

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Buněčná biologie



Bc. Jana Vepřková

**Vliv TGF β na produkci proteinů extracelulární matrix
mezenchymálními buňkami mikroprostředí glioblastomu**

Effect of TGF β on the production of extracellular matrix proteins
by mesenchymal cells in the glioblastoma microenvironment

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. MUDr. Petr Bušek, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Petr Výmola

Praha 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Kvantifikaci kolagenu typu I a fibronektinu v tkáňových lyzátech glioblastomu (viz kapitola 4.1.3) provedl Mgr. Petr Výmola.

V Praze, 27.4.2023

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala školiteli diplomové práce doc. MUDr. Petrovi Buškovi, Ph.D. za neobyčejnou ochotu, trpělivost, cenné rady a komentáře, které mi pomohly při vypracování práce. Děkuji mému konzultantovi Mgr. Petru Výmolovi za věnovaný čas a trpělivou pomoc při řešení problémů v průběhu diplomové práce a magisterského studia. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem členům Laboratoře biologie nádorové buňky za příjemné a nápomocné pracovní prostředí. Mé poděkování patří především MUDr. Evě Balažiové, Ph.D., MUDr. Barboře Výmolové, Mgr. Elena Garcia Borja, Mgr. Rosana Mateau, Ph.D., Ph.D., MUDr. Zdislavě Vaníčkové, Ph.D., Mgr. Magdaleně Houdové Megové, Mgr. Ivaně Matrasové, MUDr. Tereze Šváblové, Mgr. Nikol Terneroové, MUDr. Doře Konečné, Karin Roubíčkové, Květoslavě Vlašicové a zejména vedoucímu výzkumné skupiny prof. MUDr. Aleksimu Šedovi, Ph.D.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt č. 1084120), projektem Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU, projektem „Centrum nádorové ekologie – Výzkum nádorového mikroprostředí podporujícího růst a šíření nádoru“ (reg.č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000785) – Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání.

Abstrakt

Glioblastom (GBM) je nejagresivnější a nejčastější maligní primární mozkový nádor, který se vyznačuje změnami extracelulární matrix (ECM). K těmto změnám může přispívat transformující růstový faktor beta (TGF β), který je v GBM zvýšeně exprimován. TGF β indukuje expresi fibroblastového aktivačního proteinu (FAP), který se v GBM nachází na mezenchymálních buňkách obklopujících cévy, kde se také typicky vyskytují proteiny ECM kolagen typu I a fibronektin.

Cílem práce bylo určit vliv TGF β na expresi kolagenu typu I a fibronektinu FAP⁺ mezenchymálními buňkami v GBM a zjistit vliv ECM produkované těmito buňkami na migraci gliomových buněk.

Bioinformatické a tkáňové analýzy prokazují korelaci mezi expresí TGF β , FAP, kolagenu typu I a fibronektinu v GBM. Pomocí imunohistochemie byla detekována exprese TGF β difúzně v GBM včetně oblastí stromatu, které obsahovaly FAP⁺ mezenchymální buňky a kolagen typu I. V *in vitro* experimentech byla po stimulaci TGF β u FAP⁺ mezenchymálních buněk prokázána zvýšená produkce kolagenu typu I a fibronektinu, zatímco u gliomových buněk byla produkce těchto proteinů i po stimulaci TGF β velmi nízká. ECM produkovaná FAP⁺ mezenchymálními buňkami významně zvyšovala migraci gliomové linie U251, avšak ECM FAP⁺ mezenchymálních buněk po stimulaci TGF β migraci této gliomové linie již více nezvýšila. ECM produkovaná FAP⁺ mezenchymálními buňkami neměla v provedených experimentech efekt na migraci gliomové linie U87.

Výsledky prokazují vliv TGF β na produkci kolagenu typu I a fibronektinu FAP⁺ mezenchymálními buňkami v GBM a naznačují mechanismus, kterým by se tato buněčná populace mohla podílet na progresi GBM.

Klíčová slova: glioblastom, extracelulární matrix, transformující růstový faktor beta, fibroblastový aktivační protein, mezenchymální buňky, kolagen typu I, fibronektin

Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive and common malignant primary brain tumor, characterized by extracellular matrix (ECM). These changes may be caused by transforming growth factor beta (TGF β), which is overexpressed in GBM. TGF β induces the expression of fibroblast activating protein (FAP), which is found in GBM on mesenchymal cells surrounding blood vessels, where ECM proteins collagen type I and fibronectin are typically found.

This study aimed to determine the effect of TGF β on the expression of collagen type I and fibronectin by FAP⁺ mesenchymal cells in the GBM and to determine the effect of ECM produced by these cells on glioma cell migration.

Bioinformatic and tissue analyses demonstrate a correlation between TGF β , FAP, collagen type I, and fibronectin expression in GBM. Using immunohistochemistry, TGF β expression was detected diffusely in GBM including areas of stroma that contained FAP⁺ mesenchymal cells and collagen type I. In *in vitro* experiments, FAP⁺ mesenchymal cells showed increased production of collagen type I and fibronectin after TGF β stimulation. In contrast, glioma cells showed very low production of these proteins even after TGF β stimulation. ECM produced by FAP⁺ mesenchymal cells significantly increased the migration of the glioma cell line U251. However, no further increase was observed for ECM produced by FAP⁺ mesenchymal cells after TGF β stimulation. ECM produced by FAP⁺ mesenchymal cells did not affect the migration of glioma cell line U87.

These results demonstrate an effect of TGF β on the production of collagen type I and fibronectin by FAP⁺ mesenchymal cells in GBM and suggest a mechanism by which this cell population might be involved in GBM progression.

Key words: glioblastoma, extracellular matrix, transforming growth factor beta, fibroblast activation protein, mesenchymal cells, collagen type I, fibronectin

Seznam zkratek

ABC	ATP Binding Cassette
<i>ANXA2</i>	Annexin A2
<i>BGN</i>	Biglycan
COL1	Collagen Type I
<i>COL18A1</i>	Collagen Type XVIII Alpha 1 Chain
<i>COL1A1</i>	Collagen Type I Alpha 1 Chain
<i>COL1A2</i>	Collagen Type I Alpha 2 Chain
<i>COL3A1</i>	Collagen Type III Alpha 1 Chain
<i>COL4A1</i>	Collagen Type IV Alpha 1 Chain
<i>COL4A2</i>	Collagen Type VI Alpha 2 Chain
<i>COL5A1</i>	Collagen Type V Alpha 1 Chain
<i>COL5A2</i>	Collagen Type V Alpha 1 Chain
<i>COL6A1</i>	Collagen Type VI Alpha 1 Chain
<i>COL6A2</i>	Collagen Type VI Alpha 2 Chain
<i>COL6A3</i>	Collagen Type VI Alpha 3 Chain
<i>COL8A2</i>	Collagen Type VIII Alpha 2 Chain
ECM	Extracellular Matrix
<i>ECM1</i>	Extracellular Matrix Protein 1
<i>EFEMP1</i>	Epidermal Growth Factor Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 1
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<i>EMILIN1</i>	Elastin Microfibril Interfacer 1
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAP	Fibroblast Activation Protein

<i>FBLN5</i>	Fibulin 5
FBS	Fetal Bovine Serum
FN	Fibronectin
<i>FN1</i>	Fibronectin 1
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GSC	Glioma Stem Cells
HBVP	Human Brain Vascular Pericytes
<i>HSPG2</i>	Heparan Sulfate Proteoglycan 2
<i>LAMB1</i>	Laminin Subunit Beta 1
<i>LAMC1</i>	Laminin Subunit Gamma 1
LAP	Latency-Associated Peptide
<i>LGALS1</i>	Galectin 1
<i>LGALS3BP</i>	Galectin 3 Binding Protein
LTBP	Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein
<i>LTBP2</i>	Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 2
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MMP	Matrix MetalloProteinase
<i>MMRN2</i>	Multimerin 2
NF-κB	Nuclear Factor Kappa-B
NF1	Neurofibromin 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGFRβ	Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta
pFAP	Primary mesenchymal cells expressing Fibroblast Activating Protein
PI3K	PhosphoInositide-3 Kinase
PKB/Akt	Protein Kinase B

RT	Room Temperature
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
SOX-2	(Sex determining region Y)-Box 2
SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin
<i>SPOCK2</i>	Testican-2
TAM	Tumor-Associated Macrophages
TCGA	The Cancer Genome Atlas
<i>TGFBI</i>	Transforming Growth Factor Beta Induced
TGFβ	Transforming Growth Factor Beta
TGFRI	Transforming Growth Factor Beta Receptor Type I
TGFRII	Transforming Growth Factor Beta Receptor Type II
<i>VWAI</i>	Von Willebrand Factor A Domain Containing 1
VWF	Von Willebrand Factor
WHO	World Health Organization

Obsah

1. Literární přehled	1
1.1. Glioblastom	1
1.2. Změny extracelulární matrix v glioblastomu.....	3
1.2.1. Extracelulární matrix mozkové tkáně.....	3
1.2.2. Extracelulární matrix glioblastomu	5
1.2.2.1. Extracelulární matrix parenchymu glioblastomu	5
1.2.2.2. Extracelulární matrix bazálních membrán glioblastomu.....	6
1.2.2.2.1. Kolageny	6
1.2.2.2.2. Fibronektin	7
1.3. Signalizace TGF β v glioblastomu	8
1.3.1. Vliv TGF β na extracelulární matrix nádoru a jeho mikroprostředí.....	11
1.4. Fibroblastový aktivační protein v nádorovém mikroprostředí	13
2. Cíle práce.....	16
3. Materiál a metody	17
3.1. Laboratorní vybavení	17
3.2. Spotřební materiál	17
3.3. Chemikálie, roztoky	18
3.4. Buněčné kultury	19
3.4.1. Gliomové linie.....	19
3.4.2. Primární FAP ⁺ mezenchymální kultury	19
3.4.3. Lidské mozkové vaskulární pericyty.....	20
3.4.4. Primární gliomové kmenové kultury.....	20
3.5. Metody.....	20
3.5.1. Rozmrazování buněk.....	20
3.5.2. Pasážování	21
3.5.3. Počítání buněk	21
3.5.4. Magneticky aktivované třídění buněk	21
3.5.5. Imunohistochemie a imunocytochemie	22
3.5.6. Příprava buněčných lyzátů	24
3.5.7. ELISA.....	25
3.5.8. Měření celkové koncentrace proteinu	25
3.5.9. <i>In vitro</i> experimenty s přidavkem TGF β 1	25
3.5.9.1. Stimulace buněčných kultur TGF β 1.....	25
3.5.9.2. Příprava 3D extracelulárních matric pod vlivem TGF β 1	26
3.5.10. Solubilizace 3D extracelulárních matric.....	27
3.5.11. Funkční <i>in vitro</i> experimenty se solubilizovanými extracelulárními matricemi	27

3.5.11.1.	Haptotaxe.....	27
3.5.12.	Bioinformatická analýza TCGA dat.....	28
3.5.13.	Statistická analýza a zpracování dat.....	29
4.	Výsledky	30
4.1.	Asociace mezi TGFβ1, FAP a ECM v mikroprostředí glioblastomu.....	30
4.1.1.	Exprese <i>TGFB1</i> a <i>FAP</i> pozitivně koreluje s proteiny ECM.....	30
4.1.2.	Lokalizace TGFβ, FAP, kolagenu typu I a fibronektinu v glioblastomu	34
4.1.3.	V glioblastomech s vyšší expresí FAP je zvýšeně exprimován TGFβ1, kolagen typu I a fibronektin	35
4.2.	Vliv TGFβ1 na expresi kolagenu typu I a fibronektinu u buněk izolovaných z glioblastomu..	37
4.2.1.	Mezenchymální buňky vytváří extracelulární matrix obsahující kolagen typu I a fibronektin	37
4.2.2.	TGFβ1 zvyšuje expresi kolagenu typu I a fibronektinu u mezenchymálních buněk izolovaných z glioblastomu.....	39
4.3.	Vliv ECM mezenchymálních buněk stimulovaných TGFβ1 na migraci gliomových buněk <i>in vitro</i>	42
5.	Diskuse	45
6.	Závěr	55
7.	Seznam použité literatury	56

1. Literární přehled

1.1. Glioblastom

Glioblastom je nejagresivnější a nejčastější typ maligního primárního nádoru centrální nervové soustavy, který reprezentuje téměř 48 % primárních maligních mozkových nádorů u dospělých (Ostrom et al. 2018). Glioblastom představuje pro pacienty velmi špatnou prognózu a jeho medián přežití se pohybuje přibližně v rozmezí 14–15 měsíců od stanovení diagnózy (Koshy et al. 2012). Tímto typem nádoru mohou být postiženi lidé v jakémkoli věku, avšak medián stáří pacienta při určení diagnózy je 64 let a nejvyšší incidence glioblastomu se vyskytuje u pacientů okolo 75 až 84 let (Thakkar et al. 2014; Montemurro 2020). Glioblastom postihuje muže až 1,6x častěji než ženy (Ostrom et al. 2018). K určení diagnózy se využívá kombinace histopatologických metod a molekulárních parametrů (Louis et al. 2021). Nejzávažnější charakteristika gliomů je vysoká invazivita a s ní spojený infiltrativní růst, což znemožňuje chirurgickou resekci nádoru a zapříčiňuje recidivu nádorového onemocnění.

Díky pokroku v oblasti molekulární biologie bylo zjištěno několik typických genetických aberací souvisejících s glioblastomem, a proto se nyní při diagnostice hledí především na specifický molekulárně-genetický profil glioblastomu (Klasifikce Světové zdravotnické organizace (WHO; World Health Organization), Louis et al. 2021). Mezi typické molekulárně-genetické znaky užívané v diagnostice glioblastomu se řadí homozygotní delece inhibitoru cyklin-dependentní kináz 2A/B, způsobující ztrátu jejich produktů (p14, p15, p16) inhibujících progresi buněčného cyklu (Ma et al. 2020; Louis et al. 2021). Mezi další diagnostický biomarker patří mutace promotoru genu telomerázové reverzní transkriptázy vedoucí ke zvýšenému přežívání buněk, které by za fyziologických podmínek přecházely do senescence nebo by podstupovaly apoptózu kvůli limitnímu zkrácení telomer (Nonoguchi et al. 2013; Louis et al. 2021). Mezi další typickou abnormalitu spojenou s glioblastomem používanou v diagnostice patří amplifikace nebo aktivační mutace genu receptoru epidermálního růstového faktoru zvyšující buněčnou proliferaci, angiogenezi, migraci a invazi nádorových buněk (Feng et al. 2014; Keller a Schmidt 2017; Louis et al. 2021). Další významný molekulární marker je současná změna počtu kopií chromosomu 7 (amplifikace celého chromozomu, či 7p nebo 7q) a ztráta chromosomu 10 (celý chromozom, či 10p nebo 10q), (+7/-10), nejčastěji trisomie chromosomu 7 a monosomie chromosomu 10, což je způsobeno pravděpodobně chybami v mitotické disjunkci (Stichel et al. 2018; Louis et al.

2021). Výše uvedené molekulární markery pro diagnostiku glioblastomu byly detekovány také v gliomových liniích a gliomových kmenových buňkách, což jsou nejčastěji používané *in vitro* modely glioblastomu ve výzkumu (Raschke et al. 2005; Lee et al. 2006; Akhavan et al. 2013; Johanns et al. 2016; Stichel et al. 2018).

Při diagnostice glioblastomu jsou vedle molekulárně-genetických znaků využívány i typické histopatologické znaky. Mezi tyto znaky se řadí silná aberantní vaskularizace, infiltrativní růst a tvorba mikrovaskulárních proliferací, což ve výsledku vede k výskytu hemoragií a nekrotizací. Mezi charakteristické znaky glioblastomových buněk patří významná mitotická aktivita, zřetelné morfologické změny a jejich vysoká heterogenita, která je zajištěna subpopulacemi gliomových kmenových buněk v mikroprostředí glioblastomu (Soeda et al. 2015; Huang et al. 2016; Mills et al. 2016).

Nad rámec klasifikace WHO lze glioblastomy podrobněji rozdělit na tři transkriptomové subtypy, a to na klasický, mezenchymální a proneurální (Wang et al. 2017; Teo et al. 2019). Tyto subtypy jsou určeny na úrovni expresního profilování a asociují s typickými genetickými změnami, například ztráta chromozomu 10 a amplifikace chromozomu 7 u klasického subtypu, fokální hemizygotní delece v oblasti 17q11.2 včetně genu pro neurofibromin 1 (*NF1*) u mezenchymálního subtypu, aberace genu receptoru růstového faktoru A krevních destiček u proneurálního subtypu (Verhaak et al. 2010; Wang et al. 2017; Teo et al. 2019). Genetické abnormality subtypů glioblastomu mají potenciál využití jako prediktivní markery a terapeutické cíle (Park et al. 2019; Teo et al. 2019). Přestože byly subtypy glioblastomu poprvé popsány před více než deseti lety, stále pro ně chybí jednotlivé specifické léčebné protokoly, a to z důvodu nedostatku systematických klasifikačních metod, složitosti a vysoké finanční nákladnosti dosavadních metod pro použití v rutinních klinických laboratořích (Schwarze et al. 2020). Pro překonání tohoto omezení a umožnění lepšího určení specifického protokolu k přesnějšímu vedení léčby i prognózy dle jednotlivých subtypů se další výzkum zabývá zjednodušením a finančním zpřístupněním metodik pro klasifikaci subtypů glioblastomu, což by v důsledku mohlo zlepšit budoucnost v léčbě tohoto onemocnění (Ensenyat-Mendez et al. 2021; Le et al. 2021).

Kromě samotných nádorových buněk ovlivňuje růst a progresi nádoru jeho mikroprostředí. Mozková tkáň je velmi specifická a oproti ostatním tkáním lidského těla vykazuje několik rozdílných charakteristik, a to jak v buněčné, tak i v nebuněčné složce. Výskyt různých typů buněk ve zdravém mozku je částečně určující pro buněčné složení mikroprostředí glioblastomu. V jeho mikroprostředí se vyskytují například neuronální buňky

a astrocyty, které jsou specifické pro mozkovou tkáň (Quail a Joyce 2017). Dále se zde nacházejí stromální buňky jako endoteliální buňky, pericyty, mezenchymální kmenové buňky a nedílnou součástí představují také buňky imunitního systému – například s nádorem asociované makrofágy (TAM; Tumor-Associated Macrophages, M2 fenotyp) a mikroglie (Bradshaw et al. 2016; Quail a Joyce 2017; DeCordova et al. 2020).

Podstatnou součástí buněčného mikroprostředí glioblastomu představují mezenchymální buňky, které se podle přibývajících důkazů ukazují jako možný faktor podporující progresi glioblastomu. Mezi tyto buňky můžeme řadit například mezenchymální kmenové buňky, pericyty a buňky podobné nádorově asociovaným fibroblastům (Clavreul et al. 2012; Appaix et al. 2014; Clavreul et al. 2014). Tyto buňky se nacházejí nejčastěji v perivaskulární oblasti glioblastomu, kde dochází k neoangiogenezi a také se zde vyskytují gliomové kmenové buňky (Calabrese et al. 2007). Některé práce naznačují, že gliomové kmenové buňky se mohou transdiferencovat v různé typy mezenchymálních buněk (Cheng et al. 2013; Hossain et al. 2015). Dalším buněčným typem měnícím svůj fenotyp a vyskytujícím se v glioblastomu jsou pericyty, které se mohou transdiferencovat v jiné mezenchymální buňky, například v buňky podobné fibroblastům (Hosaka et al. 2016; Li et al. 2020). Buňky podobné nádorově asociovaným fibroblastům jsou v perivaskulárních oblastech v glioblastomu obklopeny fibronektinem a mohly by se podílet na modifikaci extracelulární matrix (ECM; Extracellular Matrix), (Busek et al. 2016). Modifikovaná ECM a rozpustné mediátory v mikroprostředí podporují perivaskulární šíření gliomových buněk, které je charakteristické pro glioblastom, a navíc některé buňky podobné fibroblastům mikroprostředí glioblastomu mohou podporovat růst gliomových buněk (Schiffer et al. 1997; Von Bulow et al. 2001; Lugassy et al. 2002; Clavreul et al. 2012; Clavreul et al. 2015). Přestože byly buňky podobné nádorově asociovaným fibroblastům u glioblastomu popsány, jejich podíl na progresi glioblastomu není zatím zcela prozkoumán (Clavreul et al. 2012; Clavreul et al. 2014).

1.2. Změny extracelulární matrix v glioblastomu

ECM v glioblastomu se svým složením i strukturou významně liší od zdravé mozkové tkáně. Přispívají k tomu nejen nádorové buňky, ale i různé stromální buňky přítomné v nádorovém mikroprostředí.

1.2.1. Extracelulární matrix mozkové tkáně

ECM tvoří až 20 % z celkového objemu mozku a je produkována z velké části neurony a gliovými buňkami. ECM zdravého mozku dospělého člověka je ve srovnání s ostatními

orgány lidského těla velmi odlišná. Matrix mozkové tkáně můžeme dělit na dva typy: proteiny bazální membrány (tj. perivaskulární oblasti) oddělující mozkovou tkáň od endotelových buněk vytvářejících cévy a ECM mozkového parenchymu vyplňující samotnou tkáň. Kromě místa výskytu v tkáni je odlišuje také rozdílné množství a složení molekul ECM (Lau et al. 2013).

V mozkové ECM převažují glykosaminoglykany a proteoglykany. Většinu ECM zde představuje glykosaminoglykan hyaluronan. Při fyziologických podmínkách zajišťuje biomechanickou integritu, tkáňovou homeostázu, strukturu a soudržnost tkáně (Ferrer et al. 2018). Díky své schopnosti fungovat jako stabilizační kostra pro další molekuly ECM (glykoproteiny a proteoglykany) může být zodpovědný za organizaci a lokalizaci více molekul důležitých například pro vedení axonu. Také ovlivňuje formování funkčních synapsí a plasticitu mozku skrze receptor CD44 exprimovaný na neuronech a gliálních buňkách (Roszkowska et al. 2016).

Proteoglykany, a to především brevikan, představují druhou nejčastější složku mozkové ECM. V mozku se proteoglykany podílí na regulaci mikroprostředí pomocí interakcí s buňkami. Brevikan byl detekován na vnější straně membrány astrocytů a neuronů. Díky své G2 doméně může interagovat s dalšími molekulami ECM mozku, například s tenascinem R, s nímž ovlivňuje tvorbu perineurálních sítí, čímž oslabuje počty synapsí (Hagihara et al. 1999; Gottschling et al. 2019).

Třetí nejčastěji zastoupenou molekulu ECM představují tenasciny. Jedná se o multimerní glykoproteiny ovlivňující plasticitu mozkové tkáně. K jejich expresi dochází během embryonálního vývoje a také při patologických stavech (Brösicke et al. 2015a). Nejčastější tenascin v mozku, tenascin C, má důležitou roli ve vytváření specifických funkčních oblastí kmenových buněk (niche), (Garcion et al. 2004). Podílí se na regulaci proliferace a migrace mozkových progenitorových buněk, jako astrocytů, gliálních buněk, neuronů a oligodendrocytů (Garcion et al. 2001; Nishio et al. 2003; Garwood et al. 2004; Karus et al. 2011).

Klasické fibrilární proteiny ECM (nejčastěji kolageny a fibronectin), typické pro ostatní tkáň lidského těla, se ve zdravém mozku nachází pouze v malém množství, a to především v oblastech bazálních membrán cév a pod mozkovými obaly (Rutka et al. 1987). Tyto vláknité složky ECM jsou v bazálních membránách mozku zastoupeny kolagenem typu IV, lamininem, perlekanem a entaktinem (čili nidogenem), (Rosell et al. 2008; Ferrer et al. 2018).

1.2.2. Extracelulární matrix glioblastomu

U glioblastomu dochází k velkým změnám ve složení ECM ve srovnání s tkání zdravého mozku u dospělých (Obrázek 1).

Z důvodu produkce různých faktorů nádorovými buňkami dochází k ovlivnění nádorového mikroprostředí (včetně perivaskulární oblasti), čímž se mění chování buněk v této oblasti glioblastomu. Ovlivněné buňky nádorového mikroprostředí zapříčiňují změnu ECM, a to i změnu v zastoupení jednotlivých molekul ECM. Nádorová tkáň se stává rigidnější a pevnější, a to především z důvodu změny exprese fibrilárních proteinů skupiny kolagenů a fibronektinu (Mammoto et al. 2013; Katt et al. 2018). Struktury fibrilárních proteinů ECM představují výhodné migrační cesty pro nádorové buňky na delší vzdálenosti nádorovým mikroprostředím. Tyto proteiny ECM tak významně přispívají k progresi glioblastomu (Mammoto et al. 2013; Brösicke et al. 2015b; Katt et al. 2018).

1.2.2.1. Extracelulární matrix parenchymu glioblastomu

V glioblastomu je oproti zdravé tkáni mozku exprese hyaluronanu zvýšena, stejně tak i exprese jeho receptoru CD44. Pomocí tohoto receptoru hyaluronan působí na zesílení přenosu signálů do cytoplazmy, čímž pozitivně ovlivňuje proliferaci, motilitu, migraci a invazivitu gliomových buněk (Kim et al. 2008; Klank et al. 2017).

Jedním z nejvíce zastoupených proteoglykanů v glioblastomu je brevikan. Při jeho zvýšené expresi se zvyšuje invazivita glioblastomových buněk, čímž napomáhá progresi nádoru (Dwyer et al. 2014). Brevikan také pozitivně reguluje expresi fibronektinu na povrchu glioblastomových buněk a následná vazba brevikanu s fibronektinem zvyšuje expresi integrinů, čímž podporuje motilitu glioblastomových buněk (Hu et al. 2008).

Dále je v ECM glioblastomu zvýšený výskyt tenascinu C, který koreluje s malignitou nádoru, a tudíž jeho vyšší exprese je asociována s kratší dobou přežívání pacienta (Maris et al. 2008). Mimo jiné v porovnání s dalšími solidními nádory byla právě v glioblastomu detekována nejvyšší exprese tenascinu C (Herold-Mende et al. 2002; Leins et al. 2003; Sivasankaran et al. 2009; Alves et al. 2011). Tenascin C může regulovat chování buněk přímo pomocí vazby na integriny nebo nepřímo pomocí vazby dalších molekul ECM, například brevikanu (Varga et al. 2012; Chiquet-Ehrismann et al. 2014; Fujita et al. 2019). Tyto interakce vedou k progresi nádoru přes zvýšení buněčné migrace a motility, čemuž přispívá inhibice fokálních adhezí skrz snížení aktivity a signalizace fokální adhezní kinázy (FAK; Focal Adhesion Kinase), extracelulárním signálem regulované kinázy (ERK; Extracellular Signal-Regulated Kinase), RhoA GTPázy (Williams a Schwarzbauer 2009).

Tenascin C také indukuje změnu exprese genů modulujících ECM, například matrix metaloproteinázy-2 (MMP; Matrix MetalloProteinase), -9, -12, čímž zvyšuje invazivitu glioblastomových buněk (Ilunga et al. 2004; Sarkar et al. 2006; Hirata et al. 2009).

1.2.2.2. Extracelulární matrix bazálních membrán glioblastomu

Přítomnost velkého množství novotvořených cév je jednou z hlavních histopatologických charakteristik glioblastomu (viz kapitola 1.1) a je spojena se zvýšenou expresí složek bazální membrány, například lamininu, kolagenu typu IV a fibronektinu (Huijbers et al. 2010).

1.2.2.2.1. Kolageny

Fibrilární kolageny patří k nejméně zastoupeným molekulám ECM většiny tkání a orgánů lidského těla s výjimkou mozkové tkáně, kde představují pouze menšinu ECM nacházející se téměř výhradně v oblastech bazální membrány. Naopak v glioblastomu lze detekovat jejich zvýšenou expresi.

Kolageny hrají roli v klíčových dějích progresu nádoru jako je adheze, motilita, invaze a angiogeneze. Jsou považovány za důležité pro růst nádoru, neboť usnadňují buněčné dělení a proliferaci (Samuel et al. 2011).

Kolagen typu IV patří mezi nejvíce exprimovaný typ kolagenu v mikroprostředí glioblastomu. Jeho exprese byla detekována v blízkosti oblastí mikrovaskulární proliferace (Huijbers et al. 2010). Zvýšená přítomnost kolagenu typu IV v glioblastomu pozitivně ovlivňuje angiogenezi, čímž dochází k rychlejšímu růstu nádoru (Mammoto et al. 2013).

Fibrilární kolagen typu I ovlivňuje díky interakcím s různými receptory mnoho buněčných dějů (Elango et al. 2022). Některé dřívější práce expresi kolagenu typu I v glioblastomu nepřipouštěly (Zámečník et al. 2004), avšak pozdější studie Huijbers et al. (2010) přítomnost tohoto proteinu prokázaly, a to v oblastech peritumorální tkáně glioblastomu (tzn. nádorové cévy a stroma) i v samotném glioblastomu. Kolageny, především fibrilární kolagen typu I, vytváří rigidní ECM v mikroprostředí nádoru. Glioblastom je tužší než okolní mozkový parenchym a gliomové buňky typicky migrují na jeho rozhraní podél cév (Farin et al. 2006; Rubenstein a Kaufman 2008; Gritsenko et al. 2017). *In vitro* experimenty s 3D kolagenovými gely ukazují zvýšenou migraci gliomových buněk ve srovnání s fibronektinovým potahem a srovnatelnou migraci jako v 3D mozkových řezech organotypických kultur (Fayzullin et al. 2019). V glioblastomu zvýšená exprese kolagenu

typu I například koreluje s jeho internalizačním receptorem Endo180, což souvisí s invazí glioblastomu, a to zejména u mezenchymálního subtypu (Huijbers et al. 2010). Mimo jiné se v perivaskulárním prostředí také nacházejí gliomové kmenové buňky a bylo dokázáno, že kolagen typu I v této oblasti zesiluje expresi CD133, jednoho z hlavních markerů gliomových kmenových buněk, čímž byla prokázána jeho další role v patogenezi glioblastomu (Motegi et al. 2014).

Kolageny mohou sloužit nejen jako migrační cesty pro gliomové buňky, ale také jako bariéra či faktor ovlivňující chování buněk, proto role kolagenů v glioblastomu zůstává zatím ne zcela objasněna. Je známo, že exprese kolagenů koreluje s invazivitou glioblastomu a dále strukturální organizace kolagenů ovlivňuje dobu přežití pacienta, kdy více uspořádané fibrilární kolageny byly spojeny s prognosticky lepšími glioblastomy (Pointer et al. 2016). Navíc bylo zjištěno, že uspořádání kolagenu v rámci ECM je závislé na přítomnosti fibronektinu (Erat et al. 2013).

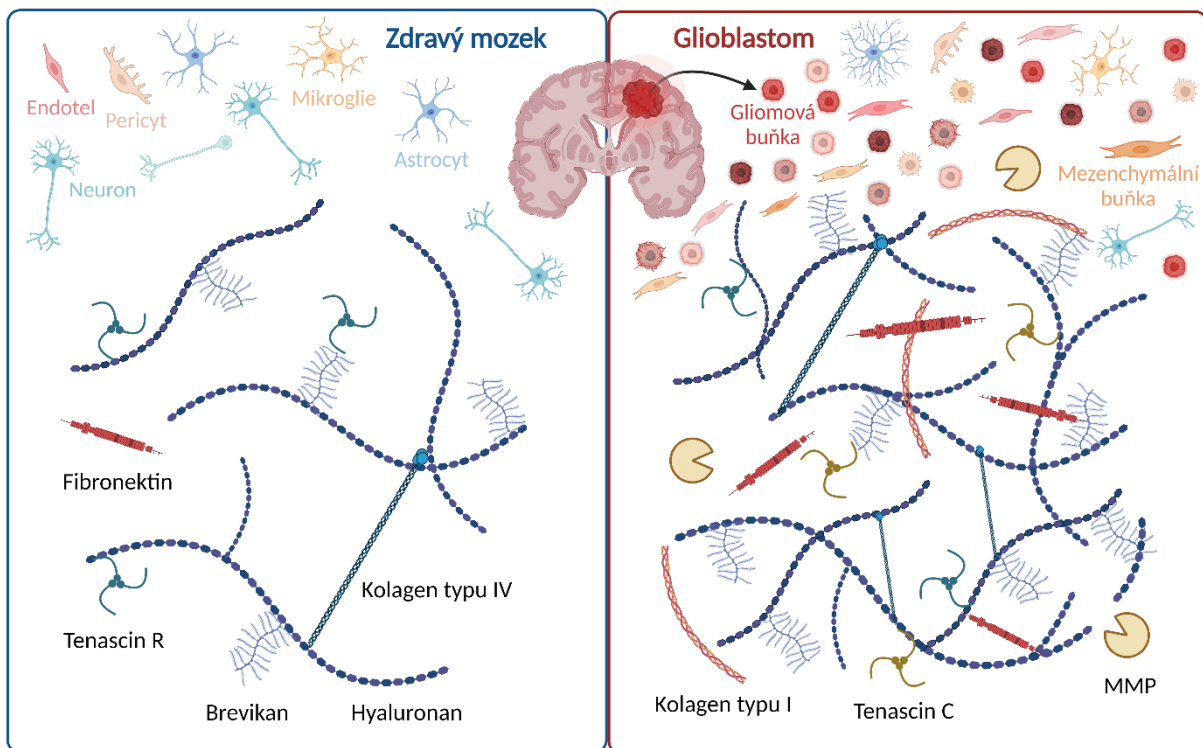
1.2.2.2.2. Fibronektin

Mezi fibrilární proteiny zvýšeně exprimované v mikroprostředí glioblastomu oproti mozku zdravého dospělého jedince patří také glykoprotein fibronektin. Zvýšená koncentrace v glioblastomu i v krvi je spojena s kratší dobou přežití u pacientů s glioblastomem (Sawaya et al. 1985; Caffo et al. 2004; Kabir a Apu 2022). Fibronektin interaguje s membránovými receptory, nejčastěji integriny. Pomocí této interakce propojuje a přenáší signál z vnějšího prostředí do vnitřního prostředí buňky. V glioblastomu integrinová interakce ovlivňuje několik aspektů jako buněčnou adhezi, proliferaci, motilitu, migraci a invazivitu (Serres et al. 2014).

Fibronektin podporuje maligní potenciál glioblastomu, například ovlivňuje gliomové kmenové buňky. *In vitro* experimenty prokázaly zvýšenou adhezi gliomových kmenových buněk v závislosti na množství fibronektinu, což indukovalo expresi MMP-2 a MMP-9 degradujících ECM. Fibronektin indukuje diferenciaci gliomových kmenových buněk, kdy dochází ke snížení exprese kmenových markerů SOX-2 ((Sex determining region Y)-box 2) a nestinu a zvýšení exprese markerů asociovaných s diferenciovanými buňkami jako β -tubulin a gliální fibrilární acidický protein (GFAP; Glial Fibrillary Acidic Protein). Fibronektin také zvyšuje proliferační aktivitu těchto buněk detekovanou pomocí proteinu Ki-67. Exprese tohoto markeru je charakteristická pro dělící se buňky a je potlačena pouze v G_0 fázi buněčného cyklu. Fibronektin dále zvyšuje přežívání gliomových kmenových buněk

prostřednictvím snížení exprese proapoptického proteinu p53 a zvýšení exprese ABC (ATP Binding Cassette) transportérů přispívajících k chemorezistenci nádoru. Do těchto modulačních procesů je zapojena aktivace signální dráhy integrin – FAK/paxillin/protein kináza B (PKB; Protein Kinase B/Akt;), která může být zvrácena intergrinovým inhibítorem (Yu et al. 2018).

Signalizace spouštěná fibronectinem byla navržena Serres et al. (2014) jako jeden z faktorů, který spouští expresi součástí signální kaskády transformujícího růstového faktoru beta (TGF β ; Transforming Growth Factor Beta) v nádorových buňkách. To vytváří podmínky pro zpětnovazebnou smyčku, protože TGF β ovlivňuje mimo jiné i mezenchymální buňky nádorového mikroprostředí k produkci molekul ECM včetně fibronektinu (Bryukhovetskiy a Shevchenko 2016; Zonneville et al. 2018).



Obrázek 1: Změna extracelulární matrix v glioblastomu oproti zdravému mozku. Schéma shrnující relativní výskyt molekul extracelulární matrix ve zdravém mozku (vlevo) a v glioblastomu (vpravo). MMP – matrix metaloproteináza. Vytvořeno v BioRender.com.

1.3. Signalizace TGF β v glioblastomu

Transformující růstový faktor beta patří do multigenové rodiny zahrnující tři geny pro izoformy TGF β , tj. izoformy TGF β 1, TGF β 2 a TGF β 3, které jsou kódované geny *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3* (Yamamoto et al. 1996). V glioblastomu produkují TGF β gliomové buňky včetně gliomových kmenových buněk a další buněčné typy mikroprostředí glioblastomu, jako

jsou astrocyty a imunitní buňky (Kjellman et al. 2000; Leitlein et al. 2001; Wesolowska et al. 2008; Wu et al. 2010; Kim et al. 2014; Frei et al. 2015; Shaim et al. 2021). Kromě TGF β jsou v glioblastomu nadměrně exprimovány i jeho receptory typu I a II (Yamada et al. 1995; Vega et al. 2008). Zvýšená exprese izoform TGF β a hyper-aktivace přenašeče signálu kanonické signalizace TGF β Smad2 koreluje s horší prognózou u pacientů s glioblastomem (Jiang et al. 2017).

TGF β je secernován v inaktivní čili latentní podobě nekovalentně vázaný na peptid asociovaný s latencí (LAP; Latency-Associated Peptide) a na protein vázající latentní TGF β (LTBP; Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein). Tímto latentním proteinovým komplexem je TGF β napojen na ECM (Hyytiäinen et al. 2004). Latentní podoba TGF β zabraňuje jeho předčasné aktivaci. Proteiny latentního komplexu TGF β přispívají k jeho stabilitě. Volný TGF β má poločas rozpadu 2 minuty, zatímco jeho latentní podoba má poločas rozpadu 90 minut (Wakefield et al. 1990). U glioblastomu je zvýšená exprese proteinu latentního komplexu LTBP-1, který je secernován nádorovými buňkami a následně se váže na proteiny ECM. Nadměrná exprese LTBP-1 zvyšuje aktivitu TGF β a fosforylaci přenašeče signálu kanonické signalizace TGF β Smad2 v nádorových buňkách glioblastomu (Tritschler et al. 2009).

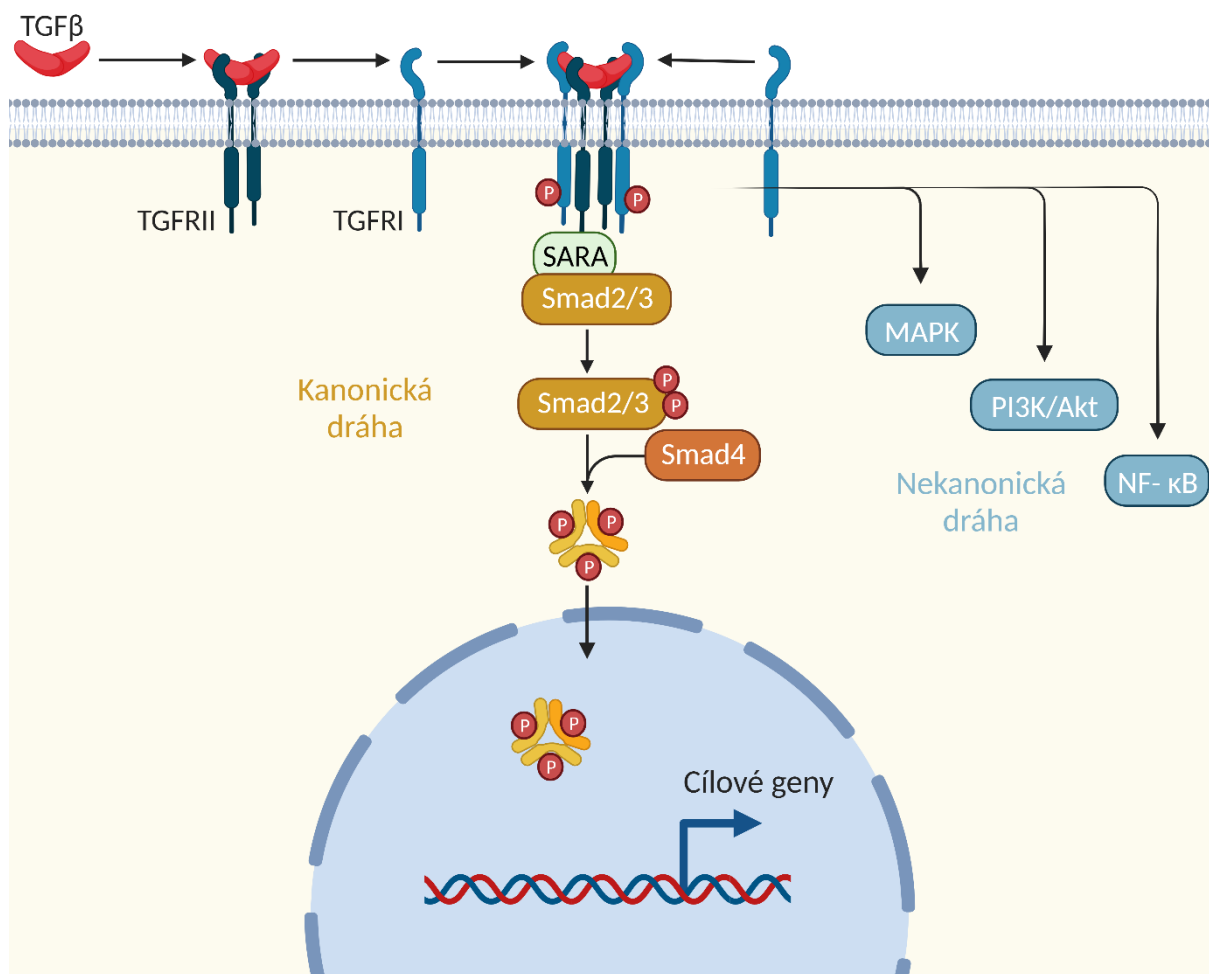
TGF β může být uvolněn z latentního komplexu a tedy aktivován pomocí štěpení serinovou proteázou, například plasminem (Juban et al. 2018). Aktivní forma dimerního TGF β se váže na dimer TGF β receptoru typu II (TGFRII; Transforming Growth Factor Beta Receptor Type II), což vede ke změně konformace tohoto receptoru, a rekrutuje se dimer TGF β receptoru typu I (TGFRI; Transforming Growth Factor Beta Receptor Type I). Dochází k vytvoření signalizačně aktivního receptorového heterotetrameru, kde TGFRII trans-fosforyluje cytosolickou regulační podjednotku TGFRI (Yamada et al. 1995). Membránový serin/threonin kinázový komplex přenáší signál s pomocí adaptorových proteinů (například SARA; Smad Anchor for Receptor Activation) fosforylací přes proteinové přenašeče signálu rodiny Smad, které v jádře fungují jako transkripční faktory ovlivňující expresi cílových genů (Frei et al. 2015), (Obrázek 2).

V kanonické dráze signalizace TGF β TGFRI fosforyluje intracelulární přenašeče signálu Smad2/3, které se váží s Co-Smad4. Heterotrimerický komplex (Smad2/3 a Smad4) se přesouvá do jádra, kde působí na genovou expresi ovlivněním struktury chromatinu a interakcemi s dalšími transkripčními faktory (Ross et al. 2006; Birch et al. 2020). Změna

transkripce vyvolaná signální dráhou TGF β je závislá na kontextu, tedy se liší v souvislosti s buněčným typem a řadou dalších faktorů (Mullen et al. 2011; Xi et al. 2011).

Nekanonická signální dráha TGF β není závislá na přenašečích signálu Smad a aktivuje se přes fosforylaci různých substrátů, například spoluúčastníků dráhy nukleárního faktoru kappa-B (NF- κ B; Nuclear Factor Kappa-B), fosfatidylinositol-3-kinázové (PI3K; PhosphoInositide-3 Kinase)/Akt, Rho-like GTPázové a mitogenem aktivované protein kinázové (MAPK; Mitogen-Activated Protein Kinase) dráhy včetně ERK2/1, c-Jun N-terminální kinázy 1 a p38. Výsledek nekanonické signální dráhy TGF β je také závislý na kontextu (Birch et al. 2020).

Signalizace TGF β v glioblastomu má různý regulační účinek dle genetických a epigenetických změn v nádorových buňkách. Na začátku vývoje nádorového onemocnění může fungovat jako tumor supresivní faktor a později se projevuje jako tumor podporující faktor (Birch et al. 2020). TGF β ovlivňuje mnoho procesů při nádorovém onemocnění. Například navozuje imunosupresi, reguluje kmenovost glioblastomových kmenových buněk, indukuje aberantní angiogenezi a usnadňuje růst (nadměrnou proliferací a zvýšeným přežíváním nádorových buněk), invazi nádoru a v neposlední řadě také reguluje expresi genů kódujících proteiny ECM (Birch et al. 2020).



Obrázek 2: Kanonická a nekanonická signální dráha transformujícího růstového faktoru beta (TGFβ). Dimer TGFβ vazbou aktivuje kinázový TGFβ receptor typu II (TGFRII), čímž transfosforylaci aktivuje kinázový TGFβ receptor typu I (TGFRI). U kanonické signální dráhy se za pomoci adaptorového proteinu SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) heterooligomerují přenašeči signálu Smad2/3 proteiny, po jejichž fosforylaci se rekrutuje přídatný Co-Smad4. Smad komplex se translokuje do jádra, kde ovlivňuje genovou expresi. Nekanonická signální dráha nezávisle na přenašečích signálu Smad aktivuje fosforylaci různé signální dráhy, například dráhu mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK), fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K)/Akt a nukleárního faktoru κB (NF-κB). Vytvořeno v BioRender.com

1.3.1. Vliv TGFβ na extracelulární matrix nádoru a jeho mikroprostředí

Jeden z důležitých důsledků signalizace TGFβ v nádorovém mikroprostředí je ovlivnění adheze a migrace nádorových buněk prostřednictvím indukce syntézy proteinů ECM nebo změnou složení adhezivních molekul na povrchu buněk (Caja et al. 2018). TGFβ kontroluje homeostázu proteinů ECM regulací, tedy zvýšením, exprese proteinů ECM. U některých buněčných typů signalizace TGFβ spouští syntézu kolagenu typu I a fibronektinu, a tím podporuje jejich inkorporaci do ECM (Igotzs a Massague 1986). Kolagen typu I a fibronektin může být transkripčně indukován přes Smad3 (přenašeč signálu kanonické dráhy TGFβ) a tato zvýšená exprese může být zvrácena působením tumorsupresoru p53

účinkujícího právě na aktivitu Smad3 (Ghosh et al. 2004; Hasegawa et al. 2009; Kang et al. 2017). Expresi fibronektinu může být zvýšena také vlivem nekanonické signalizace TGF β přes MAPK p38 a ERK1/2 (Niculescu-duvaz et al. 2007). Dále bylo prokázáno, že TGF β stimuluje expresi adhezivních molekul, například integrinových podjednotek α_5 a β_3 . Tato změněná exprese integrinů vede ke zvýšené migraci nádorových buněk. Ta může být inhibována integrin-neutralizující protilátkou nebo echistatinem (inhibitor obsahující RGD (Arg-Gly-Asp) sekvenci), který váže integriny a blokuje jejich signalizaci (Platten et al. 2000; Silginer et al. 2014). Integriny navíc mohou indukovat uvolnění proteinového komplexu (LAP a LTBP) z TGF β , čímž se z latentní formy TGF β stává aktivní forma (Annes et al. 2004).

V rámci remodelace ECM a zvýšení migrace nádoru indukuje TGF β expresi řady ECM degradujících proteáz, včetně MMP, což jsou extracelulární endopeptidázy štěpící různé molekuly ECM včetně proteoglykanů mozkové ECM (Nakano et al. 1995; Dziembowska et al. 2007; Sakai et al. 2011). TGF β indukuje například MMP-2 a MMP-9 zvýšením stability jejich mRNA, což vede ke zvýšené proteinové expresi (Sehgal a Thompson 1999; Wick et al. 2001; Baumann et al. 2009). TGF β navíc zvyšuje aktivitu MMP-2 například prostřednictvím vazby na TGF β indukovaný typ integrinu $\alpha_v\beta_3$. Tyto vazby na povrchové molekuly nebo další proteiny v ECM jsou nezbytný předpoklad pro účinnou aktivaci a maturaci těchto enzymů (Brooks et al. 1996; Baumann et al. 2009). TGF β zároveň může ovlivnit aktivitu MMP snížením exprese tkáňových inhibitorů MMP (Nakano et al. 1995; Wick et al. 2001). Zvýšeně exprimované MMP následně dokáží mimo degradaci klasických molekul ECM aktivovat TGF β z latentní podoby uložené v ECM a dochází tedy k pozitivní zpětné vazbě (Tatti et al. 2008).

Ve výsledku signalizace TGF β vede k nerovnováze proteázových aktivit, což podporuje degradaci původní ECM a zároveň vede ke změně exprese proteinů ECM v nádoru, a tak různými způsoby dotváří nádorové mikroprostředí vhodné pro následnou invazi buněk, a tedy podporuje progresi nádorového onemocnění.

Existuje velké množství literárních dat zkoumajících expresi a účinky TGF β v mozkových nádorech, ale dosud však nejsou zcela známy molekulární mechanismy jeho působení a zapojení do patogeneze glioblastomu (Kaminska a Cyranowski 2020).

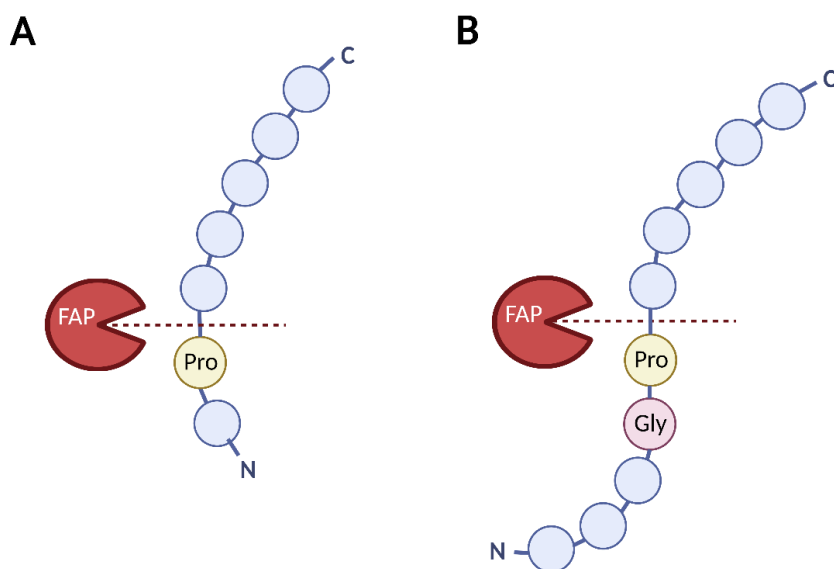
In vitro experimenty s buňkami mikroprostředí glioblastomu dokázaly, že kanonická signální dráha TGF β vede ke zvýšení produkce povrchové proteázy fibroblastového aktivačního proteinu (FAP; Fibroblast Activation Protein), (Krepela et al. 2021). Řadou

autorů byl FAP asociován s horší prognózou pacientů s nádorovými onemocněními včetně pacientů s glioblastomem (Tchou et al. 2013; Wikberg et al. 2013; Patsouras et al. 2015; Ebert et al. 2020).

1.4. Fibroblastový aktivační protein v nádorovém mikroprostředí

Fibroblastový aktivační protein patří mezi povrchově exprimované serinové proteázy funkční skupiny s dipeptidylpeptidázovou-IV aktivitou a/nebo strukturou homologních molekul (tzv. DASH molekuly), (Šedo a Malík 2001). Enzymaticky aktivní FAP je složen ze dvou enzymaticky neaktivních monomerních 97kDa podjednotek (Piñeiro-Sánchez et al. 1997). Aminokyseliny důležité pro enzymatickou aktivitu FAP jsou Ser₆₂₄, Asp₇₀₂ a His₇₃₄, které tvoří katalytickou triádu v aktivním místě enzymu (Niedermeyer et al. 1998).

FAP má dvě různé enzymové aktivity (Obrázek 3). Patří do skupiny exopeptidáz či aminopeptidáz (S9B oligopeptidázové rodiny) díky schopnosti odštěpit dipeptidy obsahující prolin v pozici P1 z N-konce proteinů (Edosada et al. 2006). Také může působit jako endopeptidáza, a tudíž štěpí proteiny uvnitř v místech specifické sekvence aminokyselin. Pro endopeptidázovou aktivitu jsou důležité aminokyseliny prolin v pozici P1 a glycin v pozici P2 ve štěpeném proteinu (Edosada et al. 2006; Jambunathan et al. 2012). Je známo několik biologicky důležitých proteinů štěpitelných FAP, například kolageny typu I a III, natriuretický peptid typu B, neuropeptid Y, YY protein a substance P (Christiansen et al. 2007; Keane et al. 2011).



Obrázek 3: Duální enzymová aktivita fibroblastového aktivačního proteinu (FAP). (A) Exopeptidázová aktivita FAP umožňuje odštěpit dipeptid za prolinovým zbytkem na N konci proteinu. (B) Endopeptidázová aktivita FAP zprostředkovává štěpení za specifickou sekvencí glycinového a prolinového zbytku uvnitř proteinu. Vytvořeno v BioRender.com.

Při fyziologických podmínkách se exprese FAP téměř nevyskytuje v postnatálních tkáních, nicméně jeho exprese byla detekována pankreatickými alfa-buňkami, retikulárními buňkami lymfatických uzlin, mezenchymálními buňkami kostní dřeně a buňkami děložní sliznice v proliferační fázi menstruačního cyklu (Dolznig et al. 2005; Chung et al. 2014; Denton et al. 2014; Busek et al. 2015). Zvýšení exprese FAP je spojováno s remodelací tkáně při různých patologických stavech. Mezi nemaligní patologické stavy se zvýšenou expresí FAP můžeme řadit idiopatickou plicní fibrózu, jaterní cirhózu či revmatoidní artritidu a osteoartritidu, kdy je FAP zapojen do patogeneze onemocnění právě remodelací ECM (Bauer et al. 2006; Milner et al. 2006; Ramachandran et al. 2013; Fan et al. 2016).

Zvýšení exprese FAP je typické pro solidní nádory, u kterých může být FAP exprimován jak na buňkách nádorového mikroprostředí, tak na samotných nádorových buňkách (Busek et al. 2016; Busek et al. 2018). Expresse FAP byla prokázána u kolorektálního karcinomu, karcinomu pankreatu, žaludku, prsu, vaječníku a dalších nádorech (Tchou et al. 2013; Wang et al. 2013; Wikberg et al. 2013; Mhawech-fauceglia et al. 2015; Patsouras et al. 2015; Busek et al. 2018). U většiny epiteliálních nádorů či karcinomů byly detekovány FAP⁺ mezenchymální buňky/fibroblasty, a to například u kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu, vaječníků a glioblastomu (Busek et al. 2016; Busek et al. 2018; Puré a Blomberg 2018).

V buněčné části mikroprostředí glioblastomu byla popsána nemaligní mezenchymální populace buněk exprimujících FAP, která představuje potenciálně důležitou složku podílející se na progresi onemocnění a byla detekována ve většině glioblastomů, především v oblastech kolem cév, což ve zdravé tkáni mozku nebylo nalezeno (Busek et al. 2016; Ebert et al. 2020). Do FAP⁺ populace můžeme řadit buněčné typy jako pericyty, multipotentní mezenchymální stromální buňky, fibrocyty, nádorově asociované fibroblasty a TAM (Tchou et al. 2013; Appaix et al. 2014; Clavreul et al. 2014; Trylcova et al. 2015; Busek et al. 2016). Ačkoli funkce této buněčné populace není zcela jasná, bylo objeveno, že FAP⁺ mezenchymální buňky se obecně podílí na zprostředkování nádorem indukované imunosuprese (Arnold et al. 2014). Bylo dokázáno, že FAP⁺ mezenchymální buňky mají vliv na proliferaci a migraci gliomových buněk pomocí rozpustných mediátorů a tedy podporují typické perivaskulární šíření gliomových buněk (Balaziova et al. 2021). Dále se FAP⁺ mezenchymální buňky zapojují do neoangiogeneze a taktéž se podílí na produkci a remodelaci ECM (Lee et al. 2011; Lo et al. 2015; Balaziova et al. 2021).

Vliv FAP⁺ buněk na remodelaci ECM v mikroprostředí nádorů stále není jasný. Expresse FAP je prokázána u různých typů migrujících buněk zejména na jejich invadopodiích, kde se

exprimují i další funkčně podobné molekuly a spolu vytvářejí proteolytické komplexy (Artym et al. 2002; Ghersi et al. 2002). FAP přispívá k invazivnímu chování nádorových buněk i přes nehydrolytické mechanismy, což bylo dokázáno *in vitro* experimenty s transfekovanými buňkami prsního karcinomu. Aktivní i neaktivní formou FAP transfekované buňky zvýšeně degradovaly ECM a exprimovaly MMP-9 (Huang et al. 2011). Dále bylo v buněčných liniích karcinomu prsu exprimujících aktivní i neaktivní FAP detekováno i zvýšené množství MMP-2 (Lv et al. 2016). Avšak mechanismus působení FAP na zvýšení degradace ECM a exprese MMP není zcela jasně pochopen.

První objevený substrát FAP – kolagen typu I byl detekován za použití denaturovaného proteinu (Park et al. 1999), proto byly podmínky štěpení kontroverzní. Později se zjistilo, že kolagen typu I může být štěpen enzymatickou aktivitou FAP až po enzymatickém štěpení pomocí MMP (Christiansen et al. 2007; Fan et al. 2016). Ve výsledku exprese FAP vede ke zvýšení migrace nádorových buněk (Ghersi et al. 2006). Tyto výsledky dále podporuje experiment *in vitro*, kde vytvořená ECM FAP⁺ fibroblasty stimulovala β 1 integrinovou signalizaci, čímž významně zvýšila motilitu nádorových buněk oproti ECM vytvořené FAP⁻ fibroblasty (Lee et al. 2011).

2. Cíle práce

Předchozí studie prokázaly přítomnost mezenchymálních buněk exprimujících fibroblastový aktivační protein a expresi fibrilárních proteinů ECM v perivaskulární oblasti glioblastomu. Taktéž bylo prokázáno, že je v glioblastomu zvýšeně aktivovaná signální dráha TGF β . Na základě našich dat i dat dalších autorů proponujeme hypotézu, že pod vlivem TGF β dochází u mezenchymálních buněk exprimujících fibroblastový aktivační protein ke zvýšené produkci ECM, což by mohlo přispívat k progresi glioblastomu.

V rámci diplomové práce bylo mými cíli 1) objasnit vliv TGF β na expresi vybraných fibrilárních proteinů ECM buňkami mikroprostředí glioblastomu, především mezenchymálními buňkami exprimujícími fibroblastový aktivační protein a 2) pomocí *in vitro* funkčních studií zjistit vliv ECM produkované mezenchymálními buňkami exprimujícími fibroblastový aktivační protein s a bez stimulace TGF β na migraci gliomových buněk.

3. Materiál a metody

3.1. Laboratorní vybavení

- Autokláv, SterilCave 18BDH, Cominox, Itálie
- Centrifuga s výkyvným rotorem, Hettich Zentrifugen Universal 16R, Německo
- Centrifuga, Hettich Zentrifugen Universal 320R
- CO₂ termostat, Sanyo, Japonsko
- Coulter Z2 Counter se 100 µm kapilárou, Beckman Coulter, Německo
- Epifluorescenční mikroskop Olympus IX8 vybavený kamerou Olympus DP30BW, Japonsko a kamerou Hamamatsu, ORCA-Flash4.0 V3, C13440-20CU, Japonsko
- Konfokální mikroskop Olympus Fluo View 300, Japonsko
- Laminární box Aura Mini, BioAir, Itálie
- Laminární box SafeFAST classic 212, Itálie
- Orbitální třepačka WT17, Biometra, Analytic Jena, Německo
- Orbitální třepačka, PTR 30, Grant-Bio, UK
- Pipetory Integra Biosciences, Švýcarsko
- Pipety Gilson, Francie
- Promývačka ELISA destiček HydroFlex, Tecan, Švýcarsko
- Spektrofotometr Sunrise-basic, Tecan, Rakousko
- Světelný mikroskop, Nikon TMS, Japonsko
- Vortex-Genie2, Scientific Industries, USA

3.2. Spotřební materiál

- Inserty do 24 jamkových desek s 8 µm póry (10769-242), VWR International, USA
- Laboratorní rukavice, Promedica, ČR
- Mikrozkušavky, Eppendorf, Německo
- Pipetovací špičky, Gilson, Francie
- Plastik pro tkáňové kultury, Nunc, USA
- Sterilní filtry Millex GV 0,22 µm, Millipore, Irsko
- Sterilní jehly Sterican, B. Braun Melsungen AG, Německo
- 96 jamkové desky, Anicrin, Itálie
- 96 jamkové EIA/RIA stripové desky, ImmunoChemistry Technologies, USA

3.3. Chemikálie, roztoky

- Akutáza (A6964; Sigma, CZ)
- B27 bez vitamínu A (12587010; ThermoFisher, CZ)
- Coulter izoton II diluent (8448011; Beckman, USA)
- ELISA-kit DuoSet Human Fibronectin (DY1918-05; R&D Systems, UK)
- ELISA-kit DuoSet Human Pro-collagen I alpha 1 (DY6220-05; R&D Systems, UK)
- ELISA-kit DuoSet TGF beta-1 (DY240-05; R&D Systems, UK)
- Epidermální růstový faktor, (AF-100-15; PeproTech, UK)
- Extrakční pufr – 20 mM NH₄OH (09859; Sigma, CZ), 0,5% Triton X-100 v PBS
- Fetální hovězí sérum (FBS; Fetal Bovine Serum), (F7524; Sigma, CZ a 0010; Sciencell, USA)
- Fibroblastový růstový faktor, (AF-100-18B; PeproTech, UK)
- Fibronektin, (F1141-5MG; Sigma, CZ)
- Geltrex (A1413302; ThermoFisher, CZ)
- GlutaMAX (35050-038; ThermoFisher, CZ)
- Hoechst 33258 (bisbenzimid; 861405; Sigma, CZ)
- Kit na stanovení celkového proteinu (DC Protein Assay Kit II; 5000112; Bio-Rad Laboratories, USA)
- Lyzační pufr – 25 μM Pepstatin A, 50 μM E64, 200 μM AEBSF, 10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 10% glycerol v H₂O
- Medium D-MEM (D5796; Sigma, CZ)
- Medium D-MEM F-12 Ham (s 15mM HEPES a NaHCO₃), (D6434; Sigma, CZ)
- Montovací médium Aqua-PolyMount (18606; Polysciences, Německo)
- Pericytární medium (1201; Sciencell, USA)
- Pericytární růstový suplement, (1252; Sciencell, USA)
- Polylysin, (4707; Sigma, CZ)
- Primární a sekundární protilátky (viz Tabulka 1)
- Roztok PBS (Phosphate Buffered Saline) – 137 mM NaCl, 4 mM Na₂HPO₄, 2,68 mM KCl, 1,76 mM KH₂PO₄; pH 7,4
- Sodná sůl kyseliny L-askorbové (A4034; Sigma, CZ)

- Solubilizační pufr – 5 M Guanidin hydrochlorid (G3272; Sigma, CZ), 10 mM dithiothreitol (20710; Serva, Německo), sterilní deionizovaná voda
- TBS s 0,03% Triton X-100
- TGFβ1 inhibitor A7701 (1744; Axon Medchem, Nizozemí)
- Transformující růstový faktor beta 1 (TGFβ1), (100-21C; PeproTech, UK)
- Tris-Pufr (TBS) – 50 mM Tris, 150 mM NaCl
- Trypsin-kyselina ethylen-diamin-tetraoctová (trypsin-EDTA), (SLBZ9299; Sigma, CZ)
- 0,1% azid sodný v PBS
- 0,1% hovězí sérový albumin (BSA; Sigma, CZ) v PBS
- 0,1% Triton X-100 v H₂O
- 0,2% želatina (G7041; Sigma, CZ) v PBS
- 1% glutaraldehyd (G6257; Sigma, CZ) v PBS
- 10% FBS s 1% BSA v TBS
- 4% paraformaldehyd
- 10 000U/ml penicillin a 10 000μg/ml streptomycin (0503; Sciencell, USA)
- 1M ethanolamin (411000; Sigma, CZ) v H₂O

Deionizovaná voda, roztok PBS a další nesterilní materiál používaný při práci s buněčnými kulturami byl sterilizován pomocí autoklávování.

3.4. Buněčné kultury

3.4.1. Gliomové linie

Od společnosti ATCC (Rockville, USA), přesněji Clontech (Clontech-Takara Bio Europe, Francie) byly opatřeny lidské gliomové buněčné kultury U87MG a U251MG. Buňky byly kultivovány za standardních podmínek dle protokolů a doporučení dodavatele, a to v kultivačních nádobách s kultivačním médiem D-MEM (Sigma) s přídavkem 10 % fetálního hovězího séra (Sigma) v CO₂ termostatu při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂ s 95% vlhkostí vzduchu.

3.4.2. Primární FAP⁺ mezenchymální kultury

Z bioptického materiálu glioblastomu byly vyizolovány primární FAP⁺ mezenchymální kultury (pFAP; Primary mesenchymal cells expressing Fibroblast Activating Protein) metodou magneticky aktivovaného buněčného třídění (MACS; Magnetic-Activated

Cell Sorting; viz kapitola 3.5.4) s využitím protilátky proti antigenu FAP (F11-24, eBioscience). Buňky byly kultivovány v kultivačních nádobách potažených fibronektinem ($2 \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-2}$) s kultivačním pericytárním médiem (Sciencell) s přidavkem 2 % fetálního hovězího séra (Sciencell), 1 % pericytárního růstového suplementu (Sciencell), 1 % penicilinu se streptomycinem (Sciencell) v CO_2 termostatu při 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO_2 s 95% vlhkostí vzduchu (Balaziova et al. 2021).

3.4.3. Lidské mozkové vaskulární pericyty

Lidské mozkové vaskulární pericyty (HBVP; Human Brain Vascular Pericytes; Sciencell, USA) byly standardně kultivovány dle doporučení a protokolů dodavatele. Buňky byly kultivovány v kultivačních nádobách potažených polylysinem ($2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) s kultivačním pericytárním médiem (Sciencell) s přidavkem 2 % fetálního hovězího séra (Sciencell), 1 % pericytárního růstového suplementu (Sciencell), 1 % penicilinu se streptomycinem (Sciencell) v CO_2 termostatu při 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO_2 s 95% vlhkostí vzduchu (Balaziova et al. 2021).

3.4.4. Primární gliomové kmenové kultury

Z biotického materiálu glioblastomu byly vyizolovány primární gliomové kmenové kultury (GSC; Glioma Stem Cells) metodou selekčního média, čímž bylo kompletní kultivační médium pro primární gliomové kmenové buňky (viz dále) a následně pomocí selekce buněk formující sféry po kultivaci na neadherentním povrchu. Gliomové kmenové buňky mohou být dále kultivovány na neadherentním plastiku ve formě sfér nebo na adherentním plastiku potaženém Geltrexem (ThermoFisher). Pro experimenty byly buňky kultivovány v kultivačních nádobách potažených Geltrexem s kultivačním médiem DMEM F-12 (Sigma) s přidavkem 1 % penicilinu/streptomycinu (Sigma), 1 % GlutaMAX (ThermoFisher), 2 % B27 (ThermoFisher), 0,02 % epidermálního růstového faktoru (PeproTech) a 0,02 % fibroblastového růstového faktoru (PeproTech) v CO_2 termostatu při 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO_2 s 95% vlhkostí vzduchu (Sana et al. 2018).

3.5. Metody

3.5.1. Rozmrazování buněk

Ve vodní lázni o teplotě 37°C byly buňky opatrně rozmrazeny. Když byl pozorován poslední kousek ledu, kryozkumavka byla otřena 70% ethanolem a vložena do sterilního laminárního boxu. Rozmražené buňky byly přeneseny do kompletního kultivačního média dle

konkrétního typu buněk (viz kapitola 3.4) a centrifugovány (4 °C, 499 g, 5 minut). Poté byl supernatant odsán a pelet byl resuspendován v příslušném kultivačním médiu. Buňky byly kultivovány v CO₂ termostatu. Po 24 hodinách bylo kultivační médium vyměněno za čerstvé kultivační médium.

3.5.2. Pasážování

Při trypsinizaci bylo nejdříve odsáto médium z kultivační nádoby. Buňky byly opláchnuty roztokem PBS (0,2 ml/cm²), po odsátí PBS byl přidán roztok trypsin-EDTA (0,04 ml/cm²). Následně byl kultivační plastik s přídavkem trypsin-EDTA uložen do CO₂ termostatu, kde byl ponechán po dobu 1 až 3 minut za vizuální kontroly uvolnění buněk. Přidáním čerstvého kompletního média se sérem v poměru 1:1 k trypsinu-EDTA bylo inhibováno jeho působení. Pomocí pipetoru byly buňky šetrně resuspendovány z agregátů. Buňky byly přeneseny v potřebném množství do předpřipraveného kultivačního plastiku s kompletním médiem dle typu kultivovaných buněk (viz kapitola 3.4).

Při pasážování gliomových kmenových buněk bylo využito roztoku akutázy. Nejdříve bylo odsáto kultivační médium z plastiku. Buňky byly ošetřeny roztokem akutázy (0,02 ml/cm²) a uloženy do CO₂ termostatu, kde byly ponechány po dobu 3 až 5 minut dle vizuální kontroly buněk. Přidáním malého objemu PBS za pomoci nasávání a vytlačování pipetorem byly buňky šetrně resuspendovány na monocelulární suspenzi. Celý objem resuspendovaných buněk byl přenesen do zkumavky, která byla centrifugována (4 °C, 499 g, 8 minut). Následně byl supernatant odsán. Pelet byl resuspendován v kompletním médiu (viz kapitola 3.4.4). Potřebné množství buněk bylo přeneseno do předpřipraveného kultivačního plastiku s kompletním médiem.

3.5.3. Počítání buněk

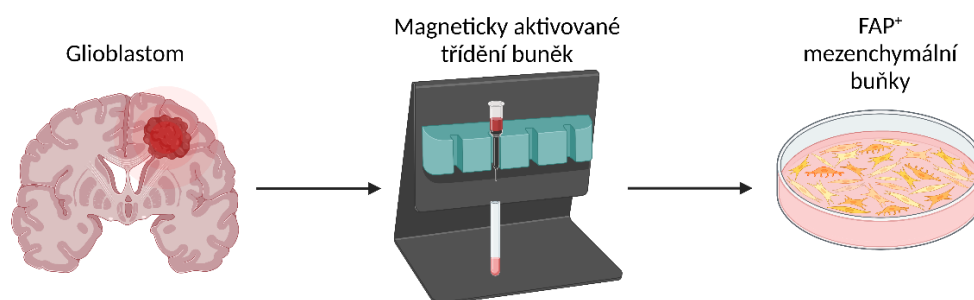
V plastové kyvetě byla promíchána odebraná buněčná suspenze a naředěna do poměru 1:200 s Coulter Izoton II Diluent (Fisher Scientific). Počet buněk byl určen za pomoci přístroje Coulter Z2 Counter s kapilárou s 100µm aperturou.

3.5.4. Magneticky aktivované třídění buněk

MACS, přesněji systém magnetických kuliček Dynabeads Sheep anti-Mouse IgG (Invitrogen), byl využit pro izolaci FAP⁺ mezenchymálních buněk z biotického materiálu glioblastomu, který byl mechanicky a enzymaticky (pomocí akutázy) disociován na monocelulární suspenzi (Obrázek 4). Izolace FAP⁺ mezenchymálních buněk byla specifická

díky protilátce proti antigenu FAP (F11-24, eBioscience). Podle protokolu a doporučení společnosti byla provedena izolace.

Monocelulární suspenze byla centrifugována (4 °C, 348 g, 4 minuty). Pelet byl resuspendován v 0,1% BSA v PBS na požadovanou koncentraci $10 \cdot 10^6$ buněk/ml. Primární myší protilátka anti-FAP byla smíchána s připravenou buněčnou suspenzí a za stálého míchání pomocí orbitální míchačky inkubována po dobu 15 minut při 4 °C. Současně dané množství Dynabeads (2,5 μ l Dynabeads/1 milion buněk) bylo dvakrát propláchnuto pomocí 1 ml 0,1% BSA v PBS. Následně byla buněčná suspenze dvakrát propláchnuta 0,1% BSA v PBS, centrifugována (4 °C, 244 g, 8 minut) a v 0,1% BSA v PBS byl resuspendován pelet na výše uvedenou koncentraci buněk. Buněčná suspenze byla smísená s připravenými Dynabeads. Inkubace směsi probíhala při 4 °C na orbitální třepačce po dobu 20 minut. Dále byl objem 0,1% BSA v PBS zdvojnásoben, respektive buněčná suspenze byla dvakrát zředěna. Za využití magnetického stojanu byly zachyceny buňky s Dynabeads a zbytková, tedy FAP negativní frakce byla odstraněna odsátím. Buňky zachycené magnetem byly čtyřikrát propláchnuty 1 ml 0,1% BSA v PBS, nasazeny do kultivačních nádob a kultivovány za výše uvedených podmínek (viz kapitola 3.4.2).



Obrázek 4: Zjednodušené schéma magneticky aktivovaného třídění buněk. Glioblastom byl disociován na suspenzi, ze které byly izolovány buňky exprimující fibroblastový aktivační protein (FAP) pomocí specifické protilátky proti antigenu FAP spojené s magnetickými kuličkami. Vytvořeno v Biorender.com.

3.5.5. Imunohistochemie a imunocytochemie

Na tkáňových řezech nebo na buňkami porostlých mikroskopických krycích sklech byla provedena imunochemická detekce (Balaziová et al. 2021). Nejdřív se vzorky 10 minut fixovaly 4% paraformaldehydem při pokojové teplotě (RT; Room Temperature), resp. 5 minut aceton:methanolem (1:1) při -10 °C, poté byl proveden dvakrát oplach PBS po dobu 5 minut při RT, resp. při fixaci acetonem se nechaly vyschnout. Následně byly vzorky inkubovány 5 minut s permeabilizačním roztokem (0,1% Triton X-100) a znovu byl dvakrát proveden oplach PBS, resp. u fixace acetonem nebyl prováděn permeabilizační krok. Po dobu 1 hodiny

byly vzorky blokovány 10% FBS s 1% BSA (Sigma) v TBS, následně byla přidána primární protilátka rozředěná v roztoku 1% BSA v TBS. Ředění a inkubační doba byly odlišné dle typu protilátky (Tabulka 1). Po uplynutí doby inkubace s primární protilátkou byly vzorky dvakrát opláchnuty v TBS s 0,03% Tritonem X-100 po dobu 5 min při RT. Následně byla přidána sekundární protilátka (Tabulka 1) rozředěná v roztoku 1% BSA v TBS s přídavkem Hoechst v koncentraci 1 μ M (bisbenzimid, Sigma) pro vizualizaci buněčných jader. Se sekundární protilátkou a přídavkem Hoechst byly vzorky inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě. Následně byl třikrát proveden oplach TBS a čtvrtý oplach deionizovanou vodou. Vzorky byly volně vysušeny a zamontovány (Polyscience). Fluorescenční mikroskop (Olympus IX70 s kamerou DP70BW a kamerou Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3) byl využit pro pozorování a fotodokumentaci barvených vzorků.

Tabulka 1: Seznam protilátek využitých při imunochemických analýzách. COLI – kolagen typu I (Collagen Type I), FAP – fibroblastový aktivační protein (Fibroblast Activation Protein), FN – fibronektin (Fibronectin), GFAP – gliální fibrilární acidický protein (Glial Fibrillary Acidic Protein), PDGFR β – receptor růstového faktoru krevních destiček beta (Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta), SMA – alfa-aktin hladkého svalů (Alpha-Smooth Muscle Actin), TE-7 – mezenchymální marker, TGF β – transformující růstový faktor beta (Transforming Growth Factor Beta), VWF – Von Willebrandův faktor (Von Willebrand Factor).

Protilátka (druh, klon/kat. č., dodavatel)	Ředění	Inkubační čas	Teplota
Anti COLI (králík, Ab34710, Abcam)	1:800	1 hodina	RT
Anti COLI (myš, C2456, Sigma-Aldrich)	1:2000	1 hodina	RT
Anti FAP (krysa, D8, Vitatex)	1:200	Přes noc	4 °C
Anti FAP (myš, IgG1 kappa izolovaná z F19 myšního hybridomu (ATCC CRL-2733))	56 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Přes noc	4 °C
Anti FN (králík, Ab23750, Abcam)	1:1200	1 hodina	RT
Anti GFAP (myš, 11255M001, Exbio)	1:200	Přes noc	4 °C
Anti PDGFR β (myš, PR7212, Bio-Rad)	1:50	Přes noc	4 °C
Anti SMA (myš, 1A4, Abcam)	1:200	Přes noc	4 °C
Anti TE-7 (myš, CBL271, Millipore)	1:200	1 hodina	RT
Anti TGF β (králík, Ab92486, Abcam)	1:400	Přes noc	4 °C
Anti VWF (králík, A0083, Dako)	1:100	1 hodina	RT
Alexa Fluor 488 koza anti králík IgG (králík, A11034, Invitrogen)	1:500	1 hodina	RT
Alexa Fluor 488 koza anti krysa IgG (koza, A11006, Invitrogen)	1:500	1 hodina	RT
Alexa Fluor 488 osel anti myš IgG (osel, A21202, Invitrogen)	1:500	1 hodina	RT
Alexa Fluor 546 koza anti králík IgG (králík, A11010, Invitrogen)	1:500	1 hodina	RT
Alexa Fluor 546 osel anti myš IgG (osel, A10036, Invitrogen)	1:500	1 hodina	RT

3.5.6. Příprava buněčných lysátů

Všechny popsané procesy byly prováděny na ledu. Buňky v kultivačních nádobách byly dvakrát opláchnuty ledovým PBS, poté bylo přidáno dané množství (80 μl na jednu jamku 6 jamkové desky) lyzačního pufru a ponecháno po dobu cca 2 minut v kultivační nádobě. Plastovou škrabkou byly buňky mechanicky staženy z povrchu kultivační nádoby. Následně byly přeneseny do mikrozkušavky, dvacetkrát promíchány 200 μl špičkou a vortexovány po dobu 10 sekund. Při 4 °C po dobu 20 minut byly vzorky ponechány na orbitální třepačce. Vzorky v mikrozkušavkách byly centrifugovány (4 °C, 21293 g,

30 minut). Odebráním supernatantu byl vytvořen alikvot, který byl dál využit k imunodetekční analýze ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) a k měření celkové koncentrace proteinu.

3.5.7. ELISA

Extracelulární proteiny kolagen typu I, fibronectin a TGF β 1 byly testovány v buněčných a tkáňových lyzátech pomocí Human Pro-collagen I alpha 1 DuoSet, Human Fibronectin DuoSet a DuoSet TGF beta-1 (DY6220-05, DY1918-05 a DY240-05, R&D Systems, Abingdon, UK) dle protokolů a doporučení společnosti. Detekční metoda ELISA byla provedena podle protokolu (Matrasova et al. 2017). Pro normalizaci výsledků metody ELISA byla použita normalizace na koncentraci celkového proteinu v lyzátu.

3.5.8. Měření celkové koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu v lyzátech byla stanovena Lowryho metodou (Lowry et al. 1951) s použitím DC kitu (detergent compatible; kompatibilního s detergenty; Bio-Rad Laboratories) na stanovení celkového proteinu.

3.5.9. *In vitro* experimenty s přidavkem TGF β 1

3.5.9.1. Stimulace buněčných kultur TGF β 1

Buněčné kultury byly stimulovány TGF β 1 po dobu 5 dní. Na základě literárních dat a předběžných výsledků byly zvoleny tři kultivační podmínky, které vycházely z předchozí práce (Krepela et al. 2021), a to kompletní kultivační médium s přidavkem askorbátu (Sigma) v koncentraci 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ve dvou dalších podmínkách při stimulaci buněčných kultur byl navíc přidán TGF β 1 (PeproTech) v koncentraci 2 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při kultivaci bylo využito kompletní kultivační médium specifické pro danou buněčnou kulturu. Buňky byly nasazeny ve čtyřech biologických replikátech pro tři výše uvedené kultivační podmínky do 6 jamkových desek a v monopletu na krycí sklo (24 x 32 mm) v malé petrici. Počet nasazených buněk pro experiment se lišil dle typu buněk (Tabulka 2). Následující den byly kultivační nádoby se skly zality čerstvým médiem s výše uvedenými přísadami. Třetí den kultivace bylo kultivační médium vyměněno za čerstvé s příslušnými přísadami. Šestý den byla kultivace ukončena fixací skel pro imunocytochemii a přípravou buněčného lyzátu z 6 jamkových desek.

Tabulka 2: Seznam buněčných kultur použitých při experimentu určující vliv TGFβ1 na tvorbu proteinů extracelulární matrix a počty buněk nasazených do kultivačních nádob. GSC – primární gliomové kmenové buňky; HBVP – lidské mozkové vaskulární pericyty; pFAP – primární FAP⁺ mezenchymální buňky; U87, U251 – gliomové linie.

Typ buněk	Počet buněk na 1 jamku v 6 jamkové desce	Počet buněk na krycí sklo
pFAP kultury	200 tisíc	174 tisíc
HBVP	200 tisíc	174 tisíc
U87	80 tisíc	69 tisíc
U251	80 tisíc	30 tisíc
GSC	200 tisíc	174 tisíc

3.5.9.2. Příprava 3D extracelulárních matric pod vlivem TGFβ1

Pro přípravu 3D extracelulárních matric byl využit modifikovaný protokol od Cukierman (2002). Nejprve byl připraven potah na kultivačních nádobách, a to inkubací 0,2% želatiny (Sigma) v PBS (0,23 ml·cm⁻²) po dobu 1 hodiny při 37 °C, následovanou oplachem PBS (0,23 ml·cm⁻²) a inkubací 1% glutaraldehydu (Sigma) v PBS (0,23 ml·cm⁻²) po dobu 30 minut při RT. Tříkrát byl proveden oplach PBS (0,23 ml·cm⁻²), každý po dobu 5 minut. Další inkubace s 1M ethanolaminem (0,23 ml·cm⁻²) byla provedena po dobu 30 minut při RT. Znovu byl třikrát proveden oplach roztokem PBS (0,23 ml·cm⁻²) a nakonec byl PBS nahrazen specifickým kompletním kultivačním médiem dle typu buněk (viz kapitola 3.4).

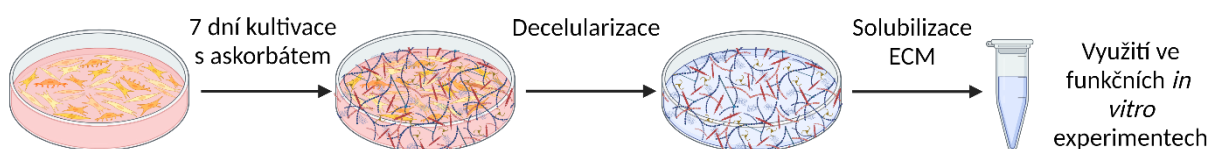
Buňky byly sebrány, spočítány a byla připravena suspenze o koncentraci $5 \cdot 10^5$ buněk/ml. Dané množství buněčné suspenze (57 tisíc buněk/cm²) bylo přeneseno do kultivačních nádob a kultivováno v CO₂ termostatu přes noc. Pro určení vlivu TGFβ1 na tvorbu 3D extracelulárních matric byly stanoveny tři kultivační podmínky. Pro přípravu kontrolní 3D extracelulární matrice byly buňky kultivovány v kompletním kultivačním médiu s přidavkem askorbátu (Sigma) v koncentraci 50 μg·ml⁻¹. Při stimulaci byl použit navíc TGFβ1 (PeproTech) v koncentraci 2 ng·ml⁻¹ a pro určení vlivu kanonické signální dráhy TGFβ1 byl navíc do média přidán TGFβ1 inhibitor A7701 (Axon Medchem) v koncentraci 1 μmol·l⁻¹. Následující den bylo médium vyměněno za čerstvé kompletní kultivační médium dle kultivační podmínky. Výše uvedená výměna kultivačního média s přidavky byla provedena také čtvrtý a šestý den kultivace.

Celkově byly buňky kultivovány 7 dní pro vytvoření matrice. Osmý den kultivace byla provedena decelularizace 3D extracelulární matrice. Dvakrát byl proveden opatrný oplach PBS (0,23 ml·cm⁻²). Následně byl po kapkách přidán extrakční pufr (0,12 ml·cm⁻²) předeřhřátý na 37 °C, jehož decelularizující efekt byl pozorován mikroskopicky po dobu 5 až 10 minut.

K extrakčnímu pufru byl opatrně přidán PBS ($0,46 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2}$). Následně byly provedeny dva oplachy PBS ($0,29 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2}$), a poté byl přidán PBS s přísadkou antibiotik $1\,000\,000\text{U/ml}$ penicilin/ $1\,000\,000\mu\text{g/ml}$ streptomycin ($0,29 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2}$). Takto ošetřené kultivační nádoby byly uskladněny při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 měsíců.

3.5.10. Solubilizace 3D extracelulárních matic

Pro solubilizaci 3D extracelulárních matic byl využit protokol od Cukierman (2002) upravený mými kolegy (Obrázek 5). Kultivační nádoby byly přeneseny na led a dále bylo pokračováno za sterilních podmínek. Opatrně byl odsán roztok PBS a bylo přidáno dané množství ($34,1 \mu\text{l} \cdot \text{cm}^{-2}$) solubilizačního pufru a inkubováno 5 minut v kultivační nádobě. Plastovou škrabkou byly decelularizované matrice mechanicky seškrábnuty z povrchu kultivační nádoby. Byly přeneseny do mikrozkušavky a znovu bylo přidáno další množství ($22,7 \mu\text{l} \cdot \text{cm}^{-2}$) solubilizačního pufru do kultivační nádoby. Povrch kultivační nádoby byl znovu mechanicky seškrábnut a přenesen do mikrozkušavky. Následně byly vzorky ponechány na orbitální třepačce po dobu 1 hodiny při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky v mikrozkušavkách byly centrifugovány ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12000 g , 15 minut). Odebráním supernatantu byl vytvořen alikvot, který byl dále skladován při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně (do deseti dnů od solubilizace) využit k funkčním studiím *in vitro*.



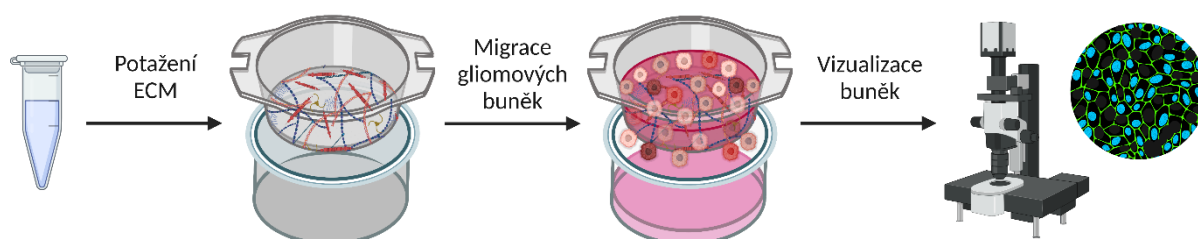
Obrázek 5: Zjednodušené schéma přípravy extracelulární matrice (ECM). Buňky byly kultivovány s askorbátem po dobu 7 dní pro vytvoření 3D extracelulární matrice. Tyto buňky byly následně decelularizovány. Vytvořené 3D extracelulární matrice byly solubilizovány, a poté využity ve funkčních experimentech *in vitro*. Vytvořeno v Biorender.com.

3.5.11. Funkční *in vitro* experimenty se solubilizovanými extracelulárními maticemi

3.5.11.1. Haptotaxe

Pro určení funkčního vlivu solubilizovaných extracelulárních matic na migraci gliomových buněk byly použity inzerty (viz kapitola 3.2) potažené danými extracelulárními maticemi (Obrázek 6). Spodní strany inzerť byly potaženy solubilizovanou maticí zředěnou 1:12,5 s 5M roztokem guanidin-HCl. Inzerty byly inkubovány v $60 \mu\text{l}$ kapce roztoku solubilizované matrice při RT po dobu 1 hodiny. Zbytek roztoku z inzertu byl odsán

a následně byl inzert třikrát opatrně opláchnut v PBS. Potažené inzerty byly vloženy do sterilní desky s 600 μl bezsérového kultivačního média a do každého z nich bylo nasazeno 60 tisíc buněk v 200 μl bezsérového kultivačního média. Buňky v potažených inzertech byly inkubovány po dobu 24 hodin v CO_2 termostatu. Poté byly odstraněny nemigrující buňky na vnitřní straně inzertu pomocí vatové štětičky. Buňky, které skrze inzert migrovaly, byly na inzertu fixovány, a to ve 4% formaldehydu po dobu 10 minut při RT. Dál byly buňky barveny v roztoku hoechst 33258 (v koncentraci 0,5 μM) po dobu 15 minut, následovala dvě opláchnutí deionizovanou vodou. Pro vyhodnocení počtu migrujících buněk bylo snímáno pět zorných polí (vždy čtyři zorné pole do kříže a jedno uprostřed) každého inzertu pomocí epifluorescenčního mikroskopu (Olympus IX70).



Obrazek 6: Zjednodušené schéma haptotaktického experimentu se solubilizovanými extracelulárními matricemi (ECM). Spodní strany inzertů byly potaženy solubilizovanou ECM. Do inzertu byly nasazeny gliomové buňky, které migrovaly po dobu 24 hodin. Migrující gliomové buňky byly následně vizualizovány pomocí obarvených jader roztokem hoechst. Vytvořeno v BioRender.com.

3.5.12. Bioinformatická analýza TCGA dat

Pro bioinformatickou analýzu byly použity expresní data The Cancer Genome Atlas (TCGA) z portálu GlioVis (GlioVis, data portál pro vizualizaci a analýzu expresních datasetů mozkových nádorů; <http://gliovis.bioinfo.cnio.es/>; Bowman et al. 2017) datasety platformy HG-U133A, Agilent-4502A a RNA-Seq (Bowman et al. 2017). Expresní data byla uložena dne 7.12.2021 z GlioVis do textového souboru, který byl převeden do excelové tabulky. Dle GlioVis korelace s mRNA *TGFBI* byly vybrány geny kódující proteiny ECM pomocí databáze pro anotaci, vizualizaci a integrované vyhledávání (DAVID; The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), (Sherman et al. 2022). Následně byl selektován soubor glioblastomů. Byly vybrány primární nově diagnostikované (respektive byly vyřazeny rekurentní) glioblastomy dospělých jedinců s nemutovaným genem pro enzym isocitrát dehydrogenázu, což představuje od roku 2021 novou podmínku pro klasifikaci glioblastomu (Louis et al. 2021). Takto připravená data byla dále analyzována a zobrazena pomocí software Statistica 14 (Statsoft, USA). Korelace byla stanovena pomocí Spearmanova neparametrického korelačního koeficientu.

3.5.13. Statistická analýza a zpracování dat

Ke statistické analýze a pro grafické znázornění dat byl použit software Statistica 14 (Statsoft, USA) a GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, USA), v nichž pro určení statistické významnosti rozdílů mezi skupinami byl zvolen Kruskal-Wallisův test, Mann-Whitney U test nebo ANOVA (Analysis of Variance). Normalita dat byla testována pomocí Shapirova-Wilksova testu. Hladina významnosti (p hodnota) je označena * pro $p < 0,05$ a *** pro $p < 0,01$. Pro obrazovou analýzu pořízené fotodokumentace byl použit software ImageJ (Národní institut zdraví, USA).

4. Výsledky

4.1. Asociace mezi TGFβ1, FAP a ECM v mikroprostředí glioblastomu

4.1.1. Exprese *TGFBI* a *FAP* pozitivně koreluje s proteiny ECM

K určení možného vztahu mezi TGFβ1 a proteiny extracelulární matrix v glioblastomu byl využit The Cancer Genome Atlas (TCGA). Ze tří dostupných mRNA expresních datasetů (HG-U133A, Agilent-4502A a RNA-Seq) byl pro níže zobrazenou analýzu vybrán dataset s největším počtem vzorků (HG-U133A). Analýza byla provedena pomocí Spearmanova neparametrického korelačního koeficientu na datech nově diagnostikovaných glioblastomech ($n = 357$).

Bioinformatická analýza prokázala pozitivní korelaci mezi expresí *TGFBI* a expresí řady genů kódujících proteiny ECM na hladině významnosti pod 0,0001. Uvedené výsledky byly podpořeny analýzou dalších dvou dostupných datasetů z TCGA (Agilent-4502A a RNA-Seq), které na úrovni mRNA potvrdily pozitivní korelaci mezi TGFβ1 a vybranými fibrilárními proteiny ECM (*data neuvedena*). V Tabulce 3 jsou uvedeny geny, jejichž exprese nejsilněji koreluje s expresí *TGFBI* dle Spearmanova neparametrického korelačního koeficientu R ($R > 0,3$; alespoň středně silná korelace).

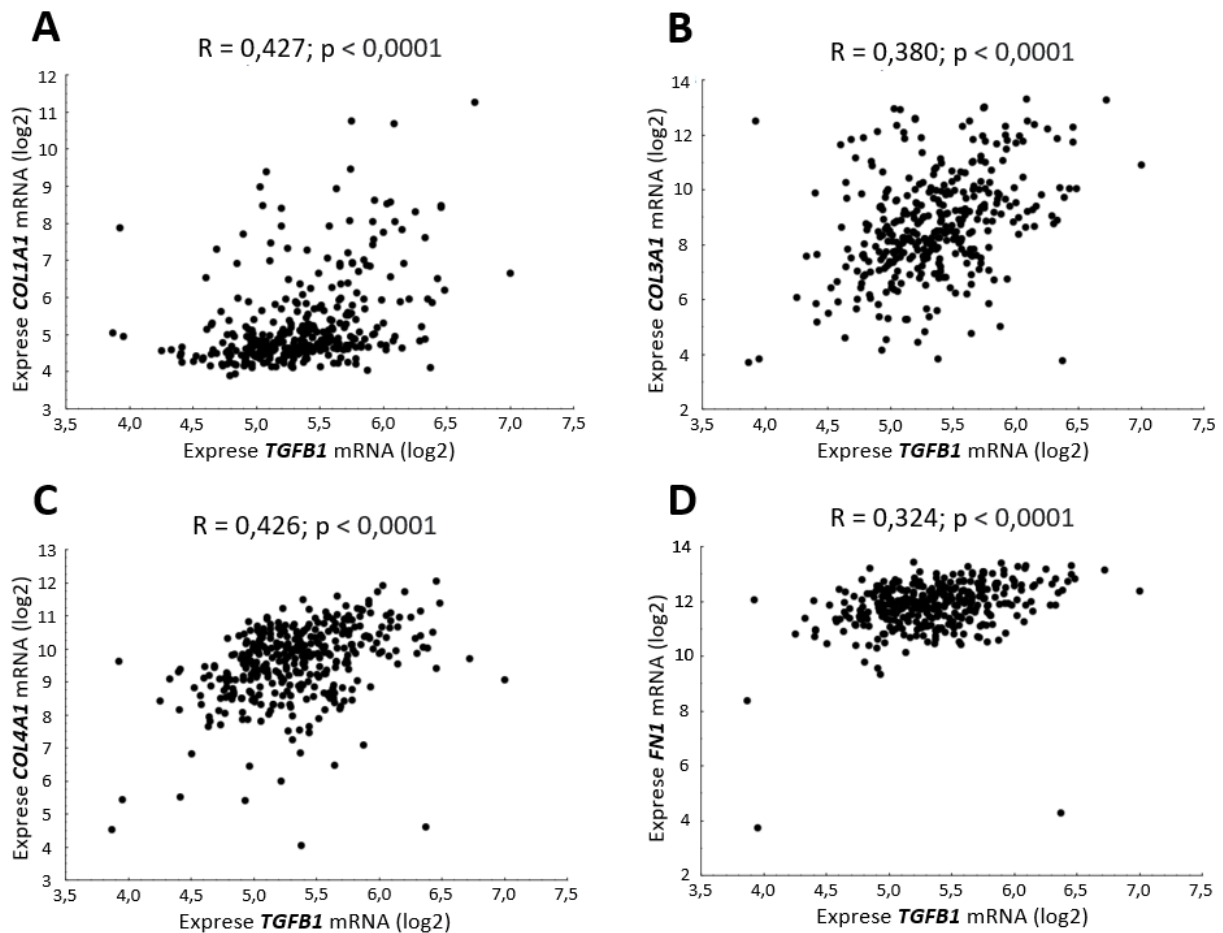
Tabulka 3: Pozitivní korelace mezi expresí mRNA transformujícího růstového faktoru beta 1 (*TGFBI*) a expresí proteinů extracelulární matrix v glioblastomu. Korelační analýza byla provedena na expresních datech The Cancer Genome Atlas (dataset HG-U133A, nově diagnostikované primární glioblastomy, $n = 357$) pomocí Spearmanova neparametrického korelačního koeficientu (R). V tabulce jsou uvedeny geny, pro které je $R > 0,3$. *ANXA2* (Annexin A2), *BGN* (Biglycan), *COL1A1* (Collagen Type I Alpha 1 Chain), *COL1A2* (Collagen Type I Alpha 2 Chain), *COL3A1* (Collagen Type III Alpha 1 Chain), *COL4A1* (Collagen Type IV Alpha 1 Chain), *COL4A2* (Collagen Type VI Alpha 2 Chain), *COL5A1* (Collagen Type V Alpha 1 Chain), *COL5A2* (Collagen Type V Alpha 1 Chain), *COL6A1* (Collagen Type VI Alpha 1 Chain), *COL6A2* (Collagen Type VI Alpha 2 Chain), *COL6A3* (Collagen Type VI Alpha 3 Chain), *COL8A2* (Collagen Type VIII Alpha 2 Chain), *COL18A1* (Collagen Type XVIII Alpha 1 Chain), *ECM1* (Extracellular Matrix Protein 1), *EFEMP1* (Epidermal Growth Factor Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 1), *EMILIN1* (Elastin Microfibril Interfacer 1), *FBLN5* (Fibulin 5), *FNI* (Fibronectin 1), *HSPG2* (Heparan Sulfate Proteoglycan 2), *LAMB1* (Laminin Subunit Beta 1), *LAMC1* (Laminin Subunit Gamma 1), *LGALS1* (Galectin 1), *LGALS3BP* (Galectin 3 Binding Protein), *LTBP2* (Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 2), *MMRN2* (Multimerin 2), *SPOCK2* (Testican-2), *TGFBI* (Transforming Growth Factor Beta Induced), *VWAI* (Von Willebrand Factor A Domain Containing 1).

Pořadí	Gen	Spearman R	p-hodnota	Pořadí	Gen	Spearman R	p-hodnota
1	<i>SPOCK2</i>	0,4453	<0,0001	16	<i>LGALS1</i>	0,3818	<0,0001
2	<i>COL6A1</i>	0,4440	<0,0001	17	<i>COL3A1</i>	0,3796	<0,0001
3	<i>ECM1</i>	0,4408	<0,0001	18	<i>LTBP2</i>	0,3760	<0,0001
4	<i>COL6A2</i>	0,4325	<0,0001	19	<i>COL8A2</i>	0,3671	<0,0001
5	<i>VWAI</i>	0,4320	<0,0001	20	<i>FBLN5</i>	0,3648	<0,0001
6	<i>COL1A1</i>	0,4266	<0,0001	21	<i>COL5A1</i>	0,3647	<0,0001
7	<i>COL4A1</i>	0,4255	<0,0001	22	<i>COL5A2</i>	0,3594	<0,0001
8	<i>EMILIN1</i>	0,4236	<0,0001	23	<i>MMRN2</i>	0,3583	<0,0001
9	<i>COL18A1</i>	0,4170	<0,0001	24	<i>TGFBI</i>	0,3575	<0,0001
10	<i>HSPG2</i>	0,4152	<0,0001	25	<i>BGN</i>	0,3537	<0,0001
11	<i>COL4A2</i>	0,4068	<0,0001	26	<i>ANXA2</i>	0,3329	<0,0001
12	<i>LAMB1</i>	0,3999	<0,0001	27	<i>FNI</i>	0,3237	<0,0001
13	<i>LGALS3BP</i>	0,3886	<0,0001	28	<i>EFEMP1</i>	0,3211	<0,0001
14	<i>COL1A2</i>	0,3872	<0,0001	29	<i>COL6A3</i>	0,3024	<0,0001
15	<i>LAMC1</i>	0,3864	<0,0001				

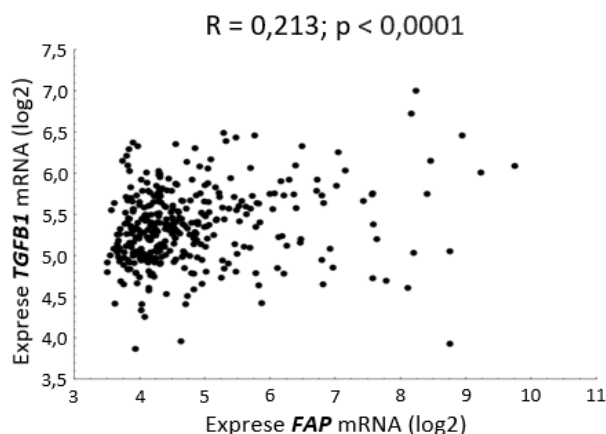
Na úrovni mRNA exprese *TGFBI* pozitivně korelovala s expresí fibrilárních proteinů ECM, například kolagenem typu I, kolagenem typu III, kolagenem typu IV a fibronektinem (Tabulka 3 a Obrázek 7), které hrají roli při progresi glioblastomu (Pointer et al. 2016; Lin et al. 2020).

Bioinformatickou analýzou byla dále prokázána statisticky významná pozitivní korelace mezi mRNA *TGFBI* a mRNA *FAP*, který je charakteristicky exprimovaný na nádorově asociovaných mezenchymálních buňkách (Obrázek 8). Z výsledků analýzy dále vyplývá, že exprese *FAP* statisticky významně pozitivně korelovala s expresí kolagenu typu I ($R = 0,524$; $p < 0,0001$), kolagenu typu III ($R = 0,532$; $p < 0,0001$), kolagenu typu IV ($R = 0,135$; $p < 0,0001$) a fibronektinu ($R = 0,412$; $p < 0,0001$). S výjimkou kolagenu typu IV byly prokázány středně silné korelace (Obrázek 9). Tyto výsledky naznačují souvislost mezi expresí $TGF\beta 1$, *FAP* a expresí vybraných proteinů ECM. V další práci jsme se zaměřili na

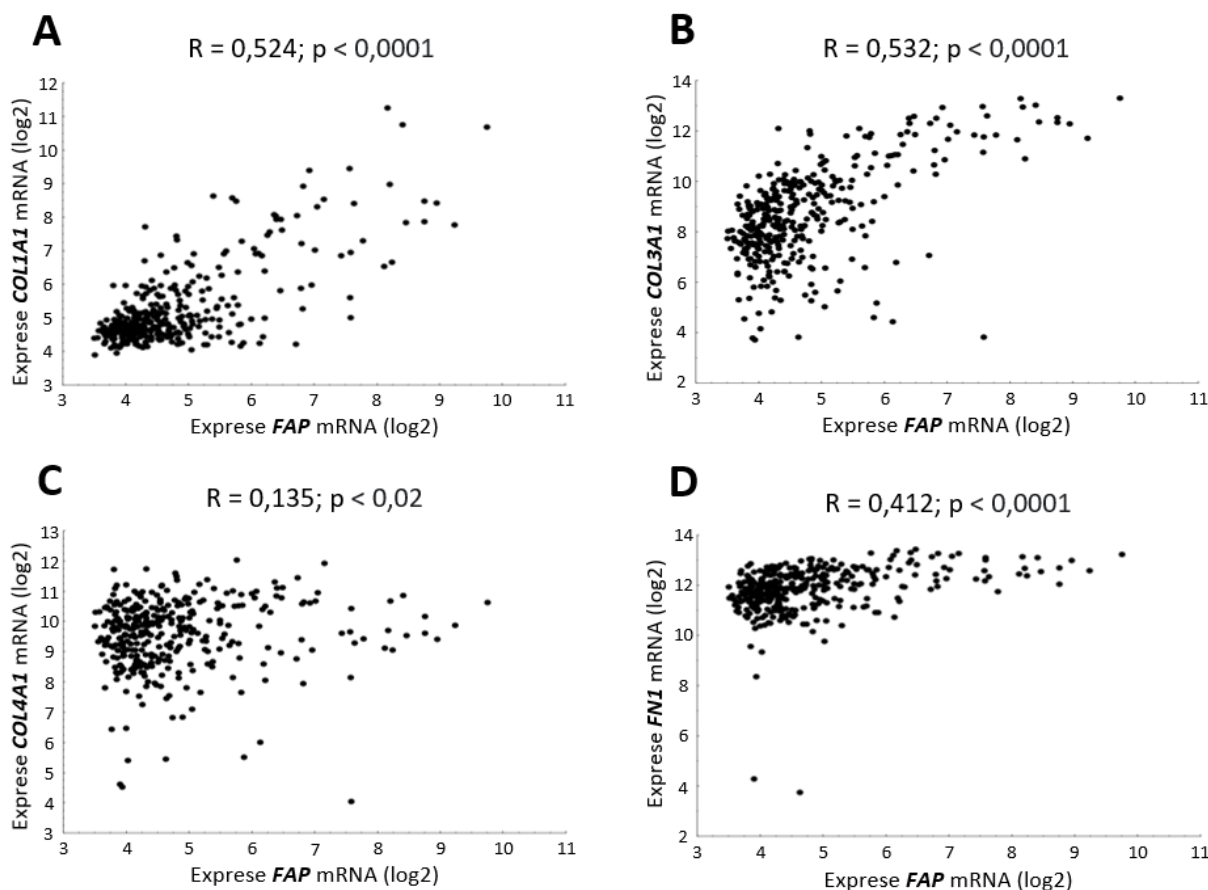
fibrilární proteiny ECM kolagen typu I a fibronektin, protože existuje řada literárních dat o jejich možné roli v patogenezi glioblastomu (Huijbers et al. 2010; Motegi et al. 2014; Serres et al. 2014; Yu et al. 2018; Fayzullin et al. 2019; Kabir a Apu 2022).



Obrázek 7: Pozitivní korelace mezi expresí mRNA transformujícího růstového faktoru beta 1 (*TGFBI*) a proteinů extracelulární matrix – kolagenu typu I, kolagenu typu III, kolagenu typu IV a fibronektinu v glioblastomu. (A) Kolagen typu I, (B) Kolagen typu III, (C) Kolagen typu IV, (D) Fibronektin. Korelační analýza byla provedena na expresních datech The Cancer Genome Atlas (dataset HG-U133A, nově diagnostikované primární glioblastomy, $n = 357$) pomocí Spearmanova neparametrického korelačního koeficientu (R). *COL1A1* (Collagen Type I Alpha 1 Chain), *COL3A1* (Collagen Type III Alpha 1 Chain), *COL4A1* (Collagen Type I Alpha 1 Chain), *FNI* (Fibronectin 1).



Obrázek 8: Pozitivní korelace mezi expresí mRNA transformujícího růstového faktoru beta 1 (TGFB1) a expresí fibroblastového aktivačního proteinu (FAP) v glioblastomu. Korelační analýza byla provedena na expresních datech The Cancer Genome Atlas (nově diagnostikované primární glioblastomy, $n = 357$) pomocí Spearmanova neparametrického korelačního koeficientu (R).

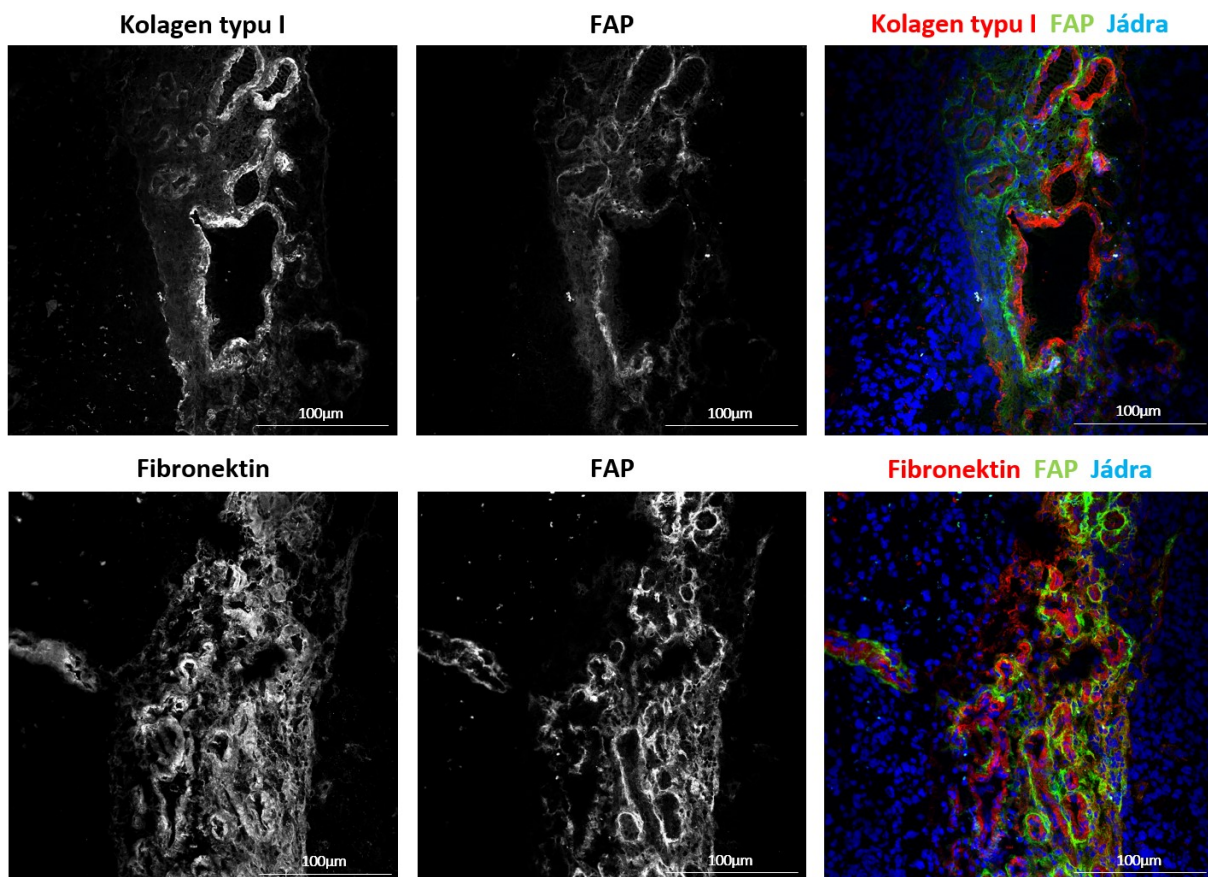


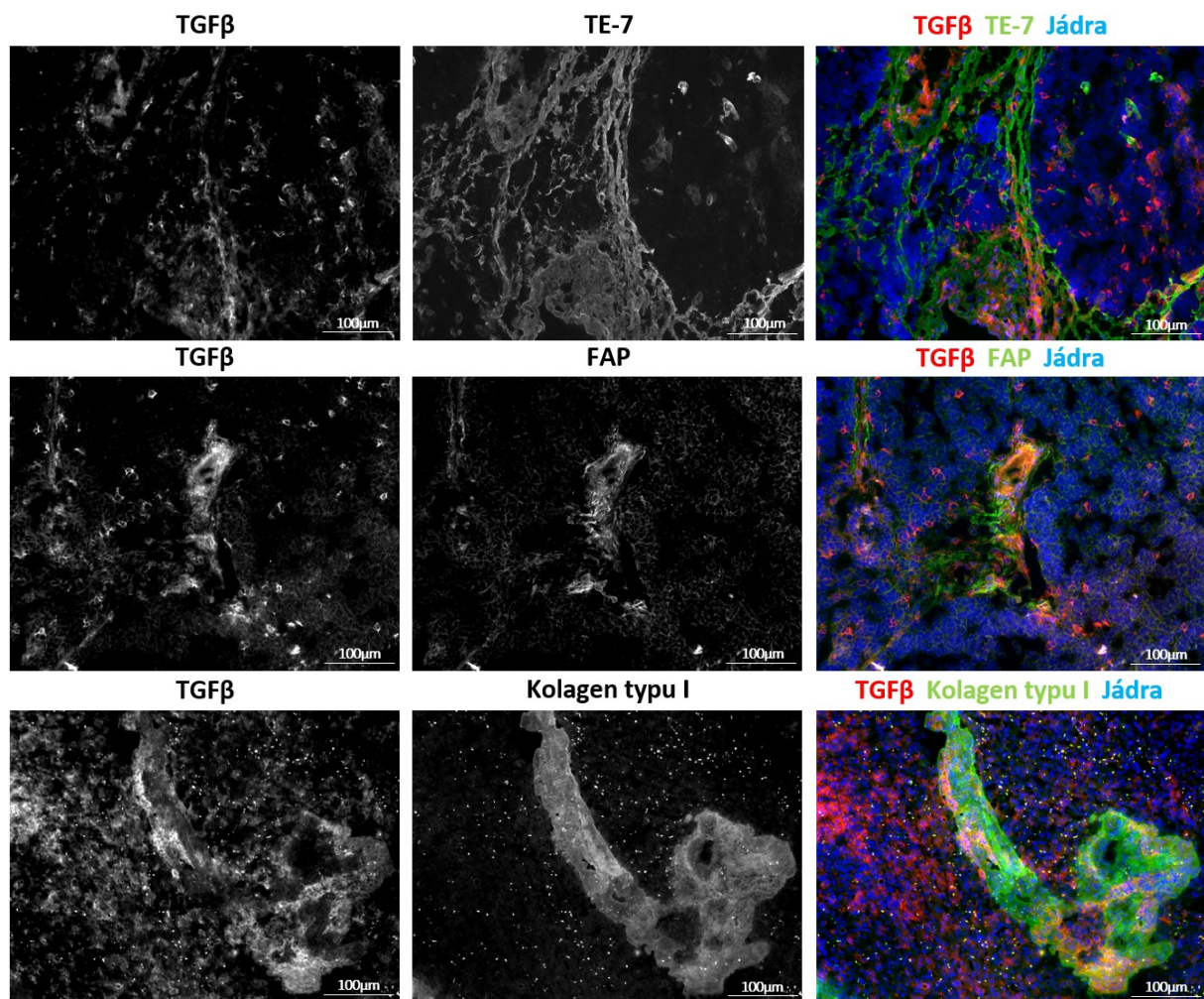
Obrázek 9: Pozitivní korelace mezi expresí mRNA fibroblastového aktivačního proteinu (FAP) a proteinů extracelulární matrix – kolagen typu I, kolagen typu III, kolagen typu IV a fibronektin v glioblastomu. (A) Kolagen typu I, (B) Kolagen typu III, (C) Kolagen typu IV, (D) Fibronektin. Korelační analýza byla provedena na expresních datech The Cancer Genome Atlas (nově diagnostikované primární glioblastomy, $n = 357$) pomocí Spearmanova neparametrického korelačního koeficientu (R). COL1A1 (Collagen Type I Alpha 1 Chain), COL3A1 (Collagen Type III Alpha 1 Chain), COL4A1 (Collagen Type I Alpha 1 Chain), FN1 (Fibronectin 1).

4.1.2. Lokalizace TGF β , FAP, kolagenu typu I a fibronektinu v glioblastomu

Bioinformatická analýza prokázala souvislost mezi expresí mRNA TGF β 1 a FAP s vybranými fibrilárními proteiny ECM, což bylo v souladu s naší hypotézou o existenci FAP⁺ mezenchymálních buněk odpovídajících na stimulaci TGF β produkcí fibrilárních proteinů ECM v glioblastomu. Pro další prokázání vzájemného vztahu FAP, TGF β a ECM byla analyzována lokalizace jejich exprese v glioblastomu. Na tuto analýzu exprese TGF β , FAP a fibrilárních proteinů ECM (kolagenu typu I a fibronektinu) bylo použito dvojité imunohistochemické barvení.

V glioblastomu se TGF β často nacházel v oblastech nádorového parenchymu, nicméně jeho exprese byla detekována i ve stromatu. Zde se vyskytovaly mezenchymální buňky exprimující mezenchymální markery TE-7 a FAP. V oblastech výskytu FAP⁺ mezenchymálních buněk (především perivaskulárně) byla navíc pozorována exprese kolagenu typu I a fibronektinu (Obrázek 10). Tyto výsledky naznačují přítomnost populace FAP⁺ mezenchymálních buněk, která by mohla odpovídat na stimulaci TGF β expresí kolagenu typu I a fibronektinu. TGF β by mohl být těmito buňkami také produkován a/nebo by je mohl autokrinně či parakrinně stimulovat.





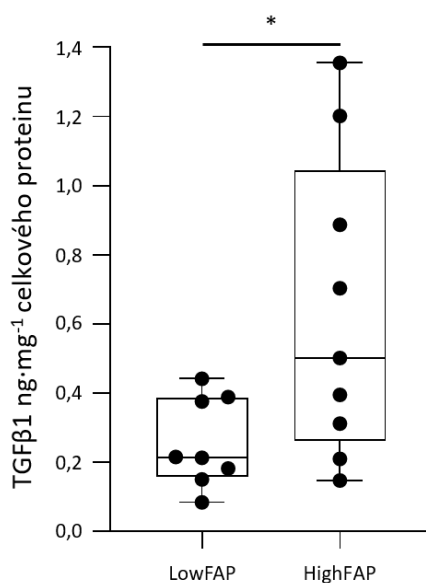
Obrázek 10: Lokalizace kolagenu typu I, fibronektinu, transformujícího růstového faktoru beta (TGFβ) a fibroblastového aktivačního proteinu (FAP) v glioblastomu. Reprezentativní snímky imunochemické analýzy lokalizace exprese FAP, kolagenu typu I, fibronektinu, TGFβ a TE-7 (mezenchymální marker) v tkáních glioblastomu. Drobné tečkovité zdánlivě pozitivní útvary na posledním snímku jsou autofluorescenční granula. Celkový počet analyzovaných tkání glioblastomu $n = 6$.

4.1.3. V glioblastomech s vyšší expresí FAP je zvýšeně exprimován TGFβ1, kolagen typu I a fibronektin

Imunochemickou analýzou byla prokázána přítomnost a lokalizace FAP, kolagenu typu I, fibronektinu, mezenchymálního markeru TE-7 a TGFβ v glioblastomu. Abychom potvrdili výsledky bioinformatické analýzy TCGA dat, stanovili jsme koncentraci TGFβ1 (hlavní izoformy TGFβ) a vybraných fibrilárních proteinů ECM (kolagenu typu I a fibronektinu) v tkáňových lyzátech glioblastomu s nízkou a vysokou expresí FAP. Koncentrace FAP byla již dříve v lyzátech stanovena metodou ELISA mými kolegy (Busek et al. 2016; Balaziová et al. 2021; Krepela et al. 2021). Na základě těchto dat byly glioblastomy rozřazeny na nádory s nízkou (LowFAP, dolní tercil, koncentrace FAP $<1,78\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$

proteinu) a s vysokou (HighFAP, horní tercil, koncentrace FAP >5,19 ng·mg⁻¹ proteinu) koncentrací FAP.

Výsledek statistické analýzy pro srovnání exprese TGFβ1, kolagenu typu I a fibronektinu u glioblastomů rozdělených dle exprese FAP byl signifikantní na hladině významnosti pod 0,05. Expres TGFβ1 byla signifikantně vyšší (p = 0,033; Welchův t-test) u skupiny HighFAP oproti skupině LowFAP (Obrázek 11). Kvantifikace kolagenu typu I a fibronektinu byla provedena mým kolegou (Mgr. Petr Výmola). Medián exprese kolagenu typu I byl statisticky významně vyšší (p = 0,031; Mann-Whitney U-test) u skupiny glioblastomů s vyšší expresí FAP (medián = 29,5 pg·mg⁻¹; mezikvartilové rozpětí (IQR) = 5,4; n = 9) oproti skupině glioblastomů s nižší expresí FAP (medián = 12,9 pg·mg⁻¹; IQR = 11,3; n = 7) a v neposlední řadě byl také medián exprese fibronektinu signifikantně vyšší (p = 0,006; Welchův t-test) u skupiny HighFAP (medián = 0,650 ng·mg⁻¹; směrodatná odchylka (SD) = 0,530; n = 9) oproti skupině LowFAP (medián = 0,308 ng·mg⁻¹; SD = 0,197; n = 8).



Obrázek 11: Expres transformujícího růstového faktoru beta 1 (TGFβ1) v glioblastomech s nízkou a vysokou expresí fibroblastového aktivačního proteinu (FAP). Kvantifikace exprese byla provedena pomocí metody ELISA v tkáňových lysátech glioblastomů. Expres TGFβ1 je ve skupině HighFAP vyšší oproti skupině LowFAP. Počet analyzovaných tkání ve skupině LowFAP n = 8 a HighFAP n = 9. * p < 0,05; Welchův t-test. – medián, □ 25%-75%, T rozsah neodlehých dat, • zdrojová data

4.2. Vliv TGFβ1 na expresi kolagenu typu I a fibronektinu u buněk izolovaných z glioblastomu

4.2.1. Mezenchymální buňky vytváří extracelulární matrix obsahující kolagen typu I a fibronektin

Z výše předložených výsledků byla zřejmá asociace mezi expresí FAP, kolagenu typu I, fibronektinu a TGFβ. Abychom zjistili vliv TGFβ na produkci kolagenu typu I a fibronektinu, exponovali jsme buněčné kultury rekombinantnímu TGFβ *in vitro*. Byla využita kultivace tří primárních FAP⁺ mezenchymálních kultur, jedné primární gliomové kmenové kultury, dvou komerčně dostupných gliomových linií (U87 a U251) a lidských mozkových vaskulárních pericytů (viz kapitoly 3.4 a 3.5.6). Buňky byly stimulovány dvěma koncentracemi rekombinantního TGFβ1 2 ng·ml⁻¹ a 10 ng·ml⁻¹ po dobu pěti dní (Krepela et al. 2021). Pro zajištění tvorby stabilních fibrilárních proteinů ECM, zejména kolagenu, byl přidán askorbát v koncentraci 50 μg·ml⁻¹, který je důležitým kofaktorem pro hydroxylaci lysinu a prolinu (Pinnell 1985; Avery et al. 2018).

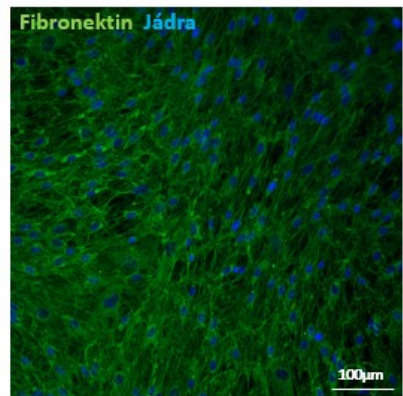
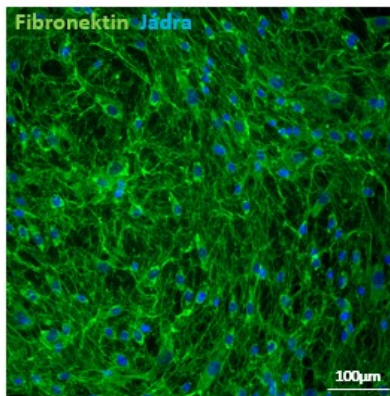
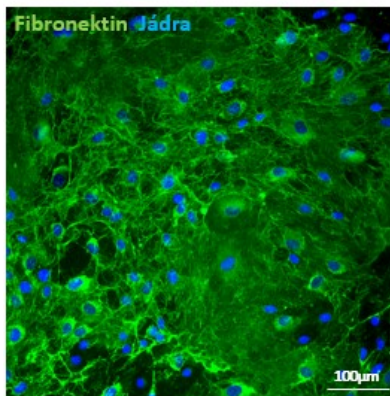
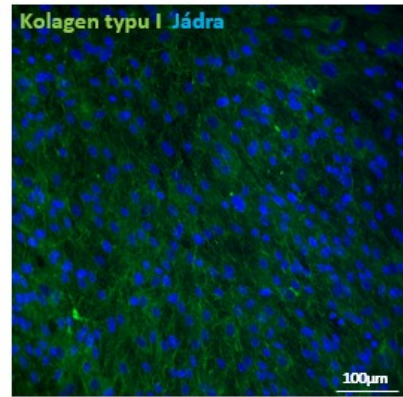
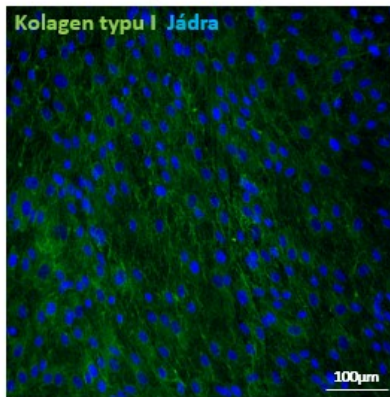
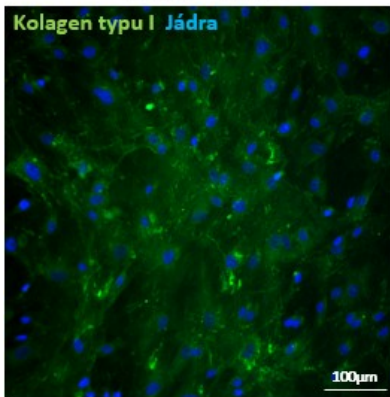
Imunochemická analýza prokázala expresi kolagenu typu I a fibronektinu mezenchymálními buňkami (primárními FAP⁺ mezenchymálními kulturami a lidskými mozkovými vaskulárními pericyty), které byly kultivované v bazálních podmínkách nebo stimulované TGFβ1 (Obrázek 12). Matrice produkované mezenchymálními buňkami vytvořily fibrilární zesíťované struktury. Exprese kolagenu typu I a fibronektinu naopak téměř nebyla detekována v gliomových liniích ani gliomové kmenové kultuře za bazálních podmínek ani po stimulaci TGFβ1. Navíc u gliomových buněk detekovaná imunopozitivita postrádala fibrilární charakter typický pro kolagen typu I a fibronektin.

A

0ng·ml⁻¹ TGFβ1

2ng·ml⁻¹ TGFβ1

10ng·ml⁻¹ TGFβ1

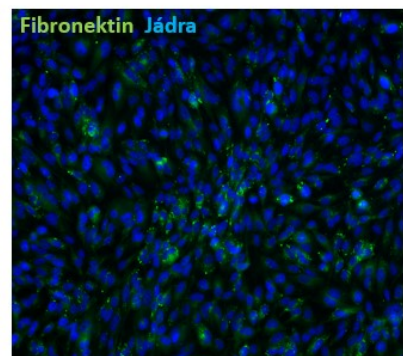
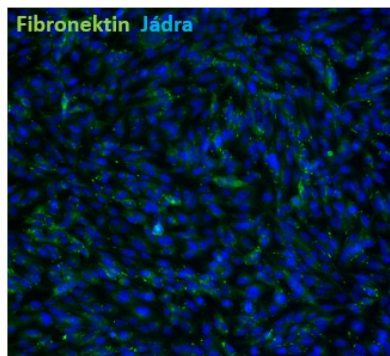
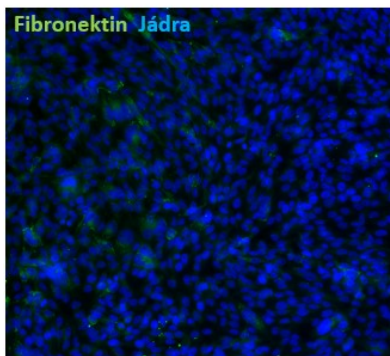
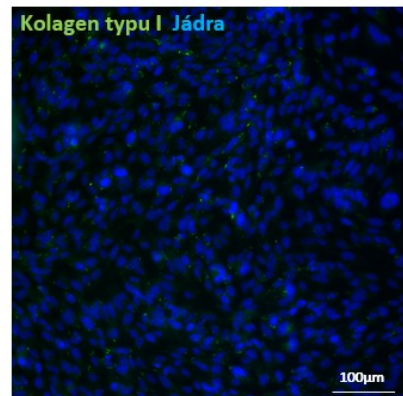
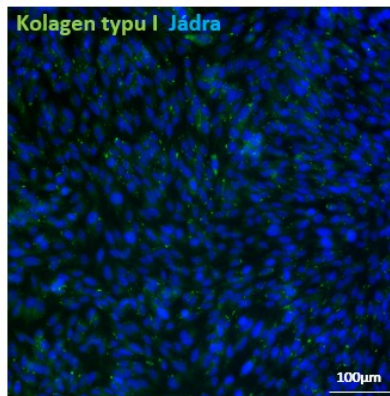
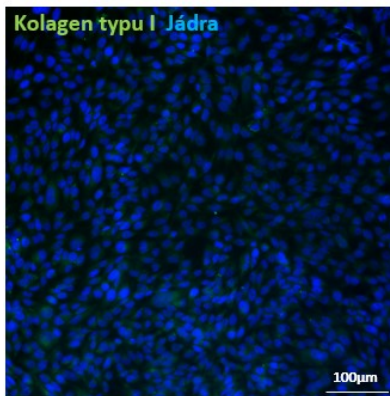


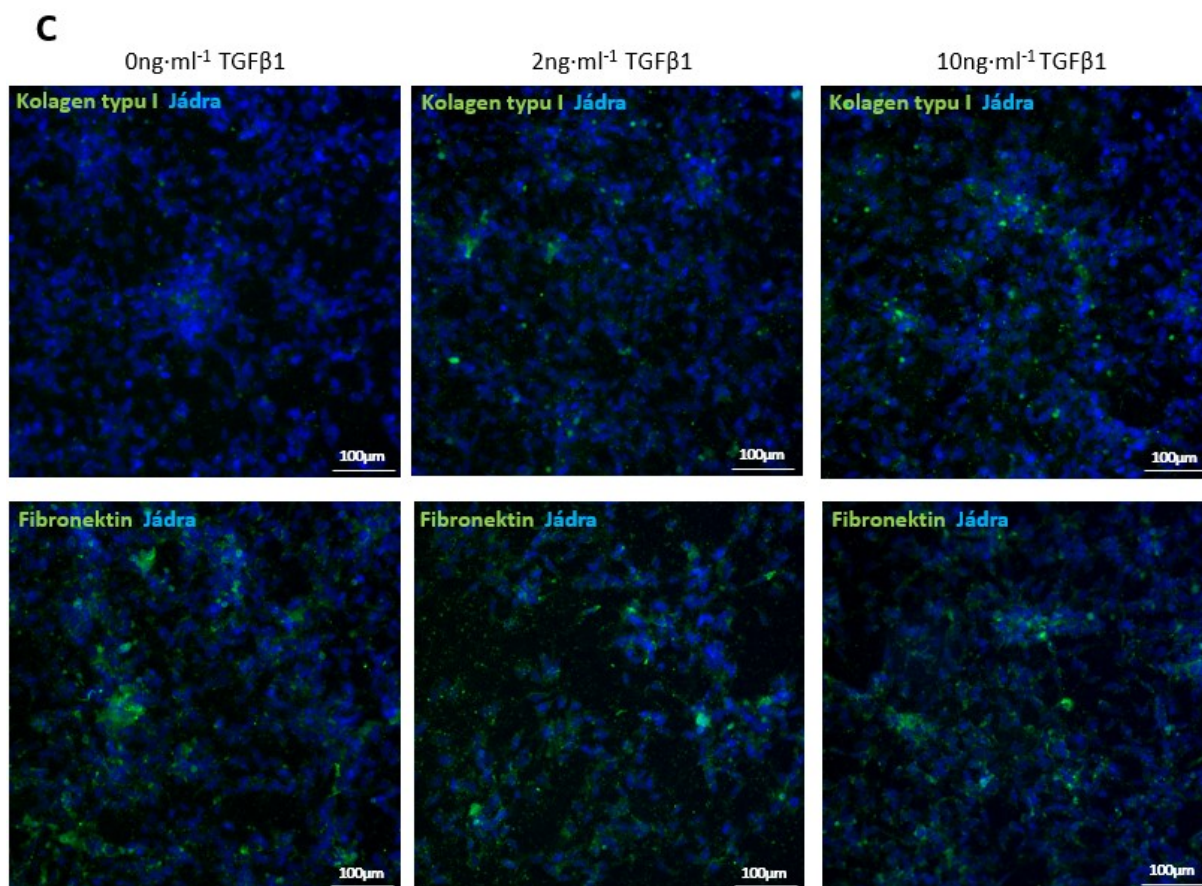
B

0ng·ml⁻¹ TGFβ1

2ng·ml⁻¹ TGFβ1

10ng·ml⁻¹ TGFβ1





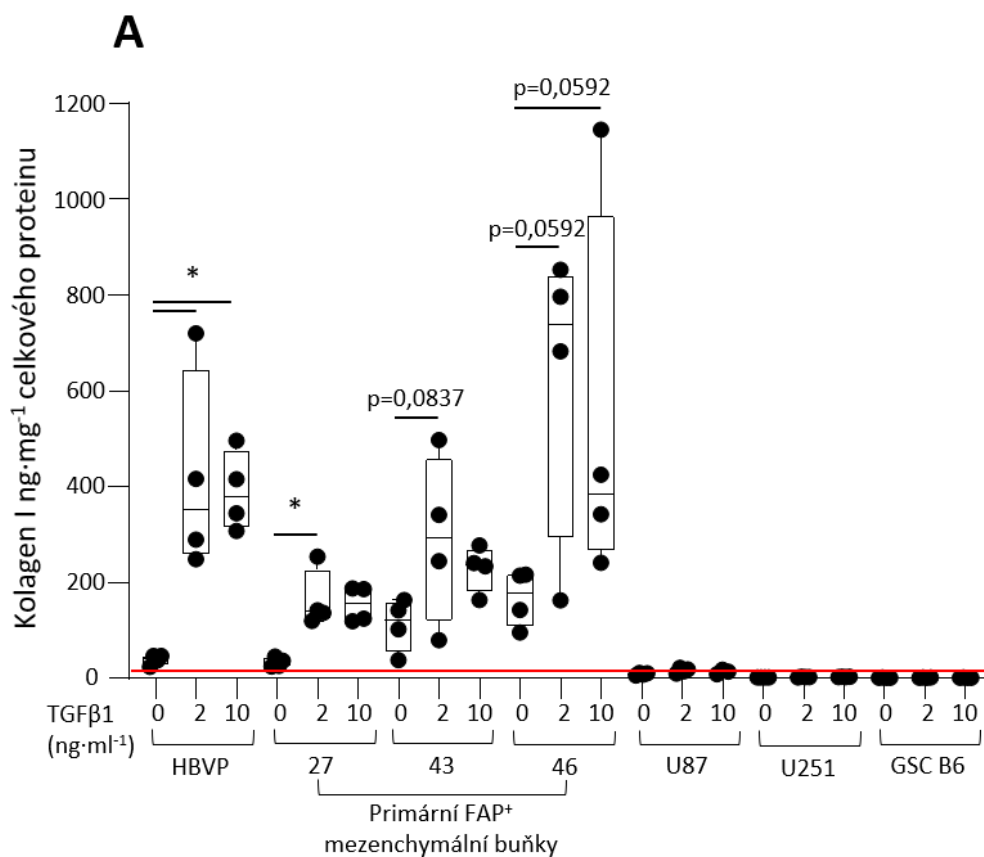
Obrázek 12: Reprezentativní snímky imunochemické analýzy exprese kolagenu typu I a fibronektinu mezenchymálními buňkami izolovanými z glioblastomu a gliomovými buňkami za bazálních podmínek a po stimulaci rekombinantním transformujícím růstovým faktorem beta 1 (TGFβ1). (A) Primární FAP⁺ mezenchymální kultura 43, (B) Gliomová linie U251, (C) Primární gliomová kmenová kultura. Buňky byly kultivovány po dobu pěti dní s různými koncentracemi rekombinantního TGFβ1 (0, 2, 10 ng· ml⁻¹). Byly použity tři primární mezenchymální kultury exprimující fibroblastový aktivační protein (FAP), lidské mozkové vaskulární pericyty, dvě gliomové linie a jedna primární gliomová kmenová kultura. Za bazálních podmínek a po stimulaci TGFβ1 mezenchymální buňky (primární FAP⁺ mezenchymální buňky a lidské mozkové vaskulární pericyty) exprimovaly kolagen typu I a fibronektin ve formě fibrilárních sítí. U gliomových buněk nedocházelo k tvorbě zesíťovaných matric kolagenu typu I a fibronektinu ani po stimulaci TGFβ1. U gliomových kmenových buněk lze také pozorovat malé oválné autofluorescenční útvary (především v oblastech lokálně zvýšené koncentrace buněk).

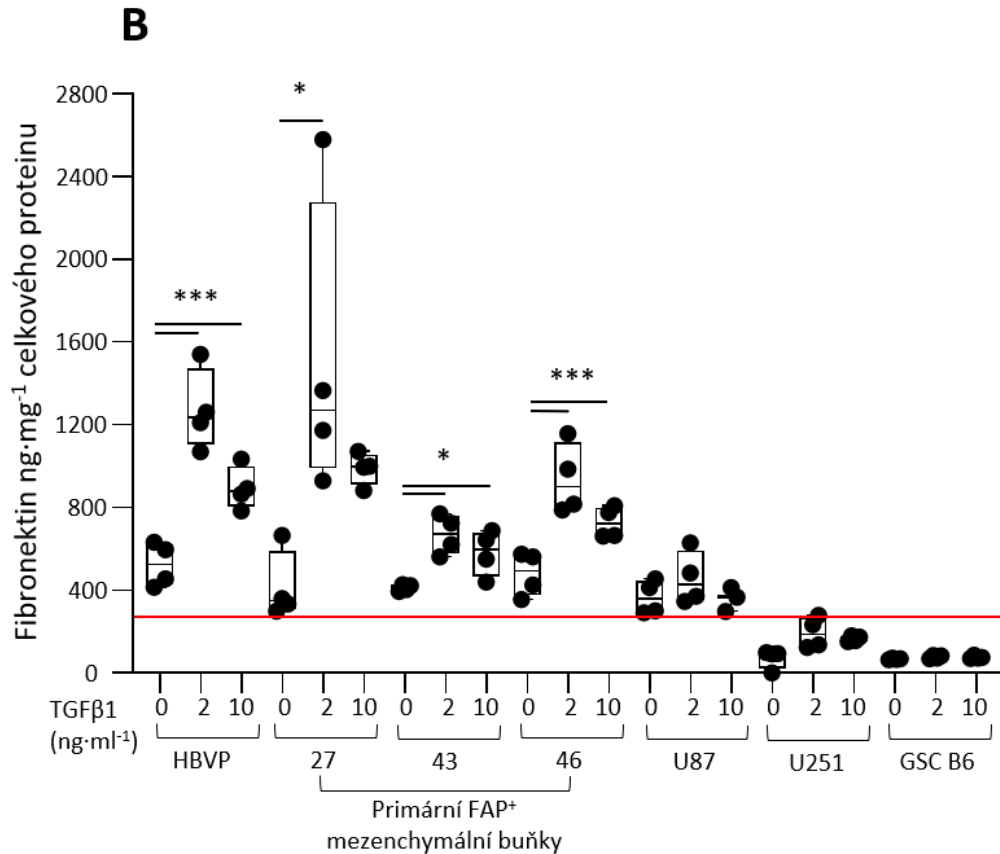
4.2.2. TGFβ1 zvyšuje expresi kolagenu typu I a fibronektinu u mezenchymálních buněk izolovaných z glioblastomu

Pro určení kvantity vybraných fibrilárních proteinů ECM (kolagenu typu I a fibronektinu) a zjištění případného rozdílu u TGFβ1 stimulovaných buněk byla dále provedena ELISA (Obrázek 13) z buněčných lyzátů různých buněčných typů (viz výše) vyskytující se v glioblastomu.

Ve shodě s výsledky imunochemických analýz byla za bazálních podmínek detekována exprese kolagenu typu I a fibronektinu u mezenchymálních buněk. Stimulací TGFβ1 byla zvýšena exprese obou fibrilárních proteinů ECM (tzn. kolagenu typu I

a fibronektinu) u mezenchymálních buněk. Při stimulaci vyšší koncentrací TGFβ1 (10 ng·ml⁻¹) byl detekován nárůst exprese vybraných proteinů ECM a při stimulaci nižší koncentrací TGFβ1 (2 ng·ml⁻¹) exprese proteinů ECM dosahovaly ještě vyšších hodnot. Navýšení exprese fibrilárních proteinů po stimulaci nižší koncentrací TGFβ1 bylo signifikantně významné oproti nestimulovaným buňkám u většiny mezenchymálních buněk. Navýšení exprese fibrilárních proteinů po stimulaci vyšší koncentrací TGFβ1 nebylo signifikantně významné oproti nestimulovaným buňkám u většiny mezenchymálních buněk. Rozdíl exprese proteinů ECM mezi mezenchymálními buňkami stimulovanými vyšší a nižší koncentrací TGFβ1 nebyl u většiny statisticky významný. Trend rozdílů exprese proteinů ECM ukazuje jasné zvýšení exprese po stimulaci TGFβ1 u mezenchymálních buněk, avšak kvůli vysoké variabilitě biologických replikátů některé rozdíly nebyly statisticky významné. Dále bylo potřeba ověřit, zda kolagen typu I a fibronektin exprimují také samotné gliomové buňky, a zároveň bylo potřeba verifikovat vliv TGFβ1 na produkci kolagenu typu I a fibronektinu těmito buňkami. Gliomové linie a gliomové kmenové buňky za bazálních podmínek ani po kultivaci s TGFβ1 nevykazovaly významně zvýšenou expresi fibrilárních proteinů kolagenu typu I a fibronektinu, která se pohybovala kolem úrovně detekčního limitu metody ELISA (Obrázek 13, Tabulka 4 a Tabulka 5).





Obrázek 13: Expres kolagenu typu I a fibronektinu různými buněčnými typy po stimulaci rekombinantním transformujícím růstovým faktorem beta 1 (TGF β 1). (A) Kolagen typu I, (B) Fibronectin. Kvantifikace exprese byla provedena pomocí metody ELISA z lyzátů buněk kultivovaných ve třech různých koncentracích rekombinantního TGF β 1 (0, 2, 10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) po dobu pěti dní. Byly kultivovány tři primární mezenchymální kultury exprimující fibroblastový aktivací protein (FAP), lidské mozkové vaskulární pericyty, dvě gliomové linie a jedna primární gliomová kmenová kultura. Mezenchymální buňky za bazálních podmínek expimovaly kolagen typu I a fibronectin a po stimulaci TGF β 1 se exprese dále zvýšila. U vyšší koncentrace TGF β 1 (10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) byl detekován menší nárůst exprese než u nižší koncentrace TGF β 1 (2 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). U gliomových buněk byla exprese kolagenu typu I a fibronektinu velmi nízká za bazálních podmínek i po stimulaci TGF β 1, kdy se exprese měřených proteinů pohybovala okolo detekčního limitu. Počet biologických replikátů $n = 4$. * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$; ANOVA test, Post hoc Dunnettův test. – medián, \square 25%-75%, \mathbf{T} rozsah neodlehých dat, \bullet zdrojová data, – detekční limit. GSC – gliomové kmenové buňky; HBVP – lidské mozkové vaskulární pericyty; U87, U251 – gliomové linie.

Tabulka 4: Průměrná změna exprese kolagenu typu I po stimulaci rekombinantním transformujícím růstovým faktorem beta 1 (TGFβ1) ve srovnání s bazální expresí u různých buněčných typů. GSC – gliomové kmenové buňky; HBVP – lidské mozkové vaskulární pericyty; pFAP – primární mezenchymální buňky exprimující fibroblastový aktivační protein; U87, U251 – gliomové linie. SD – směrodatná odchylka.

Název buněk	Průměrná změna exprese kolagenu typu I ve srovnání s kontrolou (± SD)	
	TGFβ1 2 ng· ml ⁻¹	TGFβ1 10 ng· ml ⁻¹
HBVP	10,7 (± 5,4)	10,0 (± 2,1)
pFAP 27	4,9 (± 1,8)	4,6 (± 1,1)
pFAP 43	2,6 (± 1,6)	2,0 (± 0,4)
pFAP 46	3,7 (± 1,9)	3,2 (± 2,4)
U87	1,8 (± 0,5)	1,5 (± 0,5)
U251	1,3 (± 0,2)	1,4 (± 0,2)
GSC B6	1,1 (± 0,3)	1,0 (± 0,1)

Tabulka 5: Průměrná změna exprese fibronektinu po stimulaci rekombinantním transformujícím růstovým faktorem beta 1 (TGFβ1) ve srovnání s bazální expresí u různých buněčných typů. GSC – gliomové kmenové buňky; HBVP – lidské mozkové vaskulární pericyty; pFAP – primární mezenchymální buňky exprimující fibroblastový aktivační protein; U87, U251 – gliomové linie. SD – směrodatná odchylka.

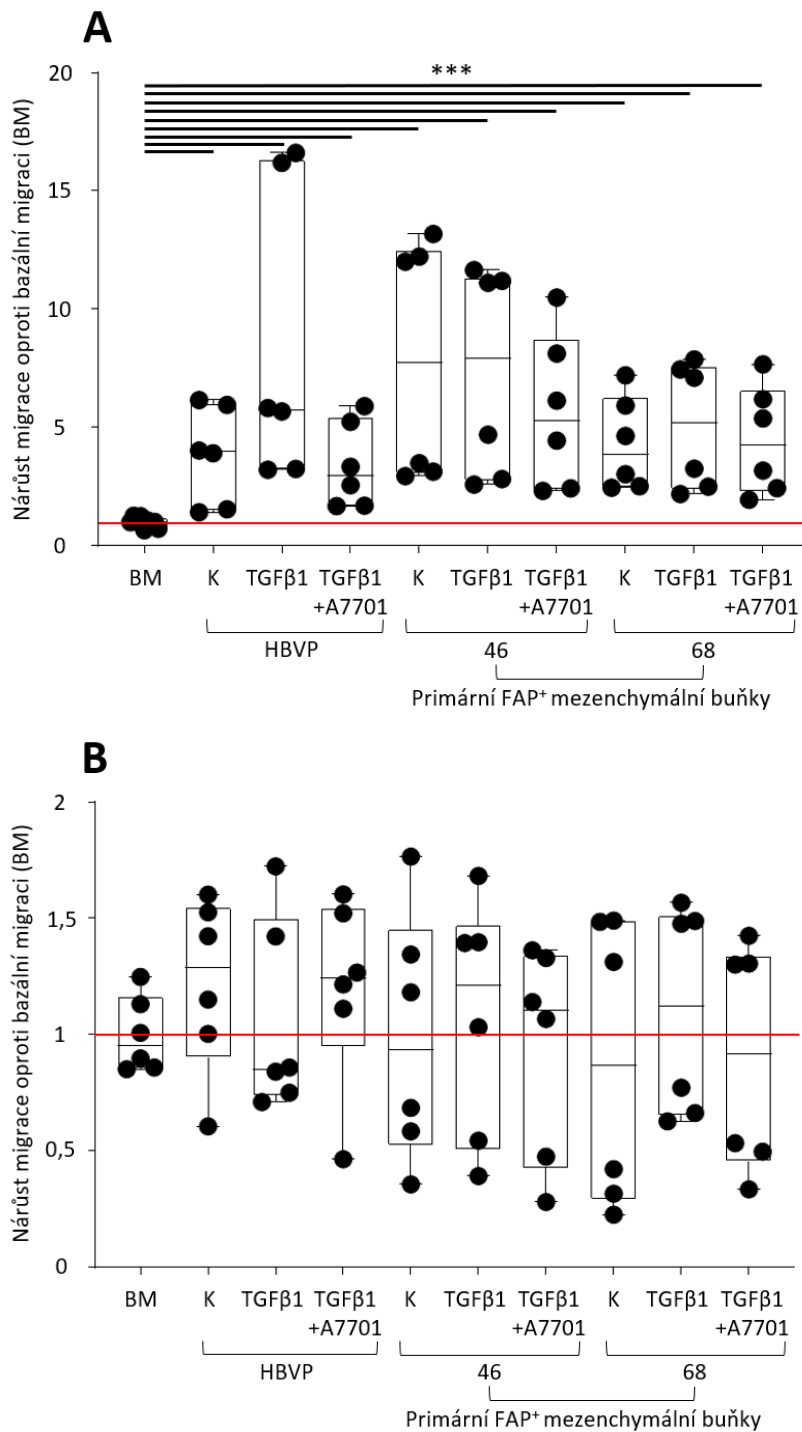
Název buněk	Průměrná změna exprese fibronektinu ve srovnání s kontrolou (± SD)	
	TGFβ1 2 ng· ml ⁻¹	TGFβ1 10 ng· ml ⁻¹
HBVP	2,4 (± 0,4)	1,7 (± 0,2)
pFAP 27	3,6 (± 1,8)	2,4 (± 0,2)
pFAP 43	1,6 (± 0,2)	1,4 (± 0,3)
pFAP 46	2,0 (± 0,4)	1,5 (± 0,2)
U87	1,3 (± 0,4)	1,0 (± 0,2)
U251	2,7 (± 1,0)	2,3 (± 0,2)
GSC B6	1,1 (± 0,1)	1,1 (± 0,1)

4.3. Vliv ECM mezenchymálních buněk stimulovaných TGFβ1 na migraci gliomových buněk *in vitro*

Abychom prokázali funkční působení ECM mezenchymálních buněk z mikroprostředí glioblastomu stimulovaných TGFβ1, byla využita *in vitro* funkční studie. Byla použita migrační esej hodnotící haptotaktickou odpověď gliomových buněk.

Matrice produkované mezenchymálními buňkami byly vytvořené při kultivaci ve třech různých podmínkách, tj. kontrolní podmínky, stimulace TGFβ1 (o koncentraci 2 ng·ml⁻¹) a stimulace TGFβ1 v přítomnosti inhibitoru kanonické signalizace prostřednictvím receptoru TGFRI (A7701, o koncentraci 1 μmol·l⁻¹, (Tojo et al. 2005)). Před samotnou haptotaktickou esejí byla v maticích ověřena exprese kolagenu typu I a fibronektinu pomocí imunochemické analýzy (*data neuvedena*). Migrace gliomové linie U251 byla zvýšena maticemi produkovanými mezenchymálními buňkami ve srovnání s bazální migrací (tzn. pouze plastik bez jakéhokoli potažení). Matrice produkované mezenchymálními buňkami po stimulaci TGFβ1 a matrice produkované mezenchymálními buňkami po stimulaci TGFβ1 s přidavkem

inhibitoru A7701 také navýšily migraci gliomové linie U251. Avšak nebyl prokázán další nárůst migrace gliomové linie U251 při použití těchto matric produkovaných mezenchymálními buňkami (po stimulaci TGF β 1 a po stimulaci TGF β 1 s přídavkem inhibitoru A7701) oproti kontrolním matricím produkovaných mezenchymálními buňkami. Působení matric produkovaných mezenchymálními buňkami na migraci gliomové linie U87 bylo velmi variabilní a žádná z testovaných matric neprokázala reprodukovatelný vliv (Obrázek 14). Možnou příčinou variability migrace této gliomové linie by mohla být její vysoká bazální migrace v těchto experimentech (průměr \pm SD = 209,9 \pm 172,3 buněk na zorné pole), která byla navíc velmi odlišná při různých opakováních experimentu. Oproti tomu gliomová linie U251 vykazovala nízkou bazální migraci (průměr \pm SD = 24,3 \pm 7,2 buněk na zorné pole), která byla konsistentní ve všech na sobě nezávislých opakováních.



Obrázek 14: Migrace gliomových buněk indukovaná extracelulární matrix (ECM) produkovanou primárními mezenchymálními kulturami exprimujícími fibroblastový aktivační protein (FAP) a lidskými mozkovými vaskulárními pericyty po stimulaci rekombinantním transformujícím růstovým faktorem beta 1 (TGFβ1) nebo po inhibici kanonické signální dráhy TGFβ. (A) Gliomová linie U251, (B) Gliomová linie U87. Kvantifikace migrace byla provedena pomocí haptotaktické migrační eseje. ECM produkovaná mezenchymálními buňkami byla vytvořena kultivací po dobu sedmi dní ve třech různých podmínkách s rekombinantním TGFβ1 (0 (K), 2 ng·ml⁻¹(TGFβ1)) nebo navíc s inhibítoem kanonické signální dráhy TGFβ (A7701). Pro vytvoření testovaných ECM byly kultivovány dvě primární FAP⁺ mezenchymální kultury a lidské mozkové vaskulární pericyty (HBVP). Dva na sobě nezávislé experimenty byly provedené v tripletu. Data byla normalizována k bazální migraci (BM) nádorové linie. *** $p < 0,01$; Kruskal-Wallisův test. – medián, □ 25%-75%, T rozsah neodlehých dat, • zdrojová data, - průměr bazální migrace.

5. Diskuse

Poznání mechanismů přispívajících k progresi nádorů představuje důležitý předpoklad k nalezení nových možností jejich diagnostiky a léčby. Nádorová onemocnění se řadí mezi druhou nejčastější příčinu smrti v rozvinutých zemích a nadále lze očekávat růst jejich incidence. Mezi významné maligní neoplázie patří maligní mozkové nádory (Ng et al. 2019). Nejčastěji se vyskytujícím primárním maligním mozkovým nádorem u dospělých je glioblastom, který je zároveň velice agresivní a řadí se mezi nádory s velmi nepříznivou prognózou. Po stanovení diagnózy glioblastomu následuje kombinovaná léčba, která se nejčastěji skládá z chirurgické resekce nádoru a následné chemoterapie (nejčastěji temozolomidem) a radioterapie. I přes kombinovaný léčebný protokol však zůstává medián přežití okolo pouhých 15 měsíců a relaps onemocnění nastává u většiny pacientů do dvou let od prvotní diagnózy (Koshy et al. 2012; Stupp et al. 2014; Pinel et al. 2019). Poslední významný úspěch používaný v klinické praxi při léčbě maligních mozkových nádorů bylo zavedení chemoterapeutika temozolomidu (alkylační činidlo), který prodloužil medián přežití o dva až necelé tři měsíce (Stupp et al. 2005). Kvůli stále špatné prognóze pacientů s glioblastomem se výzkum zaměřuje na pochopení jednotlivých mechanismů onkogeneze glioblastomu, což by mohlo přispět k vývoji nových terapeutických alternativ.

Dosavadní výzkum protinádorových terapií glioblastomu zaměřených na ECM se zabýval především proteiny souvisejícími s ECM spíše než přímo strukturálními molekulami ECM a jako terapeutické cíle byly v klinických studiích testovány zejména MMP nebo integriny (Mohiuddin a Wakimoto 2021).

Za potenciální molekulární cíle se považují mimo jiné proteázy, které hrají důležitou roli v progresi nádorového onemocnění. V cílené terapii proti proteázám se může využívat inhibice enzymové aktivity, ablace buněk exprimujících proteázu nebo využití enzymatické aktivity k aktivaci či cílení cytotoxické látky (Verhulst et al. 2022). Mezi proteázy považované za potenciální molekulární cíl při diagnostice a terapii se řadí také fibroblastový aktivační protein (FAP), (Röhrich et al. 2019; Šimková et al. 2020; Altmann et al. 2021).

FAP je nadějným kandidátem pro diagnostiku či cílenou léčbu nádorových onemocnění díky své specifické expresi téměř výhradně v maligních nádorech a možnému podílu na jejich patogenezi (Garin-Chesa et al. 1990; Busek et al. 2018). Byla vyvinutá řada experimentálních přístupů na jeho cílení, které byly testovány v preklinických modelech (Zboralski et al. 2022). Hlavní skupinou maligních nádorů, kde byla detekována přítomnost FAP, jsou epiteliální

nádory (karcinomy), avšak zvýšená exprese byla pozorována také u glioblastomu (Tchou et al. 2013; Wikberg et al. 2013; Mhawech-fauceglia et al. 2015; Busek et al. 2016). FAP je exprimován na povrchu nádorových buněk i na buňkách nádorového mikroprostředí, nejčastěji na nádorově asociovaných fibroblastech (Scanlan et al. 1994). Funkce FAP⁺ nádorově asociovaných fibroblastů zůstává nevyjasněná, avšak řada autorů je popisuje jako buněčnou populaci podporující progresi nádoru a rekurenci po léčbě onemocnění (Fearon 2014; Sorrentino et al. 2016; Higashino et al. 2019).

V glioblastomu byla exprese FAP zjištěna především na buňkách nádorového mikroprostředí, především na mezenchymálních buňkách. FAP byl konsistentně lokalizován v blízkosti hyperplastických cév a v místech mikrovaskulární proliferace. Oproti tomu ve zdravém mozku cévy postrádaly expresi FAP, a tedy FAP by mohl být unikátní marker angiogenních glioblastomových cév (Busek et al. 2016; Ebert et al. 2020). Dále byl FAP v glioblastomu detekován na transformovaných buňkách (Busek et al. 2016). Práce Ebert et al. (2020) našla FAP⁺ transformované buňky, z nich většina současně exprimovala antigen CD90, který byl navržen jako marker gliomových kmenových buněk a podporuje invazi glioblastomových buněk (He et al. 2012; Avril et al. 2017). Nicméně jiné práce expresi FAP na gliomových kmenových buňkách nepodporují (Mentlein et al. 2011; Busek et al. 2016). U glioblastomu by cílená terapie proti FAP mohla být efektivní, protože by zasáhla nejen samotné nádorové buňky, ale také nádorové mikroprostředí, které je esenciální pro rozvoj nádorového onemocnění.

Kromě exprese FAP se v glioblastomu specificky zvyšuje i exprese některých proteinů ECM. Patří mezi ně různé typy kolagenů a fibronektin, které byly recentními studiemi navrženy jako slibné prognostické a terapeutické cíle u glioblastomu (Saw et al. 2021; Yin et al. 2021; Kabir a Apu 2022). U fibronektinu bylo vyvinuto již několik možných přístupů jeho využití v cílené terapii glioblastomu, například protilátky konjugované s radioizotopy, nanočástice doručující malé interferující RNA nebo látky modifikující samotný fibronektin. Zajímavé je též zjištění, že například protiedematózní léčba dexametazonem aktivuje sestavování fibronektinové matrix, která zvyšuje soudržnost gliomových buněk a snižuje schopnost jejich disperze (Czabanka et al. 2011; Shannon et al. 2015; Saw et al. 2018). Tyto práce byly však provedeny pouze na zvířecích modelech. Nicméně pro další zlepšení léčby glioblastomu je potřeba dále porozumět změnám ECM a její funkci v patologii tohoto onemocnění.

Tato diplomová práce navazuje na pozorování Krepela et al. (2021), který zaznamenal, že TGF β indukuje expresi FAP v glioblastomu. Dále se diplomová práce zaměřuje na FAP⁺ mezenchymální buňky z hlediska exprese fibrilárních proteinů ECM. V glioblastomu je přítomnost těchto proteinů, například kolagenu typu I a fibronektinu, zvýšena oproti zdravé tkáni, a navíc v řadě jiných tkání TGF β indukuje expresi kolagenu typu I a fibronektinu (Igotzs a Massague 1986; Huijbers et al. 2010; Kabir a Apu 2022). Hlavním cílem diplomové práce bylo analyzovat vliv TGF β 1 na produkci kolagenu typu I a fibronektinu FAP⁺ mezenchymálními buňkami mikroprostředí glioblastomu a zjistit možný promigratorní efekt extracelulární matrix produkované FAP⁺ mezenchymálními buňkami stimulovanými TGF β 1.

Jeden z důležitých a velmi známých mediátorů epiteliálně-mezenchymální tranzice nádorových buněk, který se potvrdil i u gliomových buněk, je TGF β (Tao et al. 2020). S procesem epiteliálně-mezenchymální tranzice bývá asociována zvýšená invazivita glioblastomu a také fibrilární proteiny ECM (Meng et al. 2017; Yin et al. 2021). Z námi provedené bioinformatické analýzy TCGA dat vyplývá, že exprese řady molekul ECM koreluje s expresí TGF β 1. Prokazují pozitivní korelaci exprese izoformy TGF β 1 (*TGFBI*) a kolagenů (*COL1A1*, *COL3A1* a *COL4A1*) v glioblastomu. Tyto výsledky se shodují s literaturou (Yin et al. 2021). Provedená bioinformatická analýza též dokazuje pozitivní korelaci exprese fibronektinu (*FNI*) s expresí TGF β 1 (*TGFBI*), což je v souladu s pozorováním, že mezi geny regulované TGF β 1 patří i gen fibronektinu (*FNI*), (Joseph et al. 2022). Na tyto proteiny ECM jsem se detailněji zaměřila také z důvodu jejich navýšení v glioblastomu oproti jejich nízkému výskytu ve zdravé mozkové tkáni. Výsledky bioinformatické analýzy také prokazují pozitivní korelaci exprese izoformy TGF β 1 (*TGFBI*) s expresí FAP v tkáních glioblastomu, což je v souladu s předchozími výsledky (Krepela et al. 2021). Dále mé výsledky prokazují pozitivní korelace exprese FAP a proteinů ECM (*FNI*, *COL1A1* a *COL3A1*), což je v souladu s předešlou studií (Busek et al. 2016). Z TCGA dat byla dokázána pouze slabá signifikantní korelace exprese FAP a kolagenu typu IV (*COL4A1*) v glioblastomu.

Na základě širší literární evidence o patogenezi glioblastomu a výsledků získaných bioinformatickou analýzou TCGA dat jsem dále pokračovala v analýze role exprese kolagenu typu I a fibronektinu. Výsledky studií zabývajících se expresí kolagenu typu I v glioblastomu jsou různé ve svých závěrech. Autoři dřívějších prací expresi kolagenu typu I v glioblastomu nedetekovali (Zámečník et al. 2004). Později jiní autoři v souladu s mými výsledky prokázali

expresi tohoto proteinu v tkáni glioblastomu, především v perivaskulárních oblastech (Huijbers et al. 2010; Motegi et al. 2014).

Z literatury vyplývá, že fibronektin, důležitý protein ECM, je nadměrně přítomen v tkáních glioblastomu a krvi pacientů postižených tímto onemocněním (Sawaya et al. 1985; Lal et al. 1999; Caffo et al. 2004). Naše výsledky potvrzují expresi tohoto proteinu v glioblastomu. Stejně jako kolagen typu I tak i fibronektin je přítomný v oblasti cév, což je v souladu s hypotézou o existenci perivaskulární populace buněk nadměrně produkující tyto proteiny v glioblastomu (Castellani et al. 2002).

Zvýšená produkce fibrilárního kolagenu typu I a fibronektinu, by mohla přispívat k invazivitě gliomových buněk, což je typický maligní znak glioblastomu, kvůli kterému je toto onemocnění těžké zcela vyléčit (Huijbers et al. 2010; Motegi et al. 2014; Serres et al. 2014; Liao et al. 2018).

Dřívější studie detekovaly výskyt FAP u gliomových linií (Rettig et al. 1988). Následně byla exprese FAP zjištěna také v samotné tkáni glioblastomu (Stremenova et al. 2007; Mentlein et al. 2011; Busek et al. 2016; Ebert et al. 2020). Práce Li et al. (2020) ukazuje častější parenchymální (intratumorální) vzor exprese FAP v glioblastomu. Nicméně kromě transformovaných buněk byly za producenty FAP označeny netransformované stromální buňky, avšak zatím konkrétní typy buněk exprimující FAP v glioblastomu nebyly stále jasně a konsistentně určeny (Busek et al. 2016; Ebert et al. 2020; Balaziova et al. 2021). Práce mých kolegů a dalších autorů prokázala expresi FAP především stromálními mezenchymálními buňkami v perivaskulárních oblastech glioblastomu (Mentlein et al. 2011; Busek et al. 2016; Ebert et al. 2020; Balaziova et al. 2021). Studie Ebert et al. (2020) ukazuje, že mezi FAP⁺ buňky nádorového mikroprostředí patří pericyty a endoteliální buňky. Avšak práce Balaziova et al. (2021) nedetekovala u FAP⁺ buněk typický endoteliální marker Von Willebrandův faktor (VWF; Von Willebrand Factor), ale detekovala mezenchymální markery receptor růstového faktoru krevních destiček beta (PDGFR β ; Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta), alfa-aktin hladkého svalu (SMA; Alpha-Smooth Muscle Actin) a TE-7. Navíc bylo tyto buňky možné efektivně expandovat v kultivačních podmínkách určených pro pericyty, což dále podporuje jejich pericytární charakter. Dále byla mezi FAP⁺ mezenchymálními buňkami nalezena minoritní subpopulace buněk podobajících se nádorovým buňkám na genomické úrovni, což by mohly být transdiferencované gliomové kmenové buňky (Balaziova et al. 2021).

V rámci diplomové práce jsem provedla dvojitě imunochemické barvení, které prokázalo, že v blízkosti buněk exprimujících FAP se vyskytuje kolagen typu I a fibronektin. Tyto proteiny se se za fyziologických okolností v mozku vyskytují pouze omezeně (Rutka et al. 1987; Busek et al. 2016) a FAP exprimující buňky by se mohly podílet na jejich zvýšené produkci v glioblastomu.

Naše imunohistochemická data prokazují přítomnost TGF β napříč nádorovým parenchymem včetně oblastí stromatu, kde je lokalizována exprese FAP. Tyto výsledky jsou v souladu s dalšími studii zabývajícími se glioblastomem (Li et al. 2020; Krepela et al. 2021). Výsledky lokalizační analýzy také prokazují, že v blízkosti oblastí pozitivních na mezenchymální marker (TE-7) a kolagen typu I je detekována exprese TGF β . Dvojitě imunochemické barvení fibronektinu s TGF β nebylo uskutečněno z důvodu nemožnosti odlišit dané primární protilátky (obě protilátky byly králičí). Ve shodě s původní hypotézou můžeme konstatovat, že v glioblastomu se TGF β nachází v oblastech, kde se vyskytují FAP⁺ mezenchymální buňky a proteiny ECM kolagen typu I a fibronektin.

Pro potvrzení výsledků bioinformatických a imunohistochemických analýz a zjištění asociace mezi FAP, TGF β , kolagenem typu I a fibronektinem v tkáni glioblastomu byla provedena kvantifikace těchto proteinů pomocí metody ELISA. V glioblastomu je FAP zvýšeně exprimován a nachází se především na stromálních buňkách. Předpokládáme tudíž, že glioblastomy s vysokou expresí FAP mají vyšší zastoupení FAP⁺ mezenchymálních buněk. Na základě výsledků předchozích studií jsme pro kvantifikaci exprese TGF β , kolagenu typu I a fibronektinu vybrali tkáně glioblastomů s vysokou (horní tercil) a nízkou (dolní tercil) expresí FAP, tedy tkáně s vysokým a nízkým zastoupením FAP⁺ mezenchymálních buněk (Busek et al. 2016; Balaziová et al. 2021; Krepela et al. 2021). U glioblastomů s nízkým zastoupením FAP⁺ buněk se nachází menší množství těchto proteinů (TGF β , kolagenu typu I a fibronektinu) než v glioblastomech s vysokou expresí FAP, kde jsou tyto proteiny zvýšeně exprimovány. Tyto výsledky podporují naši hypotézu, že v glioblastomech s vysokou expresí TGF β se vyskytuje vyšší zastoupení FAP⁺ mezenchymálních buněk, které odpovídají na stimulaci TGF β zvýšenou expresí kolagenu typu I a fibronektinu. Toto je první studie prokazující asociaci mezi TGF β , kolagenem typu I, fibronektinem a FAP stanovením exprese na proteinové úrovni v glioblastomu. Práce Koczorowska et al. (2016) podporuje tyto výsledky a ukazuje u nádorových onemocnění stimulační efekt FAP⁺ nádorem asociovaných fibroblastů na produkci TGF β 1 a proteinů ECM, například kolagenu typu I.

Souhrnně výsledky z bioinformatické, imunohistochemické i kvantitativní analýzy implikují možnost výskytu FAP⁺ mezenchymálních buněk odpovídajících na stimulaci TGFβ expresí fibrilárních proteinů ECM (kolagenu typu I a fibronektinu), čímž by se mohly podílet na progresi glioblastomu. Pro dokázání přímého vlivu TGFβ na expresi kolagenu typu I a fibronektinu FAP⁺ mezenchymálními buňkami byly provedeny *in vitro* experimenty.

K realizaci *in vitro* experimentů bylo zapotřebí nejprve derivovat primární kultury FAP⁺ mezenchymálních buněk z patientských tkání glioblastomu. Tyto buňky byly získány metodou MACS (viz kapitola 3.5.4). Při této metodě jsou izolovány buňky na základě vazby se specifickou protilátkou proti určitému antigenu, v našem případě proti FAP. Podle výsledků práce Balaziova et al. (2021) předpokládáme, že se jedná o mezenchymální buňky pericytárního charakteru, proto byly zvoleny kultivační podmínky, které jsou doporučeny pro komerčně dostupnou linii mozkových pericytů HBVP (pericytární médium viz kapitoly 3.3 a 3.4.3). Derivované primární kultury FAP⁺ mezenchymálních buněk byly po první pasáži (nebo po rozmrazení) imunochemicky ověřeny s využitím několika mezenchymálních markerů (TE-7, SMA, PDGFRβ) včetně FAP. Dále byly také testovány antigeny asociované s jinými buněčnými typy vyskytujícími se v tkáni glioblastomu, například typický marker gliálních buněk GFAP nebo marker endotelových buněk VWF. V souladu s předchozími daty byla exprese těchto markerů u FAP⁺ mezenchymálních buněk zcela minimální až nedetekovatelná (Balaziova et al. 2021), což podporuje čistotu derivace primárních kultur FAP⁺ mezenchymálních buněk.

Mezi další testovanou primární buněčnou kulturu patří gliomové kmenové buňky, které byly derivované z nádorové tkáně od pacientů s glioblastomem. Tyto buňky byly izolovány pomocí selekčního média, které se používá pro kultivaci gliomových kmenových buněk (Sana et al. 2018). Stejně jako u primárních kultur FAP⁺ mezenchymálních buněk se také u primárních kultur gliomových kmenových buněk testovala čistota izolace několika markery. Nejdůležitějšími pozitivními markery byly SOX-2 a CD133, které označovaly úspěšnost derivace gliomových kmenových buněk. Pro experimenty v této diplomové práci byly gliomové kmenové buňky kultivovány jako adherentní kultura na plastiku potaženém Geltrexem (Sana et al. 2018).

V *in vitro* experimentech byly jako modelová kultura použity lidské mozkové vaskulární pericyty (HBVP). Tyto buňky exprimovaly většinu markerů jako FAP⁺ mezenchymální buněčné kultury (*data neuvedena*) včetně FAP.

Byly kultivovány čtyři mezenchymální buněčné kultury – modelová kultura HBVP (izolovaná ze zdravé lidské mozkové tkáně) a tři různé primární FAP⁺ mezenchymální buněčné kultury (derivované z glioblastomu). Pro ověření exprese kolagenu typu I a fibronektinu především mezenchymálními buňkami byly také kultivovány jiné typy buněk nacházejících se v glioblastomu, a to dvě komerčně dostupné gliomové linie (U87 a U251) a jedna primární buněčná kultura gliomových kmenových buněk. Gliomové kmenové buňky jsou nyní považovány za lepší a více realistické *in vitro* modely glioblastomu oproti dosud často používaným gliomovým liniím (Da Hora et al. 2019). Buněčné lyzáty z těchto kultur byly poté použity na detekci a kvantifikaci exprese kolagenu typu I a fibronektinu pod vlivem TGFβ.

Pro stimulaci buněk v *in vitro* experimentech byl vybrán TGFβ1 jako nejčastěji se vyskytující izoforma TGFβ v glioblastomu a jeho koncentrace byla zvolena na základě předchozí práce (Krepela et al. 2021). Výsledky imunochemické analýzy ukazují expresi kolagenu typu I a fibronektinu mezenchymálními buňkami (tj. FAP⁺ mezenchymální buňky a HBVP) ve formě matrice s charakteristicky uspořádanými fibrilami. Tyto výsledky jsou ve shodě s předchozí prací studující FAP⁺ fibroblasty (Lee et al. 2011). Naopak u gliomových liniích ani u gliomové kmenové kultury nebyla pozorována exprese kolagenu typu I a fibronektinu ve formě fibrilárních struktur. Pro přesné zhodnocení produkce kolagenu typu I a fibronektinu a zároveň kvantifikaci vlivu TGFβ1 na expresi stimulovaných buněk byla použita metoda ELISA.

Za bazálních podmínek nestimulované mezenchymální buňky (HBVP a FAP⁺ mezenchymální buňky) produkují kolagen typu I a fibronektin a po stimulaci TGFβ1 dochází k výraznému zvýšení exprese těchto proteinů. Tyto výsledky podporuje také dostupná literatura ukazující expresi kolagenu typu I a fibronektinu FAP⁺ mezenchymálními buňkami asociovanými s jinými typy nádorů a navíc je známo, že TGFβ může zvyšovat produkci těchto proteinů (Ignatzs a Massague 1986; Schultze-Mosgau et al. 2006; Lee et al. 2011; Luo et al. 2014; Lo et al. 2015). Zajímavý výsledek je, že exprese kolagenu typu I a fibronektinu mezenchymálními buňkami není úměrně závislá na koncentraci TGFβ1. Maximální exprese kolagenu typu I a fibronektinu dosahují mezenchymální buňky po stimulaci TGFβ1 o koncentraci 2 ng·ml⁻¹. Při zvýšení koncentrace TGFβ1 na 10 ng·ml⁻¹ nedochází k vyššímu nárůstu exprese těchto proteinů mezenchymálními buňkami. K indukci exprese kolagenu typu I a fibronektinu dostačuje TGFβ1 o koncentraci 2 ng·ml⁻¹, která zřejmě spouští transkripci jejich genů prostřednictvím obsazení vysoko afinitních míst DNA pro Smad proteiny. Tyto

závěry jsou ve shodě s dosavadními studiemi. Dle literatury Smad proteiny funkčně asociují a kooperují s transkripčními faktory s vysokou afinitou k DNA, například s komplexem aktivačního proteinu-1, který řídí mimo jiné i expresi kolagenu typu I a fibronektinu (Chung et al. 1996; Liberati et al. 1999). U většiny mezenchymálních kultur je nárůst exprese kolagenu typu I a fibronektinu po stimulaci TGFβ1 signifikantní. Naopak u některých mezenchymálních buněk statistická významnost změny exprese těchto proteinů po stimulaci TGFβ1 nevychází z důvodu velkého rozptylu naměřených hodnot, avšak trend nárůstu exprese proteinů je zřejmý.

Zajímavý výsledek přinesla modelová kultura HBVP, která odpovídala na stimulaci TGFβ1 výrazným zvýšením produkce sledovaných proteinů. Od dodavatele jsme zjistili, že se jedná o pericyty z fetu nikoli z dospělého člověka, což může vysvětlovat, proč byly tyto buňky tak citlivé na stimulaci TGFβ1. Fetální původ také může vysvětlit expresi FAP těmito buňkami.

Gliomové linie a gliomové kmenové buňky nevykazují produkci sledovaných proteinů (kolagenu typu I a fibronektinu) za bazálních podmínek ani po stimulaci TGFβ1. Exprese těchto proteinů je u gliomových buněk na úrovni detekčního limitu metody ELISA, ačkoli si můžeme všimnout u gliomové linie U87 mírné produkce sledovaných proteinů, u které po stimulaci TGFβ1 není detekován statisticky významný nárůst exprese. Dřívější výsledky ukazují, že tato gliomová linie nese mezenchymální znaky (*data neuvedena*), které mohou být podpořeny stimulací TGFβ1 (Ouanouki et al. 2017). Předložené výsledky nicméně ukazují, že gliomové buňky jsou minoritní producenti proteinů kolagenu typu I a fibronektinu i po stimulaci TGFβ1. Moje zjištění nejsou zcela ve shodě se studií Bryukhovetskiy a Shevchenko (2016), kteří zjistili téměř dvojnásobný nárůst exprese kolagenu typu I a fibronektinu u linie U87 po stimulaci TGFβ1. Nicméně v této práci byla použita jiná koncentrace TGFβ1 ($5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) a zároveň byly buňky stimulovány TGFβ1 po dobu tří dnů, takže dosažené výsledky se mohou lišit i kvůli jiným kultivačním podmínkám.

Studie Allen et al. (2016) ukázala, že gliomová linie U87 se v laboratořích může výrazně lišit oproti původně izolované a ustálené linii derivované z tkáně glioblastomu. Gliomové linie U87 a U251 se přestávají považovat za dostatečně přesný model glioblastomu kvůli jejich odlišnému transkriptomu od tkáně glioblastomu (Lee et al. 2006). Dál bych proto navrhovala využití jiného modelu gliomových buněk, například gliomových kmenových buněk kultivovaných v bezsérovém médiu pro nervové kmenové buňky, které se stále častěji využívají v experimentálním výzkumu (Pollard et al. 2009).

Ve funkčních *in vitro* studiích jsme se zaměřili na matrice produkované TGFβ1 stimulovanými mezenchymálními buňkami, u kterých jsme prokázali nárůst zastoupení kolagenu typu I a fibronektinu, a dalšími experimenty jsme zjišťovali jejich možný promigrační vliv na gliomové linie.

V této diplomové práci prokazují zvýšenou migraci gliomové linie U251 na maticích produkovaných FAP⁺ mezenchymálními buňkami, což je první studie ukazující efekt matic produkovaných FAP⁺ mezenchymálními buňkami mikroprostředí glioblastomu na migraci gliomových buněk. Studie Lee et al. (2011) podporuje pozitivní efekt matic produkovaných FAP⁺ mezenchymálními buňkami na migraci nádorových buněk, avšak tato práce studovala nádorové buňky pankreatu. U druhé testované gliomové linie U87 jsme v rámci provedených experimentů tento efekt nepozorovali. Data z migračních experimentů U87 byla velmi variabilní a lišila se i v rámci provedených experimentů. Navíc bazální migrace U87 se výrazně lišila ve dvou na sobě nezávislých experimentech a byla výrazně zvýšena oproti předchozím experimentům s touto linií (*data neuvedena*), což mohlo významně ovlivnit efekt matic.

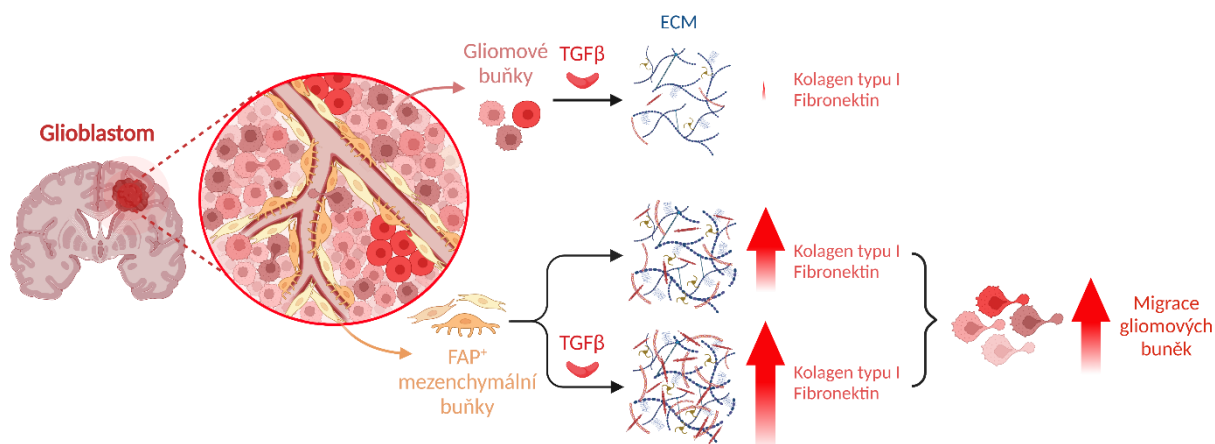
Ve dvou na sobě nezávislých předexperimentech bylo pozorováno zvýšení migrace gliomové linie U251 maticemi produkovanými mezenchymálními buňkami po stimulaci TGFβ1 (*data neuvedena*), avšak v následných experimentech tento efekt na gliomové linie (U87 a U251) nebyl prokázán. Matrice produkované mezenchymálními buňkami po stimulaci TGFβ1 sice zvyšují migraci gliomové linie U251, avšak tento nárůst migrace se významně neliší od migrace za použití kontrolních matic produkovaných mezenchymálními buňkami a není blokován u matic produkovaných mezenchymálními buňkami kultivovanými s přidavkem inhibitoru TGFβ1 signalizace. Jeden z možných důvodů, proč v uvedených experimentech migrace gliomových buněk nebyla zvýšena maticemi produkovanými mezenchymálními buňkami po stimulaci TGFβ1 oproti kontrolním maticím produkovaných mezenchymálními buňkami, by mohlo být změněné chování derivovaných FAP⁺ mezenchymálních buněk. Při přípravě matic na migrační experimenty primární FAP⁺ mezenchymální buňky méně proliferovaly, snáze podstupovaly buněčnou smrt a dle imunochemické analýzy exprese kolagenu typu I a fibronektinu již většina netvořila silné fibrilární síť. Navíc z migračních experimentů byla vyřazena buněčná kultura 27 primárních FAP⁺ mezenchymálních buněk kvůli ztrátě mezenchymálních znaků. Jelikož jsou primární FAP⁺ mezenchymální buňky velmi vzácný materiál, nebyl už dostupný už další materiál pro opakování experimentu.

Přestože předchozí práce využívající purifikovaný kolagen typu I a fibronectin prokázaly jejich stimulační vliv na migraci gliomových buněk (Kaufman et al. 2005; Brösicke et al. 2015b; Fayzullin et al. 2019), existuje jen velmi málo studií, které by podobně jako předkládaná práce využívaly komplexní směs molekul ECM a přibližovaly se tak reálnému mikroprostředí glioblastomu.

6. Závěr

- Exprese TGFβ1 v glioblastomu pozitivně koreluje s expresí řady proteinů extracelulární matrix (například kolagen typu I, kolagen typu III, kolagen typu IV, fibronektin) a FAP.
- TGFβ1 zvyšuje produkci kolagenu typu I a fibronektinu u FAP⁺ mezenchymálních buněk derivovaných z glioblastomu. Gliomové linie a gliomové kmenové buňky tyto proteiny téměř neexprimují ani po stimulaci TGFβ1.
- Matrice produkované FAP⁺ mezenchymálními buňkami zvýšily migraci gliomové linie U251, u matric produkovaných FAP⁺ mezenchymálními buňkami po stimulaci TGFβ1 nebylo patrné další zvýšení migrace gliomové linie U251. V provedených experimentech matrice produkované FAP⁺ mezenchymálními buňkami neměly významný vliv na migraci gliomové linie U87.

Výše uvedené výsledky potvrdily část hypotézy, že TGFβ1 pozitivně působí na produkci kolagenu typu I a fibronektinu FAP⁺ mezenchymálními buňkami, čímž naznačují mechanismus, kterým by tato buněčná subpopulace mohla přispívat k progresi glioblastomu (Obrázek 15). Přesný mechanismus vlivu na gliomové buňky a působení extracelulární matrix tvořené FAP⁺ mezenchymálními buňkami na další buněčné populace v nádorovém mikroprostředí glioblastomu není dosud znám.



Obrázek 15: Schéma shrnující výsledky diplomové práce. Mezenchymální buňky exprimující fibroblastový aktivační protein (FAP) se nacházejí typicky v perivaskulární oblasti glioblastomu. Tyto buňky produkují významně více kolagenu typu I a fibronektinu oproti gliomovým buňkám, které i po stimulaci TGFβ exprimují pouze minimální množství kolagenu typu I a fibronektinu. Vlivem TGFβ dochází u mezenchymálních buněk exprimujících FAP k nárůstu produkce kolagenu typu I a fibronektinu. Extracelulární matrix produkovaná mezenchymálními buňkami exprimujícími FAP může zvyšovat migraci gliomových buněk. Vytvořeno v BioRender.com.

7. Seznam použité literatury

AKHAVAN, David, Alexandra L. POURZIA, Alex A. NOURIAN, Kevin J. WILLIAMS, David NATHANSON, Ivan BABIC, Genaro R. VILLA, Kazuhiro TANAKA, Ali NAEL, Huijun YANG, Julie DANG, Harry V. VINTERS, William H. YONG, Mitchell FLAGG, Fuyuhiko TAMANOI, Takashi SASAYAMA, C. DAVID JAMES, Harley I. KORNBLUM, Tim F. CLOUGHESY, Webster K. CAVENEE, Steven J. BENSINGER a Paul S. MISCHER, 2013. De-repression of PDGFR β transcription promotes acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in glioblastoma patients. *Cancer Discovery* [online]. **3**(5), 534–547. Dostupné z: doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0502

ALLEN, Marie, Mia BJERKE, Hanna EDLUND, Sven NELANDER a Bengt WESTERMARK, 2016. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Science translational medicine* [online]. **8**(354), 354re3–354re3. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.aaf6853

ALTMANN, Annette, Uwe HABERKORN a Jens SIVEKE, 2021. The Latest Developments in Imaging of Fibroblast Activation Protein. *Journal of Nuclear Medicine* [online]. **62**(2), 160–167. Dostupné z: doi:10.2967/jnumed.120.244806

ALVES, Tercia Rodrigues, Anna Carolina DA FONSECA, Sara Santana NUNES, Aline Oliveira DA SILVA, Luiz Gustavo Feijó DUBOIS, Jane FARIA, Suzana Assad KAHN, Nathan Bessa VIANA, Jorge MARCONDES, Chantal LEGRAND, Vivaldo MOURA-NETO a Verônica MORANDI, 2011. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Experimental Cell Research* [online]. **317**(15), 2073–2085. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2011.06.006

ANNES, Justin P, Yan CHEN, John S MUNGER a Daniel B RIFKIN, 2004. Integrin α V β 6-mediated activation of latent TGF- β requires the latent TGF- β binding protein-1. *The Journal of cell biology* [online]. **165**(5), 723–734. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200312172

APPAIX, Florence, Marie-France NISSOU, Boudewijn VAN DER SANDEN, Matthieu DREYFUS, François BERGER, Jean-Paul ISSARTEL a Didier WION, 2014. Brain mesenchymal stem cells: The other stem cells of the brain? *World Journal of Stem Cells* [online]. **6**(2), 134–143. Dostupné z: doi:10.4252/wjsc.v6.i2.134

ARNOLD, James N., Lukasz MAGIERA, Matthew KRAMAN a Douglas T. FEARON, 2014. Tumoral immune suppression by macrophages expressing fibroblast activation protein- α and heme oxygenase-1. *Cancer immunology research* [online]. **2**(2), 121–126. Dostupné z: doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0150

ARTYM, Vira V, Andrei L KINDZELSKII, Wen-tien CHEN a Howard R PETTY, 2002. Molecular proximity of seprase and the urokinase-type plasminogen activator receptor on malignant melanoma cell membranes: dependence on β 1 integrins and the cytoskeleton. *Carcinogenesis* [online]. **23**(10), 1593–1601. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/23.10.1593

AVERY, Diana, Priya GOVINDARAJU, Michele JACOB, Leslie TODD, James MONSLOW a Ellen PURÉ, 2018. Extracellular matrix directs phenotypic heterogeneity of activated fibroblasts. *Matrix Biology* [online]. **67**, 90–106. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2017.12.003

AVRIL, Tony, Amandine ETCHEVERRY, Raphael PINEAU, Joanna OBACZ, Gwenaële JEGOU, Florence JOUAN, Pierre-Jean LE RESTE, Masumeh HATAMI, Rivka R COLEN, Brett L CARLSON, Paul A DECKER, Jann N SARKARIA, Elodie VAULEON, Dan Cristian CHIFOREANU, Anne CLAVREUL, Jean MOSSER, Eric CHEVET a Veronique QUILIEN, 2017. CD90 Expression Controls Migration and Predicts Dasatinib Response in Glioblastoma. *Clinical Cancer Research* [online]. **23**(23), 7360–7374. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1549

BALAZIOVA, Eva, Petr VYMOLA, Petr HRABAL, Rosana MATEU, Michal ZUBAL, Robert TOMAS, David NETUKA, Filip KRAMAR, Zuzana ZEMANOVA, Karla SVOBODOVA, Marek BRABEC, Aleksí SEDO a Petr BUSEK, 2021. Fibroblast Activation Protein Expressing

- Mesenchymal Cells Promote Glioblastoma Angiogenesis. *Cancers* [online]. **13**(13), 3304. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13133304
- BAUER, Stefan, Michael C. JENDRO, Andreas WADLE, Sascha KLEBER, Frank STENNER, Robert DINSER, Anja REICH, Erica FACCIN, Stefan GÖDDE, Harald DINGES, Ulf MÜLLER-LADNER a Christoph RENNEN, 2006. Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Research and Therapy* [online]. **8**(6), 1–11. Dostupné z: doi:10.1186/ar2080
- BAUMANN, Fusun, Petra LEUKEL, Anett DOERFELT, Christoph P. BEIER, Katja DETTMER, Peter J. OEFNER, Michael KASTENBERGER, Marina KREUTZ, Thomas NICKL-JOCKSCHAT, Ulrich BOGDHANN, Anja Katrin BOSSERHOFF a Peter HAU, 2009. Lactate promotes glioma migration by TGF- β 2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. *Neuro-Oncology* [online]. **11**(4), 368–380. Dostupné z: doi:10.1215/15228517-2008-106
- BIRCH, Joanna L., Barry J. COULL, Lindsay C. SPENDER, Courtney WATT, Alice WILLISON, Nelofer SYED, Anthony J. CHALMERS, M. Kismet HOSSAIN-IBRAHIM a Gareth J. INMAN, 2020. Multifaceted transforming growth factor-beta (TGF β) signalling in glioblastoma. *Cellular Signalling* [online]. **72**(109638). Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2020.109638
- BOWMAN, Robert L., Qianghu WANG, Angel CARRO, Roel G.W. VERHAAK a Massimo SQUATRITO, 2017. GlioVis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. *Neuro-Oncology* [online]. **19**(1), 139–141. Dostupné z: doi:10.1093/neuonc/now247
- BRADSHAW, Amy, Agadha WICKREMSEKERA, Swee T. TAN, Lifeng PENG, Paul F. DAVIS a Tinte ITINTEANG, 2016. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in Surgery* [online]. **3**(21), 1–15. Dostupné z: doi:10.3389/fsurg.2016.00021
- BROOKS, P.C., S. STRÖMBLAD, L. SANDERS, T.L. VONSCHALSCHA, R.T. AMIES, T.P. OUIGLEY a P.A. CHERESH, 1996. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha\beta$ 3. *Cell* [online]. **85**(5), 683–693. Dostupné z: doi:10.1016/s0092-8674(00)81235-0
- BRÖSICKE, Nicole a Andreas FAISSNER, 2015a. Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell Adhesion and Migration* [online]. **9**(1–2), 131–140. Dostupné z: doi:10.1080/19336918.2014.1000071
- BRÖSICKE, Nicole, Muhammad SALLOUH, Lisa Marie PRIOR, Albert JOB, Ralf WEBERSKIRCH a Andreas FAISSNER, 2015b. Extracellular Matrix Glycoprotein-Derived Synthetic Peptides Differentially Modulate Glioma and Sarcoma Cell Migration. *Cellular and Molecular Neurobiology* [online]. **35**(5), 741–753. Dostupné z: doi:10.1007/s10571-015-0170-1
- BRYUKHOVETSKIY, Igor a Valeriy SHEVCHENKO, 2016. Molecular mechanisms of the effect of TGF- β 1 on U87 human glioblastoma cells. *Oncology Letters* [online]. **12**(2), 1581–1590. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2016.4756
- BUSEK, Petr, Eva BALAZIOVA, Ivana MATRASOVA, Marek HILSER, Robert TOMAS, Martin SYRUCEK, Zuzana ZEMANOVA, Evzen KREPELA, Jaromir BELACEK a Aleksí SEDO, 2016. Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. *Tumor Biology* [online]. **37**(10), 13961–13971. Dostupné z: doi:10.1007/s13277-016-5274-9
- BUSEK, Petr, Petr HRABAL, Premysl FRIC a Aleksí SEDO, 2015. Co-expression of the homologous proteases fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase-IV in the adult human Langerhans islets. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. **143**(5), 497–504. Dostupné z: doi:10.1007/s00418-014-1292-0
- BUSEK, Petr, Rosana MATEU, Michal ZUBAL, Lenka KOTACKOVA a Aleksí SEDO, 2018. Targeting fibroblast activation protein in cancer – Prospects and caveats. *Frontiers in Bioscience - Landmark* [online]. **23**(10), 1933–1968. Dostupné z: doi:10.2741/4682

- CAFFO, M., A. GERMANO, G. CARUSO, F. MELI, S. GALATIOTO, M. P. SCIACCA a F. TOMASELLO, 2004. An immunohistochemical study of extracellular matrix proteins laminin, fibronectin and type IV collagen in paediatric glioblastoma multiforme. *Acta Neurochirurgica* [online]. **146**(10), 1113–1118. Dostupné z: doi:10.1007/s00701-004-0344-y
- CAJA, Laia, Francesco DITURI, Serena MANCARELLA, Daniel CABALLERO-DIAZ, Aristidis Moustakas ID, Gianluigi GIANNELLI a Isabel FABREGAT, 2018. TGF- β and the Tissue Microenvironment: Relevance in Fibrosis and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **19**(5), 1294. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19051294
- CALABRESE, Christopher, Helen POPPLETON, Mehmet KOCAK, Twala L HOGG, Christine FULLER, Blair HAMNER, Eun Young OH, M Waleed GABER, David FINKLESTEIN, Meredith ALLEN, Adrian FRANK, Ildar T BAYAZITOV, Stanislav S ZAKHARENKO, Amar GAJJAR, Andrew DAVIDOFF a Richard J GILBERTSON, 2007. A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell* [online]. **11**(1), 69–82. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2006.11.020
- CASTELLANI, Patrizia, Laura BORSI, Barbara CARNEMOLLA, Attila BIRO, Alessandra DORCARATTO, Giuseppe L VIALE, Dario NERI a Luciano ZARDI, 2002. Differentiation between High- and Low-Grade Astrocytoma Using a Human Recombinant Antibody to the Extra Domain-B of Fibronectin. *The American journal of pathology* [online]. **161**(5), 1695–1700. Dostupné z: doi:10.1016/S0002-9440(10)64446-X
- CHENG, Lin, Zhi HUANG, Wenchao ZHOU, Qiulian WU, Shannon DONNOLA, James K LIU, Xiaoguang FANG, Andrew E SLOAN, Yubin MAO, Justin D LATHIA, Wang MIN, Roger E MCLENDON, Jeremy N RICH a Shideng BAO, 2013. Glioblastoma Stem Cells Generate Vascular Pericytes to Support Vessel Function and Tumor Growth. *Cell* [online]. **153**(1), 139–152. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2013.02.021
- CHIQUET-EHRISMANN, Ruth, Gertraud OREND, Matthias CHIQUET, Richard P. TUCKER a Kim S. MIDWOOD, 2014. Tenascins in stem cell niches. *Matrix Biology* [online]. **37**, 112–123. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2014.01.007
- CHRISTIANSEN, Victoria J., Kenneth W. JACKSON, Kyung N. LEE a Patrick A. MCKEE, 2007. Effect of fibroblast activation protein and $\alpha 2$ -antiplasmin cleaving enzyme on collagen Types I, III, and IV. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **457**(2), 177–186. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2006.11.006
- CHUNG, Kee Yang, Akhilesh AGARWAL, Jouni UITTO a Alain MAUVIEL, 1996. An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human $\alpha 2$ (I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor- β . *Journal of Biological Chemistry* [online]. **271**(6), 3272–3278. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.271.6.3272
- CHUNG, Kuei Min, Shu Ching HSU, Yue Ru CHU, Mei Yao LIN, Weir Tong JIAANG, Ruey Hwa CHEN a Xin CHEN, 2014. Fibroblast activation protein (FAP) is essential for the migration of bone marrow mesenchymal stem cells through RhoA activation. *PLoS ONE* [online]. **9**(2), e88772. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0088772
- CLAVREUL, Anne, Amandine ETCHEVERRY, Tony AVRIL, Marie-lise JOURDAN, Sophie MICHALAK, Patrick FRANC, Jean-luc CARRE, Jean MOSSER, The GRAND, Ouest GLIOMA, Project NETWORK a Philippe MENEI, 2012. Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment. *Journal of Neuro-Oncology* [online]. **106**(3), 493–504. Dostupné z: doi:10.1007/s11060-011-0701-7
- CLAVREUL, Anne, Amandine ETCHEVERRY, Clément TÉTAUD, Audrey ROUSSEAU, Tony AVRIL, Cécile HENRY, Jean MOSSER a Philippe MENEI, 2015. Identification of two glioblastoma-associated stromal cell subtypes with different carcinogenic properties in histologically normal surgical margins. *Journal of Neuro-Oncology* [online]. **112**(1), 1–10. Dostupné z: doi:10.1007/s11060-014-1683-z

- CLAVREUL, Anne, Catherine GUETTE, Rogatien FAGUER, Clément TÉTAUD, Alice BOISSARD, Laurent LEMAIRE, Audrey ROUSSEAU, Tony AVRIL, Cécile HENRY, Olivier COQUERET a Philippe MENEI, 2014. Glioblastoma-associated stromal cells (GASCs) from histologically normal surgical margins have a myofibroblast phenotype and angiogenic properties. *Journal of Pathology* [online]. **233**(1), 74–88. Dostupné z: doi:10.1002/path.4332
- CUKIERMAN, Edna, 2002. Preparation of Extracellular Matrices Produced by Cultured Fibroblasts. *Current protocols in cell biology* [online]. **16**(1), 1–15. Dostupné z: doi:10.1002/0471143030.cb1009s16
- CZABANKA, Marcus, Guliz PARMAKSIZ, Simon H BAYERL, Melina NIEMINEN, Eveline TRACHSEL, Hans D MENSSSEN, Ralf ERBER, Dario NERI a Peter VAJKOCZY, 2011. Microvascular biodistribution of L19-SIP in angiogenesis targeting strategies. *European Journal of Cancer* [online]. **47**(8), 1276–1284. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2011.02.001
- DA HORA, Cintia Carla, Markus W SCHWEIGER, Thomas WURDINGER a Bakhos A TANNOUS, 2019. Patient-Derived Glioma Models : From Patients to Dish to Animals. *Cells* [online]. **8**(10), 1177. Dostupné z: doi:10.3390/cells8101177
- DECORDOVA, Syreeta, Abhishek SHASTRI, Anthony G. TSOLAKI, Hadida YASMIN, Lukas KLEIN, Shiv K. SINGH a Uday KISHORE, 2020. Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Frontiers in Immunology* [online]. **11**(1402), 1–18. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.01402
- DENTON, Alice E., Edward W. ROBERTS, Michelle A. LINTERMAN a Douglas T. FEARON, 2014. Fibroblastic reticular cells of the lymph node are required for retention of resting but not activated CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **111**(33), 12139–12144. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1412910111
- DOLZNIG, Helmut, Norbert SCHWEIFER, Christina PURI, Norbert KRAUT, Wolfgang J. RETTIG, Dentscho KERJASCHKI a Pilar GARIN-CHESA, 2005. Characterization of cancer stroma markers: In silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immunity* [online]. **5**(1), 1–9. Dostupné z: doi:10.1158/1424-9634.DCL-10.5.1
- DWYER, Chrissa A., Wenya Linda BI, Mariano S. VIAPIANO a Russell T. MATTHEWS, 2014. Brevican knockdown reduces late-stage glioma tumor aggressiveness. *Journal of Neuro-Oncology* [online]. **120**(1), 63–72. Dostupné z: doi:10.1007/s11060-014-1541-z
- DZIEMBOWSKA, Magdalena, Malgorzata DANILKIEWICZ, Aleksandra WESOŁOWSKA, Agata ZUPANSKA, Salem CHOUAIB a Bożena KAMINSKA, 2007. Cross-talk between Smad and p38 MAPK signalling in transforming growth factor b signal transduction in human glioblastoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **354**(4), 1101–1106. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.113
- EBERT, Lisa M., Wenbo YU, Tessa GARGETT, John TOUBIA, Paris M. KOLLIS, Melinda N. TEA, Brenton W. EBERT, Cedric BARDY, Mark VAN DEN HURK, Claudine S. BONDER, Jim MANAVIS, Kathleen S. ENSBEY, Mariana OKSDATH MANSILLA, Kaitlin G. SCHEER, Sally L. PERRIN, Rebecca J. ORMSBY, Santosh POONNOOSE, Barbara KOSZYCA, Stuart M. PITSON, Bryan W. DAY, Guillermo A. GOMEZ a Michael P. BROWN, 2020. Endothelial, pericyte and tumor cell expression in glioblastoma identifies fibroblast activation protein (FAP) as an excellent target for immunotherapy. *Clinical and Translational Immunology* [online]. **9**(10), e1191. Dostupné z: doi:10.1002/cti2.1191
- EDOSADA, Conrad Yap, Clifford QUAN, Thuy TRAN, Victoria PHAM, Christian WIESMANN, Wayne FAIRBROTHER a Beni B. WOLF, 2006. Peptide substrate profiling defines fibroblast activation protein as an endopeptidase of strict Gly2-Pro1-cleaving specificity. *FEBS Letters* [online]. **580**(6), 1581–1586. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2006.01.087
- ELANGO, Jeevithan, Chunyu HOU, Bin BAO, Shujun WANG, José Eduardo Maté Sánchez DE VAL

- a Wu WENHUI, 2022. The Molecular Interaction of Collagen with Cell Receptors for Biological Function. *Polymers* [online]. **14**(5), 876. Dostupné z: doi:10.3390/polym14050876
- ENSENYAT-MENDEZ, Miquel, Sandra ÍÑIGUEZ-MUÑOZ, Borja SESÉ a Diego M MARZESE, 2021. iGlioSub: an integrative transcriptomic and epigenomic classifier for glioblastoma molecular subtypes. *BioData Mining* [online]. **14**(1), 1–16. Dostupné z: doi:10.1186/s13040-021-00273-8
- ERAT, Michèle C., Barbara SLADEK, Iain D. CAMPBELL a Ioannis VAKONAKIS, 2013. Structural analysis of collagen type I interactions with human fibronectin reveals a cooperative binding mode. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **288**(24), 17441–17450. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M113.469841
- FAN, Ming Hui, Qiang ZHU, Hui Hua LI, Hyun Jeong RA, Sonali MAJUMDAR, Dexter L. GULICK, Jacob A. JEROME, Daniel H. MADSEN, Melpo CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, David W. SPEICHER, William W. BACHOVCHIN, Carol FEGHALI-BOSTWICK a Ellen PURÉ, 2016. Fibroblast activation protein (FAP) accelerates collagen degradation and clearance from lungs in mice. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **291**(15), 8070–8089. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M115.701433
- FARIN, Azadeh, Satoshi O SUZUKI, Michael WEIKER, James E GOLDMAN, Jeffrey N BRUCE a Peter CANOLL, 2006. Transplanted Glioma Cells Migrate and Proliferate on Host Brain Vasculature : A Dynamic Analysis. *Glia* [online]. **53**(8), 799–808. Dostupné z: doi:10.1002/glia.20334
- FAYZULLIN, Artem, Cecilie J. SANDBERG, Matthew SPREADBURY, Birthe Mikkelsen SABERNIAK, Zanina GRIEG, Erlend SKAGA, Iver A. LANGMOEN a Einar O. VIK-MO, 2019. Phenotypic and Expressional Heterogeneity in the Invasive Glioma Cells. *Translational Oncology* [online]. **12**(1), 122–133. Dostupné z: doi:10.1016/j.tranon.2018.09.014
- FEARON, Douglas T, 2014. The Carcinoma-Associated Fibroblast Expressing Fibroblast Activation Protein and Escape from Immune Surveillance. *Cancer immunology research* [online]. **2**(3), 187–193. Dostupné z: doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0002
- FENG, H., B. HU, K. VUORI, J. N. SARKARIA, F. B. FURNARI, W. K. CAVENEE a S. Y. CHENG, 2014. EGFRvIII stimulates glioma growth and invasion through PKA-dependent serine phosphorylation of Dock180. *Oncogene* [online]. **33**(19), 2504–2512. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2013.198
- FERRER, Valéria Pereira, Vivaldo MOURA NETO a Rolf MENTLEIN, 2018. Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators. *Glia* [online]. **66**(8), 1542–1565. Dostupné z: doi:10.1002/glia.23309
- FREI, Karl, Dorothee GRAMATZKI, Isabel TRITSCHLER, Judith Johanna SCHROEDER, Larisa ESPINOZA, Elisabeth Jane RUSHING a Michael WELLER, 2015. Transforming growth factor- β pathway activity in glioblastoma. *Oncotarget* [online]. **6**(8), 5963–5977. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.3467
- FUJITA, Motomichi, Tetsuya YAMAMOTO, Takuya IYODA, Tatsuya FUJISAWA, Manabu SASADA, Reo NAGAI, Chikako KUDO, Kazuki OTSUKA, Sadahiro KAMIYA, Hiroaki KODAMA a Fumio FUKAI, 2019. Aggressive Progression in Glioblastoma Cells through Potentiated Activation of Integrin $\alpha 5 \beta 1$ by the Tenascin-C-Derived Peptide TNIIIA2. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. **18**(9), 1649–1658. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-1251
- GARCION, E., A. FAISSNER a C. FFRENCH-CONSTANT, 2001. Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development* [online]. **128**(13), 2485–2496. Dostupné z: doi:10.1242/dev.128.13.2485
- GARCION, Emmanuel, Aida HALILAGIC, Andreas FAISSNER a Charles FFRENCH-CONSTANT, 2004. Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecular tenascin C. *Development* [online]. **131**(14), 3423–3432. Dostupné z: doi:10.1242/dev.128.13.2485

z: doi:10.1242/dev.01202

GARIN-CHESA, Pilar, Lloyd J OLD a Wolfgang J RETTIG, 1990. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **87**(18), 7235–7239. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.87.18.7235

GARWOOD, Jeremy, Emmanuel GARCION, Alexandre DOBBERTIN, Nicolas HECK, Valerie CALCO, Charles FFRENCH-CONSTANT a Andreas FAISSNER, 2004. The extracellular matrix glycoprotein Tenascin-C is expressed by oligodendrocyte precursor cells and required for the regulation of maturation rate, survival and responsiveness to platelet-derived growth factor. *European Journal of Neuroscience* [online]. **20**(10), 2524–2540. Dostupné z: doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03727.x

GHERSI, Giulio, Huan DONG, Leslie A GOLDSTEIN, Yunyun YEH, Lari HAKKINEN, Hannu S LARJAVA a Wen-tien CHEN, 2002. Regulation of Fibroblast Migration on Collagenous Matrix by a Cell Surface Peptidase Complex. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **277**(32), 29231–29241. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M202770200

GHERSI, Giulio, Qiang ZHAO, Monica SALAMONE, Yunyun YEH, Stanley ZUCKER a Wen-tien CHEN, 2006. The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. *Cancer Research* [online]. **66**(9), 4652–4661. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1245

GHOSH, Asish K, Swati BHATTACHARYYA a John VARGA, 2004. The Tumor Suppressor p53 Abrogates Smad-dependent Collagen Gene Induction in Mesenchymal Cells. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(46), 47455–47463. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M403477200

GOTTSCHLING, Christine, David WEGRZYN, Bernd DENECKE a Andreas FAISSNER, 2019. Elimination of the four extracellular matrix molecules tenascin-C, tenascin-R, brevican and neurocan alters the ratio of excitatory and inhibitory synapses. *Scientific Reports* [online]. **9**(1), 1–17. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-50404-9

GRITSENKO, Pavlo, William LEENDERS a Peter FRIEDL, 2017. Recapitulating in vivo-like plasticity of glioma cell invasion along blood vessels and in astrocyte-rich stroma. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. **148**(4), 395–406. Dostupné z: doi:10.1007/s00418-017-1604-2

HAGIHARA, Kazuki, Ryu MIURA, Rika KOSAKI, Erik BERGLUND, Barbara RANSCHT a Yu YAMAGUCHI, 1999. Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: Colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *Journal of Comparative Neurology* [online]. **410**(2), 256–264. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19990726)410:2<256::AID-CNE7>3.0.CO;2-5

HASEGAWA, Minoru, Yukiyo MATSUSHITA, Mayuka HORIKAWA, Kiyoshi HIGASHI, Yoshitaka TOMIGAHARA, Hideo KANEKO, Fumiaki SHIRASAKI, Manabu FUJIMOTO, Kazuhiko TAKEHARA a Shinichi SATO, 2009. A Novel Inhibitor of Smad-Dependent Transcriptional Activation Suppresses Tissue Fibrosis in Mouse Models of Systemic Sclerosis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* [online]. **60**(11), 3465–3475. Dostupné z: doi:10.1002/art.24934

HE, Jintang, Yashu LIU, Thant ZHU, Jianhui ZHU, Francesco DIMECO, Angelo L VESCOVI, Jason A HETH, Karin M MURASZKO, Xing FAN a David M LUBMAN, 2012. CD90 is Identified as a Candidate Marker for Cancer Stem Cells in Primary High-Grade Gliomas Using Tissue Microarrays. *Molecular and Cellular Proteomics* [online]. **11**(6), 10.1074/mcp.M111.010744–1-10.1074/mcp.M111.010744. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M111.010744

HEROLD-MENDE, Christel, Margareta M. MUELLER, Mario M. BONSANTO, Horst Peter SCHMITT, Stefan KUNZE a Hans Herbert STEINER, 2002. Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *International Journal of Cancer* [online]. **98**(3),

362–369. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.10233

HIGASHINO, Nobuhide, Yu-ichiro KOMA, Masayoshi HOSONO, Nobuhisa TAKASE, Maiko OKAMOTO, Himiko KODAIRA, Mari NISHIO, Manabu SHIGEOKA, Yoshihiro KAKEJI a Hiroshi YOKOZAKI, 2019. Fibroblast activation protein-positive fibroblasts promote tumor progression through secretion of CCL2 and interleukin-6 in esophageal squamous cell carcinoma. *Laboratory Investigation* [online]. **99**(6), 777–792. Dostupné z: doi:10.1038/s41374-018-0185-6

HIRATA, Eishu, Yoshiki ARAKAWA, Mitsuaki SHIRAHATA, Makoto YAMAGUCHI, Yo KISHI, Takashi OKADA, Jun A. TAKAHASHI, Michiyuki MATSUDA a Nobuo HASHIMOTO, 2009. Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Science* [online]. **100**(8), 1451–1459. Dostupné z: doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01189.x

HOSAKA, Kayoko, Yunlong YANG, Takahiro SEKI, Carina FISCHER, Olivier DUBEY, Erik FREDLUND, Johan HARTMAN, Piotr RELIGAD, Hiromasa MORIKAWA, Yoko ISHII, Masakiyo SASAHARA, Ola LARSSON, Giulio COSSU, Renhai CAO, Sharon LIM a Yihai CAO, 2016. Pericyte – fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **113**(38), E5618–E5627. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1608384113

HOSSAIN, Anwar, Joy GUMIN, Feng GAO, Javier FIGUEROA, Naoki SHINOJIMA, Waldemar PRIEBE, Diana VILLARREAL, Seok-gu KANG, Celine JOYCE, Qianghu WANG, Frank C MARINI, Michael ANDREEFF, Howard COLMAN a Frederick F LANG, 2015. Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6/gp130/STAT3 Pathway. *Stem cell* [online]. **33**(8), 2400–2415. Dostupné z: doi:10.1002/stem.2053

HU, Bin, Leopold L. KONG, Russell T. MATTHEWS a Mariano S. VIAPIANO, 2008. The proteoglycan brevican binds to fibronectin after proteolytic cleavage and promotes glioma cell motility. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(36), 24848–24859. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M801433200

HUANG, Menggui, Constantinos KOUMENIS, Yi FAN, Menggui HUANG, Tianrun LIU, Peihong MA, R Alan Mittee JR, Zhenting ZHANG, Hyun Jun KIM, Eujin YEO, Duo ZHANG, Yanqing GONG, Constantinos KOUMENIS a Yi FAN, 2016. c-Met – mediated endothelial plasticity drives aberrant vascularization and chemoresistance in glioblastoma. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. **126**(5), 1801–1814. Dostupné z: doi:10.1172/JCI84876

HUANG, Yan, Avis E SIMMS, Anna MAZUR, Sophie WANG, Noel R LEO, Nazneen AZIZ a Thomas KELLY, 2011. Fibroblast activation protein-1 promotes tumor growth and invasion of breast cancer cells through non-enzymatic functions. *Clinical & Experimental Metastasis* [online]. **28**(6), 567–579. Dostupné z: doi:10.1007/s10585-011-9392-x

HUIJBERS, Ivo J., Marjan IRAVANI, Sergey POPOV, David ROBERTSON, Safa AL-SARRAJ, Chris JONES a Clare M. ISACKE, 2010. A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion. *PLoS ONE* [online]. **5**(3), e9808. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0009808

HYTTIÄINEN, Marko, Carita PENTTINEN a Jorma KESKI-OJA, 2004. Latent TGF- β Binding Proteins: Extracellular Matrix Association and Roles in TGF- β Activation. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* [online]. **41**(3), 233–264. Dostupné z: doi:10.1080/10408360490460933

IGNOTZS, Ronald A a Joan MASSAGUE, 1986. Transforming Growth Factor- β Stimulates the Expression of Fibronectin and Collagen and Their Incorporation into the Extracellular Matrix. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **261**(9), 4337–4345. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(17)35666-1

ILUNGA, Kalembeiyi, Rika NISHIURA, Hiroyasu INADA, Amro EL-KAREF, Kyoko IMANAKA-YOSHIDA, Teruyo SAKAKURA a Toshimichi YOSHIDA, 2004. Co-stimulation of human breast

cancer cells with transforming growth factor- β and tenascin-C enhances matrix metalloproteinase-9 expression and cancer cell invasion. *International Journal of Experimental Pathology* [online]. **85**(6), 373–379. Dostupné z: doi:10.1111/j.0959-9673.2004.00406.x

JAMBUNATHAN, Kalyani, Douglas S. WATSON, Aaron N. ENDSLEY, Krishna KODUKULA a Amit K. GALANDE, 2012. Comparative analysis of the substrate preferences of two post-proline cleaving endopeptidases, prolyl oligopeptidase and fibroblast activation protein α . *FEBS Letters* [online]. **586**(16), 2507–2512. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2012.06.015

JIANG, L., J. ZHOU, D. ZHONG, Y. ZHOU, W. ZHANG, W. WU, Z. ZHAO, W. WANG, W. XU, L. HE, Y. MA, Y. HU, W. ZHANG a J. LI, 2017. Overexpression of SMC4 activates TGF β /Smad signaling and promotes aggressive phenotype in glioma cells. *Oncogenesis* [online]. **6**(3), e301. Dostupné z: doi:10.1038/oncsis.2017.8

JOHANNNS, Tanner M., Yujie FU, Dale K. KOBAYASHI, Yu MEI, Ian F. DUNN, Diane D. MAO, Albert H. KIM a Gavin P. DUNN, 2016. High incidence of TERT mutation in brain tumor cell lines. *Brain Tumor Pathology* [online]. **33**(3), 222–227. Dostupné z: doi:10.1007/s10014-016-0257-5

JOSEPH, Justin V., Capucine R. MAGAUT, Simon STOREVIK, Luiz H. GERALDO, Thomas MATHIVET, Md Abdul LATIF, Justine RUDEWICZ, Joris GUYON, Matteo GAMBARETTI, Frida HAUKAS, Amalie TRONES, Jubayer A. RØMO YSTAAS, LARS A. HOSSAIN, Sandra NINZIMA, Sylvain CUVEL a Hrvoje MILETIC, 2022. TGF- β promotes microtubule formation in glioblastoma through thrombospondin 1. *Neuro-Oncology* [online]. **24**(4), 541–553. Dostupné z: doi:10.1093/neuonc/noab212

JUBAN, Gaëtan, Marielle SACLIER, Houda YACOUB-YOUSSEF, Amel KERNOU, Ludovic ARNOLD, Camille BOISSON, Sabrina BEN LARBI, Mélanie MAGNAN, Sylvain CUVELLIER, Marine THÉRET, Basil J. PETROF, Isabelle DESGUERRE, Julien GONDIN, Rémi MOUNIER a Bénédicte CHAZAUD, 2018. AMPK Activation Regulates LTBP4-Dependent TGF- β 1 Secretion by Pro-inflammatory Macrophages and Controls Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell Reports* [online]. **25**(8), 2163–2176.e6. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2018.10.077

KABIR, Farzana a Mohd Nazmul Hasan APU, 2022. Multi-omics analysis predicts fibronectin 1 as a prognostic biomarker in glioblastoma multiforme. *Genomics* [online]. **114**(3), 110378. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygeno.2022.110378

KAMINSKA, Bozena a Salvador CYRANOWSKI, 2020. Recent Advances in Understanding Mechanisms of TGF Beta Signaling and Its Role in Glioma Pathogenesis. In: *Glioma Signaling* [online]. s. 179–201. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-30651-9_9

KANG, Jeong-han, Mi-yeon JUNG, Xueqian YIN, Mahefatiana ANDRIANIFAHANANA, Danielle M HERNANDEZ a Edward B LEOF, 2017. Cell-penetrating peptides selectively targeting SMAD3 inhibit profibrotic TGF- β signaling. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. **127**(7), 2541–2554. Dostupné z: doi:10.1172/JCI88696

KARUS, Michael, Bernd DENECKE, Charles FFRENCH-CONSTANT, Stefan WIESE a Andreas FAISSNER, 2011. The extracellular matrix molecule tenascin C modulates expression levels and territories of key patterning genes during spinal cord astrocyte specification. *Development* [online]. **138**(24), 5321–5331. Dostupné z: doi:10.1242/dev.067413

KATT, Moriah E., Raleigh M. LINVILLE, Lakyn N. MAYO, Zinnia S. XU a Peter C. SEARSON, 2018. Functional brain-specific microvessels from iPSC-derived human brain microvascular endothelial cells: The role of matrix composition on monolayer formation. *Fluids and Barriers of the CNS* [online]. **15**(1), 1–12. Dostupné z: doi:10.1186/s12987-018-0092-7

KAUFMAN, L J, C P BRANGWYNNE, K E KASZA, E FILIPPIDI, V D GORDON, T S DEISBOECK a D A WEITZ, 2005. Glioma Expansion in Collagen I Matrices : Analyzing Collagen Concentration-Dependent Growth and Motility Patterns. *Biophysical Journal* [online]. **89**(1), 635–650. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.105.061994

KEANE, Fiona M., Naveed A. NADVI, Tsun Wen YAO a Mark D. GORRELL, 2011. Neuropeptide Y, B-type natriuretic peptide, substance P and peptide YY are novel substrates of fibroblast activation protein- α . *The FEBS Journal* [online]. **278**(8), 1316–1332. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08051.x

KELLER, Stefanie a Mirko H.H. SCHMIDT, 2017. EGFR and EGFRvIII promote angiogenesis and cell invasion in glioblastoma: Combination therapies for an effective treatment. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **18**(6), 1295. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18061295

KIM, Jun-kyum, Xiong JIN, Young-woo SOHN, Xun JIN, Hee-young JEON, Eun-jung KIM, Seok WON, Hye-min JEON, So-young CHANG, Se-yeong OH, Jinlong YIN, Sung-hak KIM, Jong BAE, Ichiro NAKANO a Hyunggee KIM, 2014. Tumoral RANKL activates astrocytes that promote glioma cell invasion through cytokine signaling. *Cancer Letters* [online]. **353**(2), 194–200. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2014.07.034

KIM, Youngmi, Yun Sil LEE, Jongseon CHOE, Hansoo LEE, Young Myeong KIM a Dooil JEOUNG, 2008. CD44-epidermal growth factor receptor interaction mediates hyaluronic acid-promoted cell motility by activating protein kinase C signaling involving Akt, Rac1, Phox, reactive oxygen species, focal adhesion kinase, and MMP-2. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(33), 22513–22528. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M708319200

KJELLMAN, Christian, Sabine P. OLOFSSON, Oscar HANSSON, Magnus SCHANTZ, TORBJÖRN VON LINDVALL, Ingar NILSSON, Leif G. SALFORD, Hans-Olov SJÖGREN a Bengt WIDEGREN, 2000. Expression of TGF- β isoforms, TGF- β receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *International Journal of Cancer* [online]. **89**(3), 251–258. Dostupné z: doi:10.1002/1097-0215(20000520)89:3<251::AID-IJC7>3.0.CO;2-5

KLANK, Rebecca L., Stacy A. DECKER GRUNKE, Benjamin L. BANGASSER, Colleen L. FORSTER, Matthew A. PRICE, Thomas J. THOMAS J. ODDE, Karen S. SANTACRUZ, Steven S. ROSENFELD, Peter CANOLL, Eva A. TURLEY, James B. MCCARTHY, John R. OHLFEST a David J. ODDE, 2017. Biphasic Dependence of Glioma Survival and Cell Migration on CD44 Expression Level. *Cell Reports* [online]. **18**(1), 23–31. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2016.12.024.

KOCZOROWSKA, M M, S THOLEN, F BUCHER, L LUTZ, J N KIZHAKKEDATHU, O De WEVER, U F WELLNER, M L BINIOSSEK, A. STAHLB, S. LASSMANN a O. SCHILLING, 2016. Fibroblast activation protein- α , a stromal cell surface protease , shapes key features of cancer associated fibroblasts through proteome and degradome alterations. *Molecular Oncology* [online]. **10**(1), 40–58. Dostupné z: doi:10.1016/j.molonc.2015.08.001

KOSHY, Matthew, John L. VILLANO, Therese A. DOLECEK, Andrew HOWARD, Usama MAHMOOD, Steven J. CHMURA, Ralph R. WEICHSELBAUM a Bridget J. MCCARTHY, 2012. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *Journal of Neuro-Oncology* [online]. **107**(1), 207–212. Dostupné z: doi:10.1007/s11060-011-0738-7

KREPELA, Evzen, Zdislava VANICKOVA, Petr HRABAL, Michal ZUBAL, Barbora CHMIELOVA, Eva BALAZIOVA, Petr VYMOLA, Ivana MATRASOVA, Petr BUSEK a Aleksí SEDO, 2021. Regulation of Fibroblast Activation Protein by Transforming Growth Factor Beta-1 in Glioblastoma Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(3), 1046. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22031046

LAL, Anita, Alex E LASH, Stephen F ALTSCHUL, Victor VELCULESCU, Lin ZHANG, Roger E MCLENDON, Marco A MARRA, Christa PRANGE, Patrice J MORIN, Kornelia POLYAK, Nickolas PAPADOPOULOS, Bert VOGELSTEIN, Kenneth W KINZLER, Robert L STRAUSBERG a Gregory J RIGGINS, 1999. A Public Database for Gene Expression in Human Cancers. *Cancer Research*. **59**(21), 5403–5407.

LE, Nguyen Quoc Khanh, Truong Nguyen Khanh HUNG, Duyen Thi DO, Luu Ho Thanh LAM, Luong Huu DANG a Tuan-Tu HUYNH, 2021. Radiomics-based machine learning model for efficiently classifying transcriptome subtypes in glioblastoma patients from MRI. *Computers in*

Biology and Medicine [online]. **132**, 104320. Dostupné z: doi:10.1016/j.compbimed.2021.104320

LEE, Hyung-ok, Stefanie R MULLINS, Janusz FRANCO-BARRAZA, Matthildi VALIANOU, Edna CUKIERMAN a Jonathan D CHENG, 2011. FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* [online]. **11**(1), 1–13. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2407-11-245

LEE, Jeongwu, Svetlana KOTLIAROVA, Yuri KOTLIAROV, Aiguo LI, Qin SU, Nicholas M DONIN, Sandra PASTORINO, Benjamin W PUROW, Neil CHRISTOPHER, Wei ZHANG, John K PARK a Howard A FINE, 2006. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* [online]. **9**(5), 391–403. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2006.03.030

LEINS, Alexander, Pietro RIVA, Ragnar LINDSTEDT, Michail S DAVIDOFF, Parviz MEHRAEIN a Serge WEIS, 2003. Expression of Tenascin-C in Various Human Brain Tumors and its Relevance for Survival in Patients with Astrocytoma. *Cancer* [online]. **98**(11), 2430–2439. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.11796

LEITLEIN, Jens, Steffen AULWURM, Robert WALTEREIT, Ulrike NAUMANN, Bettina WAGENKNECHT, Wolfgang GARTEN, Michael WELLER a Michael PLATTEN, 2001. Processing of Immunosuppressive Pro-TGF- β 1,2 by Human Glioblastoma Cells Involves Cytoplasmic and Secreted Furin-Like Proteases. *The Journal of Immunology* [online]. **166**(12), 7238–7243. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.166.12.7238

LI, Ming, Guoping LI, Juri KIYOKAWA, Zain TIRMIZI, Leland G RICHARDSON, Jianfang NING, Saumya DAS, Robert L MARTUZA, Anat STEMMER-RACHAMIMOV, Samuel D RABKIN a Hiroaki WAKIMOTO, 2020. Characterization and oncolytic virus targeting of FAP-expressing tumor-associated pericytes in glioblastoma. *Acta Neuropathologica Communications* [online]. **8**(1), 1–13. Dostupné z: doi:10.1186/s40478-020-01096-0

LIAO, Yu-xiang, Zhi-ping ZHANG, Jie ZHAO a Jing-Ping LIU, 2018. Effects of Fibronectin 1 on Cell Proliferation, Senescence and Apoptosis of Human Glioma Cells Through the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry* [online]. **48**(3), 1382–1396. Dostupné z: doi:10.1159/000492096

LIBERATI, Nicole T., Michael B. DATTO, Joshua P. FREDERICK, Xing SHEN, Carolyn WONG, Elissa M. ROUGIER-CHAPMAN a Xiao Fan WANG, 1999. Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **96**(9), 4844–4849. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.9.4844

LIN, Tsung Cheng, Cheng Han YANG, Li Hsin CHENG, Wen Tsan CHANG, Yuh Rong LIN a Hung Chi CHENG, 2020. Fibronectin in cancer: Friend or foe. *Cells* [online]. **9**(1), 27. Dostupné z: doi:10.3390/cells9010027

LO, Albert, Liang-Chuan S. WANG, John SCHOLLER, James MONSLOW, Diana AVERY, Kheng NEWICK, Shaun O'BRIEN, Rebecca A. EVANS, David J. BAJOR, Cynthia CLENDENIN, Amy C. DURHAM, Elizabeth L. BUZA, Robert H. VONDERHEIDE, Carl H. JUNE, Steven M. ALBELDA a Ellen PURÉ, 2015. Tumor-Promoting Desmoplasia Is Disrupted by Depleting FAP-Expressing Stromal Cells. *Cancer Research* [online]. **75**(14), 2800–2810. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3041

LOUIS, David N., Arie PERRY, Pieter WESSELING, Daniel J. BRAT, Ian A. CREE, Dominique FIGARELLA-BRANGER, Cynthia HAWKINS, H. K. NG, Stefan M. PFISTER, Guido REIFENBERGER, Riccardo SOFFIETTI, Andreas VON DEIMLING a David W. ELLISON, 2021. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro-Oncology* [online]. **23**(8), 1231–1251. Dostupné z: doi:10.1093/neuonc/noab106

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR a R. J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* [online]. **193**(1), 265–275.

Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)

LUGASSY, Claire, Raymond I HAROUN, Henry BREM, Betty M TYLER, Robert V JONES, Patricia M FERNANDEZ, D PH, Steven R PATIERNO, D PH, Hynda K KLEINMAN, D PH a Raymond L BARNHILL, 2002. Pericytic-Like Angiotropism of Glioma and Melanoma Cells. *The American journal of dermatopathology* [online]. **24**(6), 473–478. Dostupné z: doi:10.1097/00000372-200212000-00003

LUO, Ning, Qiyu GUAN, Lihua ZHENG, Xiaoyan QU, Hong DAI a Zhongping CHENG, 2014. Estrogen-mediated activation of fibroblasts and its effects on the fibroid cell proliferation. *Translational Research* [online]. **163**(3), 232–241. Dostupné z: doi:10.1016/j.trsl.2013.11.008

LV, Baobei, F E I XIE, Pengxiang ZHAO, Xuemei MA, W E N G JIANG, Jing YU, Xiaodong ZHANG a J U N JIA, 2016. Promotion of Cellular Growth and Motility Is Independent of Enzymatic Activity of Fibroblast Activation Protein- α . *Cancer Genomics & Proteomics*. **13**(3), 201–208.

MA, Sirui, Soumon RUDRA, Jian L CAMPIAN, Sonika DAHIYA, Gavin P DUNN, Tanner JOHANNIS, Michael GOLDSTEIN, Albert H KIM a Jiayi HUANG, 2020. Prognostic impact of CDKN2A/B deletion, TERT mutation, and EGFR amplification on histological and molecular IDH-wildtype glioblastoma. *Neuro-Oncology Advances* [online]. **2**(1), 1–11. Dostupné z: doi:10.1093/oaajnl/vdaa126

MAMMOTO, Tadanori, Amanda JIANG, Elisabeth JIANG, Dipak PANIGRAHY, Mark W. KIERAN a Akiko MAMMOTO, 2013. Role of collagen matrix in tumor angiogenesis and glioblastoma multiforme progression. *The American Journal of Pathology* [online]. **183**(4), 1293–1305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajpath.2013.06.026

MARIS, C., S. RORIVE, F. SANDRAS, N. D'HAENE, N. SADEGHI, I. BIÈCHE, M. VIDAUD, C. DECAESTECKER a I. SALMON, 2008. Tenascin-C expression relates to clinicopathological features in pilocytic and diffuse astrocytomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology* [online]. **34**(3), 316–329. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2990.2007.00898.x

MATRASOVA, Ivana, Petr BUSEK, Eva BALAZIOVA a Aleksí SEDO, 2017. Heterogeneity of molecular forms of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein in human glioblastomas. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc* [online]. **161**(3), 252–260. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2017.010

MENG, Li, Xiaoyi WANG, Weihua LIAO, Jianling LIU, Yiwei LIAO a Qionqiong HE, 2017. BAF53a is a potential prognostic biomarker and promotes invasion and epithelial-mesenchymal transition of glioma cells. *Oncology Reports* [online]. **38**(6), 3327–3334. Dostupné z: doi:10.3892/or.2017.6019

MENTLEIN, Rolf, Kirsten HATTERMANN, Achim A JUNGBLUTH a Janka HELD-FEINDT, 2011. Expression and role of the cell surface protease seprase/fibroblast activation protein- α (FAP- α) in astroglial tumors. *Biological Chemistry* [online]. **392**(3), 199–207. Dostupné z: doi:10.1515/BC.2010.119

MHAWECH-FAUCEGLIA, Paulette, Li YAN, Maryam SHARIFIAN, Xing REN, Song LIU, Grace KIM, Tanja GAYTHER, SIMON A. PEJOVIC a Kate LAWRENSON, 2015. Stromal Expression of Fibroblast Activation Protein Alpha (FAP) Predicts Platinum Resistance and Shorter Recurrence in patients with Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Microenvironment* [online]. **8**(1), 23–31. Dostupné z: doi:10.1007/s12307-014-0153-7

MILLS, S.J., D. du PLESSIS, P. PAL, G. THOMPSON, G. BUONACORRSI, C. SOH, G.J.M. PARKER a A. JACKSON, 2016. Mitotic Activity in Glioblastoma Correlates with Estimated Extravascular Extracellular Space Derived from Dynamic Contrast-Enhanced MR Imaging. *American Journal of Neuroradiology* [online]. **37**(5), 811–817. Dostupné z: doi:10.3174/ajnr.A4623

MILNER, Jennifer M., Lara KEVORKIAN, David A. YOUNG, Debra JONES, Robin WAIT, Simon

- T. DONELL, Emma BARKSBY, Angela M. PATTERSON, Jim MIDDLETON, Benjamin F. CRAVATT, Ian M. CLARK, Andrew D. ROWAN a Timothy E. CAWSTON, 2006. Fibroblast activation protein alpha is expressed by chondrocytes following a pro-inflammatory stimulus and is elevated in osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy* [online]. **8**(1), 1–8. Dostupné z: doi:10.1186/ar1877
- MOHIUDDIN, Enaya a Hiroaki WAKIMOTO, 2021. Extracellular matrix in glioblastoma: opportunities for emerging therapeutic approaches. *American Journal of Cancer Research*. **11**(8), 3742–3754.
- MONTEMURRO, Nicola, 2020. *Glioblastoma Multiforme and Genetic Mutations: The Issue Is Not over Yet. An Overview of the Current Literature* [online]. 2020. Dostupné z: doi:10.1055/s-0039-1688911
- MOTEGI, Hiroaki, Yuuta KAMOSHIMA, Shunsuke TERASAKA, Hiroyuki KOBAYASHI a Kiyohiro HOUKIN, 2014. Type 1 collagen as a potential niche component for CD133-positive glioblastoma cells. *Neuropathology* [online]. **34**(3), 378–385. Dostupné z: doi:10.1111/neup.12117
- MULLEN, Alan C., David A. ORLANDO, Jamie J. NEWMAN, Jakob LOVÉN, Roshan M. KUMAR, Steve BILODEAU, Jessica REDDY, Matthew G. GUENTHER, Rodney P. DEKOTER a Richard A. YOUNG, 2011. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell* [online]. **147**(3), 565–576. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.08.050
- NAKANO, Atsuhisa, Eiichi TANI, Kaoru MIYAZAKI, Yoshihiro YAMAMOTO a Jun-ichi FURUYAMA, 1995. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas. *Journal of Neurosurgery* [online]. **83**(2), 298–307. Dostupné z: doi:10.3171/jns.1995.83.2.0298
- NG, Justin Choon Hwee, Angela An Qi SEE, Ting Yao ANG, Lysia Yan Rong TAN, Beng Ti ANG a Nicolas Kon Kam KING, 2019. Effects of surgery on neurocognitive function in patients with glioma: a meta-analysis of immediate post-operative and long-term follow-up neurocognitive outcomes. *Journal of Neuro-Oncology* [online]. **141**(1), 167–182. Dostupné z: doi:10.1007/s11060-018-03023-9
- NICULESCU-DUVAZ, Ioana, Mysore K PHANISH, Paul COLVILLE-NASH a Mark E C DOCKRELL, 2007. The TGF β 1-Induced Fibronectin in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells Is p38 MAP Kinase Dependent and Smad Independent. *Nephron Experimental Nephrology* [online]. **105**(4), e108–e116. Dostupné z: doi:10.1159/000100492
- NIEDERMEYER, Joachim, Barbara ENENKEL, John E. PARK, Martin LENTER, Wolfgang J. RETTIG, Klaus DAMM a Andreas SCHNAPP, 1998. Mouse fibroblast-activation protein - Conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease. *European Journal of Biochemistry* [online]. **254**(3), 650–654. Dostupné z: doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2540650.x
- NISHIO, Takeshi, Saburo KAWAGUCHI, Tsutomu ISEDA, Takayuki KAWASAKI a Takao HASE, 2003. Secretion of tenascin-C by cultured astrocytes: Regulation of cell proliferation and process elongation. *Brain Research* [online]. **990**(1–2), 129–140. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-8993(03)03448-6
- NONOGUCHI, Naosuke, Takashi OHTA, Ji Eun OH, Young Ho KIM, Paul KLEIHUES a Hiroko OHGAKI, 2013. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathologica* [online]. **126**(6), 931–937. Dostupné z: doi:10.1007/s00401-013-1163-0
- OSTROM, Quinn T., Haley GITTLEMAN, Gabrielle TRUITT, Alexander BOSCIA, Carol KRUCHKO a Jill S. BARNHOLTZ-SLOAN, 2018. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro-Oncology* [online]. **20**(suppl_4), iv1–iv86. Dostupné z: doi:10.1093/neuonc/noy131
- OUANOUI, Amira, Sylvie LAMY a Borhane ANNABI, 2017. Anthocyanidins inhibit epithelial–mesenchymal transition through a TGF β /Smad2 signaling pathway in glioblastoma cells. *Molecular*

Carcinogenesis [online]. **56**(3), 1088–1099. Dostupné z: doi:10.1002/mc.22575

PARK, Ae Kyung, Pora KIM, Leomar Y BALLESTER, Yoshua ESQUENAZI a Zhongming ZHAO, 2019. Subtype-specific signaling pathways and genomic aberrations associated with prognosis of glioblastoma. *Neuro-Oncology* [online]. **21**(1), 59–70. Dostupné z: doi:10.1093/neuonc/noy120

PARK, John E, Martin C LENTER, Rainer N ZIMMERMANN, Pilar GARIN-CHESA, Lloyd J OLD a Wolfgang J RETTIG, 1999. Fibroblast Activation Protein, a Dual Specificity Serine Protease Expressed in Reactive Human Tumor Stromal Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **274**(51), 36505–36512. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.51.36505

PATSOURAS, Dimitrios, Kostis PAPAXOINIS, Alkiviadis KOSTAKIS a Polyxeni SAFIOLEAS, MICHAEL C. LAZARIS, ANDREAS C. NICOLOPOULOU-STAMATI, 2015. Fibroblast activation protein and its prognostic significance in correlation with vascular endothelial growth factor in pancreatic adenocarcinoma. *Molecular Medicine Reports* [online]. **11**(6), 4585–4590. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2015.3259

PIÑEIRO-SÁNCHEZ, Mayra L., Leslie A. GOLDSTEIN, Johannes DODT, Linda HOWARD, Yunyun YEH a Wen Tien CHEN, 1997. Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(12), 7595–7601. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.12.7595

PINEL, Sophie, Noémie THOMAS, Cédric BOURA a Muriel BARBERI-HEYOB, 2019. Approaches to physical stimulation of metallic nanoparticles for glioblastoma treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **138**, 344–357. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2018.10.013

PINNELL, S. R., 1985. Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: A review. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. **58**(6), 553–559.

PLATTEN, Michael, Wolfgang WICK, Christine WILD-BODE, Steffen AULWURM, Johannes DICHGANS a Michael WELLER, 2000. Transforming Growth Factors β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 2 Promote Glioma Cell Migration via Up-Regulation of α V β 3 Integrin Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **268**(2), 607–611. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.2000.2176

POINTER, Kelli B, Paul A CLARK, Alexandra B SCHROEDER, M Shahriar SALAMAT, Kevin W ELICEIRI a John S KUO, 2016. Association of collagen architecture with glioblastoma patient survival. *Journal of Neurosurgery* [online]. **126**(6), 1812–1821. Dostupné z: doi:10.3171/2016.6.JNS152797

POLLARD, Steven M, Koichi YOSHIKAWA, Ian D CLARKE, Davide DANONI, Stefan STRICKER, Roslin RUSSELL, Jane BAYANI, Renee HEAD, Marco LEE, Mark BERNSTEIN, Jeremy A SQUIRE, Austin SMITH a Peter DIRKS, 2009. Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens. *Cell Stem Cell* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, **4**(6), 568–580. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2009.03.014

PURÉ, Ellen a Rachel BLOMBERG, 2018. Pro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: back to the basics. *Oncogene* [online]. **37**(32), 4343–4357. Dostupné z: doi:10.1038/s41388-018-0275-3

QUAIL, Daniela F. a Johanna A. JOYCE, 2017. The microenvironmental landscape of brain tumors. *Cancer Cell* [online]. **31**(3), 326–341. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2017.02.009.

RAMACHANDRAN, Sabarinathan, Haseeb ILIAS BASHA, Nayan J. SARMA, Yiing LIN, Jeffrey S. CRIPPIN, William C. CHAPMAN a Thalachallour MOHANAKUMAR, 2013. Hepatitis C Virus Induced miR200c Down Modulates FAP-1, a Negative Regulator of Src Signaling and Promotes Hepatic Fibrosis. *PLoS ONE* [online]. **8**(8), e70744. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0070744

RASCHKE, Sascha, Vera BALZ, Thomas EFFERTH, Wolfgang A. SCHULZ a Andrea R. FLORL,

2005. Homozygous deletions of CDKN2A caused by alternative mechanisms in various human cancer cell lines. *Genes, Chromosomes and Cancer* [online]. **42**(1), 58–67. Dostupné z: doi:10.1002/gcc.20119

RETTIG, Wolfgang J, Pilar GARIN-CHESA, H Richard BERESFORD, Herbert F OETTGEN, Myron R MELAMED a Lloyd J OLD, 1988. Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: Differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **85**(9), 3110–3114. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.85.9.3110

RÖHRICH, Manuel, Anastasia LOKTEV, Annika K WEFERS, Annette ALTMANN, Daniel PAECH, Sebastian ADEBERG, Paul WINDISCH, Thomas HIELSCHER, Paul FLECHSIG, Ralf FLOCA, Dominik LEITZ, Julius P SCHUSTER, Peter E HUBER, Jürgen DEBUS, Andreas Von DEIMLING, Thomas LINDNER a Uwe HABERKORN, 2019. IDH-wildtype glioblastomas and grade III/IV IDH-mutant gliomas show elevated tracer uptake in fibroblast activation protein – specific PET/CT. *European Journal of Nuclear medicine and molecular imaging* [online]. **46**(12), 2569–2580. Dostupné z: doi:10.1007/s00259-019-04444-y

ROSELL, Anna, Eloy CUADRADO, Arantxa ORTEGA-AZNAR, Mar HERNA, Eng H LO a Joan MONTANER, 2008. MMP-9 – Positive Neutrophil Infiltration Is Associated to Blood – Brain Barrier Breakdown and Basal Lamina Type IV Collagen Degradation During Hemorrhagic Transformation After Human Ischemic Stroke. *Stroke* [online]. **39**(4), 1121–1126. Dostupné z: doi:10.1161/STROKEAHA.107.500868

ROSS, Sarah, Edwin CHEUNG, Thodoris G PETRAKIS, Michael HOWELL, W Lee KRAUS a Caroline S HILL, 2006. Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription. *The EMBO Journal* [online]. **25**(19), 4490–4502. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7601332

ROSZKOWSKA, Matylda, Anna SKUPIEN, Tomasz WÓJTOWICZ, Anna KONOPKA, Adam GORLEWICZ, Magdalena KISIEL, Marek BEKISZ, Blazej RUSZCZYCKI, Hubert DOLEZYCZEK, Emilia REJMAK, Ewelina KNAPSKA, Jerzy W. MOZRZYMAS, Jakub WŁODARCZYK, Grzegorz M. WILCZYNSKI a Joanna DZWONEK, 2016. CD44: A novel synaptic cell adhesion molecule regulating structural and functional plasticity of dendritic spines. *Molecular Biology of the Cell* [online]. **27**(25), 4055–4066. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.E16-06-0423

RUBENSTEIN, Brenda M. a Laura J. KAUFMAN, 2008. The role of extracellular matrix in glioma invasion: A cellular Potts model approach. *Biophysical Journal* [online]. **95**(12), 5661–5680. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.108.140624

RUTKA, James T., Craig A. MYATT, Jane R. GIBLIN, Richard L. DAVIS a Mark L. ROSENBLUM, 1987. Distribution of Extracellular Matrix Proteins in Primary Human Brain Tumours: An Immunohistochemical Analysis. *Canadian Journal of Neurological Sciences* [online]. **14**(1), 25–30. Dostupné z: doi:10.1017/S0317167100026123

SAKAI, Katsuya, Takahiro NAKAMURA, Yoshinori SUZUKI, Takafumi IMIZU a Kunio MATSUMOTO, 2011. 3-D collagen-dependent cell surface expression of MT1-MMP and MMP-2 activation regardless of integrin $\alpha 1$ function and matrix stiffness. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **412**(1), 98–103. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.050

SAMUEL, Michael S., Jose I. LOPEZ, Ewan J. MCGHEE, Daniel R. CROFT, David STRACHAN, Paul TIMPSON, June MUNRO, Ewald SCHRÖDER, Jing ZHOU, Valerie G. BRUNTON, Nick BARKER, Hans CLEVERS, Owen J. SANSOM, Kurt I. ANDERSON, Valerie M. WEAVER a Michael F. OLSON, 2011. Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and β -catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth. *Cancer Cell* [online]. **19**(6), 776–791. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2011.05.008

SANA, Jiri, Petr BUSEK, Pavel FADRUS, Andrej BESSE, Lenka RADOVA, Marek VECERA, Stefan REGULI, Lucie Stollinova SROMOVA, Marek HILSER, Radim LIPINA, Radek LAKOMY, Leos KREN, Martin SMRCKA, Aleksí SEDO a Ondrej SLABY, 2018. Identification of microRNAs

differentially expressed in glioblastoma stem-like cells and their association with patient survival. *Scientific Reports* [online]. **8**(1), 1–11. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-20929-6

SARKAR, Susobhan, Robert K. NUTTALL, Shuhong LIU, Dylan R. EDWARDS a V. Wee YONG, 2006. Tenascin-C stimulates glioma cell invasion through matrix metalloproteinase-12. *Cancer Research* [online]. **66**(24), 11771–11780. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0470

SAW, Phei Er, Xiaoding XU, Bo Ram KANG, Jungsul LEE, Yeo Song LEE, Chungyeul KIM, Shinhyuk KANG, Yoo Jin NA, Hong Joo MOON, Joo Han KIM, Youn-kwan PARK, Wonki YOON, Jong Hyun KIM, Taek-hyun KWON, Chulhee CHOI, Sangyong JON a Kyuha CHONG, 2021. Extradomain B of fibronectin as an alternative target for drug delivery and a cancer diagnostic and prognostic biomarker for malignant glioma. *Theranostics* [online]. **11**(2), 941–957. Dostupné z: doi:10.7150/thno.44948

SAW, Phei Er, Ao ZHANG, Yan NIE, Lei ZHANG, Yingjie XU a Xiaoding XU, 2018. Tumor-Associated Fibronectin Targeted Liposomal Nanoplatform for Cyclophilin A siRNA Delivery and Targeted Malignant Glioblastoma Therapy. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **9**(1194), 1–10. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2018.01194

SAWAYA, R, CJ CUMMINS, BH SMITH a PL KORNBLITH, 1985. Plasma fibronectin in patients with brain tumors. *Neurosurgery* [online]. **16**(2), 161–165. Dostupné z: doi:10.1227/00006123-198502000-00006

SCANLAN, Matthew J., B. K. Mohan RAJ, Benjamin CALVO, Pilar GARIN-CHESA, M. Pilar SANZ-MONCASI, John H. HEALEY, Lloyd J. OLD a Wolfgang J. RETTIG, 1994. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **91**(12), 5657–5661. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.12.5657

SCHIFFER, Davide, P CAVALLA, A DUTTO a L BORSOTTI, 1997. Cell proliferation and invasion in malignant gliomas. *Anticancer research*. **17**(1A), 61–69.

SCHULTZE-MOSGAU, Stefan, Jürgen KOPP, Michael THORWARTH, Franz RÖDEL, Ivan MELNYCHENKO, Gerhard G. GRABENBAUER, Kerstin AMANN a Falk WEHRHAN, 2006. Plasminogen activator inhibitor-I-related regulation of procollagen I ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) by antitransforming growth factor- $\beta 1$ treatment during radiation-impaired wound healing. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* [online]. **64**(1), 280–288. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijrobp.2005.09.006

SCHWARZE, Katharina, James BUCHANAN, Jilles M FERMONT, Helene DREAU, Mark W TILLEY, John M TAYLOR, Pavlos ANTONIOU, Samantha J L KNIGHT, Carme CAMPS, Melissa M PENTONY, Erika M KVIKSTAD, Steve HARRIS, Niko POPITSCH, Alistair T PAGNAMENTA, Anna SCHUH, Jenny C TAYLOR a Sarah WORDSWORTH, 2020. The complete costs of genome sequencing: a microcosting study in cancer and rare diseases from a single center in the United Kingdom. *Genetics in Medicine* [online]. **22**(1), 85–94. Dostupné z: doi:10.1038/s41436-019-0618-7

ŠEDO, Aleksí a Radek MALÍK, 2001. Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: Homologous proteins or homologous activities? *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* [online]. **1550**(2), 107–116. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4838(01)00278-3

SEHGAL, Inder a Timothy C THOMPSON, 1999. Novel Regulation of Type IV Collagenase (Matrix Metalloproteinase-9 and -2) Activities by Transforming Growth Factor- $\beta 1$ in Human Prostate Cancer Cell Lines. *Molecular Biology of the Cell* [online]. **10**(2), 407–416. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.10.2.407

SERRES, E., F. DEBARBIEUX, F. STANCHI, L. MAGGIORELLA, D. GRALL, L. TURCHI, F. BUREL-VANDENBOS, D. FIGARELLA-BRANGER, T. VIROLLE, G. ROUGON a E. VAN OBBERGHEN-SCHILLING, 2014. Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene*

[online]. **33**(26), 3451–3462. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2013.305

SHAIM, Hila, Mayra SHANLEY, Rafet BASAR, May DAHER, Joy GUMIN, Daniel B. ZAMLER, Nadima UPRETY, Fang WANG, Yuefan HUANG, Konrad GABRUSIEWICZ, Qi MIAO, Jinzhuang DOU, Abdullah ALSULIMAN, Lucila N. KERBAUY, Sunil ACHARYA, Vakul MOHANTY, Mayela MENDT, Sufang LI, Jun Jun LU, Jun WEI, Natalie W. FOWLKES, Elif GOKDEMIR, Emily L. ENSLEY, Mecit KAPLAN, Cynthia KASSAB, Li LI, Gonca OZCAN, Pinaki P. BANERJEE, Yifei SHEN, April L. GILBERT, Corry M. JONES, Mustafa BDIWI, Ana K. NUNEZ-CORTES, Enli LIU, Jun YU, Nobuhiko IMAHASHI, Luis MUNIZ-FELICIANO, Ye LI, Jian HU, Giulio DRAETTA, David MARIN, Dihua YU, Stephan MIELKE, Matthias EYRICH, Richard E. CHAMPLIN, Ken CHEN, Frederick F. LANG, Elizabeth J. SHPALL, Amy B. HEIMBERGER a Katayoun REZVANI, 2021. Targeting the α integrin/TGF- β axis improves natural killer cell function against glioblastoma stem cells. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **131**(14), 1–15. Dostupné z: doi:10.1172/JCI142116

SHANNON, Stephen, Connan VACA, Dongxuan JIA, Ildiko ENTERSZ, Andrew SCHAER, Jonathan CARCIONE, Michael WEAVER, Yoav AVIDAR, Ryan PETTIT, Mohan NAIR, Atif KHAN a Ramsey A FOTY, 2015. Dexamethasone-Mediated Activation of Fibronectin Matrix Assembly Reduces Dispersal of Primary Human Glioblastoma Cell. *PLoS One* [online]. **10**(8), e0135951. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0135951

SHERMAN, Brad T, Ming HAO, Ju QIU, Xiaoli JIAO, Michael W BASELER, H Clifford LANE, Tomozumi IMAMICHI a Weizhong CHANG, 2022. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research* [online]. **50**(W1), W216–221. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkac194

SILGINER, M, M WELLER, U ZIEGLER a P ROTH, 2014. Integrin inhibition promotes atypical anoikis in glioma cells. *Cell Death and Disease* [online]. **5**(1), e1012. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2013.543

ŠIMKOVÁ, Adéla, Petr BUŠEK, Aleksi ŠEDO a Jan KONVALINKA, 2020. Molecular recognition of fibroblast activation protein for diagnostic and therapeutic applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* [online]. **1868**(7), 140409. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2020.140409

SIVASANKARAN, Balasubramanian, Martin DEGEN, Anthony GHAFARI, Monika E HEGI, Marie-france HAMOU, Mihai-constantin S IONESCU, Christian ZWEIFEL, Markus TOLNAY, Morten WASNER, Susanne MERGENTHALER, R MISEREZ, Robert KISS, Maddalena M LINO, Adrian MERLO, Ruth CHIQUET-EHRISMANN a Jean-louis BOULAY, 2009. Tenascin-C Is a Novel RBPJK -Induced Target Gene for Notch Signaling in Gliomas. *Cancer research* [online]. **69**(2), 458–465. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2610

SOEDA, Akio, Akira HARA, Takahiro KUNISADA, Shin-ichi YOSHIMURA, Toru IWAMA a Deric M PARK, 2015. The Evidence of Glioblastoma Heterogeneity. *Scientific Reports* [online]. **5**(1), 1–7. Dostupné z: doi:10.1038/srep07979

SORRENTINO, Claudia, Lucio MIELE, Amalia PORTA, Aldo PINTO a Silvana MORELLO, 2016. Activation of the A2B adenosine receptor in B16 melanomas induces CXCL12 expression in FAP-positive tumor stromal cells, enhancing tumor progression. *Oncotarget* [online]. **7**(39), 64274–64288. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.11729

STICHEL, Damian, Azadeh EBRAHIMI, David REUSS, Daniel SCHRIMPF, Takahiro ONO, Mitsuaki SHIRAHATA, Guido REIFENBERGER, Michael WELLER, Daniel HÄNGGI, Wolfgang WICK, Christel HEROLD-MENDE, Manfred WESTPHAL, Sebastian BRANDNER, Stefan M. PFISTER, David CAPPER, Felix SAHM a Andreas VON DEIMLING, 2018. Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathologica* [online]. **136**(5), 793–803. Dostupné z: doi:10.1007/s00401-018-1905-0

STREMENOVA, Jarmila, Evzen KREPELA, Vladislav MARES, Julie TRIM, Vladimir DBALY, Josef MAREK, Zdislava VANICKOVA, Vera LISA, Chris YEA a Aleksí SEDO, 2007. Expression and enzymatic activity of dipeptidyl peptidase-IV in human astrocytic tumours are associated with tumour grade. *International Journal of Oncology* [online]. **31**(4), 785–792. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.31.4.785

STUPP, R., M. BRADA, M. J. VAN DEN BENT, J. C. TONN a G. PENTHEROUDAKIS, 2014. High-grade glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* [online]. **25**, 93–101. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdu050

STUPP, Roger, Warren P. MASON, Michael VAN DEN BENT, MARTIN J. WELLER, Barbara FISHER, Martin J.B. TAPHOORN, Karl BELANGER, Alba A. BRANDES, Christine MAROSI, Ulrich BOGDAHN, Jürgen CURSCHMANN, Robert C. JANZER, Samuel K. LUDWIN, Thierry GORLIA, Anouk ALLGEIER, Denis LACOMBE, Elizabeth CAIRNCROSS, J. GREGORY EISENHAEUER a René O. MIRIMANOFF, 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England journal of medicine* [online]. **352**(10), 987–996. Dostupné z: doi:10.1007/s11060-008-9538-0

TAO, Chuming, Kai HUANG, Jin SHI, Qing HU, Kuangxun LI a Xingen ZHU, 2020. Genomics and Prognosis Analysis of Epithelial-Mesenchymal Transition in Glioma. *Frontiers in Oncology* [online]. **10**(183), 1–13. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2020.00183

TATTI, Olga, Piia VEHVILÄINEN, Kaisa LEHTI a Jorma KESKI-OJA, 2008. MT1-MMP releases latent TGF- β 1 from endothelial cell extracellular matrix via proteolytic processing of LTBP-1. *Experimental Cell Research* [online]. **314**(13), 2501–2514. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2008.05.018

TCHOU, Julia, Paul J. ZHANG, Yingtao BI, Celine SATIJA, Rajrupa MARJUMDAR, Tom L. STEPHEN, Albert LO, Haiying CHEN, Carolyn MIES, Carl H. JUNE, Jose CONEJO-GARCIA a Ellen PURÉ, 2013. Fibroblast activation protein expression by stromal cells and tumor-associated macrophages in human breast cancer. *Human Pathology* [online]. **44**(11), 2549–2557. Dostupné z: doi:10.1016/j.humpath.2013.06.016

TEO, Wan-ye, Karthik SEKAR, Pratap SESHACHALAM, Jianhe SHEN, Wing-Yuk CHOW, Ching C. LAU, HeeKyoung YANG, Junseong PARK, Seok-Gu KANG, Xiaonan LI, Do-Hyun NAM a Kam M. HUI, 2019. Relevance of a TCGA-derived Glioblastoma Subtype Gene- Classifier among Patient Populations. *Scientific Reports* [online]. **9**(1), 1–10. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-43173-y

THAKKAR, Jigisha P., Therese A. DOLECEK, Craig HORBINSKI, Quinn T. OSTROM, Donita D. LIGHTNER, Jill S. BARNHOLTZ-SLOAN a John L. VILLANO, 2014. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* [online]. **23**(10), 1985–1996. Dostupné z: doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0275

TOJO, Masayoshi, Yoshio HAMASHIMA, Aki HANYU, Tetsuya KAJIMOTO, Masao SAITOH, Kohei MIYAZONO, Manabu NODE a Takeshi IMAMURA, 2005. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor- β . *Cancer Science* [online]. **96**(11), 791–800. Dostupné z: doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00103.x

TRITSCHLER, Isabel, Dorothee GRAMATZKI, David CAPPER, Michel MITTELBRONN, Richard MEYERMANN, Juha SAHARINEN, Wolfgang WICK, Jorma KESKI-OJA a Michael WELLER, 2009. Modulation of TGF- β activity by latent TGF- β -binding protein 1 in human malignant glioma cells. *International Journal of Cancer* [online]. **125**(3), 530–540. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.24443

TRYLCOVA, Jana, Petr BUSEK, Karel SMETANA, Eva BALAZIOVA, Barbora DVORANKOVA, Alzbeta MIFKOVA a Aleksí SEDO, 2015. Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells in vitro. *Tumor Biology* [online]. **36**(8), 5873–5879. Dostupné z: doi:10.1007/s13277-015-3259-8

VARGA, Imre, Gábor HUTÓCZKI, Csaba D. SZEMCSÁK, Gábor ZAHUCZKY, Judit TÓTH, Zsolt

- ADAMECZ, Annamária KENYERES, László BOGNÁR, Zoltán HANZÉLY a Almos KLEKNER, 2012. Brevican, neurocan, tenascin-C and versican are mainly responsible for the invasiveness of low-grade astrocytoma. *Pathology and Oncology Research* [online]. **18**(2), 413–420. Dostupné z: doi:10.1007/s12253-011-9461-0
- VEGA, Eleanor A., Michael W. GRANER a John H. SAMPSON, 2008. Combating immunosuppression in glioma. *Future Oncology* [online]. **4**(3), 433–442. Dostupné z: doi:10.2217/14796694.4.3.433
- VERHAAK, Roel G W, Katherine A HOADLEY, Elizabeth PURDOM, Victoria WANG, Yuan QI, Matthew D WILKERSON, C Ryan MILLER, Li DING, Todd GOLUB, Jill P MESIROV, Gabriele ALEXE, Michael LAWRENCE, Michael O KELLY, Pablo TAMAYO, Barbara A WEIR, Stacey GABRIEL, Wendy WINCKLER, Supriya GUPTA, Lakshmi JAKKULA, Heidi S FEILER, J Graeme HODGSON, C David JAMES, Jann N SARKARIA, Cameron BRENNAN, Gad GETZ, Charles M PEROU a D Neil HAYES, 2010. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* [online]. **17**(1), 98–110. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020
- VERHULST, Emile, Delphine GARNIER, Ingrid De MEESTER a Brigitte BAUVOIS, 2022. Validating Cell Surface Proteases as Drug Targets for Cancer Therapy: What Do We Know, and Where Do We Go? *Cancers* [online]. **14**(3), 624. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14030624
- VON BULLOW, Cornelia, Wiebke HAYEN, Anke HARTMANN, Wolfgang MUELLER-KLIESER, Bruno ALLOLIO a Volker NEHLS, 2001. Endothelial capillaries chemotactically attract tumour cells. *The Journal of pathology* [online]. **193**(3), 367–376. Dostupné z: doi:10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::AID-PATH810>3.0.CO;2-1
- WAKEFIELD, Lalage M, Thomas S WINOKUR, Robin S HOLLANDS, Karen CHRISTOPHERSON, Arthur D LEVINSON a Michael B SPORN, 1990. Recombinant Latent Transforming Growth Factor Beta 1 Has a Longer Plasma Half-Life in Rats than Active Transforming Growth Factor Beta 1, and a Different Tissue Distribution. *The Journal of Clinical Investigation*. **86**(6), 1976–1984.
- WANG, Qianghu, Baoli HU, Xin HU, Erik P SULMAN, Do-hyun NAM a Roel G W VERHAAK, 2017. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* [online]. **32**(1), 42–56. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2017.06.003
- WANG, Rui-fen, Li-hong ZHANG, Li-hui SHAN, Wen-guang SUN, Cui-cui CHAI, Hong-mei WU, Juan C IBLA, Li-feng WANG a Jia-ren LIU, 2013. Effects of the fibroblast activation protein on the invasion and migration of gastric cancer. *Experimental and Molecular Pathology* [online]. **95**(3), 350–356. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexmp.2013.10.008
- WESOŁOWSKA, A., A. KWIATKOWSKA, L. SŁOMNICKI, M. DEMBINSKI, A. MASTER, M. SŁIWA, K. FRANCISZKIEWICZ, S. CHOUAIB a B. KAMINSKA, 2008. Microglia-derived TGF- β as an important regulator of glioblastoma invasion - An inhibition of TGF- β -dependent effects by shRNA against human TGF- β type II receptor. *Oncogene* [online]. **27**(7), 918–930. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1210683
- WICK, Wolfgang, Michael PLATTEN a Michael WELLER, 2001. Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF- β . *Journal of Neuro-Oncology* [online]. **53**(2), 177–185. Dostupné z: doi:10.1023/a:1012209518843
- WIKBERG, Maria L, Sofia EDIN, Ida V LUNDBERG, Bethany Van GUELPHEN, Anna M DAHLIN a Richard PALMQVIST, 2013. High intratumoral expression of fibroblast activation protein (FAP) in colon cancer is associated with poorer patient prognosis. *Tumor Biology* [online]. **34**(2), 1013–1020. Dostupné z: doi:10.1007/s13277-012-0638-2
- WILLIAMS, Selwyn A a Jean E SCHWARZBAUER, 2009. A Shared Mechanism of Adhesion

- Modulation for Tenascin-C and Fibulin-1. *Molecular Biology of the Cell* [online]. **20**(4), 1141–1149. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.e08-06-0621
- WU, Adam, Jun WEI, Ling Yuan KONG, Yongtao WANG, Waldemar PRIEBE, Wei QIAO, Raymond SAWAYA a Amy B. HEIMBERGER, 2010. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-Oncology* [online]. **12**(11), 1113–1125. Dostupné z: doi:10.1093/neuonc/noq082
- XI, Qiaoran, Zhanxin WANG, Alexia-ileana ZAROMYTIDOU, Xiang H.-F. ZHANG, Lai-Fong CHOW-TSANG, Jing X. LIU, Hyesoo KIM, Afsar BARLAS, Katia MANOVA-TODOROVA, Vesa KAARTINEN, Lorenz STUDER, Willie MARK, Dinshaw J. PATEL a Joan MASSAGUÉ, 2011. A Poised Chromatin Platform for TGF- β Access to Master Regulators. *Cell* [online]. **147**(7), 1511–1524. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.11.032
- YAMADA, Naoshi, Mitsuyasu KATO, Hidetoshi YAMASHITA, Monica NISTÉR, Kohei MIYAZONO, Carl-Henrik -H HELDIN a Keiko FUNA, 1995. Enhanced expression of transforming growth factor- β and its type-I and type-II receptors in human glioblastoma. *International Journal of Cancer* [online]. **62**(4), 386–392. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.2910620405
- YAMAMOTO, Tatsuo, Nancy A. NOBLE, Arthur H. COHEN, Cynthia C. NAST, Akira HISHIDA, Leslie I. GOLD a Wayne A. BORDER, 1996. Expression of transforming growth factor- β isoforms in human glomerular diseases. *Kidney International* [online]. **49**(2), 461–469. Dostupné z: doi:10.1038/ki.1996.65
- YIN, Wen, Hecheng ZHU, Jun TAN, Zhaoqi XIN, Quanwei ZHOU, Yudong CAO, Zhaoping WU, Lei WANG, Ming ZHAO, Xingjun JIANG, Caiping REN a Guihua TANG, 2021. Identification of collagen genes related to immune infiltration and epithelial-mesenchymal transition in glioma. *Cancer Cell International* [online]. **21**(1), 1–18. Dostupné z: doi:10.1186/s12935-021-01982-0
- YU, Qi, Yixue XUE, Jing LIU, Zhuo XI, Zhen LI a Yunhui LIU, 2018. Fibronectin promotes the malignancy of glioma stem-like cells via modulation of cell adhesion, differentiation, proliferation and chemoresistance. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [online]. **11**(130), 1–13. Dostupné z: doi:10.3389/fnmol.2018.00130
- ZÁMEČNÍK, J., L. VARGOVÁ, A. HOMOLA, R. KODET a E. SYKOVÁ, 2004. Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. *Neuropathology and Applied Neurobiology* [online]. **30**(4), 338–350. Dostupné z: doi:10.1046/j.0305-1846.2003.00541.x
- ZBORALSKI, Dirk, Aileen HOEHNE, Anne BREDENBECK, Anne SCHUMANN, Minh NGUYEN, Eberhard SCHNEIDER, Jan UNGEWISS, Matthias PASCHKE, Christian HAASE, Jan L Von HACHT, Tanya KWAN, Kevin K LIN, Jan LENORE, Thomas C HARDING, Jim XIAO, Andrew D SIMMONS, Ajay MOHAN, Mohan NICOLA, Beindorff ULRICH, Christiane SMERLING a Frank OSTERKAMP, 2022. Preclinical evaluation of FAP-2286 for fibroblast activation protein targeted radionuclide imaging and therapy. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* [online]. **49**(11), 3651–3667. Dostupné z: doi:10.1007/s00259-022-05842-5
- ZONNEVILLE, Justin, Alfiya SAFINA, Alexander M TRUSKINOVSKY, Carlos L ARTEAGA a Andrei V BAKIN, 2018. TGF- β signaling promotes tumor vasculature by enhancing the pericyte-endothelium association. *BMC Cancer* [online]. **18**(1), 1–13. Dostupné z: doi:10.1186/s12885-018-4587-z