

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Nové trendy v buněčné a molekulární biologii
karcinomů hlavy a krku

Zdeněk Fík

2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Anatomický ústav 1. LF UK

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

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

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

OBSAH

SOUHRN	3
SUMMARY	4
1. ÚVOD	5
2. HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	6
3. MATERIÁL A METODIKA.....	7
4. VÝSLEDKY	8
4.1. <i>Galektin-1 jako induktor tvorby nádorově asociovaných fibroblastů.....</i>	<i>8</i>
4.2. <i>Galektin-9 není exprimován v dysplastických epitelech a nádorech</i>	<i>8</i>
4.3. <i>Farmakokinetické vlastnosti mutovaných variant Galektinu-2</i>	<i>9</i>
4.4. <i>Role chemokinů a interleukinů v EMI</i>	<i>10</i>
<i>Tato práce se zaměřila na působení chemokinů v mezibuněčné komunikaci epitelových buněk s fibroblasty. 10</i>	
4.5. <i>Vliv stromatu na diferenciaci nádorových buněk.....</i>	<i>11</i>
5. DISKUZE	12
6. ZÁVĚRY	14
7. LITERATURA	15
8. SEZNAM PUBLIKACÍ	16
8.1. PUBLIKACE IN EXTENSO, KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTACE	16
8.2. PUBLIKACE IN EXTENSO, KTERÉ NEJSOU PODKLADEM DISERTACE	17
9. OCENĚNÍ.....	19

SOUHRN

Slibným instrumentem pro studium nádorů je glykobiologie, především využití skupiny endogenních lektinů – galektinů. V předkládané práci je prezentován význam galektinu-1 v progresi nádorového onemocnění, konkrétně jeho efekt na stimulaci myofibroblastů/nádorově asociovaných fibroblastů, zodpovědných za invazivní chování nádorů. Galektin-9 (gal-9) naopak není v karcinomu exprimován a v případě dysplastické tkáně, dochází též k jeho aberantní expresi. Kromě využití galektinů jako prognostických znaků byl studován též jejich význam terapeutický. Prezentovaná práce s mutovanými variantami galektinu-2 ukázala možnosti ovlivnění jak farmakodynamiky, tak farmakokinetiky upravených galektinů. Interleukiny IL-6, IL-8, CXCL-1 jsou zodpovědné za snižování diference epitelových buněk cestou epitel-mesenchymové interakce (EMI), jejíž aktivita v různých typech prostředí byla studována i z pohledu nádorových kmenových buněk (CSCs). Výzkum glykobiologie, EMI a CSCs přináší komplexní pohled na biologii nádorového onemocnění.

SUMMARY

Glycobiology is the promising tool for cancer study, using specifically the group of endogenous lectins – galectins represents promising tool. The presented work focuses on the significance of galectin-1 for the tumor progression, especially its influence on the regulation of the myofibroblasts/cancer associated fibroblasts that are responsible for invasive tumor behaviour. On the other hand, galectin-9 is not present in the carcinoma. In the case of dysplasia its expression indicated aberrant features. Except from galectins using as prognostic markers, we also focused on the galectins as therapeutics instruments. Presented work with mutant variants of galectin-2 proved their effect on both pharmacodynamics and pharmacokinetics of the lectin. Interleukins IL-6, IL-8, CXCL-1 were responsible for decreasing of the epithelial cell differentiation via epithelial-mesenchymal interaction (EMI). Activity of the EMI was studied in the cancer stem cells as well, focusing on their properties under the different kinds of the environment. Research of the glycobiology, EMI and CSCs bears complex insight into the cancer biology.

1. Úvod

Celosvětově je dlaždicovým karcinomem hlavy a krku postiženo každoročně přibližně 600 000 lidí, což řadí nádory hlavy a krku na celkové 7. místo mezi všemi malignitami. Navzdory pokrokům v diagnostice a vytvoření nových léčebných algoritmů došlo za poslední dvě dekády jen k mírnému snížení mortality (Howlader et al., 2013). Na podkladě těchto skutečností byla na molekulární úrovni objevena řada markerů, jejichž exprese se váže ke stádiu a prognóze onemocnění. Jednou z možností, jak studovat procesy nádorové biologie, je studium tzv. glykokódu, který předpokládá uložení informace v molekulách sacharidů. Ta může být rozpoznávána a čtena specifickou rodinou proteinů – lektinů (Cada et al., 2008). Kromě informačního přínosu lektinů je recentně studován též jejich terapeutický potenciál. Ukazuje se, že některé galektiny by mohly být v určitých případech schopny blokovat růst nádorových buněk (Sanchez-Ruderisch et al., 2011). Za klíčovou populaci, zodpovědnou za rekurenci nádorového onemocnění jsou považovány tzv. nádorové kmenové buňky (CSCs), jejichž původ nebyl dosud objasněn. CSCs jsou regulovány mikroprostředím nazývaným „*niche*“, jehož struktura je nejspíše podobná *niche* normálních kmenových buněk. Toto prostředí je zodpovědné za regulaci biologického chování nádorové kmenové buňky. V roce 1986 profesor Harold Dvorak publikoval práci, v níž přirovnal nádor k nehojící se ráně. Podrobnosti nalezl na úrovni reakce

epitelu i stromatu a jednou ze společných klíčových stromálních složek byly určeny myofibroblasty/nádorově asociované fibroblasty (CAFs) (Dvorak, 1986). Tato tzv. epitelomesenchymová interakce je recentně studována v procesu hojení, fibrózy a nádorového bujení. Poznatky uvedené v disertační práci diskutují snahy o zlepšení diagnostických a terapeutických postupů na podkladě molekulární biologie.

2. Hypotézy a cíle disertační 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, produkovanych stromatem na regulaci diferenciacie epitelu.
3. vlivu prostředí na kmenové vlastnosti nádorových buněk.

3. Materiál a metodika

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. Po transportu na Anatomický ústav 1. LF UK byly zpracovány technikou zmražených řezů a imunohistochemicky značeny.

K *in vitro* pokusům byly použity linie buněk FaDu, pocházející z dlaždicového karcinomu hypopharyngu, dále nádorově asociované fibroblasty (SCCF), zdravé lidské fibroblasty a keratinocyty (HF a HK) a imortalizované keratinocyty HaCaT. Tyto linie byly využity ke kultivacím za specifických podmínek dle potřeb jednotlivých pokusů. Zkoumané procesy byly studovány metodou nepřímé imunofluorescence.

Jednotlivé práce vznikaly za spolupráce s Mikrobiologickým ústavem, AV ČR, v.v.i., Oddělení imunologie a gnothobiologie (pod vedením Prof. RNDr. Blanky Říhové, DrSc.), s Ústavem molekulární genetiky AV, v.v.i., Oddělení genomiky a informatiky (pod vedením RNDr. Čestmíra Vlčka, CSc.), s Ústavem hematologie a krevní transfúze v Praze, Oddělení laboratorní virologie, Národní referenční laboratoř pro papillomaviry (pod vedením RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.) a Prof.

H.-J. Gabiusem z Ludwig-Maximilianovy univerzity v Mnichově,
Fakulta veterinární medicíny, Institut fyziologické chemie.

4. Výsledky

4.1. Galektin-1 jako induktor tvorby nádorově asociovaných fibroblastů

V této práci jsme studovali vliv galektinu-1 na tvorbu nádorově asociovaných fibroblastů *in vivo*. V nádorech, které obsahovaly hladkosvalový aktin (SMA) pozitivní fibroblasty, byla pozorována vysoká exprese galektinu-1 ve stromatu.

Vyhodnocením transkriptomu nádorů bylo ve skupině galektin-1⁺ SMA⁺ identifikováno 6 transkriptů (MAP3K2, TRIM23, PTPLAD1, FUSIP1, SLC25A40 a SPIN1), u kterých byl již dříve popsán vliv na progresi nádorového onemocnění. 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.

4.2. Galektin-9 není exprimován v dysplastických epitelech a nádorech

Zaměřili jsme se na pozorování exprese galektinu-9 v dlaždicobuněčných karcinomech, chirurgických okrajích nádoru

a ve zdravých epitelech. Jako referenční markery diferenceiace byly zvoleny keratin-14 a keratin-19 (K-14 a K-19).

Tři čtvrtiny (n = 24) **normálních epitelů**, vykazovalo expresi galektinu-9 v celé délce bazální vrstvy současně s fyziologickým zastoupením sledovaných keratinů – 14 a 19. Zbývající zdravé tkáně exprimovaly galektin-9 buď mozaikovitě, anebo vůbec a tomu odpovídala i aberantní exprese K-14 a K-19. Naproti tomu pouze jeden 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).

Tyto výsledky napovídají, že by galektin-9 mohl sloužit jako citlivý marker premaligní transformace dlaždicových epitelů.

4.3. Farmakokinetické vlastnosti mutovaných variant Galektinu-2

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.

Studium **afinity** jednotlivých tří proteinů ke glykoproteinům ukázalo její trojnásobný pokles u obou mutovaných variant ve srovnání s divokým typem galektinu-2. **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. **Aglutinace** fixovaných králičích buněk byla nejvíce ovlivněna mutovaným proteinem, následoval divoký typ a nejslabším aglutinačním efektem se prezentoval PEGylovaný galektin. Schopnost **inhibice proliferace buněk** neuroblastomu nebyla ovlivněna mutací galektinu-2 na rozdíl od buněk erythroleukemie, kdy byl inhibice schopen pouze divoký typ galektinu-2. Sledováním **clearance** obou radioiodem značených mutovaných variant 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-2 na jeho funkci ve vztahu k inhibici buněčné proliferace, která mutovanými variantami nebyla prakticky vůbec ovlivněna.

4.4. Role chemokinů a interleukinů v EMI

Tato práce se zaměřila na působení chemokinů v mezibuněčné komunikaci epitelových buněk s fibroblasty.

Pomocí mikročipové analýzy byly vybrány nejvýznamněji upregulované geny v dlaždicovém karcinomu ve srovnání s normální sliznicí, geny chemokinů, signálních proteinů – CXCL-1, IL-6, IL-8.

ELISA analýza kondiciovaných médií zdravých fibroblastů a CAF s FADU a HK buňkami potvrdila zvýšenou produkci IL-6, IL-8 a CXCL-1 v kokulturách *in vitro*. Kondiciované médium z FaDu + HF a FaDu + CAFs bylo schopno indukovat expresi keratinu 8 (K-8) v původně zdravých keratinocytech. Kondiciované médium ze samotných FaDu indukovalo v keratinocytech jen nízkou expresi K-8. Přidání 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.

4.5. Vliv stromatu na diferenciaci nádorových buněk

Studovali jsme linii FaDu samostatně i v přímé a nepřímé kokultivaci s nádorovými fibroblasty (SCCF) a lidskými fibroblasty (HF). 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, jaderná vazebná místa pro Gal-1). Vyjmenované znaky jsme prokazovali též v *side population*.

Kokultivace přímá i nepřímá měla za následek zvýšení buněčnosti kolonií nádorových buněk FaDu ve srovnání s izolovanou kultivací FaDu. SCCF byly schopné indukovat tvorbu větších kolonií než HF. Současně exprese vybraných znaků byla v případě kokultivace bohatší a v případě přímé kokultury se pozitivní buňky nacházely především na periferii kolonií, zatímco u nepřímé kokultury byly pozitivní buňky přítomny i v centru kolonií. Buňky *side population* v nultém dni existence konstantně exprimovaly vybrané znaky.

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

5. Diskuze

EMI je proces, ve kterém vzájemná komunikace mezi stromatem a epitelem probíhá oběma směry nejen na podkladě mezibuněčných spojů, ale též za pomoci parakrinní signalizace. Popisovaná role myofibroblastů a interleukinů v EMI nádorového bujení je analogií k procesům probíhajícím v hojící se tkáni. Deregulace popsaných interleukinů 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). Předpokládá se možnost cílené terapie, zaměřené na blokování galektinu-1, která by měla za cíl potlačit nejen invazivní chování dlaždicového karcinomu, ale i progresi chronických zánětlivých změn. Morfologická studie epitelomesenchymové komunikace podpořila znalosti o významu prostředí a tedy nutnosti cílení léčby nejen na nádorové buňky samotné, nýbrž i na nádorové stroma.

Prognostický význam galektinu-9 byl prokázán u karcinomu děložního čípku, karcinomu prsu a maligního melanomu (Liang et al., 2008). V naší práci jsme potvrdili jeho význam též u dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku. Galektin-9, jakožto terapeutický cíl či samotný prostředek k cílené terapii, je diskutován u řady chronických zánětlivých a autoimunitních onemocnění, nicméně dosud neexistuje klinicky testované léčivo.

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. V prezentované práci jsme prokázali zlepšení farmakokinetiky PEGylovaného galektinu-2, nicméně na úkor snížení jeho biologické účinnosti.

6. Závěry

1. Galektin-1, exprimovaný ve stromatu nádoru, je zodpovědný za tvorbu myofibroblastů a je asociován s aktivací genů v parenchymu, souvisejících se špatnou prognózou 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. Nejvíce produkované chemokiny v kokulturách fibroblastů a keratinocytů (IL-6, IL-8 a CXCL-1) jsou schopny změnit diferenciační status keratinocytů směrem k níže diferencovaným buňkám nezávisle na existenci mezibuněčných spojů.

3. Stroma nádoru významným způsobem ovlivňuje podíl níže diferencovaných buněk, které jsou svou charakteristikou blízké buňkám kmenovým.

7. Literatura

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.

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.

Howlander 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.

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.

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.

8. Seznam publikací

8.1. Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

a) s IF

Valach J, **Fík Z**, 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**)

Fík Z, Valach J, 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**)

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**)

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**)

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**)

b) bez IF – 0

8.2. Publikace in extenso, které nejsou podkladem disertace

a) s IF - 0

b) bez IF

Fík Z, Chovanec M, Zábrodský M, Lukeš P, Astl J, Betka J. Konvenční versus miniinvazivní video-asistovaná tyroidektomie: Limity a benefity miniinvazivního přístupu. *Otorinolaryng a Foniatri*. 2012; 61: 3-12.

Chovanec M, Zábrodský M, Vik K, Plzák J, **Fík Z**, Klozar J, Betka J, Calabrese L. Rekonstrukce rozsáhlých defektů

v oblasti hlavy a krku volným lalokem z anterolaterálního stehna. *Otorinolaryng a Foniatic.* 2011; 60: 198-203.

Zábrodský M, Chovanec M, **Fík Z**, Bouček J, Betka J. Změny ve VKG obrazu a objektivní hlasové analýze při aplikaci minimálně invazivních technologií a NM v chirurgii štítné žlázy.

Otorinolaryng a Foniatic. 2012; 61: 148-161.

Monografie:

Betka J, Chovanec M, Zvěřina E, Profant O, Lukeš P, Skřivan J, Kluh J, **Fík Z**. Minimally Invasive Endoscopic and Endoscopy-Assisted Microsurgery of Vestibular Schwannoma. *Advances in Endoscopic Surgery*, Prof. Cornel Iancu (Ed.), InTech, 2011, ISBN: 978-953-307-717-8, DOI: 10.5772/23793.

Fík Z. Otitis externa. V *ORL pro všeobecné praktické lékaře*, Praha: RAABE, 2011. Kapitola 11, str. 64-8, ISBN 978-80-86307-90-9

Štingl J, Grim M, Druga R, et al., Regional anatomy, Galén, 1.vydání, 2012; 123 stran, ISBN 978-80-246-2115-9 -

spolupřekladatel

Fík Z, Naňka O et al.: Klinická topografická anatomie pro 4. ročník. *Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: Portál 1. lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Praze* [online]. ISSN 1803-6619

9. Ocenění

1. Cena Alberta Schweitzera za lékařství 2012
2. Cena České anatomické společnosti 2012
3. Vítězná přednáška na Kongresu mladých otorinolaryngologů 13.-15.9.2012
4. Studentská vědecká konference 2013 – 3. místo v sekci postgraduálních prací
5. Nadační fond Scientia – 3.místo za nejlepší vědeckou práci studentů 1.LF UK v Praze publikovanou v roce 2012 (postgraduální student)