmenovým. Zároveň v průběhu kultivace udržuje tento stav na konstantní úrovni.

## 7. Literatura

Ackley BD, Kang SH, Crew JR, Suh C, Jin Y, Kramer JM. The basement membrane components nidogen and type XVIII collagen regulate organization of neuromuscular junctions in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*. 2003; 23(9):3577-87.

Afratis N, Gialeli C, Nikitovic D, Tsegenidis T, Karousou E, Theocharis AD, Pavao MS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J*. 2012; 279(7):1177-97.

Akiyama M, Dale BA, Sun TT, Holbrook KA. Characterization of hair follicle bulge in human fetal skin: the human fetal bulge is a pool of undifferentiated keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1995; 105(6):844-50.

Alberts B. 2008. *Molecular Biology of the Cell: Reference edition*: Garland Science.

Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008; 66(1):1-9.

Alves PM, Godoy GP, Gomes DQ, Medeiros AM, de Souza LB, da Silveira EJ, Vasconcelos MG, Queiroz LM. Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. *Pathol Res Pract*. 2011; 207(4):236-40.

Ambler CA, Maatta A. Epidermal stem cells: location, potential and contribution to cancer. *J Pathol*. 2009; 217(2):206-16.

Ambrus JL, Ambrus CM, Mink IB, Pickren JW. Causes of death in cancer patients. *J Med*. 1975; 6(1):61-4.

Araki S, Omori Y, Lyn D, Singh RK, Meinbach DM, Sandman Y, Lokeshwar VB, Lokeshwar BL. Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2007; 67(14):6854-62.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008; 371(9625):1695-709.

Arimoto K, Funami K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(36):15856-61.

Bandyopadhyay S, Chiang CY, Srivastava J, Gersten M, White S, Bell R, Kurschner C, Martin C, Smoot M, Sahasrabudhe S and others. A human MAP kinase interactome. *Nat Methods*. 2010; 7(10):801-5.

Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115(2):209-18.

Becker JC, Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P. Immune-suppressive properties of the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*. 2013; 62(7):1137-48.

Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka KA, Banchereau J. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med*. 1999; 190(10):1417-26.

Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*. 2007; 446(7139):1030-7.

Boissan M, De Wever O, Lizarraga F, Wendum D, Poincloux R, Chignard N, Desbois-Mouthon C, Dufour S, Nawrocki-Raby B, Birembaut P and others. Implication of metastasis suppressor NM23-H1 in maintaining adherens junctions and limiting the invasive potential of human cancer cells. *Cancer Res*. 2010; 70(19):7710-22.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997; 3(7):730-7.

Bozec A, Peyrade F, Fischel JL, Milano G. Emerging molecular targeted therapies in the treatment of head and neck cancer. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2009; 14(2):299-310.

Bozec A, Peyrade F, Milano G. Molecular targeted therapies in the management of head and neck squamous cell carcinoma: recent developments and perspectives. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013; 13(3):389-402.

- Bruce WR, Van Der Gaag H. A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature*. 1963; 199:79-80.
- Bull LB, Kvigne VL, Leonardson GR, Lacina L, Welty TK. Validation of a self-administered questionnaire to screen for prenatal alcohol use in Northern Plains Indian women. *Am J Prev Med*. 1999; 16(3):240-3.
- Bunnell BA, Estes BT, Guilak F, Gimble JM. Differentiation of adipose stem cells. *Methods Mol Biol*. 2008; 456:155-71.
- Burgos-Tiburcio A, Santos ES, Arango BA, Raez LE. Development of targeted therapy for squamous cell carcinomas of the head and neck. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011; 11(3):373-86.
- Cada Z, Chovanec M, Smetana K, Betka J, Lacina L, Plzak J, Kodet R, Stork J, Lensch M, Kaltner H and others. Galectin-7: will the lectin's activity establish clinical correlations in head and neck squamous cell and basal cell carcinomas? *Histol Histopathol*. 2009; 24(1):41-8.
- Cada Z, Plzak J, Chovanec M, Dvorankova B, Lacina L, Szabo P, Smetana K, Jr., Betka J. [Galectins in squamous cell carcinomas of the head and neck cancers]. *Cas Lek Cesk*. 2008; 147(11):559-63.
- Cai L, Zhou H, Fang Z, Yuan J, Niki T, Hirashima M, He W, Chen ZK. Galectin-9 in combination with rapamycin induces cardiac allograft tolerance in mice. *Transplantation*. 2013; 96(4):379-86.
- Cedeno-Laurent F, Dimitroff CJ. Galectins and their ligands: negative regulators of anti-tumor immunity. *Glycoconj J*. 2012; 29(8-9):619-25.
- Clausen BE, Kel JM. Langerhans cells: critical regulators of skin immunity? *Immunol Cell Biol*. 2010; 88(4):351-60.
- Cmelak AJ. Current issues in combined modality therapy in locally advanced head and neck cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012; 84(2):261-73.

- Contag SA, Gostout BS, Clayton AC, Dixon MH, McGovern RM, Calhoun ES. Comparison of gene expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2004; 95(3):610-7.
- Copper MP, Braakhuis BJ, de Vries N, van Dongen GA, Nauta JJ, Snow GB. A panel of biomarkers of carcinogenesis of the upper aerodigestive tract as potential intermediate endpoints in chemoprevention trials. *Cancer.* 1993; 71(3):825-30.
- Costea DE, Tsinkalovsky O, Vintermyr OK, Johannessen AC, Mackenzie IC. Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2006a; 12(5):443-454.
- Costea DE, Tsinkalovsky O, Vintermyr OK, Johannessen AC, Mackenzie IC. Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma (vol 12, pg 443, 2006). *Oral Dis.* 2006b; 12(6):584-584.
- Coward WR, Saini G, Jenkins G. The pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ther Adv Respir Dis.* 2010; 4(6):367-88.
- Crissman JD, Visscher DW, Sarkar FH. Premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: biomarkers of genetic alterations, proliferation, and differentiation. *J Cell Biochem Suppl.* 1993; 17F:192-8.
- Cummings RD, Liu FT. 2009. Galectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology.* 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY).
- D'Souza O, Hasan S, Chary G, Hoisala VR, Correa M. Cervical lymph node metastases in head & neck malignancy - A Clinical /ultrasonographic/ Histopathological comparative study. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 55(2):90-3.
- Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M, Comparative Risk Assessment collaborating g. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet.* 2005; 366(9499):1784-93.
- Danguy A, Rorive S, Decaestecker C, Bronckart Y, Kaltner H, Hadari YR, Goren R, Zich Y, Petein M, Salmon I and others. Immunohistochemical profile of galectin-8 expression

in benign and malignant tumors of epithelial, mesenchymatous and adipous origins, and of the nervous system. *Histol Histopathol.* 2001; 16(3):861-8.

Datta MW, Hernandez AM, Schlicht MJ, Kahler AJ, DeGueme AM, Dhir R, Shah RB, Farach-Carson C, Barrett A, Datta S. Perlecan, a candidate gene for the CAPB locus, regulates prostate cancer cell growth via the Sonic Hedgehog pathway. *Mol Cancer.* 2006; 5:9.

De Boeck A, Hendrix A, Maynard D, Van Bockstal M, Daniels A, Pauwels P, Gespach C, Bracke M, De Wever O. Differential secretome analysis of cancer-associated fibroblasts and bone marrow-derived precursors to identify microenvironmental regulators of colon cancer progression. *Proteomics.* 2013; 13(2):379-88.

de Bondt RB, Nelemans PJ, Hofman PA, Casselman JW, Kremer B, van Engelshoven JM, Beets-Tan RG. Detection of lymph node metastases in head and neck cancer: a meta-analysis comparing US, USgFNAC, CT and MR imaging. *Eur J Radiol.* 2007; 64(2):266-72.

de Carvalho AC, Kowalski LP, Campos AH, Soares FA, Carvalho AL, Vettore AL. Clinical significance of molecular alterations in histologically negative surgical margins of head and neck cancer patients. *Oral Oncol.* 2012; 48(3):240-8.

de Kruijf EM, van Nes JG, van de Velde CJ, Putter H, Smit VT, Liefers GJ, Kuppen PJ, Tollenaar RA, Mesker WE. Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 125(3):687-96.

De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer.* 2008a; 123(10):2229-38.

De Wever O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Gespach C, Bracke M, Berx G. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol.* 2008b; 130(3):481-94.

Degen M, Brellier F, Schenk S, Driscoll R, Zaman K, Stupp R, Tornillo L, Terracciano L, Chiquet-Ehrismann R, Rugg C and others. Tenascin-W, a new marker of cancer stroma,

is elevated in sera of colon and breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2008; 122(11):2454-61.

Devalaraja RM, Nanney LB, Du J, Qian Q, Yu Y, Devalaraja MN, Richmond A. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol*. 2000; 115(2):234-44.

Dong Y, He Y, de Boer L, Stack MS, Lumley JW, Clements JA, Hooper JD. The cell surface glycoprotein CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) contributes to epidermal growth factor receptor-mediated cell migration. *J Biol Chem*. 2012; 287(13):9792-803.

Dorsey K, Agulnik M. Promising new molecular targeted therapies in head and neck cancer. *Drugs*. 2013; 73(4):315-25.

Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:83-117.

Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986; 315(26):1650-9.

Dvorankova B, Szabo P, Lacina L, Gal P, Uhrova J, Zima T, Kaltner H, Andre S, Gabius HJ, Sykova E and others. 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*. 2011; 194(6):469-80.

Dvorankova B, Szabo P, Lacina L, Kodet O, Matouskova 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 Biol*. 2012; 137(5):679-85.

Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev*. 2001; 15(1):50-65.

Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res*. 2001; 264(1):169-84.

Epifano C, Perez-Moreno M. Crossroads of integrins and cadherins in epithelia and stroma remodeling. *Cell Adh Migr*. 2012; 6(3):261-73.

Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008; 15(3):504-14.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010; 127(12):2893-917.

Ferlito A, Rinaldo A, Buckley JG, Mondin V. General considerations on distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2001; 63(4):189-91.

Fik Z, Valach J, Chovanec M, Mazanek J, Kodet R, Kodet O, Tachezy R, Foltynova E, Andre S, Kaltner H and others. Loss of adhesion/growth-regulatory galectin-9 from squamous cell epithelium in head and neck carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2013; 42(2):166-73.

Fillies T, Werkmeister R, Packeisen J, Brandt B, Morin P, Weingart D, Joos U, Buerger H. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer.* 2006; 6:10.

Fligny C, Duffield JS. Activation of pericytes: recent insights into kidney fibrosis and microvascular rarefaction. *Curr Opin Rheumatol.* 2013; 25(1):78-86.

Franz M, Brehm BR, Richter P, Gruen K, Neri D, Kosmehl H, Hekmat K, Renner A, Gummert J, Figulla HR and others. Changes in extra cellular matrix remodelling and re-expression of fibronectin and tenascin-C splicing variants in human myocardial tissue of the right atrial auricle: implications for a targeted therapy of cardiovascular diseases using human SIP format antibodies. *J Mol Histol.* 2010; 41(1):39-50.

Franz M, Hansen T, Richter P, Borsi L, Bohmer FD, Hyckel P, Schleier P, Katenkamp D, Zardi L, Kosmehl H and others. Complex formation of the laminin-5 gamma2 chain and large unspliced tenascin-C in oral squamous cell carcinoma in vitro and in situ: implications for sequential modulation of extracellular matrix in the invasive tumor front. *Histochem Cell Biol.* 2006; 126(1):125-31.



- Fujiwara D, Kato K, Nohara S, Iwanuma Y, Kajiyama Y. The usefulness of three-dimensional cell culture in induction of cancer stem cells from esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 434(4):773-8.
- Fukushi J, Makagiansar IT, Stallcup WB. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Mol Biol Cell.* 2004; 15(8):3580-90.
- Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Siebert HC. The sugar code: functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1572(2-3):165-77.
- Gabius HJ, Siebert HC, Andre S, Jimenez-Barbero J, Rudiger H. Chemical biology of the sugar code. *Chembiochem.* 2004; 5(6):740-64.
- Gagneux P, Cheriyan M, Hurtado-Ziola N, van der Linden EC, Anderson D, McClure H, Varki A, Varki NM. Human-specific regulation of alpha 2-6-linked sialic acids. *J Biol Chem.* 2003; 278(48):48245-50.
- Galbiatti AL, Padovani-Junior JA, Maniglia JV, Rodrigues CD, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2013; 79(2):239-47.
- Gangemi R, Paleari L, Orengo AM, Cesario A, Chessa L, Ferrini S, Russo P. Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance. *Curr Med Chem.* 2009; 16(14):1688-703.
- Garcia-Roman J, Zentella-Dehesa A. Vascular permeability changes involved in tumor metastasis. *Cancer Lett.* 2013; 335(2):259-69.
- Ghiselli G, Eichstetter I, Iozzo RV. A role for the perlecan protein core in the activation of the keratinocyte growth factor receptor. *Biochem J.* 2001; 359(Pt 1):153-63.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *Journal of Experimental Medicine.* 1996; 183(4):1797-1806.
- Goodman SL, Picard M. Integrins as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci.* 2012; 33(7):405-12.

- Graziano A, d'Aquino R, Tirino V, Desiderio V, Rossi A, Pirozzi G. The stem cell hypothesis in head and neck cancer. *J Cell Biochem.* 2008; 103(2):408-12.
- Grichnik JM. Genomic instability and tumor stem cells. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(6):1214-6.
- Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol.* 1994; 124(4):401-4.
- Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, Szmitkowski M. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012; 50(1):12-9.
- Gundacker NC, Haudek VJ, Wimmer H, Slany A, Griss J, Bochkov V, Zielinski C, Wagner O, Stockl J, Gerner C. Cytoplasmic proteome and secretome profiles of differently stimulated human dendritic cells. *J Proteome Res.* 2009; 8(6):2799-811.
- Gupta S, Takebe N, Lorusso P. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2010; 2(4):237-50.
- Guttery DS, Shaw JA, Lloyd K, Pringle JH, Walker RA. Expression of tenascin-C and its isoforms in the breast. *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29(4):595-606.
- Haass NK, Smalley KS, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol.* 2004; 35(3):309-18.
- Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Experimental Cell Research.* 2006; 312(19):3701-3710.
- Hagedorn EJ, Ziel JW, Morrissey MA, Linden LM, Wang Z, Chi Q, Johnson SA, Sherwood DR. The netrin receptor DCC focuses invadopodia-driven basement membrane transmigration in vivo. *J Cell Biol.* 2013; 201(6):903-13.
- Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med.* 2002; 347(20):1593-603.

- Halata Z, Grim M, Bauman KI. Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003; 271(1):225-39.
- Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science.* 1977; 197(4302):461-3.
- Harbrecht BG, Franklin GA, Miller FB, Richardson JD. Is splenectomy after trauma an endangered species? *Am Surg.* 2008; 74(5):410-2.
- Harnden P, Southgate J. Cytokeratin 14 as a marker of squamous differentiation in transitional cell carcinomas. *J Clin Pathol.* 1997; 50(12):1032-3.
- Harris JM, Martin NE, Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 2001; 40(7):539-51.
- Hembruff SL, Cheng N. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. *Cancer Ther.* 2009; 7(A):254-267.
- Heron M. Deaths: leading causes for 2008. *Natl Vital Stat Rep.* 2012; 60(6):1-94.
- Heusschen R, Griffioen AW, Thijssen VL. Galectin-9 in tumor biology: a jack of multiple trades. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1836(1):177-85.
- Hirashima M, Kashio Y, Nishi N, Yamauchi A, Imaizumi TA, Kageshita T, Saita N, Nakamura T. Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconj J.* 2004; 19(7-9):593-600.
- Hittelman WN, Voravud N, Shin DM, Lee JS, Ro JY, Hong WK. Early genetic changes during upper aerodigestive tract tumorigenesis. *J Cell Biochem Suppl.* 1993; 17F:233-6.
- Hohenester E, Yurchenco PD. Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adh Migr.* 2013; 7(1):56-63.
- Holikova Z, Hrdlickova-Cela E, Plzak J, Smetana K, Jr., Betka J, Dvorankova B, Esner M, Wasano K, Andre S, Kaltner H and others. Defining the glycophenotype of squamous epithelia using plant and mammalian lectins. Differentiation-dependent expression of alpha2,6- and alpha2,3-linked N-acetylneuraminic acid in squamous epithelia and

carcinomas, and its differential effect on binding of the endogenous lectins galectins-1 and -3. *APMIS*. 2002; 110(12):845-56.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z and others. SEER Cancer Statistics Review 1975-2010. 2013.

Hu B, Phan SH. Myofibroblasts. *Curr Opin Rheumatol*. 2013; 25(1):71-7.

Huang EY, Chanchien CC, Lin H, Wang CC, Wang CJ, Huang CC. Galectin-1 is an independent prognostic factor for local recurrence and survival after definitive radiation therapy for patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013; 87(5):975-82.

Huang W, Chiquet-Ehrismann R, Moyano JV, Garcia-Pardo A, Orend G. Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Res*. 2001; 61(23):8586-94.

Huang Y, Song N, Ding Y, Yuan S, Li X, Cai H, Shi H, Luo Y. Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis. *Cancer Res*. 2009; 69(19):7529-37.

Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med*. 1999; 5(7):803-9.

Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(4):311-21.

Chen AL, Soman KV, Rychahou PG, Luxon BA, Evers BM. Proteomic analysis of colonic myofibroblasts and effect on colon cancer cell proliferation. *Surgery*. 2005; 138(2):382-90.

Chovanec M, Plzak J, Betka J, Brabec J, Kodet R, Smetana K, Jr. Comparative analysis of alpha2,3/2,6-linked N-acetylneuraminic acid and cytokeratin expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2004a; 12(2):297-301.

Chovanec M, Smetana K, Jr., Dvorankova B, Plzakova Z, Andre S, Gabius HJ. Decrease of nuclear reactivity to growth-regulatory galectin-1 in senescent human keratinocytes

- and detection of non-uniform staining profile alterations upon prolonged culture for galectin-1 and -3. *Anat Histol Embryol.* 2004b; 33(6):348-54.
- Chu PG, Lyda MH, Weiss LM. Cytokeratin 14 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases with emphasis on its value in differentiating squamous cell carcinomas from other epithelial tumours. *Histopathology.* 2001; 39(1):9-16.
- Chu YW, Runyan RB, Oshima RG, Hendrix MJ. Expression of complete keratin filaments in mouse L cells augments cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(9):4261-5.
- Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA, Ang KK, El-Naggar AK, Zanation AM, Cmelak AJ and others. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2006; 66(16):8210-8.
- Igyarto BZ, Kaplan DH. The evolving function of Langerhans cells in adaptive skin immunity. *Immunol Cell Biol.* 2010; 88(4):361-5.
- Ikarashi T, Ida-Yonemochi H, Ohshiro K, Cheng J, Saku T. Intraepithelial expression of perlecan, a basement membrane-type heparan sulfate proteoglycan reflects dysplastic changes of the oral mucosal epithelium. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33(2):87-95.
- Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, Karavasilis V, Tsanou H, Arvanitis DL, Agnantis NJ, Pavlidis N. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur J Cancer.* 2002; 38(18):2362-70.
- Irmisch A, Huelsken J. Metastasis: New insights into organ-specific extravasation and metastatic niches. *Exp Cell Res.* 2013.
- Itano N, Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life.* 2002; 54(4):195-9.
- Janes SM, Watt FM. New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(3):175-83.

- Jia D, Yan M, Wang X, Hao X, Liang L, Liu L, Kong H, He X, Li J, Yao M. Development of a highly metastatic model that reveals a crucial role of fibronectin in lung cancer cell migration and invasion. *BMC Cancer*. 2010; 10:364.
- Jiang J, Jin MS, Kong F, Cao D, Ma HX, Jia Z, Wang YP, Suo J, Cao X. Decreased galectin-9 and increased tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. *PLoS One*. 2013; 8(12):e81799.
- Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1995; 75(6):1343-53.
- Jung DW, Che ZM, Kim J, Kim K, Kim KY, Williams D, Kim J. Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. *Int J Cancer*. 2010; 127(2):332-44.
- Kanazawa T, Nishino H, Hasegawa M, Ohta Y, Iino Y, Ichimura K, Noda Y. Interleukin-6 directly influences proliferation and invasion potential of head and neck cancer cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2007; 264(7):815-21.
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S and others. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008; 359(17):1757-65.
- Kasamatsu A, Uzawa K, Nakashima D, Koike H, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H. Galectin-9 as a regulator of cellular adhesion in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Mol Med*. 2005; 16(2):269-73.
- Kato H, Liao Z, Mitsios JV, Wang HY, Deryugina EI, Varner JA, Quigley JP, Shattil SJ. The primacy of beta1 integrin activation in the metastatic cascade. *PLoS One*. 2012; 7(10):e46576.
- Kaur J, Sawhney M, Dattagupta S, Shukla NK, Srivastava A, Walfish PG, Ralhan R. Clinical Significance of Altered Expression of beta-Catenin and E-Cadherin in Oral Dysplasia and Cancer: Potential Link with ALCAM Expression. *PLoS One*. 2013; 8(6):e67361.

- Kawase A, Yoshida J, Ishii G, Nakao M, Aokage K, Hishida T, Nishimura M, Nagai K. Differences between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung: are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma prognostically equal? *Jpn J Clin Oncol*. 2012; 42(3):189-95.
- Kim BG, Gao MQ, Choi YP, Kang S, Park HR, Kang KS, Cho NH. Invasive breast cancer induces laminin-332 upregulation and integrin beta4 neoexpression in myofibroblasts to confer an anoikis-resistant phenotype during tissue remodeling. *Breast Cancer Res*. 2012a; 14(3):R88.
- Kim HJ, Do IG, Jeon HK, Cho YJ, Park YA, Choi JJ, Sung CO, Lee YY, Choi CH, Kim TJ and others. Galectin 1 expression is associated with tumor invasion and metastasis in stage IB to IIA cervical cancer. *Hum Pathol*. 2013; 44(1):62-8.
- Kim KY, Li S, Cha JD, Zhang X, Cha IH. Significance of molecular markers in survival prediction of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2012b; 34(7):929-36.
- Kim MY, Kim OR, Choi YS, Lee H, Park K, Lee CT, Kang KW, Jeong S. Selection and characterization of tenascin C targeting peptide. *Mol Cells*. 2012c; 33(1):71-7.
- Klibi J, Niki T, Riedel A, Pioche-Durieu C, Souquere S, Rubinstein E, Le Moulec S, Guigay J, Hirashima M, Guemira F and others. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood*. 2009; 113(9):1957-66.
- Klingberg F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol*. 2013; 229(2):298-309.
- Klozar J, Kratochvil V, Salakova M, Smahelova J, Vesela E, Hamsikova E, Betka J, Tachezy R. HPV status and regional metastasis in the prognosis of oral and oropharyngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2008; 265 Suppl 1:S75-82.
- Kobayashi H, Dubois S, Sato N, Sabzevari H, Sakai Y, Waldmann TA, Tagaya Y. Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood*. 2005; 105(2):721-7.

- Kodet O, Dvorankova B, Krejci E, Szabo P, Dvorak P, Stork J, Krajsova I, Dundr P, Smetana K, Jr., Lacina L. Cultivation-dependent plasticity of melanoma phenotype. *Tumour Biol.* 2013; 34(6):3345-55.
- Kodet O, Dvorankova B, Lacina L, Andre S, Kaltner H, Gabius HJ, Smetana K, Jr. Comparative analysis of the nuclear presence of adhesion/growth-regulatory galectins and reactivity in the nuclei of interphasic and mitotic cells. *Folia Biol (Praha)*. 2011; 57(3):125-32.
- Kolar M, Szabo P, Dvorankova B, Lacina L, Gabius HJ, Strnad H, Sachova J, Vlcek C, Plzak J, Chovanec M and others. Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biol Cell.* 2012; 104(12):738-51.
- Koslubova E, Hamsikova E, Salakova M, Klozar J, Foltynova E, Salkova E, Rotnaglova E, Ludvikova V, Tachezy R. Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *Int J Cancer.* 2013; 133(8):1832-9.
- Kouvidi K, Berdiaki A, Nikitovic D, Katonis P, Afratis N, Hascall VC, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Role of receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM) in low molecular weight hyaluronan (LMWHA)-mediated fibrosarcoma cell adhesion. *J Biol Chem.* 2011; 286(44):38509-20.
- Kressin MK, Kim AS. Metastatic Merkel cell carcinoma in the bone marrow of a patient with plasma cell myeloma and therapy-related myelodysplastic syndrome. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012; 5(9):1007-12.
- Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG and others. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature.* 2006; 442(7104):818-22.
- Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Nguyen PT, Siriwardena SB, Tsunematsu T, Ohbayashi M, Ando T, Hatakeyama D, Shibata T and others. Periostin directly and indirectly promotes tumor lymphangiogenesis of head and neck cancer. *PLoS One.* 2012; 7(8):e44488.



- Kuk C, Gunawardana CG, Soosaipillai A, Kobayashi H, Li L, Zheng Y, Diamandis EP. Nidogen-2: a new serum biomarker for ovarian cancer. *Clin Biochem.* 2010; 43(4-5):355-61.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL. 2012. Robbins Basic Pathology: Elsevier/Saunders.
- Kvigne VL, Bull LB, Welty TK, Leonardson GR, Lacina L. Relationship of prenatal alcohol use with maternal and prenatal factors in American Indian women. *Soc Biol.* 1998; 45(3-4):214-22.
- Lacina L, Dvorankova B, Smetana K, Jr., Chovanec M, Plzak J, Tachezy R, Kideryova L, Kucerova L, Cada Z, Boucek J and others. 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.* 2007a; 83(11-12):837-48.
- Lacina L, Smetana K, Jr., Dvorankova B, Pytlik R, Kideryova L, Kucerova L, Plzakova Z, Stork J, Gabius HJ, Andre S. Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *Br J Dermatol.* 2007b; 156(5):819-29.
- Lane EB, McLean WH. Keratins and skin disorders. *J Pathol.* 2004; 204(4):355-66.
- Le Tourneau C, Faivre S, Siu LL. Molecular targeted therapy of head and neck cancer: review and clinical development challenges. *Eur J Cancer.* 2007; 43(17):2457-66.
- Lee YK, Lin TH, Chang CF, Lo YL. Galectin-3 silencing inhibits epirubicin-induced ATP binding cassette transporters and activates the mitochondrial apoptosis pathway via beta-catenin/GSK-3beta modulation in colorectal carcinoma. *PLoS One.* 2013; 8(11):e82478.
- Lee YS, Wysocki A, Warburton D, Tuan TL. Wound healing in development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2012; 96(3):213-22.
- Li XX, Wang J, Wang HL, Wang W, Yin XB, Li QW, Chen YY, Yi J. Characterization of cancer stem-like cells derived from a side population of a human gallbladder carcinoma cell line, SGC-996. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 419(4):728-34.

- Liang M, Ueno M, Oomizu S, Arikawa T, Shinonaga R, Zhang S, Yamauchi A, Hirashima M. Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008; 134(8):899-907.
- Licitra L, Felip E, Group EGW. Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2009; 20 Suppl 4:121-2.
- Lin CI, Whang EE, Donner DB, Jiang X, Price BD, Carothers AM, Delaine T, Leffler H, Nilsson UJ, Nose V and others. Galectin-3 targeted therapy with a small molecule inhibitor activates apoptosis and enhances both chemosensitivity and radiosensitivity in papillary thyroid cancer. *Mol Cancer Res*. 2009; 7(10):1655-62.
- Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med*. 2001; 193(6):727-40.
- Locke M, Heywood M, Fawell S, Mackenzie IC. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res*. 2005; 65(19):8944-50.
- Lyons AJ, Bateman AC, Spedding A, Primrose JN, Mandel U. Oncofetal fibronectin and oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2001; 39(6):471-7.
- Maddox P, Sasieni P, Szarewski A, Anderson M, Hanby A. Differential expression of keratins 10, 17, and 19 in normal cervical epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma. *J Clin Pathol*. 1999; 52(1):41-6.
- Malanchi I, Santamaria-Martinez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, Huelsken J. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*. 2012; 481(7379):85-9.
- Mariette C, Finzi L, Piessen G, Van Seuning I, Triboulet JP. Esophageal carcinoma: prognostic differences between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Surg*. 2005; 29(1):39-45.
- Mathiasen AB, Harutyunyan MJ, Jorgensen E, Helqvist S, Ripa R, Gotze JP, Johansen JS, Kastrup J. Plasma YKL-40 in relation to the degree of coronary artery disease in patients with stable ischemic heart disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2011; 71(5):439-47.

Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, Akiyama T, Kuroda H, Kawano Y, Kobune M and others. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med.* 2003; 9(9):1158-65.

Matthias C, Mack B, Berghaus A, Gires O. Keratin 8 expression in head and neck epithelia. *BMC Cancer.* 2008; 8:267.

Maurer J, Nelson B, Cecena G, Bajpai R, Mercola M, Terskikh A, Oshima RG. Contrasting expression of keratins in mouse and human embryonic stem cells. *PLoS One.* 2008; 3(10):e3451.

McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.* 2001; 13(5):534-40.

Mescher A. 2009. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition: McGraw-Hill Education.

Mesker WE, Junggeburst JM, Szuhai K, de Heer P, Morreau H, Tanke HJ, Tollenaar RA. The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage. *Cell Oncol.* 2007; 29(5):387-98.

Metwaly H, Maruyama S, Yamazaki M, Tsuneki M, Abe T, Jen KY, Cheng J, Saku T. Parenchymal-stromal switching for extracellular matrix production on invasion of oral squamous cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2012; 43(11):1973-81.

Mhawech P, Dulguerov P, Assaly M, Ares C, Allal AS. EB-D fibronectin expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2005; 41(1):82-8.

Michl P, Gress TM. Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer. *Gut.* 2013; 62(2):317-26.

Miller FA, Wilson B, Grimshaw J, Battista R, Blancquaert I, Carroll JC, Rousseau F, Slater B. The Helix in the Labyrinth: Do We Need Genetic Health Services and Policy Research? *Healthc Policy.* 2008; 4(1):30-38.

Miyazaki C, Lin G, Powell BD, Espinosa RE, Bruce CJ, Miller FA, Jr., Karon BL, Rea RF, Hayes DL, Oh JK. Strain dyssynchrony index correlates with improvement in left

ventricular volume after cardiac resynchronization therapy better than tissue velocity dyssynchrony indexes. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2008a; 1(1):14-22.

Miyazaki C, Powell BD, Bruce CJ, Espinosa RE, Redfield MM, Miller FA, Hayes DL, Cha YM, Oh JK. Comparison of echocardiographic dyssynchrony assessment by tissue velocity and strain imaging in subjects with or without systolic dysfunction and with or without left bundle-branch block. *Circulation*. 2008b; 117(20):2617-25.

Moncharmont C, Levy A, Gilormini M, Bertrand G, Chargari C, Alphonse G, Ardail D, Rodriguez-Lafrasse C, Magne N. Targeting a cornerstone of radiation resistance: cancer stem cell. *Cancer Lett*. 2012; 322(2):139-47.

Moritoki M, Kadowaki T, Niki T, Nakano D, Soma G, Mori H, Kobara H, Masaki T, Kohno M, Hirashima M. Galectin-9 ameliorates clinical severity of MRL/lpr lupus-prone mice by inducing plasma cell apoptosis independently of Tim-3. *PLoS One*. 2013; 8(4):e60807.

Morra L, Moch H. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. *Virchows Arch*. 2011; 459(5):465-75.

Mozet C, Stoehr M, Dimitrova K, Dietz A, Wichmann G. Hedgehog targeting by cyclopamine suppresses head and neck squamous cell carcinoma and enhances chemotherapeutic effects. *Anticancer Res*. 2013; 33(6):2415-24.

Murphy CC, Bartholomew LK, Carpentier MY, Bluethmann SM, Vernon SW. Adherence to adjuvant hormonal therapy among breast cancer survivors in clinical practice: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 134(2):459-78.

Nathan CO, Franklin S, Abreo FW, Nassar R, de Benedetti A, Williams J, Stucker FJ. Expression of eIF4E during head and neck tumorigenesis: possible role in angiogenesis. *Laryngoscope*. 1999; 109(8):1253-8.

Nikitovic D, Assouti M, Sifaki M, Katonis P, Krasagakis K, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Chondroitin sulfate and heparan sulfate-containing proteoglycans are both partners and targets of basic fibroblast growth factor-mediated proliferation in human metastatic melanoma cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(1):72-83.

Nunez MA, de Matos FR, Freitas Rde A, Galvao HC. Immunohistochemical Study of Integrin alpha5beta1, Fibronectin, and Bcl-2 in Normal Oral Mucosa, Inflammatory Fibroepithelial Hyperplasia, Oral Epithelial Dysplasia, and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013; 21(4):354-61.

Nuzzo PV, Rubagotti A, Zinoli L, Ricci F, Salvi S, Boccardo S, Boccardo F. Prognostic value of stromal and epithelial periostin expression in human prostate cancer: correlation with clinical pathological features and the risk of biochemical relapse or death. *BMC Cancer*. 2012; 12:625.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007; 445(7123):106-10.

O'Donoghue B, Schäfer MR, Becker J, Papageorgiou K, Amminger GP. Metabolic changes in first-episode early-onset schizophrenia with second-generation antipsychotics. *Early Intervention in Psychiatry*. 2013:n/a-n/a.

Oerbeck B, Johansen J, Lundahl K, Kristensen H. Selective mutism: a home- and kindergarten-based intervention for children 3-5 years: a pilot study. *Clin Child Psychol Psychiatry*. 2012; 17(3):370-83.

Oetting WS, Guan W, Schladt DP, Wildebush WA, Becker J, Thyagarajan B, Jacobson PA, Matas AJ, Israni AK. Telomere length of recipients and living kidney donors and chronic graft dysfunction in kidney transplants. *Transplantation*. 2014; 97(3):325-9.

Offner H, Celnik B, Bringman TS, Casentini-Borocz D, Nedwin GE, Vandenbark AA. Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 1990; 28(2):177-84.

Ohlund D, Franklin O, Lundberg E, Lundin C, Sund M. Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC Cancer*. 2013; 13:154.

Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur J Cancer*. 2010; 46(7):1271-7.

- Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massague J. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 2008; 133(1):66-77.
- Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989; 8(2):98-101.
- Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(4):265-77.
- Palucka K, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells and immunity against cancer. *J Intern Med*. 2011; 269(1):64-73.
- Palumbo JS, Potter JM, Kaplan LS, Talmage K, Jackson DG, Degen JL. Spontaneous hematogenous and lymphatic metastasis, but not primary tumor growth or angiogenesis, is diminished in fibrinogen-deficient mice. *Cancer Res*. 2002; 62(23):6966-72.
- Panigrahy D, Greene ER, Pozzi A, Wang DW, Zeldin DC. EET signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2011; 30(3-4):525-40.
- Pannuti A, Foreman K, Rizzo P, Osipo C, Golde T, Osborne B, Miele L. Targeting Notch to target cancer stem cells. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(12):3141-52.
- Peng Q, Zhao L, Hou Y, Sun Y, Wang L, Luo H, Peng H, Liu M. Biological characteristics and genetic heterogeneity between carcinoma-associated fibroblasts and their paired normal fibroblasts in human breast cancer. *PLoS One*. 2013; 8(4):e60321.
- Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol*. 2006; 59(5):445-53.
- Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*. 2010; 316(8):1324-31.
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 2004; 431(7007):461-6.

Plzak J, Betka J, Smetana K, Jr., Chovanec M, Kaltner H, Andre S, Kodet R, Gabius HJ. Galectin-3 - an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *Eur J Cancer*. 2004; 40(15):2324-30.

Plzak J, Lacina L, Chovanec M, Dvorankova B, Szabo P, Cada 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*. 2010; 30(2):455-62.

Plzak J, Smetana K, Jr., Chovanec M, Betka J. Glycobiology of head and neck squamous epithelia and carcinomas. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2005; 67(2):61-9.

Plzakova Z, Chovanec M, Smetana K, Jr., Plzak J, Stork J, Saeland S. Comparison of the expression of Langerin and 175 kD mannose receptor in antigen-presenting cells in normal human skin and basal cell carcinoma. *Folia Biol (Praha)*. 2004; 50(2):71-3.

Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet*. 2009; 25(1):30-8.

Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 289(1):G2-7.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(3):973-8.

Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(4):285-93.

Rabinovich GA, Rubinstein N, Fainboim L. Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *J Leukoc Biol*. 2002; 71(5):741-52.

Rangan SR. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 1972; 29(1):117-21.

Reisfeld RA. The tumor microenvironment: a target for combination therapy of breast cancer. *Crit Rev Oncog*. 2013; 18(1-2):115-33.

Ritzenthaler JD, Han S, Roman J. Stimulation of lung carcinoma cell growth by fibronectin-integrin signalling. *Mol Biosyst*. 2008; 4(12):1160-9.

Roberts CT, Jr. IGF-1 and prostate cancer. *Novartis Found Symp*. 2004; 262:193-9; discussion 199-204, 265-8.

Romani N, Schuler G. The immunologic properties of epidermal Langerhans cells as a part of the dendritic cell system. *Springer Semin Immunopathol*. 1992; 13(3-4):265-79.

Rosca EV, Lal B, Koskimaki JE, Popel AS, Lathera J. Collagen IV and CXC chemokine-derived antiangiogenic peptides suppress glioma xenograft growth. *Anticancer Drugs*. 2012; 23(7):706-12.

Sanchez-Ruderisch H, Detjen KM, Welzel M, Andre S, Fischer C, Gabius HJ, Rosewicz S. Galectin-1 sensitizes carcinoma cells to anoikis via the fibronectin receptor alpha5beta1-integrin. *Cell Death Differ*. 2011; 18(5):806-16.

Sata T, Roth J, Zuber C, Stamm B, Heitz PU. Expression of alpha 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with Sambucus nigra and Maackia amurensis lectins. *Am J Pathol*. 1991; 139(6):1435-48.

Sharma B, Handler M, Eichstetter I, Whitelock JM, Nugent MA, Iozzo RV. Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 1998; 102(8):1599-608.

Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2010; 21(1):19-25.

Shukla R, Chanda N, Zambre A, Upendran A, Katti K, Kulkarni RR, Nune SK, Casteel SW, Smith CJ, Vimal J and others. Laminin receptor specific therapeutic gold nanoparticles (198AuNP-EGCg) show efficacy in treating prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(31):12426-31.



Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J and others. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol.* 2005; 174(10):6477-89.

Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, van den Born M, van Es JH, van de Wetering M, Clevers H. Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science.* 2012; 337(6095):730-5.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003; 63(18):5821-8.

Smetana K, Jr., Andre S, Kaltner H, Kopitz J, Gabius HJ. Context-dependent multifunctionality of galectin-1: a challenge for defining the lectin as therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.* 2013; 17(4):379-92.

Smetana K, Jr., Plzak J, Dvorankova B, Holikova Z. Functional consequences of the glycophenotype of squamous epithelia--practical employment. *Folia Biol (Praha).* 2003; 49(3):118-27.

Song G, Liao X, Zhou L, Wu L, Feng Y, Han ZC. HI44a, an anti-CD44 monoclonal antibody, induces differentiation and apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Leuk Res.* 2004; 28(10):1089-96.

Spiekstra SW, Breetveld M, Rustemeyer T, Scheper RJ, Gibbs S. Wound-healing factors secreted by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in skin substitutes. *Wound Repair Regen.* 2007; 15(5):708-17.

Stallcup WB, Huang FJ. A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. *Cell Adh Migr.* 2008; 2(3):192-201.

Strnad H, Lacina L, Kolar M, Cada Z, Vlcek C, Dvorankova B, Betka J, Plzak J, Chovanec M, Sachova J and others. Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. *Histochem Cell Biol.* 2010; 133(2):201-11.

Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Muller GA, Neilson EG. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* 2002; 61(5):1714-28.

Sujata L, Chaudhuri S. Stem cell niche, the microenvironment and immunological crosstalk. *Cell Mol Immunol.* 2008; 5(2):107-12.

Sun W, Wei X, Kesavan K, Garrington TP, Fan R, Mei J, Anderson SM, Gelfand EW, Johnson GL. MEK kinase 2 and the adaptor protein Lad regulate extracellular signal-regulated kinase 5 activation by epidermal growth factor via Src. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(7):2298-308.

Takahashi-Yanaga F, Kahn M. Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res.* 2010; 16(12):3153-62.

Takeda T, Sugihara K, Hirayama Y, Hirano M, Tanuma JI, Semba I. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35(6):369-75.

Talmadge JE, Donkor M, Scholar E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26(3-4):373-400.

Tang X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Lett.* 2013; 332(1):3-10.

Terhaard CH, Lubsen H, Van der Tweel I, Hilgers FJ, Eijkenboom WM, Marres HA, Tjho-Heslinga RE, de Jong JM, Roodenburg JL, Dutch H and others. Salivary gland carcinoma: independent prognostic factors for locoregional control, distant metastases, and overall survival: results of the Dutch head and neck oncology cooperative group. *Head Neck.* 2004; 26(8):681-92; discussion 692-3.

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(2):131-42.

Thode C, Jorgensen TG, Dabelsteen E, Mackenzie I, Dabelsteen S. Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2011; 40(3):201-7.

Thomson CS, Forman D. Cancer survival in England and the influence of early diagnosis: what can we learn from recent EURO CARE results? *Br J Cancer*. 2009; 101 Suppl 2:S102-9.

Triel C, Vestergaard ME, Bolund L, Jensen TG, Jensen UB. Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Experimental Cell Research*. 2004; 295(1):79-90.

Trizna Z, Schantz SP. Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 1992; 25(5):1089-103.

Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem*. 2002; 50(2):125-33.

Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(7):2082-90.

Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem*. 2002; 277(7):4589-92.

Uekita T, Sakai R. Roles of CUB domain-containing protein 1 signaling in cancer invasion and metastasis. *Cancer Sci*. 2011; 102(11):1943-8.

Ukawala M, Chaudhari K, Rajyaguru T, Manjappa AS, Murthy RS, Gude R. Laminin receptor-targeted etoposide loaded polymeric micelles: a novel approach for the effective treatment of tumor metastasis. *J Drug Target*. 2012; 20(1):55-66.

Ulazzi L, Sabbioni S, Miotto E, Veronese A, Angusti A, Gafa R, Manfredini S, Farinati F, Sasaki T, Lanza G and others. Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human gastrointestinal cancer. *Mol Cancer*. 2007; 6:17.

Vaidya MM, Kanojia D. Keratins: markers of cell differentiation or regulators of cell differentiation? *J Biosci*. 2007; 32(4):629-34.

Valach J, Fik Z, Strnad H, Chovanec M, Plzak J, Cada Z, Szabo P, Sachova J, Hroudova M, Urbanova M and others. Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head

and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *Int J Cancer*. 2012; 131(11):2499-508.

Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011; 147(2):275-92.

van Beurden HE, Von den Hoff JW, Torensma R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Myofibroblasts in palatal wound healing: prospects for the reduction of wound contraction after cleft palate repair. *J Dent Res*. 2005; 84(10):871-80.

Vega-Carrascal I, Bergin DA, McElvaney OJ, McCarthy C, Banville N, Pohl K, Hirashima M, Kuchroo VK, Reeves EP, McElvaney NG. Galectin-9 Signaling through TIM-3 Is Involved in Neutrophil-Mediated Gram-Negative Bacterial Killing: An Effect Abrogated within the Cystic Fibrosis Lung. *The Journal of Immunology*. 2014; 192(5):2418-2431.

Vermorken JB, Stohlmacher-Williams J, Davidenko I, Licitra L, Winqvist E, Villanueva C, Foa P, Rottey S, Skladowski K, Tahara M and others. Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14(8):697-710.

Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, Klagsbrun M. Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(8):2292-6.

Vlodavsky I, Friedmann Y. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest*. 2001; 108(3):341-7.

Wang D, Wang H, Shi Q, Katkuri S, Walhi W, Desvergne B, Das SK, Dey SK, DuBois RN. Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer Cell*. 2004; 6(3):285-95.

Wang J, Svendsen A, Kmiecik J, Immervoll H, Skaftnesmo KO, Planaguma J, Reed RK, Bjerkvig R, Miletic H, Enger PO and others. Targeting the NG2/CSPG4 proteoglycan retards tumour growth and angiogenesis in preclinical models of GBM and melanoma. *PLoS One*. 2011; 6(7):e23062.

- Wang K, Ma W, Wang J, Yu L, Zhang X, Wang Z, Tan B, Wang N, Bai B, Yang S and others. Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *J Thorac Oncol.* 2012; 7(9):1457-61.
- Wang S, Garcia AJ, Wu M, Lawson DA, Witte ON, Wu H. Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(5):1480-5.
- Wang Y. Breast cancer metastasis driven by ErbB2 and 14-3-3zeta: A division of labor. *Cell Adh Migr.* 2010; 4(1):7-9.
- Wang Y, Nangia-Makker P, Tait L, Balan V, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. Regulation of prostate cancer progression by galectin-3. *Am J Pathol.* 2009; 174(4):1515-23.
- Wang Z, Liu H, Zhao R, Zhang H, Liu C, Song Y. [Tumor-stroma ratio is an independent prognostic factor of non-small cell lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2013; 16(4):191-6.
- Watnick RS. The role of the tumor microenvironment in regulating angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(12):a006676.
- Weisfeldt ML, Zieman SJ. Advances in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Health Aff (Millwood).* 2007; 26(1):25-37.
- Wiersma VR, de Bruyn M, van Ginkel RJ, Sigar E, Hirashima M, Niki T, Nishi N, Samplonius DF, Helfrich W, Bremer E. The glycan-binding protein galectin-9 has direct apoptotic activity toward melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2012; 132(9):2302-5.
- Wu M-J, Jan C-I, Tsay Y-G, Yu Y-H, Huang C-Y, Lin S-C, Liu C-J, Chen Y-S, Lo J-F, Yu C-C. Elimination of head and neck cancer initiating cells through targeting glucose regulated protein78 signaling. *Molecular Cancer.* 2010; 9(1):283.
- Wu MH, Hong HC, Hong TM, Chiang WF, Jin YT, Chen YL. Targeting galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts inhibits oral squamous cell carcinoma metastasis by downregulating MCP-1/CCL2 expression. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(6):1306-16.
- Xu D, Xu H, Ren Y, Liu C, Wang X, Zhang H, Lu P. Cancer stem cell-related gene periostin: a novel prognostic marker for breast cancer. *PLoS One.* 2012; 7(10):e46670.

Xu X, Zhang XA, Wang DW. The roles of CYP450 epoxygenases and metabolites, epoxyeicosatrienoic acids, in cardiovascular and malignant diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63(8):597-609.

Yamashita M, Ogawa T, Zhang X, Hanamura N, Kashikura Y, Takamura M, Yoneda M, Shiraishi T. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer.* 2012; 19(2):170-6.

Yamauchi A, Kontani K, Kihara M, Nishi N, Yokomise H, Hirashima M. Galectin-9, a novel prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Breast J.* 2006; 12(5 Suppl 2):S196-200.

Yanamoto S, Kawasaki G, Yamada S, Yoshitomi I, Kawano T, Yonezawa H, Rokutanda S, Naruse T, Umeda M. Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. *Oral Oncol.* 2011; 47(9):855-60.

Yang XR, Xu Y, Shi GM, Fan J, Zhou J, Ji Y, Sun HC, Qiu SJ, Yu B, Gao Q and others. Cytokeratin 10 and cytokeratin 19: predictive markers for poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients after curative resection. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(12):3850-9.

Yuan H, Zhang P, Qin L, Chen L, Shi S, Lu Y, Yan F, Bai C, Nan X, Liu D and others. Overexpression of SPINDLIN1 induces cellular senescence, multinucleation and apoptosis. *Gene.* 2008; 410(1):67-74.

Zhang P, Zuo H, Ozaki T, Nakagomi N, Kakudo K. Cancer stem cell hypothesis in thyroid cancer. *Pathol Int.* 2006; 56(9):485-9.

Zhang Q, Luan H, Wang L, He F, Zhou H, Xu X, Li X, Xu Q, Niki T, Hirashima M and others. Galectin-9 ameliorates anti-GBM glomerulonephritis by inhibiting Th1 and Th17 immune responses in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014.

Zhang Y, Wang Z, Yu J, Shi J, Wang C, Fu W, Chen Z, Yang J. Cancer stem-like cells contribute to cisplatin resistance and progression in bladder cancer. *Cancer Lett.* 2012a; 322(1):70-7.

Zhang ZY, Dong JH, Chen YW, Wang XQ, Li CH, Wang J, Wang GQ, Li HL, Wang XD. Galectin-9 acts as a prognostic factor with antimetastatic potential in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012b; 13(6):2503-9.

Zhong LP, Wei KJ, Yang X, Pan HY, Ye DX, Wang LZ, Zhang ZY. Overexpression of Galectin-1 is negatively correlated with pathologic differentiation grade in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010; 136(10):1527-35.

Zhou Y, Huang X, Hecker L, Kurundkar D, Kurundkar A, Liu H, Jin TH, Desai L, Bernard K, Thannickal VJ. Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 2013; 123(3):1096-108.