Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

Dipeptidylpeptidáza-IV a Fibroblastový aktivační protein v gliomagenezi

Jana Trylová

Praha, 2017

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a Patobiochemie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Školicí pracoviště: Laboratoř biologie nádorové buňky

Ústav biochemie a experimentální onkologie

Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta

U Nemocnice 5

128 53, Praha 2

Školitel: Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

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

Obsah

Abstrakt 5
Abstract 5
1. Úvod 6
1.1. Nádory centrální nervové soustavy 6
1.2. DASH molekuly v kancerogenezi 6
1.2.1. Dipeptidylpeptidáza-IV 7
1.2.2. Fibroblastový aktivační protein alfa 9
1.2.3. Ostatní DASH molekuly 10
1.3. Substráty DASH molekul v nádorových onemocněních 11
1.4. Nádorové mikroprostředí 12
2. Hypotéza a cíle práce 14
3. Materiál a metodika 15
3.1. Laboratorní materiál 15
3.1.1. Laboratorní přístroje a pomůcky 15
3.1.2. Spotřební materiál 15
3.1.3. Chemikálie, roztoky 15
3.1.4. Vektory, cDNA 17
3.1.5. Seznam použitých protilátek 17
3.2. Buněčné kultury, primární buněčné kultury a příprava vzorku 18
3.2.1. Selekční antibiotika pro transfekované buňky 18
3.3. Příprava vektorů, transfekce a ustanovení stabilních Tet on buněčných linií 18
3.3.1. Vektory 18
20
3.4. Transfekce a selekce Tet-On-Advanced buněčných linií obsahujících pTRE-Tight s cDNA pro DPP-IV a FAP 20
3.5. Magnetic-Activated Cell sorting (MACS) 21
3.6. Biochemické stanovení enzymové aktivity DPP-IV a FAP 21
3.7. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) pro lidskou DPP-IV/CD26 a FAP 21
3.8. Příprava kondiciovaného média 22
3.9. Stanovení buněčné proliferace 22
3.10. Průtoková cytometrie 22
3.11. Izolace a kvantifikace celkové RNA, real time RT-PCR 23
24
3.12. Stanovení koncentrace proteinu 24
3.13. Stanovení migračního potenciálu buněk 24
3.14. Experimentální model ortotopické xenotransplantace 24
3.15. Fluorescenční zobrazení 25
3.16. Morfometrická kvantifikace objemu nádoru 25
3.17. Imunohistochemická detekce DPP-IV a FAP v řezech myší mozkové tkáně 25
3.18. Statistická analýza 26
4. Výsledky 26
4.1. Transgenní buněčné linie nesoucí různé formy DPP-IV 26

4.1.1. Intracelulární forma DPP-IV 26
4.1.2. Secernovaná forma DPP-IV.....26
4.2. Transgenní buněčné linie nesoucí různé formy FAP 27
4.3. Transgenní buněčné linie nesoucí fluorescenční reportér mKate2 30
4.4. Ověření indukovatelnosti exprese DPP-IV a FAP *in-situ* 30
4.5. Vliv nádorově asociovaných fibroblastů na gliomové buňky *in-vitro* 31
4.6. Příprava koimplantačního *in-vivo* modelu nádorově asociovaných fibroblastů s glioblastomovými buněčnými liniemi.....33
5. Diskuze 35
5.1. Příprava stabilně transfekovaných lidských gliomových buněk nesoucích varianty genu pro DPP-IV, FAP a mKate (cíl I., II., III.) 35
5.2. Ověření indukovatelnosti exprese DPP-IV a FAP *in-vivo* (cíl IV.) 37
5.3. Vliv nádorově asociovaných fibroblastů na gliomové buňky *in-vitro* (cíl V.) 37
5.4. Příprava koimplantačního *in-vivo* modelu nádorově asociovaných fibroblastů s glioblastomovými buněčnými liniemi (cíl VI.) 38
6. Závěry 39
Seznam zkratek 39
7. Použitá literatura 41

Abstrakt

ĂDipeptidylpeptidáze-IV aktivitou a/nebo strukturou homologníñ (DASH) molekuly představují skupinu multifunkčních molekul, z nichž většina nese hydrolytickou aktivitu podobnou dipeptidylpeptidáze-IV (DPP-IV), která odštěpuje X-Pro dipeptidy od N-konce peptidů a bílkovin. Do této skupiny patří další molekuly nesoucí podobnou enzymovou aktivitu jako například fibroblastový aktivační protein (FAP), DPP-II, DPP8 a DPP9 nebo i DPP-IV strukturou podobné, ale hydrolyticky neaktivní molekuly (DPP6 a DPP10). Souhrnné poznatky svědčí o významu těchto molekul v procesech vzniku a rozvoje řady nádorových onemocnění.

Cílem této práce je příprava biologického modelu a jeho využití pro pochopení mechanismů interakce transformovaných gliálních buněk s buňkami stromatu v procesech vzniku a rozvoje nádorů odvozených z neuroektodermu. V rámci projektu byly připraveny stabilně transfekované lidské glioblastomové buněčné linie s indukovatelnou expresí DPP-IV a fibroblastového aktivačního proteinu a jejich mutantních, enzymově neaktivních forem.

Vzniklé buněčné linie jsou nadále používány nejen jako nástroj studia Ăautokrinníhoñ významu DPP-IV a FAP pro vlastní exprimující transformované buňky v in-vitro modelech, tak i Ăparakrinníhoñ působení na úrovni nádorového mikroprostředí po homotopní implantaci do imunodeficientní myši.

Porozumění mechanismům interakce nádorových a nenádorových buněk v gliomagenezi může být přínosem k rozšíření stávajícího terapeutického portfolia v léčbě maligních gliomů.

Abstract

ñDipeptidyl peptidase-IV Activity and/or Structure Homologuesñ(DASH) represent a newly defined group of multifunctional molecules, typically bearing dipeptidyl peptidase-IV-like hydrolytic activity. Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) cleaves out X-Pro dipeptides from the N-terminus of peptides. Other molecules carrying similar enzyme activity, such as Fibroblast activation protein (FAP), DPP-II, DPP8 and DPP9 or even DPP-IV structure-like but hydrolytically inactive molecules (DPP6 and DPP10) also belong to this group. Recent knowledge suggest a substantial role of DASH in cancer pathogenesis.

The aim of this study is a preparation of a biological model and its use for understanding the mechanisms of interaction(s) between transformed glial cells and stroma in the processes of origin and development of tumors derived from neuroectoderm. Stable transfected human glioblastoma cell lines with inducible gene expression of DPP-IV, Fibroblast activation protein and their enzymatically inactive mutated forms, were prepared within the project.

Prepared cell lines are used as a tool for studying not only the Ăautocrineñ importance of DPP-IV and FAP for the expressing cells in *in-vitro*, but also for their potential Ăparacrineñ effect(s) within the tumor microenvironment after homotopic implantation into the brain of immunodeficient mice.

Understanding the mechanisms of tumor and non-tumor cell interactions in gliomagenesis might expand existing therapeutic portfolios of malignant gliomas.

1. Úvod

1.1. Nádory centrální nervové soustavy

Nádorová transformace, jakožto podklad neoplastických onemocnění, je mnohastupňový proces vedoucí k narušení normální kontroly růstových vlastností buněk a řady mezibuněčných interakcí. Podstatou přechodu od normálního k transformovanému fenotypu jsou obecně poruchy funkcí dvou tříd genů: onkogenů a tumor-supresorových genů (Louis a Gusella 1995).

Tato práce je zaměřena na nádory neuroektodermálního původu, vycházející především z gliálních buněk. Do této skupiny patří ependymální buňky (které dávají po své transformaci vznik ependymomům a subependymomům), dále oligodendrocyty (a následně jejich neoplastická forma oligodendrogliomy) a astrocyty (dávající vznik astrocytomům – nejčastěji vyskytujícím se nádorům centrální nervové soustavy (CNS)). Klasifikace nádorů centrální nervové soustavy dle Světové zdravotnické organizace (WHO) přihlížela jen k histologickým kritériím, což se zdálo jevit jako nedostatečné pro další klinický postup (Louis et al. 2001). V současné době byla zavedena nová WHO klasifikace nádorů CNS, která využívá nejen histologické parametry, ale poprvé přihlíží i k molekulárním změnám v nádoru, umožňující využití specifické terapie pro jednotlivé typy nádorů na základě jejich biologických odlišností (Louis et al. 2016).

Během normálního vývoje mozku dochází k diferenciaci neuroepitelových prekurzorových buněk, které zahrnují i neurální kmenové buňky (NSCs). Neurální kmenové buňky jsou přítomny také v mozku dospělého člověka (Gage 2000). Tyto buňky mohou dát vznik nádorovým kmenovým buňkám (CSCs) (Polyak a Hahn 2006; Singh et al. 2004). Vzájemné interakce CSCs, diferencovaných nádorových buněk, hostitelských buněk (mikroglie, makrofágy, astrocyty, oligodendrocyty, neurony, gliální a neurální progenitory, pericyty, endotelové buňky) a složek extracelulární matrix (ECM) vytváří nádorové mikroprostředí, které podporuje růst nádoru, jeho invazivní chování, ovlivňuje buněčnou smrt, rezistenci k radioterapii a chemoterapii a možnost imunitního úniku (Bonavia et al. 2011; Reinhard et al. 2016).

Gliomy patří mezi nejčastější typ primárních mozkových nádorů sročním výskytem 5-6 případů na 100 000 obyvatel. Nejzávažnější formu představuje glioblastoma multiforme s mediánem přežití 12-15 měsíců (Bush et al. 2016; Louis et al. 2007). Pochopení procesů kontrolující růstové vlastnosti gliálních buněk přispěje k objasnění buněčných a molekulárních mechanismů gliomageneze, které přes intenzivní studium zůstávají dosud nedostatečně popsány (Ohgaki a Kleihues 2005; Parsons et al. 2008).

1.2. DASH molekuly v kancerogenezi

Mnoho primárních lidských mozkových nádorů vykazuje deregulaci exprese řady proteáz – serinových, cysteinových a metalloproteáz, které usnadňují penetraci transformovaných buněk přes bariéry pojivových tkání. Proteolytické enzymy ovlivňují nádorové mikroprostředí i dalšími způsoby – mohou štěpit strukturní komponenty extracelulární matrix, uvolňovat a aktivovat v matrix vázané růstové faktory a cytokiny nebo měnit funkci chemokinů jejich specifickým štěpením (Wolf et al. 2008). Proteolytické enzymy se tímto podílejí na invazivní povaze maligních tumorů lokální destrukcí a narušením okolní normální tkáně (Rao 2003; Sedo a Mentlein 2014).

Proteolytická posttranslační úprava patří mezi základní mechanizmy kontrolující funkci biologicky aktivních peptidů, včetně těch, které se uplatňují na regulacích komplexních procesů buněčné transformace, proliferace, migrace nádorových buněk a angiogeneze. Díky

tomu se řada proteáz významně účastní na kontrole nádorové progrese a vzniku metastáz (Carl-McGrath et al. 2004).

Vzhledem k jedinečné struktuře prolinu mezi ostatními aminokyselinami, peptidová vazba, na níž se prolin podílí, je relativně rezistentní proti štěpení běžnými proteázami. Tím představuje vysoce konzervativní proteolytický ‚check-point' řady biologicky aktivních peptidů, zabraňující nespecifickému ataku většinou proteáz (Vanhoof et al. 1995).

Dipeptidylpeptidáza-IV (EC 3.4.14.5, identická s diferenciačním antigenem lymfocytů CD26) byla po mnoho let považována za unikátní membránově vázanou proteázu, schopnou odštěpovat X-Pro dipeptidy z N-konce peptidů a bílkovin. Postupně byla popsána řada genových produktů s podobnou enzymovou aktivitou a různou sekvenční podobností, tvořící skupinu ‚Dipeptidylpeptidáze-IV aktivitou a/nebo strukturou homologních' (DASH) molekul (Sedo a Malik 2001). Tato skupina obsahuje například fibroblastový aktivační protein alfa, dipeptidylpeptidázy II, 6, 8, 9, 10 a DPP-IV-b.

Do skupiny biologicky aktivních substrátů DASH molekul jsou řazeny molekuly, které se uplatňují při procesech kancerogeneze. Jedná se například o substanci P (SP), neuropeptid Y (NPY), peptid YY (PYY), glukagonu podobný peptid 1, 2 a chemokiny Regulated upon Activation Normal T cells Expressed and Secreted (RANTES, CCL5) či Stromal cell-derived factor-1α (SDF-1, CXCL12) (Busek et al. 2004; Gorrell 2005).

DASH molekuly se podílejí na regulaci různých vlastností transformovaných gliálních buněk, a proto je předpokládán jejich vztah ke vzniku a rozvoji mozkových nádorových onemocnění (Sedo et al. 2008). Ačkoliv funkční mechanizmus uplatnění DASH molekul v gliomagenezi není zcela jasný, některé výsledky poukazují na souvislost regulace se signální osou chemokinu SDF-1 a jeho receptoru CXCR4 s DPP-IV (Busek et al. 2008b). Dosud publikované práce většinou nepopisují původ DASH molekul z hlediska exprimující buněčné populace v rámci nádorového mikroprostředí. Přitom lze předpokládat, že funkční důsledky exprese DASH molekul se mohou *in-vivo* realizovat nejen na úrovni vlastní exprimující buňky, ale i ‚parakrinně', v rámci různých buněčných, stromálních i transformovaných subpopulací obsažených v nádoru (Sedo, et al. 2008; Wen a Kesari 2008). Tímto může docházet k proteolytické úpravě konkrétního biologicky aktivního peptidu jednou buněčnou populací, vedoucí k modifikaci biologické odpovědi jiné buněčné populace, ve vztahu ‚poskytovatel-klient' (Busek et al. 2008a).

1.2.1. Dipeptidylpeptidáza-IV

Dipeptidylpeptidáza-IV je vysoce glykosylovaná serinová proteáza se širokou tkáňovou distribucí. Jedná se o 220 kDa transmembránově vázaný protein, složený ze dvou identických 110 kDa podjednotek. V krevní plazmě a tělních tekutinách se nachází její solubilní forma bez intracelulárního a transmembránového segmentu (Durinx et al. 2000). Buněčný zdroj této varianty DPP-IV není zcela objasněn, předpokládá se možnost proteolytického štěpení transmembránové formy z buněk exprimující DPP-IV (Iwaki-Egawa et al. 1998) nebo možnost přímého transportu z místa syntézy pomocí exozómů (Cordero et al. 2009). Solubilní forma DPP-IV má pravděpodobně význam v kancerogenezi a změny její koncentrace je možno využít v onkologické diagnostice (Boccardi et al. 2015; Cordero et al. 2011; Otero-Estevez et al. 2015).

Katalytická triáda DPP-IV je složena z Ser^{630}, Asp^{708}, His^{740}, které se nacházejí v rámci 140-ti posledních aminokyselin C-terminálního regionu. Ser^{630} se nachází v ‚nukleofilní obálce' formované ze zbytků Gly-Trp- Ser^{630}-Tyr-Gly. Tato sekvence je esenciální pro hydrolytickou aktivitu DPP-IV (Ogata et al. 1992). V případě řady transmembránových dipeptidylpeptidáz je glykosylace podmínkou jejich enzymové aktivity, správného

proteinového sbalení, formace dimerů a vazby na adenosindeaminázu (ADA) (Aertgeerts et al. 2004).

DPP-IV svojí hydrolytickou aktivitou preferenčně odštěpuje X-Pro nebo X-Ala dipeptidy z N-konce peptidů. Jedná se o multifunkční molekulu, která se svojí enzymovou aktivitou podílí na řadě imunoregulačních funkcí (Aytac a Dang 2004; Tanaka et al. 1994). Podstatná je i její role v metabolizmu živin a její inhibice je v současnosti jedna z hlavních terapií diabetu mellitu druhého typu (Kushwaha et al. 2014).

Některé z významných biologických rolí DPP-IV nejsou závislé na její enzymové aktivitě a jsou zprostředkovány cestou jiných intermolekulárních interakcí (Havre et al. 2008). DPP-IV hraje roli jako vazebná molekula pro ADA, CD 45 a plazminogen 2, zprostředkovává kontakty buňka ï buňka, buňka ï ECM, působí rovněž jako koreceptor pro HIV a podílí se na některých molekulárních mechanizmech signální transdukce. Díky výše zmíněným funkcím se DPP-IV uplatňuje v procesech buněčné proliferace, diferenciace, nádorové transformace a apoptózy (Aytac a Dang 2004; De Meester et al. 2002; Gonzalez-Gronow et al. 2008; Sedo a Malik 2001).

Jedním z předpokládaných mechanizmů, jímž se DPP-IV účastní vzniku a rozvoje nádorových onemocnění, je její schopnost vazby ke kolagenu a fibronektinu; interakce DPP-IV s proteiny ECM je významná jak pro cílení lymfocytů, tak pro některé případy orgánově specifického metastazování (Dang a Morimoto 2002; Kikkawa et al. 2003; Kikkawa et al. 2005). Díky DPP-IV enzymové aktivitě dochází ke štěpení, a tím biologické aktivaci či inaktivaci peptidů, které se podílejí na komunikaci v nádorového mikroprostředí (Beckenkamp et al. 2016).

Změna exprese DPP-IV byla popsána v bioptickém materiálu z mnoha lidských tumorů. Rozvoj některých typů tumorů je doprovázen úbytkem exprese DPP-IV. Řada studií poukazuje, že opětovné navození exprese DPP-IV vede k restauraci nemaligního fenotypu (Arscott et al. 2009; Houghton et al. 1988; Morrison et al. 1993; Wesley et al. 1999). DPP-IV byla popsána i jako protein asociovaný s procesy invaze a metastazování (Havre, et al. 2008; Pang et al. 2010). Exprese DPP-IV je v řadě případů považována za možný pomocný diagnostický a prognostický ukazatel (Busek, et al. 2004; Busek et al. 2012; Javidroozi et al. 2012).

V případě malignit vycházejících z neuroektodermu byla DPP-IV studována v maligním melanomu a v transformovaných nervových a gliálních buňkách (Arscott, et al. 2009). DPP-IV zde působí jako tumorový supresor (Houghton, et al. 1988; Morrison, et al. 1993). V závislosti na enzymové aktivitě DPP-IV dochází k potlačení maligního fenotypu (Wesley, et al. 1999). Znovunavození exprese DPP-IV vede ke snížení invazivity maligních melanomových buněk, přičemž vlastní hydrolytická aktivita ani intaktní cytoplazmatická doména patrně není podmínkou tohoto efektu (Pethiyagoda et al. 2000).

Tumor supresorový efekt DPP-IV je popsán taktéž v buňkách neuroblastomu. Ztráta exprese DPP-IV v těchto buňkách vede k poklesu degradace chemokinu SDF-1, a tím k jeho zvýšené biologické dostupnosti. Vysoká exprese SDF-1 a jeho receptoru CXCR4 v buňkách neuroblastomu má za následek navýšení metastatického potenciálu (Arscott, et al. 2009).

Exprese DPP-IV byla popsána v gliomových buněčných liniích, primárních liniích odvozených z glioblastomu a v kmenových gliomových nádorových buňkách (Busek, et al. 2008b; Busek, et al. 2012; Sedo et al. 2001). Zvýšení enzymové aktivity bylo popsáno v tkáních pocházejících z tumorů s vyšším stupněm malignity dle WHO. Významná část DPP-IV podobné aktivity v gliomech je důsledkem zvýšené exprese kanonické DPP-IV. Výsledky enzymových inhibičních studií vedou k předpokladu spolupůsobení DPP-IV a FAP molekul v mozkových nádorech (Stremenova et al. 2007).

Vyšší exprese DPP-IV je pro gliomy typická. Negativně ovlivňuje proliferační potenciál gliomových buněk nezávisle na vlastní enzymové aktivitě enzymu. Tento efekt byl pozorován

i v xenotransplantátech imunodeficientních myší (Busek, et al. 2012). Antionkogenní/antiproliferační efekt zvýšené exprese DPP-IV v gliomech je provázen i inverzní korelací s proliferačním ukazatelem Ki67 a horší postoperační prognózou u pacientů s nízkou hodnotou DPP-IV podobné aktivity (Mares et al. 2012).

Exprese DPP-IV je v gliomech popsána jak na vlastních transformovaných buňkách, tak i na buňkách stromatu. DPP-IV se podílí na pericelulární proteolýze biologicky aktivních peptidů a lze tudíž předpokládat možný parakrinní efekt na další subpopulace buněk nádoru (Busek a Sedo 2013). Deregulace její exprese a/nebo enzymové aktivity může tedy přispívat k rozvoji nádorů jak přímo, na úrovni transformované buňky, tak i nepřímo v rámci svého imunomodulačního potenciálu a vlivu na neovaskularizaci (Busek, et al. 2004).

1.2.2. Fibroblastový aktivační protein alfa

FAP, identická se seprázou (Surface Expressed Protease), je 170 kDa integrální membránová kolagenáza/gelatináza složená ze dvou 97 kDa podjednotek. Svou orientací v plazmatické membráně patří stejně jako DPP-IV mezi transmembránové proteiny typu II. Skládá se ze 760 aminokyselin, z toho šest aminokyselin tvoří intracelulární sekvenci, dále následuje transmembránová doména o 20 aminokyselinách a extracelulární doména čítající 734 aminokyselin. C-konec obsahuje katalytický region (cca 200 aminokyselin), který je z 68% identický s DPP-IV. Lidské sekvence FAP a DPP-IV sdílí 48% identitu primární struktury (Goldstein et al. 1997). Geny pro obě tyto proteázy jsou lokalizovány blízko sebe na druhém chromozómu (Levy et al. 1999), v obou případech se jedná o glykoproteiny považované za produkt genové duplikace (Havre, et al. 2008).

FAP obsahuje proteázový motiv Gly-Trp-Ser^{624}-Tyr-Gly. Na rozdíl od DPP-IV nese FAP protein i endopeptidázovou aktivitu (Aertgeerts et al. 2005). Mezi substráty této proteázy patří kolagen typu III, želatina (denaturovaná forma kolagenu typu I), nikoliv však další nativní kolageny, dále α2-antiplasmin fibronektin a laminin (Aertgeerts, et al. 2005; Christiansen et al. 2007; Wolf, et al. 2008). Mezi další fyziologické substráty patří neuropeptid Y, substance P, natriuretický peptid typu B a peptid YY (Keane et al. 2011).

Stejně jako u DPP-IV, homodimerizace FAP molekuly je podmínkou její hydrolytické aktivity, přičemž existuje předpoklad možné heterodimerizace DPP-IV/FAP (Nakahara et al. 1996). Exprese FAP nebyla popsána ve zralých somatických elementech, ale je typická pro reaktivní stromální fibroblasty v nádorové tkáni, melanocyty, některé transformované buňky a pro fetální mezenchymální tkáň. Proto je předpokládán význam FAP zejména v procesech tkáňové remodelace, hojení a v embryonálním vývoji. Solubilní forma FAP proteinu (bez transmembránové domény) byla identifikována v lidské krevní plazmě, dříve označovaná jako enzym štěpící antiplasmin (APCE) (Lee et al. 2006).

Zvýšená exprese proteinu FAP byla nalezena v transformovaných buňkách řetzného původu (přehledně popsáno O'Brien a O'Connor (2008)). Tato molekula může být ukazatelem tumorové invazivity některých typů nádorů, neboť je lokalizována v invadopodiích maligních buněk (Kennedy et al. 2009; Ramirez-Montagut et al. 2004; Sedo a Malik 2001). Exprese FAP je v takových buňkách součástí jejich invazivního fenotypu, v němž spolu s dalšími secernovanými proteázami hraje roli v degradaci složek ECM (Monsky et al. 1994). Je popsána i formace proteázových komplexů složených z membrانově vázaných molekul FAP a DPP-IV v invadopodiích migrujících aktivovaných fibroblastů (Ghersi et al. 2002).

V transformovaných neuroektodermálních buňkách působí FAP ovšem jako tumorový supresor, který snižuje schopnost buněk tvořit nádory (Ramirez-Montagut, et al. 2004). FAP je konstitutivně exprimován v několika melanomových buněčných liniích. Obdobně jako DPP-IV, exprese FAP je umlčena během progrese maligní transformace melanocytů. Její silná tumor-supresorová aktivita je nezávislá na vlastní enzymové aktivitě proteinu a patrně k ní

dochází prostřednictvím nehydrolytických protein-proteinových interakcí (Ramirez-Montagut, et al. 2004). Experimentálně navozená re-exprese DPP-IV vede ne zcela jasným mechanizmem k sekundárnímu navýšení povrchové exprese FAP (Ramirez-Montagut, et al. 2004; Wesley, et al. 1999).

V lidských glioblastomech byl detekován FAP transkript, stejně tak i *in-vitro* v gliomových buněčných liniích (Stremenova, et al. 2007). Exprese FAP proteinu byla popsána na gliomových buňkách *in-situ* a *in-vitro*, kde tento protein napomáhá k migraci skrz složky mozkové extracelulární matrix, stejně tak i skrz mozkovou tkáň (Mentlein et al. 2011). Navýšená exprese FAP proteinu byla popsána u mezenchymálního podtypu glioblastomu. FAP je exprimován nejen na vlastních gliomových buňkách, ale právě i na stromálních buněčných subpopulacích mezenchymálního původu, přítomných v nádorovém mikroprostředí (Busek et al. 2016). Exprese FAP proteinu v glioblastomech stimuluje růst nádoru díky degradaci složek mozkové extracelulární matrix, podporuje angiogenezi a tlumí protinádorovou odpověď imunitního systému (Cheng et al. 2002).

Podobně jako DPP-IV spolupůsobí na degradaci substrátů, a tím změny jejich biologických funkcí (Kelly et al. 2012). FAP tedy může hrát důležitou roli v utváření nádorového mikroprostředí, a tím ovlivňovat růst tumoru.

1.2.3. Ostatní DASH molekuly

Mezi další členy DASH molekul se řadí **dipeptidylpeptidáza II** (DPPII, dříve nazývaná „Quiescent cell“ prolinová dipeptidáza, QPP). Jedná se o intracelulární homodimer složený ze dvou 60 kDa podjednotek primárně lokalizovaný ve vezikulárním systému. pH optimum se nachází v rozmezí 5,0 – 5,5, ke ztrátě enzymové aktivity dochází při pH 8,0 (Leiting et al. 2003).

DPPII je syntetizována jako propeptid a následně v Golgiho aparátu podstupuje N-glykosylaci, která je podmínkou enzymové aktivity molekuly. DPPII je secernována ve funkční aktivní formě jako odpověď na uvolnění vápníku. Substrátovou specifitou se velmi podobá DPP-IV, tedy odštěpuje N-terminální dipeptidy ze substrátů, kde je na předposledním místě prolin nebo s menší afinitou než u DPP-IV alanin (Chiravuri et al. 2000; Maes et al. 2007; Maes et al. 2005). DPPII se svojí enzymovou aktivitou podílí na degradaci fragmentů kolagenních vláken, myofibrilárních proteinů a neuropeptidů (Maes, et al. 2007). DPPII hraje hlavní roli při kontrole buněčného G0 programu („quiescence“) a zabraňuje apoptóze u klidových lymfocytů a fibroblastů. Předpokládaným mechanizmem je funkční modifikace „quiescence-promoting“ faktorů po odštěpení N-koncového dipeptidu (Mele et al. 2009).

Stejně jako DPP-IV i DPPII může tvořit komplex s adenosindeaminázou (Sharoyan et al. 2008).

Mezi další enzymově aktivní členy DASH molekul patří **dipeptidylpeptidáza 8** (DPP8) a **dipeptidylpeptidáza 9** (DPP9). Jedná se o cytoplazmatické neglykosylované proteiny, katalyticky aktivní v monomerní podobě. DPP8 vykazuje 20% aminokyselinovou identitu a 32% podobnost s lidskou molekulou DPP-IV, DPP 9 je z 19% identický a 31% podobný s DPP-IV (Qi et al. 2003). Na základě podobné tkáňové distribuce s DPP-IV a enzymové specifity, se předpokládá význam DPP8 pro aktivaci T-buněk a v dalších imunoregulačních funkcích (Abbott et al. 2000).

I u těchto molekul je popsán význam pro buněčnou adhezi, migraci a apoptózu, nezávislý na vlastní enzymové aktivitě DPP8 či 9 (Yu et al. 2006).

Dipeptidylpeptidáza 6 (DPP6 nebo DPPX) a **dipeptidylpeptidáza 10** (DPP10) neobsahují ve své katalytické triádě serin, který je esenciální pro katalýzu, a tudíž se jedná o enzymově neaktivní molekuly ve skupině DASH molekul. Důsledkem alternativního sestřihu se DPP6 vyskytuje ve dvou formách – s 90 aminokyselinami dlouhou N-koncovou

sekvencí nebo s 32 aminokyselinovou sekvencí. DPP6 sdílí 33% aminokyselinovou identitu s DPP-IV (Chen et al. 2003). DPP10 je molekula z 32% identická s DPP-IV a z 51% s DPP6 (Qi, et al. 2003). Obě tyto molekuly jsou exprimovány především v mozku, kde fungují jako regulátory draslíkových kanálů v neuronech (Clark et al. 2008) a mají význam ve vývoji centrální nervové soustavy (McNicholas et al. 2009).

Snížení genové exprese DPP10 bylo popsáno u karcinomu nosohltanu (Xiong et al. 2011) a kolorektálního karcinomu, což je spojeno s horší prognózou pro pacienta (Park et al. 2013).

1.3. Substráty DASH molekul v nádorových onemocněních

DASH molekuly se podílejí na mechanizmech rozvoje různých nádorových onemocnění. Většinu svých funkcí realizují proteolytickou modifikací biologicky aktivních peptidů, lokálně regulujících růstové vlastnosti jak vlastních nádorových, tak stromálních, ale i imunitních buněk (Sedo a Malik 2001). Limitovaná proteolýza DASH substrátu může vést nejen ke kvantitativní (funkční inaktivaci či aktivaci), ale i ke kvalitativní změně jejího signálního potenciálu (např. změna preference receptorového subtypu) (Busek, et al. 2004).

V souvislosti dobře je popsáno několik desítek přirozených biologicky aktivních peptidů DASH substrátů, z nichž některé jsou známými autokrinními nebo parakrinními regulátory významnými v patogenezi nádorových onemocnění (Busek, et al. 2008b). V následující kapitole se zaměřím na substráty DASH molekul, u nichž je předpokládán význam pro patogenezi nádorových onemocnění.

Členy pankreatické polypeptidové rodiny a důležitými substráty DPP-IV jsou **neuropeptid Y** a **peptid YY**. NPY se hojně vyskytuje v centrálním i periferním nervovém systému, kde se mimo jiné podílí na rozvoji angiogeneze a regulacích imunitní odpovědi (Lee et al. 2003). DPP-IV odštěpuje Tyr-Pro z N-konce NPY, a tím dává vznik další biologicky aktivní formě peptidu, NPY(3-36), která však má již jinou receptorovou preferenci (Kitlinska et al. 2003). NPY byl identifikován i jako přirozený substrát solubilní formy FAP proteinu z lidské krevní plazmy. FAP společně s DPP-IV mohou fungovat jako molekulární přepínače signalizace NPY (Wong et al. 2016). Peptid YY je přirozený střevní hormon s většinou inhibičním působením na mnohonásobné tkáňové cíle. Snížená exprese PYY byla pozorována během vzniku a progrese střevního adenokarcinomu (Tseng a Liu 2002). Ačkoliv NPY a PYY sdílí 70% sekvenční identitu, PYY není přirozeným endogenním substrátem FAP proteinu (Wong, et al. 2016).

Dalším substrátem DASH molekul je **substance P**, člen tachykininové rodiny s řadou biologických efektů v celém organizmu. SP je lokální mediátor fungující jako autokrinní/parakrinní růstový faktor (Palma et al. 1999). V souvislosti s nádorovou transformací a progresí je významná mitogenní aktivita SP, která byla prokázána v mnoha buněčných typech nejen ektodermálního, ale i mezodermálního původu. Angiogenní aktivita SP podporuje krevní zásobení tumoru (Ziche et al. 1991). DPP-IV štěpí SP postupně do podoby $SP_{(3-11)}$ a $SP_{(5-11)}$, kdy oba fragmenty jsou stále aktivní, nicméně jejich afinita k receptoru NK1 klesá (Mentlein 1999). Upregulace SP a jejího receptoru NK1 je významná v patologii mozkových nádorů, kde narušuje hematoencefalickou bariéru, podporuje růst tumoru a vede k otoku mozku (Harford-Wright et al. 2013). Stimulace NK1 receptoru v liniích transformovaných glioblastomových buněk vede ke zvýšení jejich proliferační aktivity a uvolnění interleukinu 6 (Yamaguchi et al. 2005). V rámci gliomageneze DPP-IV může proteolyticky inaktivovat SP, a tím dochází ke ztrátě signálního potenciálu (Busek, et al. 2008a).

Další velkou skupinou substrátů DASH molekul jsou **chemokiny** - rodina relativně malých cytokinů, které hrají roli v imunitním systému, ale i v procesech angiogeneze a regulace hematopoietických kmenových buněk (Zhong a Rajagopalan 2015). Řada

chemokinů patří mezi *in-vitro* a *in-vivo* substráty DPP-IV (Mentlein 1999) a *in-vitro* substráty DPP8 a DPP9 (Bjelke et al. 2006). Mezi prokázané substráty DASH molekul patří stromal cell-derived faktor 1, „regulated on activation normal T-cell expressed and secreted", eotaxin (CCL11), „macrophage-derived chemokine" (MDC, CCL22), „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), interleukin-3 (IL-3) (Van Damme et al. 1999; Zhong a Rajagopalan 2015). Exprese chemokinů a jejich receptorů byla popsána v gliomových buňkách (Arscott, et al. 2009; Robledo et al. 2001). Mezi jednu z nejvíce studovaných drah chemokinu/receptoru s možností terapeutického využití v řadě nádorových onemocnění patří SDF-1 se svým receptorem CXCR4 (člen G-proteinové receptorové rodiny) (Tang et al. 2015; Wolf, et al. 2008; Zhong a Rajagopalan 2015). SDF-1 (exprimován ve třech izoformách) je konstitutivně produkován v mnoha tkáních se zvýšenou permisivitou pro metastázy (Ben-Baruch 2008). Jeho proteolytickým štěpením molekulou DPP-IV vzniká produkt, který ztrácí svoji chemotaktickou aktivitu a zároveň může účinkovat jako receptorový antagonista CXCR4 receptoru (Van Damme, et al. 1999). CXCR4 v buňkách gliomových liniích po aktivaci ligandem SDF-1, navozuje fosforylaci mitogenem aktivovaných proteinkináz asociovaných s přežíváním a blokaci apoptózy gliomových buněk (Richardson 2016). Ve vzorcích lidských glioblastomů byla popsána navýšená exprese receptoru CXCR4, která prokazatelně souvisí s malignitou gliomových buněk a horší prognózou pro pacienty (Richardson 2016; Stremenova, et al. 2007; Tang, et al. 2015).

Z řady inkretinových hormonů patří mezi DASH substráty **glukagonu podobný peptid 1** (GLP-1), **glukagonu podobný peptid 2** (GLP-2) a **gastrický inhibiční polypeptid** (GIP). GLP-1 je do oběhu uvolňován po příjmu potravy. Stimuluje sekreci inzulínu, inhibuje sekreci glukagonu, zpomaluje vyprazdňování žaludku a podporuje pocit sytosti (Green a Flatt 2007). GLP-2 napomáhá intestinálnímu transportu hexózy, reguluje sekreci žaludečních kyselin a motilitu (Austin et al. 2016). U pacientů s diabetem mellitem druhého typu dochází postupně k úbytku B-buněk a ke snížení exprese inzulínu. Účinek GLP-1 je u těchto pacientů zachován, bohužel dochází k jeho degradaci proteázou DPP-IV, a tím ke zkrácení poločasu účinku tohoto hormonu. Inhibitory DPP-IV jsou využívány v terapii diabetu mellitu druhého typu. V dnešní době jsou dostupné DPP-IV inhibitory tzv. gliptiny (Kushwaha, et al. 2014). Vzhledem k širokospektrému působení DPP-IV v lidském těle může ovšem využití těchto inhibitorů mít závažné vedlejší účinky vedoucí k deregulaci imunitních funkcí a k diskutovanému navýšení rizika rozvoje některých typů nádorů (Amin et al. 2016; Masur et al. 2006; Stulc a Sedo 2010).

1.4. Nádorové mikroprostředí

Solidní tumory se skládají z nádorového stromatu a z vlastních nádorových buněk, včetně nádorových kmenových buněk, které jsou schopny sebeobnovy a diferenciace v heterogenní linie nádorových elementů. Většina nádorů vzniká z prekurzorů, které mají vlastnosti nádorové kmenové buňky (Motlik et al. 2007). Nádorové stroma se skládá z komponent extracelulární matrix a nenádorových buněk, zejména buněk imunitního systému, endotelií a nádorově asociovaných fibroblastů (CAFs) (Li et al. 2007). Nádorové mikroprostředí, vznikající vzájemnou interakcí těchto populací, určuje biologické vlastnosti maligních tumorů - podmiňuje diferenciaci, lokální agresivitu a metastazování transformovaných buněk (Polyak et al. 2009).

Nádorově asociované fibroblasty jsou významnými konstituenty nádorového mikroprostředí. Jsou odpovědné za obrat komponent extracelulární matrix prostřednictvím extracelulárně vyloučených proteáz, dále produkují pestrou škálu růstových faktorů, kterými ovlivňují další buňky stromatu i vlastní nádorové buňky. Vyznačují se expresí alfa aktinu

hladké svaloviny (alfa-SMA) nebo fibroblastového ukazatele vimentinu a TE-7 a sdílejí aktivovaný fenotyp jako myofibroblasty z hojících ran (Cirri a Chiarugi 2011; Goodpaster et al. 2008). Nádorově asociované fibroblasty jsou funkčně i fenotypově odlišné od fibroblastů z normální tkáně (Kolar et al. 2012; Strnad et al. 2010). Výsledky mnoha autorů ukazují, že předpokládaným zdrojem nádorově asociovaných fibroblastů jsou rezidentní fibroblasty a další mezenchymální buňky aktivované nádorovými buňkami. Mohou to být například endotelové buňky, pericyty, preadipocyty, makrofágy, mezenchymální kmenové buňky a buňky pocházející z hematopoetické kmenové buňky (Haviv et al. 2009; Polanska a Orimo 2013; Smetana et al. 2013), ale i nádorové buňky, které prošly epitelově-mezenchymovou transformací (De Wever et al. 2008; Plzak et al. 2010). Heterogenita CAFs je dána nejen rozdílným původem, ale také závisí na místně specifické indukci a ovlivnění buněk. Z tohoto důvodu mohou mít různě vzniklé nádorově asociované fibroblasty s obdobným biologickým potenciálem řadu funkčních a fenotypových odlišností (Ishii et al. 2011).

Normální lidské fibroblasty se mohou transformovat v nádorově asociované fibroblasty pomocí TGF-beta a endogenního lektinu galektinu-1 (Dvorankova et al. 2011; Valach et al. 2012). Porovnáním transkriptomu takto indukovaných CAFs s normálními fibroblasty nacházíme rozdíl v expresi téměř 600 genů. Za funkčně velmi důležité lze považovat geny kódující růstové faktory, cytokiny a chemokiny (Kolar, et al. 2012; Strnad, et al. 2010). Tyto fibroblasty jsou biologicky aktivní. Svojí produkcí molekul extracelulární matrix (např. fibronektin, tenascin, galektin-1) mimo jiné ovlivňují diferenciační profil normálních a maligních fibroblastů a nádorových buněk (Dvorankova, et al. 2011; Mifkova et al. 2014; Valach, et al. 2012). Některé biologické vlastnosti nádorově asociovaných fibroblastů jsou patrně obecné a nezávislé na typu nádoru, z kterého pochází (Dvorankova et al. 2012).

Role CAFs v nádorové progresi je mnohostranná. Podobně jako imunitní buňky a normální fibroblasty, CAFs inhibují raná stádia rozvoje nádoru (Orimo et al. 2005), ale v pokročilých stádiích, kdy jsou samy průběžně ovlivněny sekretovanými molekulami nádorových buněk nabývají schopnost ovlivnit fenotyp nádorových buněk směrem ke vzniku nádorových kmenových buněk. Tato vlastnost je pozorována u CAFs bez ohledu na jejich buněčný původ (Cirri a Chiarugi 2011). Není bez zajímavosti, že podobné funkční vlastnosti na základě podobných molekulárních charakteristik má i granulační tkáň vzniklá během hojení, což je v souladu s hypotézou H. Dvoraka („Tumors: wounds that do not heal“), prezentovanou před třiceti lety (Dvorak 1986).

Nádorové mikroprostředí primárních mozkových nádorů je závislé nejen na vlastních gliomových buňkách, ale i dalších buněčných typech (da Fonseca a Badie 2013; Charles et al. 2012). Zdá se, že makrofágy a některé typy lymfocytů mohou přímo ovlivnit agresivitu nádoru.

V nedávné době byla popsána nová stromální populace buněk z peritumorální tkáně pacientů s glioblastomem. Tato populace „glioblastomu asociovaných“ stromálních buněk má mnohé fenotypové a funkční vlastnosti společné s CAFs (Clavreul et al. 2012; Clavreul et al. 2014). Následně i další autoři popisují izolace mezenchymálních kmenových buněk z glioblastomu. Tyto netumorigenní stromální buňky v *in-vitro* podmínkách zvyšují proliferační potenciál a schopnost sebeobnovy glioblastomových kmenových buněk a jejich tumorigenicitu *in-vivo* (Hossain et al. 2015). Jiní autoři popisují dvě populace endogenních mezenchymálních stromálních buněk, které mohou podporovat nádorovou angiogenezi (Svensson et al. 2016). Zdroj těchto buněk není znám. Patrně jsou tyto buňky do nádoru atrahovány pomocí IL-8, monocytárního chemotaktického proteinu-1 a SDF-1 (Svensson, et al. 2016; Xu et al. 2010). Vzhledem k tomu, že řada autorů předpokládá patogenetický význam CAFs na různých úrovních onkogeneze a zároveň za slibný terapeutický cíl (Cirri a Chiarugi 2011), znalost mechanizmů a podmínek jejich biologických interakcí v nádorovém mikroprostředí glioblastomu je základem pro budoucí klinické využití.

2. Hypotéza a cíle práce

Nádorové mikroprostředí má významnou roli pro progresi nádorů. Je schopné ovlivnit diferenciaci, lokální agresivitu a metastazování transformovaných buněk (Polyak, et al. 2009). Dosavadní výsledky svědčí pro zapojení DPP-IV a FAP do různých biologických programů v různých v nádoru přítomných buněčných subpopulacích (Busek a Sedo 2013; Busek, et al. 2012). Na regulaci růstových vlastností normálních a transformovaných buněk se významně podílí i nádorově asociované fibroblasty. Funkční potenciál regulace se může uskutečňovat prostřednictvím proteolytické úpravy biologicky aktivních substrátů i lokálních mediátorů buněčné proliferace enzymovou aktivitou DASH molekul, nebo i neproteolytickými mechanizmy - přímým buněčným kontaktem.

V současné době nejsou dostatečně poznány mechanizmy gliomageneze závislé na vztazích jednotlivých buněčných populací, podílejících se na tvorbě tkáňového mikroprostředí. Předpokládáme, že analýza vztahů transformovaných gliálních buněk s definovanou expresí DPP-IV a FAP spolu s podrobně popsanými nádorově asociovanými fibroblasty může přiblížit významné vztahy v nádorovém mikroprostředí. Tyto výsledky mohou být přínosem pro návrh nových léčebných modalit.

Cíle práce:

I. Připravit stabilně transfekované lidské gliomové buněčné linie s indukovatelnou expresí různých variant genu lidské **dipeptidylpeptidázy-IV** (cytoplazmatická a secernovaná forma) jako instrument pro další experimenty zaměřené na posouzení významu DPP-IV v gliomagenezi.

II. Připravit stabilně transfekované lidské gliomové buněčné linie s indukovatelnou expresí genu lidského enzymově aktivního a neaktivního **fibroblastového aktivačního proteinu** jako instrument pro další experimenty zaměřené na posouzení významu intrinzické enzymové aktivity pro její biologické funkce v regulaci růstových vlastností transformovaných gliálních buněk.

III. Připravit biologický systém pro *in-vivo* monitorování velikosti nádoru v experimentálním modelu ortotopické xenotransplantace.

IV. Ověřit funkčnost indukovatelné exprese **DPP-IV** a **FAP** v *in-vivo* modelu stereotakticky kontrolované ortotopické implantace buněk do mozku imunodeficientních myší.

V. Připravit model a popsat vzájemné účinky vybraných buněčných populací nádorového mikroprostředí pro růstové a migrační vlastnosti transformovaných gliálních buněk *in-vitro*.

VI. Připravit koimplantační *in-vivo* model nádorově asociovaných fibroblastů s glioblastovými buněčnými liniemi.

3. Materiál a metodika

3.1. Laboratorní materiál

3.1.1. Laboratorní přístroje a pomůcky

- Pipety Gilson, Francie
- Mikrostříkačka Hamilton, ThermoFisher Scientific, USA
- Atraumatický šicí set, Chirlac, ČR
- Vortex-Genie2, Scientific Industries, USA
- Orbitální třepačka, PTR 30, Grant-Bio, UK
- 12-ti zkumavkový magnet, Qiagen, USA
- Centrifuga s výkyvným rotorem, Hettich Zentrifugen Universal 16R, Německo
- Centrifuga, Hettich Zentrifugen Universal 320R
- CO_2 termostat, Sanyo, Japonsko
- Světelný mikroskop, Nikon TMS, Japonsko
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX 70, Olympus Czech Group s.r.o., ČR
- Konfokální mikroskop Olympus IX 81 s 488, 543 a 633 nm lasery, FluoView 300, Olympus Czech Group s.r.o., ČR
- Spektrofluorimetr FluoroMax-4, Horiba Jobin Yvon, USA
- Spektrofluorimetr1420 multilabel counter Victor 3, Perkin Elmer, USA
- Spektrofotometr Helios Unicam, Thermo Scientific, USA
- Vodní lázeň Neslab RTE7, Thermo Scientific
- Autokláv, SterilCave 18BDH, Cominox, Itálie
- Coulter Counter Z2 se 100 εm kapilárou, Beckman Coulter, Německo
- Microplate reader Sunrise, Tecan, Švýcarsko
- Průtokový cytometr BD FACS Canto II, BD Biosciences, USA
- Termocyklér ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, USA
- Kryotom, Bright Instruments, UK
- Stereotaktické zařízení, Stoelting Europe, Irsko
- iBox® Scientia Small Animal Imaging System s CCD kamerou BioChemi HR 400, obojí UVP, USA

3.1.2. Spotřební materiál

- Pipetovací špičky, Gilson, Francie
- Mikrozkumavky, Eppendorf, Německo
- Plastik pro tkáňové kultury, Nunc, USA
- 6-ti jamkové destičky CellBind 6-well, Corning, Holandsko
- 24-jamkové buněčný kultivační inzerty s 8 µm póry, Becton Dickinson, Německo
- Sterilní filtry Millex GV 0,22 εm, Millipore, Irsko
- Laboratorní rukavice, Promedica, ČR

3.1.3. Chemikálie, roztoky

- Trypsin 0,25%, Biochrom, Německo

- Trypsin 0,25%-kyselina ethylen-diamin-tetraoctová 0,02% (trypsin-EDTA), Sigma-Aldrich Chemie, ĺR
- Fosfátový pufr (PBS) ï 137 mM NaCl, 4 mM Na_2HPO_4, 2,68 mM KCl, 1,76 mM KH_2PO_4, pH 7,4
- PBS/EDTA byla pŚipravena pŚidavkem EDTA do fosfátového pufru (0,02%, pH 7,4)
- PBS pufr s pŚidavkem azidu sodného (0,1%)
- Kompletní kultivaĺní médium bylo pŚipraveno z Dulbeccoôs modified Eagleôs médium (DMEM) s doplŘkem fetálního hovĎzího séra (FBS, 10%), obojí Sigma-Aldrich Chemie, ĺR
- Opti-Mem Reduced Serum Medium, Gibco, Invitrogen, USA
- Tet System Approved FBS, Clontech-Takara Bio Europe, Francie
- Streptomycin byl pŚipraven ŚedĎním v deionizované sterilní vodĎna koncentraci 1 mg/ml a sterilnĎfiltrován, Sigma-Aldrich Chemie, ĺR
- Penicilin G byl pŚipraven ŚedĎním v deionizované sterilní vodĎna koncentraci 1000 U/ml a sterilnĎfiltrován, Sigma-Aldrich Chemie, ĺR
- Zeocin byl pŚipraven ŚedĎní v deionizované sterilní vodĎna koncentraci 50 mg/ml a sterilnĎfiltrován, Invitrogen, USA
- Hygromycin B (zásobní koncentrace 50 mg/ml) byl pŚipraven rozŚedĎním v PBS na koncentraci 10 mg/ml a sterilnĎfiltrován, Invitrogen, USA
- Geneticin/G418 byl pŚipraven ŚedĎním v deionizované sterilní vodĎna koncentraci 50 mg/ml a sterilnĎfiltrován, Sigma-Aldrich Chemie, ĺR
- Doxycyklin byl pŚipraven ŚedĎním v deionizované sterilní vodĎna koncentraci 1 mg/ml a sterilnĎfiltrován, Clontech-Takara Bio Europe, Francie
- HovĎzí sérový albumin (BSA), Sigma-Aldrich Chemie, ĺR
- Coulter Izoton II Diluent, Beckman Coulter
- Lyzaĺní pufr s pŚidavkem inhibitorŢ proteáz - Tris-HCL 10 mM pH 7,5; Triton X-100 1%; SDS 0,1%; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glycerol 10%; Pepstatin A 25 εM; E64 50 εM; AEBSF 200 εM
- Lipofectamine^{TM}2000, Invitrogen, USA
- Dynabeads Sheep anti-Mouse IgG, Dynal Biotech, Invitrogen, USA
- Substrát glycyl-L-prolyl-7-amidomethylkumarin (H-Gly-Pro-AMC), Bachem AG, Ġvýcarsko
- Substrát N-benzylokarbonyl-glycyl-L-prolyl-7-amidomethylkumarin (Z-Gly-Pro-AMC), Bachem AG, Ġvýcarsko
- Methylenová modŚ(5 g/l v 50% v/v ethanolu)
- 1% roztok SDS
- 4% paraformaldehyd
- TriZol reagent, Invitrogen, USA
- ThermoScript One-Step System, Invitrogen, USA
- ELISA-kit DuoSet DPP-IV/CD26, DY1180, R&D Systems, NĎmecko
- ELISA-kit DuoSet FAP, DY3715, R&D Systems, NĎmecko
- Substrátový roztok peroxidu vodíku a tetramethylbenzidinu, 1:1, DY998, R&D Systems, NĎmecko
- Kit RiboGreen RNA Quantitation Kit, Molecular Probes, Eugene, USA
- Detekĺní kit Luciferase Assay System, Promega Corporation, Madison, USA
- Permeabilizaĺní pufr Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer, BioLegend, USA

- Roztok SDS pro stanovení koncentrace proteinů (2% Na_2CO_3, 0,4% NaOH, 0,16% vínan sodný, 1% SDS)
- 4% roztok modré skalice ($CuSO_4$)
- Folin & Ciocalteuův fenolové činidlo, Sigma-Aldrich Chemie, ČR
- 5% roztok gluteraldehydu v PBS
- Montovací médium Aqua Polymount, Polysciences, Německo
- Jung Tissue Freezing Medium, Leica Microsystems, Německo
- Heamatoxylin roztok dle Mayera, Sigma-Aldrich Chemie, ČR
- Eosin vodný roztok, Sigma-Aldrich Chemie, ČR
- Ketamin, Kepro, Holandsko
- Xylazin, Kepro, Holandsko

3.1.4. Vektory, cDNA

- Indukovatelný expresní genový systém Tet-On Advanced, Clontech-Takara Bio Europe, Francie
- pcDNA4, Invitrogen, USA
- cDNA proteinu FAP, NM_004460.2, OriGene, USA
- cDNA mKate2, Evrogen, Rusko
- lineární hygromycin B marker, Clontech-Takara Bio Europe, Francie

3.1.5. Seznam použitých protilátek

Protilátka	Původ	klon/ kat. č.	ředění	Výrobce
Anti CD45	myš	C-7556	1:50	Sigma-Aldrich Chemie, ČR
Anti MART-1 (MELAN-A)	myš	18-7259	1:100	Invitrogen, USA
Anti HMB-45	myš	08-0050	neředěná	Invitrogen, USA
Anti cytokeratin	králík	ab 9377	1:100	Abcam, UK
Anti Vimentin	myš	N1521	neředěná	DAKO, Dánsko
Anti DPP-IV	myš	M-A261	neředěná	Abcam, UK
Anti DPP-IV	krysa	E19	1:100	Vitatex, USA
Anti human CD26/DPP-IV-fykoerytrin	krysa	222113	1:20	R&D Systems, UK
Anti FAP	myš	F11-24	neředěná	Santa Cruz, Exbio, ČR
Anti FAP	krysa	D8	1:300	Vitatex, USA
Anti FAP	krysa	D28	1:100	Vitatex, USA
Alexa Fluor 488 anti rat IgG	koza	A 21208	1:100	Invitrogen, UK
Alexa Fluor 546 anti rat IgG	koza	A 11081	1:500	Invitrogen, UK
ToPro	-	T3605	-	ThermoFisher Scientific, USA
DAPI	-	D9542	-	Sigma-Aldrich Chemie, ČR

3.2. Buněčné kultury, primární buněčné kultury a příprava vzorku

Pro experimenty byly použity lidské gliomové buněčné linie U87 a T98G (odvozeny z glioblastoma multiforme, Cell Lines Services, CLS, Německo a American Type Culture Collection, ATCC, LGC Standards, Velká Británie) a U373 (odvozeno z gliomu stupně III dle WHO, ATCC, LGC Standards). Lidské osteosarkomové buňky U2-OS-Luc Tet-On Control byly pořízeny u firmy Clontech (Clontech-Takara Bio Europe, Francie).

Buňky byly kultivovány podle standardních protokolů a doporučení společnosti American Type Culture Collection nebo Clontech. Buňky byly pěstovány v kultivačních plastových nádobách o ploše 25 cm^2 v termostatu při 37° C (5% CO_2/95% vzduch) v kultivačním médiu DMEM, které bylo doplněno 10% fetálním hovězím sérem (FBS). Všechny metody byly upraveny dle předešlých zkušeností a podle protokolů Freshney R. I. (2005).

Ve spolupráci s Prof. MUDr. Karlem Smetanou, DrSc. z Anatomického ústavu 1. LF UK byla připravena primární kultura nádorově asociovaných fibroblastů z kožní metastázy primárního nodulárního melanomu (Breslow index 2,25 a Clarck index III). Vzorek byl nakrájen na malé kousky a ošetřen 0,25% roztokem trypsinu po dobu 30 minut při 37° C. Tkáňové explantáty byly přeneseny do 6-ti jamkové destičky a kultivovány v DMEM s 10% FBS a s antibiotiky (streptomycin f.c. 100 µg/ml, penicilin G f.c. 100 U/ml) při 37° C a 5% CO_2. Během jednoho týdne začaly fibroblasty migrovat z explantátu.

Normální dermální fibroblasty (NFs) byly izolovány ze vzorku kůže zdravé ženy. Vzorek byl inkubován přes noc v 0,3% trypsinu při 4° C, epidermis byla stáhnuta a zbylá dermální tkáň zpracována, jak je popsáno výše. Migrující buňky z explantátů byly pravidelně sbírány trypsinizací (0,25% trypsin a 0,02% EDTA) a charakterizovány imunocytochemickými metodami. Buněčné kultury s více jak 90% populací negativních buněk na leukocytový (CD45), melanocytový (MELAN-A, HMB-45) a epiteliální (keratiny) buněčný ukazatel a pozitivní na vimentin byly považovány za fibroblasty. Oba typy fibroblastů byly expandovány a buňky v 5. (NFs) a 7. (CAFs) pasáži použity pro experimenty (Trylcova et al. 2015).

Stanovení počtu buněk v buněčné suspenzi bylo prováděno na přístroji Coulter Counter Z2 ve 100µm kapiláře v roztoku Coulter Izoton II Diluent (obojí Beckman Coulter, Německo).

Celkový buněčný lyzát (cca 10 x 10^6 buněk/ml) byl připravován na ledu v lyzačním pufru s přídavkem inhibitorů proteáz. Ve vzniklém supernatantu byla stanovena koncentrace proteinů. Lyzát byl skladován při -21° C pro další použití.

3.2.1. Selekční antibiotika pro transfekované buňky

Testován byl hygromycin B, geneticin a zeocin. Před použitím selekčních antibiotik a ustanovením stabilně transfekovaných buněk byla antibiotika titrována pro určení optimální selekční koncentrace pro U373. Optimální koncentrace byla stanovena pro všechny typy antibiotik a pro buněčnou linii U373 dle instrukcí výrobce. Jako selekční koncentrace byla vybrána nejnižší koncentrace, která u buněk způsobila masivní úhyn během prvních pěti dnů a k celkovému usmrcení buněk došlo do dvou týdnů.

Pro selekci stabilních transfektantů byla použita finální koncentrace hygromycinu B 200 µg/ml, geneticinu 400 µg/ml a zeocinu 400 µg/ml v kultivačním médiu.

3.3. Příprava vektorů, transfekce a ustanovení stabilních Tet on buněčných linií

3.3.1. Vektory

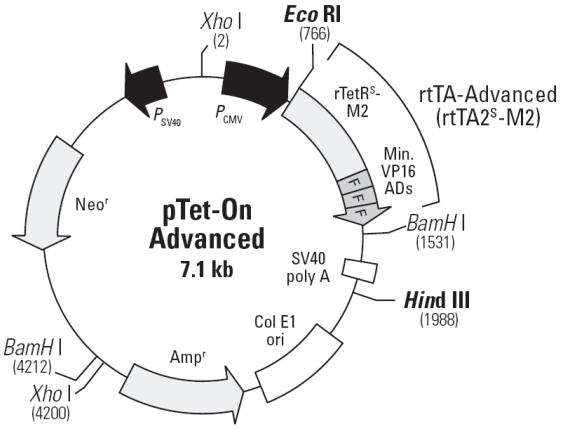
Příprava vektorů, konstrukce a ověření mutace Ser^{630} → Ala u DPP-IV a Ser^{624} → Ala u FAP byla provedena v naší laboratoři ve spolupráci s Mgr. Daliborem Kožíškem, Ph. D.. cDNA lidské DPP-IV byla získána z předešlých experimentů naší laboratoře. cDNA byla množena a zaklonována do pTRE-Tight vektoru indukovatelného expresního genového systému Tet-On Advanced. Připraveno a sekvenací ověřeno bylo celkem osm plazmidů s DPP-IV: **DPP-IV/pTRE** (s wt podobou genu lidské DPP-IV), **DPP-IVmut/pTRE** (s enzymově neaktivní podobou genu lidské DPP-IV), **cytDPP-IV/pTRE, cytDPP-IVmut/pTRE** (konstrukty bez transmembránové části s cytoplazmatickými aminokyselinami na N-konci s wt DPP-IV a enzymově neaktivní DPP-IV). Pro extracelulárně secernovanou formu DPP-IV byl nejprve zvolen signální peptid z versicanu (Swissprot accession number P13611, http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/) a následně signální sekvence z lehkého řetězce Ig Kappa doplněná o iniciační kodon a restrikční místo BamHI nutné pro klonování (**secDPP-IV/pTRE** a **secDPP-IVmut/pTRE**). cDNA proteinu FAP byla zaligována do linearizovaného vektoru pTRE-Tight (**FAP/pTRE** s wt podobou genu lidského FAP). Bodovou mutagenezí byla připravena enzymově neaktivní podoba genu lidského FAP (**FAPmut/pTRE**) (viz tabulka č. 1).

označení	konstrukt	předpokládaná lokalizace
DPP-IV/pTRE	Nativní DPP-IV zaklonovaná do vektoru pTRE-Tight	transmembránová
DPP-IVmut/pTRE	Enzymově neaktivní DPP-IV zaklonovaná do vektoru pTRE-Tight	transmembránová
cytDPP-IV/pTRE	DPP-IV bez transmembránové domény ve vektoru pTRE-Tight	cytoplazmatická
cytDPP-IVmut/pTRE	Enzymově neaktivní DPP-IV bez transmembránové domény ve vektoru pTRE-Tight	cytoplazmatická
secDPP-IVver/pTRE	DPP-IV se signálním peptidem z versicanu ve vektoru pTRE-Tight	secernovaná
secDPP-IVvermut/pTRE	Enzymově neaktivní DPP-IV se signálním peptidem z versicanu ve vektoru pTRE-Tight	secernovaná
secDPP-IV_IgK/pTRE	DPP-IV se signálním peptidem z Ig kappa ve vektoru pTRE-Tight	secernovaná
secDPP-IV_IgKmut/pTRE	Enzymově neaktivní DPP-IV se signálním peptidem z Ig kappa ve vektoru pTRE-Tight	secernovaná
FAP/pTRE	Nativní FAP zaklonovaný do vektoru pTRE-Tight	transmembránová
FAPmut/pTRE	Enzymově neaktivní FAP zaklonovaný do vektoru pTRE-Tight	transmembránová

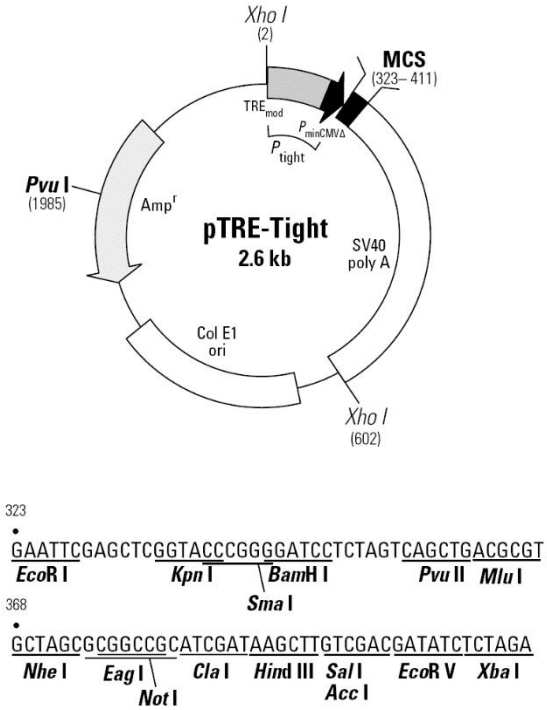
Tab. č. 1: Seznam vektorů nesoucí wt nebo mutovanou formu genu pro DPP-IV respektive FAP připravených pro transfekci modelových buněk.

Vektor pcDNA4 s cDNA mKate2 byl získán darem od Doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. z Laboratoře proteas lidských patogenů, Ústav organické chemie a biochemie.

Jako transfekční postup byl použit nevirový, lipozomem-zprostředkovaný přenos nukleové kyseliny do buněk. Pro vlastní transfekci byl použit Lipofectamine^{TM}2000 s vysokým transfekčním výtěžkem. Selekce na základě antibiotické rezistence následovala pro zisk stabilně transfekovaných buněk. Vektor pTet-On-Advanced (obrázek č. 1) nese společně s genem pro regulační protein rtTA antibiotickou rezistenci na geneticin a pTRE-Tight vektor (obrázek č. 2) byl kontransfekován společně s lineárním hygromycin B markerem.



Obrázek č. 1: Restrikční mapa vektoru pTet-On-Advanced. Unikátní restrikční místa jsou uvedena tučným písmem (převzato z manuálu firmy Clontech).



Obrázek 1. 2: Mapa a mnohonásobná klonovací místa (MCS) vektoru pTRE-Tight. Unikátní restrikční místa jsou označena tučným písmem (převzato z manuálu firmy Clontech).

3.4. Transfekce a selekce Tet-On-Advanced buněčných linií obsahujících pTRE-Tight s cDNA pro DPP-IV a FAP

V rámci mé diplomové práce (Němeková 2009) jsem připravila a testovala stabilní buněčné linie U373 nesoucí vektor Tet-On-Advanced (linie **U373On**). Schopnost indukce exprese proteinu byla testována tranzientní transfekcí vektorem pTRE-Tight-Luc, následnou indukcí doxycyklinem v koncentraci 10^{-6} g/ml a stanovením luciferázové aktivity.

V případě druhé transfekce bylo nutné využít kotransfekce lineárního hygromycinového markeru, coby lineární cDNA s genem pro rezistenci na Hygromycin a vlastního plazmidu pTRE-Tight. U373On buněčná linie byla kotransfekována dle standardního protokolu výrobce Lipofectamine™2000 (Invitrogen) vektorem pTRE-Tight (s danou formou cDNA pro DPP-IV a FAP) a lineárním hygromycinovým markerem (v poměru 20:1). Populace byla pasážována a přenesena do nádob s větším kultivačním povrchem. Jako selekční médium bylo použito kompletní médium obsahující předchozími experimenty ověřené koncentrace geneticinu a hygromycinu B. Buňky byly denně kontrolovány, přibližně každý třetí den bylo měněno selekční médium.

Hygromycin-rezistentní klony byly izolovány a přeneseny do 24-jamkové destičky. Při dalším pasážování byly expandovány na větší povrch a do více kultivačních nádob k následnému ověření inzerce a exprese transgenu po indukci doxycyklinem (10^{-6} g/ml, 72 hodin).

Získané klony byly postupně testovány a výsledná hodnota exprese proteinu byla porovnána s bazální enzymovou aktivitou DPP-IV respektive FAP transfekovaných neindukovaných buněk (Busek, et al. 2012).

Vzniklé stabilní transfektanty s U373 s wt podobou genu DPP-IV (U373onDPP-IV) byly následovně transfekovány vektorem pcDNA4 s cDNA genu mKate2 pomocí Lipofectamine™2000 a stabilní transfektanty selektovány stejným způsobem jako je popsáno výše za pomoci antibiotika Zeocinu.

Z každého vhodného stabilního transfekovaného klonu byl připraven alikvot k zamrazení a uchování.

3.5. Magnetic-Activated Cell sorting (MACS)

Dynabeads Sheep anti-Mouse IgG společně s primární myší protilátkou byl použit pro pozitivní izolaci buněk exprimujících wt nebo mutovanou podobu genu DPP-IV nebo FAP. Byla zvolena nepřímá metoda separace.

Exprese transmembránové formy proteinu DPP-IV a FAP v buňkách byla indukována po dobu 48 hodin přidavkem doxycyklinu do média (f.c. 10^{-6} g/ml). Buňky byly trypsinizovány a stanoven jejich počet. Buňky byly centrifugovány (4 minuty, 4° C, 130 g) a buněčný pelet resuspendován v PBS pufru obsahujícím 0,1% hovězího sérového albuminu (BSA) na výslednou koncentraci buněk 10 x 10^6 buněk/ml.

Dynabeads (25 ε l Dynabeads/10 x 10^6 buněk) byly před použitím dvakrát opláchnuty 1 ml PBS obsahujícím 0,1% BSA. Ve 2 ml centrifugační zkumavce byl smíchán 1 ml buněčné suspenze s primární myší protilátkou anti-CD26 pro buňky exprimující DPP-IV (klon M-A261) nebo myší anti-FAP (klon F11-24) pro FAP pozitivní buňky.

Buňky byly inkubovány po dobu 15 minut při 4° C. Následoval dvakrát oplach PBS s 0,1% BSA a centrifugace (8 minut, 4° C, 225 g). Buněčný pelet byl resuspendován v čerstvém PBS s 0,1% BSA na stejnou buněčnou koncentraci. K buněčné suspenzi byla přidána suspenze Dynabeads a inkubováno společně 20 minut při 4° C na orbitální třepačce. Objem PBS s 0,1% BSA byl zdvojnásoben a zkumavka uložena do 12-ti místného magnetu. Dynabeads navázané na buňky byly přichyceny k magnetu, zbylá suspenze byla odsáta a přenesena do malé Petriho misky (tato frakce pojmenována jako negativní frakce). Pro pozitivní separaci byly použity buňky zachycené na magnetu. Buňky byly 4x opláchnuty (1 ml PBS s 0,1% BSA) a nasazeny do 10 cm Petriho misky a pěstovány ve standardních podmínkách.

3.6. Biochemické stanovení enzymové aktivity DPP-IV a FAP

Enzymová aktivita DPP-IV a FAP byla stanovována v kyvetách kontinuální fluorimetrickou metodou při excitační vlnové délce 380 nm a emisní vlnové délce 460 nm. Exopeptidázová aktivita byla stanovena pomocí fluorogenního substrátu glycyl-L-prolyl-7-amidomethylkumarin (H-Gly-Pro-AMC) a endopeptidázová aktivita proteinu FAP pomocí N-benzylokarbonyl-glycyl-L-prolyl-7-amidomethylkumarin (Z-Gly-Pro-AMC) ve finální koncentraci 50 ε M. Stanovení exopeptidázové aktivity bylo provedeno v temperované (37° C) reakční směsi (celkový objem 2000 ε l) obsahující 20 ε l vzorku, 1980 ε l PBS pH 7,4 a 20 ε l substrátového roztoku. Endopeptidázová reakce probíhala v temperované reakční směsi vzorku a 25mM fosfátového pufru s 4% metanolem a 1mM EDTA pH 7,4. Reakce byla zahájena v kyvetěse směsí pufru a substrátu, po 30 vteřinách byl přidán vzorek a kinetika viabilních buněk stanovena po dobu 60 sekund. Pro permeabilizaci buněk pro stanovení celkové enzymové aktivity byl použit Triton X-100 (f.c. 0,1%). Reakce ukončena po 150 sekundách. Uvolnění 7-amino-4-methylkumarinu bylo monitorováno na spektrofluorimetru FluoroMax-4 (Horiba Jobin Yvon, USA) a vyhodnoceno v programu Fluor Essence V3. Veškerá měření byla prováděna v duplikátech (Sedo et al. 1998).

3.7. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) pro lidskou DPP-IV/CD26 a FAP

Pro kvantitativní stanovení lidské DPP-IV a FAP byly použity komerční ELISA-kity DuoSet DPP-IV a DuoSet FAP. Příprava vzorků a reagencií byla provedena dle protokolu

výrobce. Každý krok byl prováděn za laboratorní teploty, vzorky a standardní vzorky byly rozředěny v roztoku PBS s 1% hovězím sérovým albuminem. Primární protilátka rozředěná v PBS (anti DPP-IV, f.c. 2 µg/ml a anti FAP, f.c. 1 µg/ml) byla přes noc navázána na 96-jamkovou průhlednou destičku. Jamky byly následně třikrát opláchnuty (Wash buffer) a blokovány blokačním pufrem (1% BSA v PBS) po dobu jedné hodiny, následně opět opláchnuty. Standardní nebo testované vzorky byly v duplikátech pipetovány do připravené 96-jamkové destičky a doplněny Ăassay diluentñ RD1-57. Po dvouhodinové inkubaci při RT byly jamky opláchnuty. Do každé jamky bylo přidáno 200 �biotinylované detekční protilátky (f.c. 1 µg/jamka anti DPP-IV nebo anti FAP) a následovala opět dvouhodinová inkubace a oplach. Každá jamka byla naplněna 200 ESL substrátového roztoku (peroxid vodíku a tetramethylbenzidin, 1:1) a reakce byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě v temnu a následně zastavena přídavkem 50 ESL 2 M kyseliny sírové.

Optická denzita byla stanovena do 30 minut na přístroji Microplate reader Sunrise při vlnové délce 450 nm a korekce byla odečtena při vlnové délce 570 nm. Výsledné hodnoty byly použity pro konstrukci kalibrační křivky a vyhodnocení dat.

3.8. Příprava kondiciovaného média

$1x10^6$ fibroblastů (CAFs i NFs) nebo U87 buněk bylo nasazeno do 100 mm Petriho misky v DMEM s 10% přídavkem FBS. Po 24 hodinách bylo médium odsáto, buňky opláchnuty PBS a dále kultivovány v DMEM bez přídavku séra po dobu 72 hodin.

Kondiciovaná média byla odsáta, centrifugována (4 minuty, 4° C, 225 g), sterilně filtrována (Millex GV 0,22 µm) a okamžitě použita pro migrační a proliferační experimenty. Jako kontrola bylo použito stejně připravené DMEM médium bez expozice buňkám.

3.9. Stanovení buněčné proliferace

Stanovení proliferace transfekovaných buněk bylo provedeno v 96 jamkové destičce. Do každé jamky bylo nasazeno 2000 buněk, které byly 24 hodin kultivovány za standardních podmínek. Druhý den bylo vyměněno kultivační médium za indukční médium (D-MEM + 10% FBS + různé koncentrace doxycyklinu), kontrolním buňkám bylo vyměněno pouze čerstvé médium. Buňky byly fixovány a barveny methylenovou modří v různých časových úsecích. Pro každou koncentraci a časový úsek bylo použito 8 jamek.

Buňky byly lyzovány 1% SDS a relativní počet buněk stanoven odečtením absorbance při vlnové délce 630nm na přístroji Microplate reader Sunrise. Odečtená absorbance byla úměrná počtu buněk. Pro ověření správnosti výsledků, byly buňky v některých experimentech počítány na přístroji Coulter Counter jak bylo popsáno výše.

Buňky U87 a U373 pro stanovení proliferační aktivity pod vlivem kondiciovaného média z CAFs, NFs nebo vlastních gliomových buněk byly nasazeny v koncentraci $1x10^4$ buněk/jamka ve 24-jamkové destičce do kondiciovaného média doplněného 1% FBS nebo do kontrolního DMEM s 1% FBS. Po 96 hodinách bylo do všech jamek přidáno 0,5 ml čerstvě připraveného kondiciovaného média. V daných časových intervalech byly buňky sbírány trypsinizací a počítány na Coulter Counter Z2. Všechny experimenty byly opakovány alespoň dvakrát v kvadruplikátech.

3.10. Průtoková cytometrie

Buňky byly sbírány trypsinizací a centrifugovány (4 minuty, 4° C, 130 g). Pelet byl resuspendován v PBS pufru s azidem sodným (0,1%) a k buněčné suspenzi byl pomalu

pipetován 4% paraformaldehyd (v poměru 1:1). Fixace buněk probíhala 1 hodinu při 4° C a následoval 2x oplach PBS pufrem a centrifugace (4 minuty, 4° C, 130 g). Na závěr byly buňky resuspendovány v PBS pufru (0,1% azid sodný).

Přibližně $1x10^5$ DPP-IV exprimujících buněk bylo pipetováno do zkumavky a centrifugováno (5 minut, 4° C, 130 g). K peletu byly přidány 2 ε l neředěné protilátky (anti-human CD26/DPP-IV-phycoerythrin, klon 222113) a inkubovány v temnu 30 minut. Po inkubaci byly buňky dvakrát opláchnuty PBS pufrem.

Buňky testované na expresi FAP proteinu byly permeabilizovány (Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer), inkubovány s 2 ε l neředěné protilátky (anti-FAP, D28), opláchnuty v permeabilizačním roztoku a inkubovány 30 minut ve tmě při RT s 2 µl Alexa Fluor 546. Na závěr byly buňky opláchnuty permeabilizačním roztokem.

Vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru BD FACS Canto II v programu Diva 5 pro akvizici. Histogramy byly vyhodnoceny v programu Flow Jo (TreeStar Inc., USA) využitím modelu Dean-Jett-Fox. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento pozitivních buněk ze sledované populace, nebo jako podíl mediánu intenzity fluorescence (MFI) pozitivních a negativních populací buněk.

3.11. Izolace a kvantifikace celkové RNA, real time RT-PCR

Buňky byly sbírány a celková RNA byla izolována činidlem TriZol dle instrukcí výrobce (2,5 ml/ 100 mm Petriho miska). Koncentrace celkové RNA byla stanovena kitem RiboGreen RNA Quantitation Kit.

Gen kódující region-specifické oligonukleotidové priméry a fluorogenní TaqMan próby pro real time RT-PCR metodu exprese zkoumaných transkriptů byly připraveny v programu Primer Express (Applied Biosystems, USA) a syntetizovány v Proligo (Francie) a Applied Biosystems. Přehled primérů a sond je uveden v tabulce č. 2. Exprese mRNA DPP-IV, FAP a beta-aktinu (interní referenční transkript) byla kvantifikována párovou RT-PCR využitím ThermoScript One-Step System. Real time RT-PCR byla provedena dvakrát v MicroAmp Optical 96-jamkové reakční desce na přístroji ABI PRISM 7700 Sequence Detection System v programu Sequence Detection System. Reverzní transkripce byla provedena při 58° C po dobu 30 minut a následné spuštění amplifikační reakce (tzv. hot start) probíhalo s iniciální denaturací při 95° C po dobu 5 minut. V každém ze 45 amplifikačních cyklů pak denaturace trvala 15 sekund při 95° C a nasednutí primérů a sond spolu s elongací šetřící 1 minutu při 58° C. Prahová hodnota cyklů (Ct) amplifikačních reakcí byla zobrazována graficky po odečtení pozadí intenzity fluorescence (qRFI) reportérové barvy (6-FAM nebo VIC) proti počtu PCR cyklů v programu Sequence Detection System. Exprese cílových transkriptů byla normalizována na expresi mRNA beta-aktinu použitím metody qCt (Livak a Schmittgen 2001).

GeneBank Transkript	Vstupní č.	Sekvence a finální koncentrace primérů a TaqMan sond
DPP-IV	**NM_001935**	
	Forward primér:	5'-TGGAAGGTTCTTCTGGGACTG-3', 200 nmol/l
	Reverse primér:	5'-GATAGAATGTCCAAACTCATCAAATGT-3', 200 nmol/l
	TaqMan sonda:	5'-(6-FAM)CACCGTGCCCGTGGTTCTGCT(TAMRA)-3', 200 nmol/l
FAP	**NM_004460**	
	Forward primér:	5'-TGCCACCTCTGCTGTGC-3', 200 nmol/l
	Reverse primér:	5'-GAAGCATTCACACTTTTCATGGT-3', 200 nmol/l

	TaqMan sonda:	5'-(6-FAM) TGCATTGTCTTACGCCCTTCAAGAGTTC(TAMRA)-3', 200 nmol/l
beta-aktin	**NM_001101**	
	Forward primér:	5'-CTGGCACCCAGCACAATG-3', 200 nmol/l
	Reverse primér:	5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3', 200 nmol/l
	TaqMan sonda:	5'-(VIC)AGCCGCCGATCCACACGGAGT(TAMRA)-3', 200 nmol/l

Tabulka č. 2: Přehled primérů a sond pro real time RT-PCR.

3.12. Stanovení koncentrace proteinu

Celková koncentrace proteinu ve vzorcích byla stanovena metodou dle Lowryho (Lowry et al. 1951). Vzorky byly doplněny deionizovanou vodou do celkového objemu 400 ěl. Do každé zkumavky bylo přidáno 1,2 ml roztoku SDS a okamžitě promícháno (smícháno v poměru 100:1 se 4% $CuSO_4$). Po 10 minutách inkubace bylo do každé zkumavky napipetováno 120 ěl Folin & Ciocalteuův fenolového činidla (1:1 naředěno v deionizované vodě) a okamžitě promícháno. Vzorky byly 45 minut inkubovány v temnu při pokojové teplotě. Absorbance byla odečtena na spektrofotometru při nastavené vlnové délce 660 nm. Standardní křivka byla připravena s použitím BSA. Všechny vzorky byly stanoveny třikrát.

3.13. Stanovení migračního potenciálu buněk

$6x10^4$ U87, U373 nebo T98G buněk v DMEM médiu bylo nasazeno do 24-jamkových buněčných kultivačních inzertů s 8 µm póry a ponecháno migrovat 8 nebo 24 hodin. Buňky, které nemigrovaly, byly odstraněny vatovou tyčinkou. Buňky, které migrovaly na spodní stranu membrány, byly zafixovány 5% gluteraldehydem v PBS po dobu 15 minut a barveny methylenovou modří. Buňky byly počítány v mikroskopu Olympus IX 70 v pěti nepřekrývajících polí z každého inzertu při 200-násobném zvětšení. Všechny experimenty byly provedeny alespoň dvakrát v kvadruplikátech.

3.14. Experimentální model ortotopické xenotransplantace

Použití zvířat pro experimenty bylo schváleno Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat (1. LF UK) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy, dle platných zákonů.

Pro experimenty byly použiti 6-7 týdnů staří samci laboratorního myšího kmene NOD. 129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J (The Jackson Laboratory, USA) vážící přibližně 25 g. Pokusná zvířata byla umístěna a chována v Centru pro experimentální biomodely 1. LF UK.

Při plné celkové anestézii (i. m. Ketamin (100 mg/kg) a Xylazin (20 mg/kg)) byla provedena chirurgická implantace požadovaného materiálu do mozku pokusného zvířete. Kožní kryt, periost byl odstraněn standardními chirurgickými postupy za využití chirurgických nástrojů používaných v humánní medicíně. Zvíře bylo upevněno do stereotaktického zařízení doplněného adaptérem pro myš. Do lebky zvířete byl vyvrtán otvor o průměru 0,4 mm (1,2 mm anteriorně od bregmy a 2,5 mm sagitálně od lebečního švu ve střední části) pomocí stomatologické frézy za stálého chlazení fyziologickým roztokem. Celkově bylo implantováno mikrostříkačkou Hamilton 6 µl buněčné suspenze (200 000 buněk/µl) po dobu pěti minut do hloubky 2,5 mm. Jehla byla po implantaci postupně vytahována po dobu 3 minut. Uzávěr kraniotomie byl ihned zajištěn kostním nebo včelím voskem. Sutura kožního krytu byla provedena pomocí standardního šicího atraumatického

setu. Veškeré operační úkony byly prováděny dle zásad aseptických a antiseptických postupů. Monitorace a pokus byl ukončen v závislosti na zdravotním stavu zvířete, nejpozději za 16 týdnů od implantace.

Skupině zvířat s implantovanými transfekovanými buňkami s možností doxycyklinem indukované exprese transgenu, bylo v pitné vodě podáváno indukční činidlo doxycyklin (2 mg/ml). Roztok byl měněn za čerstvý každý třetí den. Kontrolní skupina zvířat měla jen pitnou vodu.

Při přípravě koimplantačního *in-vivo* modelu byly ustanoveny dvě experimentální skupiny (dvě buněčné linie glioblastomu koimplantované s CAFs), jedna kontrolní skupina (CAFs a NFs) a jedna skupina vnitřních kontrol (dvě buněčné linie glioblastomu koimplantovaná s nenádorovými fibroblasty). Skupině osmi myší bylo implantováno 5 µl buněčné suspenze, která obsahovala 750 000 buněk fibroblastů (CAFs nebo NFs) spolu s gliomovými buňkami (U87 nebo U373) v poměru 2:1. Kontrolním skupinám myší bylo implantováno 500 000 fibroblastů (CAFs nebo NFs) nebo 250 000 gliomových buněk (U87 nebo U373) vždy v celkovém objemu 5 µl. Pokus byl ukončen za 4 týdny po implantaci.

3.15. Fluorescenční zobrazení

Pro *in-vivo* monitorování velikosti nádoru v myších po implantaci stabilně transfekovaných buněk U373onDPP-IV s genem mKate2 bylo použito fluorescenční zobrazení na přístroji iBox® Scientia Small Animal Imaging System s CCD kamerou BioChemi HR 400. Systém byl v režimu epi-iluminace vybaven 150W halogenovou žárovkou a 533-587 nm excitačním filtrem. Emisní filtr (607-688 nm) byl umístěn před objektivem. Pokusné zvíře bylo vzdáleno 25 cm od objektivu.

Fluorescence (doba expozice 90 s) byla snímána u zvířat v celkové anestézii jedenkrát týdně po dobu 6-ti týdnů od implantace. Zvířatům byla depilována snímaná oblast hlavy. Po poslední *in-vivo* monitoraci růstu nádoru byla zvířata usmrcena, mozek byl během pěti minut vyjmut a umístěn do stejné pozice zobrazovacího systému jako živé zvíře. Mozek byl fotografován při stejném nastavení, jako je uvedeno výše (čas expozice 10 s) a následně zamrazen pro účely morfometrické kvantifikace objemu nádoru.

Analýza obrázků byla provedena v programu ImageJ software (National Institute of Health, USA). Průměr intenzity fluorescence byl použit pro statistické vyhodnocení.

3.16. Morfometrická kvantifikace objemu nádoru

V závislosti na implantovaných buňkách byla zvířata 4-8 týdnů po implantaci usmrcena předávkováním anestetikem a oddělením hlavy od trupu. Mozek byl vyjmut a zmražen při - 20° C v Jung Tissue Freezing Medium. Byly připraveny 10 µm sériové koronární řezy na kryotomu při teplotě -20° C a uchovány při -20° C.

Každý desátý řez byl barven standardním protokolem heamatoxylin a eosin a digitalizován při 20 násobném zvětšení na mikroskopu Olympus IX 70. Kvantifikace velikosti tumoru byla hodnocena pomocí Cavalieriho metody pro nezaujatý odhad objemu (Mayhew a Olsen 1991) v programu ImageJ software.

3.17. Imunohistochemická detekce DPP-IV a FAP v řezech myší mozkové tkáně

Ze vzorků myší mozkové tkáně byly připraveny 10 µm řezy na kryotomu, které byly následně fixovány 4% paraformaldehydem, blokovány v roztoku 10% fetálního telecího séra s 1% BSA v TRIS pufru (TBS) a inkubována s primární protilátkou anti DPP-IV E19 a anti FAP D28 přes noc při 4° C. Po oplachu primární protilátky byly vzorky inkubovány 1 hodinu

při laboratorní teplotě s příslušnou konjugovanou sekundární protilátkou (Alexa Fluor 546). K dobarvení buněčných jader bylo použito ToPro nebo DAPI. Jako kontrola barvení vzorku byla vynechána primární protilátka nebo použita irelevantní protilátka stejného izotypu.

Skla byla montována v médiu Aqua Polymount a vyhodnocena na konfokálním mikroskopu Olympus IX 81 s 488, 543 a 633 nm lasery Fluo View 300.

3.18. Statistická analýza

Software Statistica 12 (StatSoft ČR s.r.o., ČR) byl použit pro všechny statistické analýzy. Jako statisticky významné bylo hodnoceno $p<0,05$.

4. Výsledky

4.1. Transgenní buněčné linie nesoucí různé formy DPP-IV

V rámci mé diplomové práce (Němeková 2009) byly zahájeny experimenty s přípravou stabilně transfekované lidské glioblastomové buněčné linie U373 nesoucí divokou formu lidské DPP-IV s neporušenou katalytickou triádou a buňky s mutovanou DPP-IV, kde aminokyselinová záměna serinu z katalytické triády za alanin na pozici 630 vedla ke vzniku enzymově neaktivního proteinu DPP-IV.

4.1.1. Intracelulární forma DPP-IV

Pro potřeby nalezení vztahu enzymové aktivity a subcelulární lokalizace variant proteinu DPP-IV k biologickým vlastnostem transformovaných gliálních buněk (růst, migrace, invazivita a tumorigenicita) *in-vivo* byly připraveny stabilní transfektanty U373 buněk nesoucí variantu genu DPP-IV bez transmembránové domény. U těchto buněk se předpokládala exprese enzymových variant proteinu DPP-IV, retinovaných v cytoplazmě.

Stabilní buněčná linie U373on nesoucí vektor pTet-On-Advanced s regulačním proteinem rtTA byla kotransfekována vektorem cytDPP-IV/pTRE nebo cyt DPP-IVmut/pTRE společně se selekčním markerem ï rezistencí na hygromycin. Buňky byly následně kultivovány v selekčním médiu s obsahem geneticinu a hygromycinu B. Po několika týdnech selekce byly stabilní klony expandovány a testovány na přítomnost proteinu DPP-IV. Exprese cytoplazmaticky lokalizované formy DPP-IV u doxycyklinem indukovaných transfekovaných buněčných klonů nebyla, přes několik modifikací postupu, úspěšná na úrovni exprese mRNA ani na úrovni exprese proteinu (průtoková cytometrie, ELISA, stanovení enzymové aktivity).

4.1.2. Secernovaná forma DPP-IV

Dalšími připravenými vektory byla enzymově aktivní a neaktivní forma genu DPP-IV s přidaným signálním peptidem z proteinu versican. Versican je extracelulární protein hojně exprimovaný v gliálních buňkách. Předpokladem byl zisk variant proteinu DPP-IV secernovaných extracelulárně.

Stabilní buněčná linie U373on byla kotransfekována vektorem secDPP-IV/pTRE nebo sec DPP-IVmut/pTRE společně s markerem hygromycinové rezistence. Buňky byly po transfekci kultivovány v selekčním médiu s obsahem geneticinu a hygromycinu B a vzniklé stabilní klony expandovány a testovány na přítomnost variant proteinu DPP-IV.

Vzniklé stabilní klony byly vystaveny doxycyklinu, aby došlo k expresi transgenu. U žádného klonu se nepodařilo prokázat expresi mRNA metodou real time RT-PCR.

Kondiciované médium z indukovaných buněk bylo použito pro stanovení přítomnosti proteinu DPP-IV metodou ELISA a pro stanovení katalytické aktivity enzymu. V obou případech s negativním výsledkem.

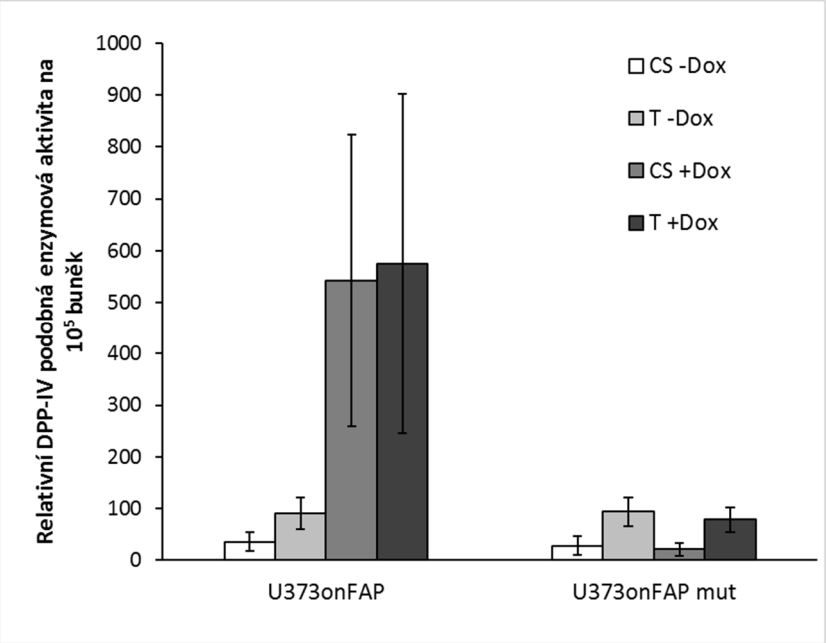
Vzhledem k tomu, že se nepodařilo připravit stabilní buněčné linie, které by exprimovaly secernované varianty DPP-IV, byly pro další práci použity vektory se signálním peptidem z Ig-kappa, který je běžně používán v komerčních systémech pro rekombinantní expresi secernovaných fúzních proteinů v savčích buňkách (Invitrogen corp.: pSecTag2 A, B, and C User manual, 2010. Firemní manuál).

V případě forem se sekreční signálem Ig-kappa se výše zmíněnými postupy po indukci exprese podařilo prokázat intracelulárně lokalizovaný solubilní, ovšem nesecernovaný transgenní produkt. Buněčné klony s modifikovanou subcelulární lokalizací DPP-IV nebyly z hlediska exprese DPP-IV stabilní a nebylo je tudíž možné použít pro funkční experimenty.

4.2. Transgenní buněčné linie nesoucí různé formy FAP

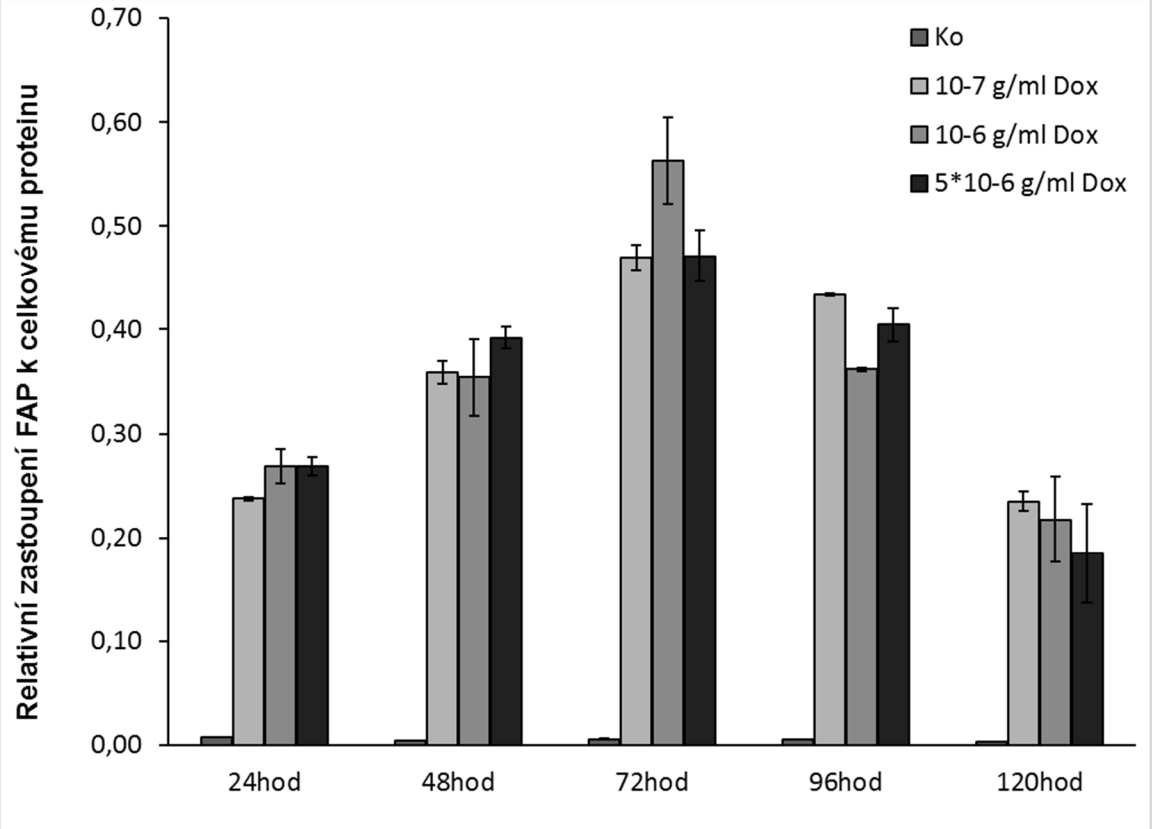
Buněčná linie U373on byla použita pro další kotransfekci vektorem FAP/pTRE a FAPmut/pTRE spolu s vektorem pro hygromycinovou rezistenci. Jako u předešlých transfekcí byly buňky po transfekci udržovány v selekčním médiu s obsahem geneticinu a hygromycinu.

Rezistentní klony byly expandovány a byla ověřena schopnost doxycyklinem indukované exprese FAP. U klonů buněk s enzymově aktivní formou fibroblastového aktivačního proteinu byl pozorován nárůst hydrolytické aktivity indukovaných buněk oproti příslušné kontrole (buňky bez indukce exprese transgenu). U buněk s mutovanou, enzymově neaktivní formou FAP, nedošlo k nárůstu specifické enzymové aktivity po 72 hodinové indukci koncentrací 10^{-6} g/ml doxycyklinu. Hodnoty exopeptidázové aktivity FAP se u indukovaných buněk pohybovaly na úrovni kontrolních neindukovaných buněk (obrázek č. 3).



Obrázek č. 3: Relativní hydrolytická aktivita vybraných klonů U373onFAP a U373FAP mut exprimujících FAP po indukci doxycyklinem 10^{-6} g/ml, 72 hodin. CS – hydrolytická aktivita stanovena na povrchu buněk; T – hydrolytická aktivita stanovena po přídavku Tritonu X-100 (f.c. 0,1%); -Dox – transfekované buňky bez indukce exprese transgenu doxycyklinem; +Dox – transfekované buňky po indukci doxycyklinem. Hodnoty jsou udávány jako průměr osmi nezávislých měření ±SEM.

Exprese FAP proteinu v buňkách U373onFAP byla indukována rozdílnou koncentrací doxycyklinu (f.c. $1*10^{-7}$ až $5*10^{-6}$ g/ml) v různých časových intervalech (24 ï 120 hodin). Již velmi nízká koncentrace doxycyklinu (f.c. $1*10^{-7}$ g/ml) aktivuje expresi transgenu FAP. Nejvyšší exprese FAP proteinu bylo dosaženo při finální koncentraci $1*10^{-6}$ g/ml doxycyklinu po 72 hodinách (obrázek č. 4). Tato koncentrace byla nadále používána pro ostatní *in-vitro* experimenty.

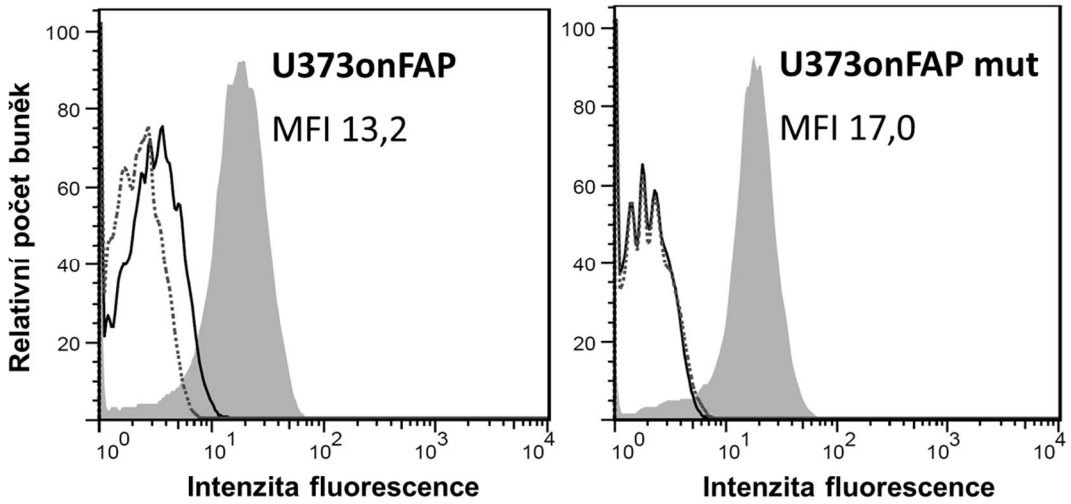


Obrázek č. 4: Relativní zastoupení exprese FAP proteinu k celkovému proteinu v buňkách U373onFAP. Exprese FAP proteinu byla indukována různými koncentracemi doxycyklinu (f.c. 10^{-7} až $5*10^{-6}$ g/ml), v různých časových intervalech (24 - 120 hod). Data představují průměr ze dvou nezávislých analýz ±SEM.

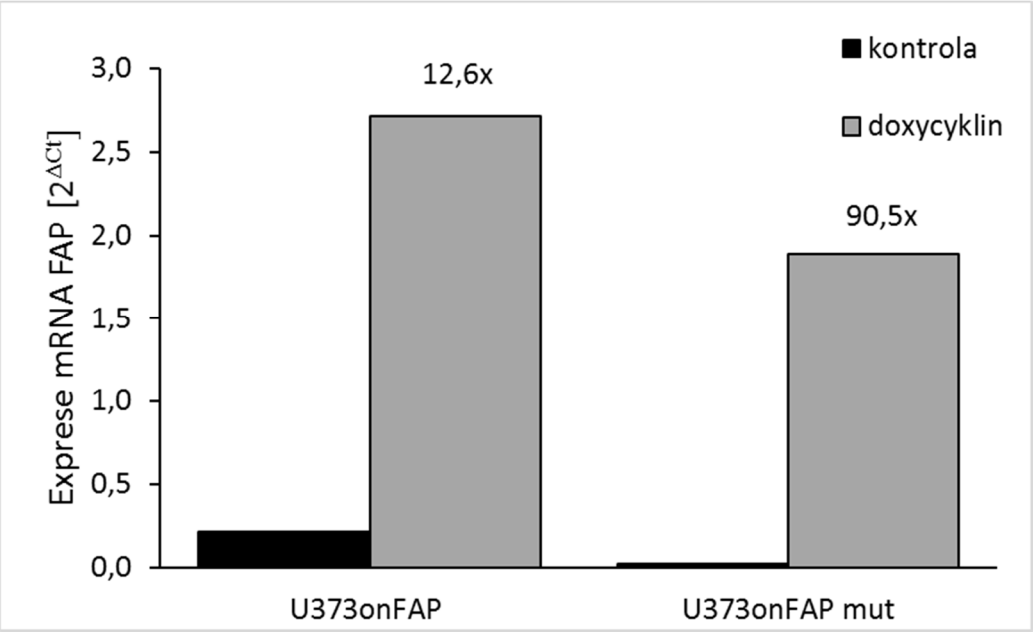
Metodou ELISA a průtokovou cytometrií s použitím specifické protilátky byla kvantifikovaná zvýšená exprese variant FAP proteinu po 72 hodinové indukci exprese doxycyklinem u obou typů transfektantů (obrázek č. 5).

Metodou real time RT-PCR byla potvrzena exprese mRNA FAP a FAP mut ve vybraných buněčných klonech (obrázek č. 6).

K získání homogenně exprimující populace buněk byly vybrané klony U373onFAP a U373onFAP mut buněk imunomagneticky separovány. Exprese transgenu u buněk byla indukována doxycyklinem, následně byly buňky selektovány na základě exprese FAP proteinu pomocí specifické monoklonální protilátky spolu se supermagnetickými partikulemi konjugovanými s příslušnou sekundární protilátkou. Kultivována byla tzv. pozitivní frakce buněk, tedy buňky, které během separace exprimovaly danou variantu FAP proteinu.



Obrázek č. 5: FACS histogram buněk U373onFAP a U373onFAP mut. Tečkovaná linie - kontrola barvení; černá linie - transfekované buňky bez indukce exprese transgenu doxycyklinem; šedý sloupec – transfekované buňky po indukci doxycyklinem (10^{-6} g/ml, 72 hodin). Uváděná hodnota MFI je pro FAP exprimující buňky vzhledem ke své kontrole.



Obrázek č. 6: Exprese mRNA FAP a FAP mut získaná metodou real time RT-PCR, normalizováno na lidský beta-aktin v transfekovaných liniích odvozených z U373. Černé sloupce – transfekované buňky bez indukce exprese transgenu doxycyklinem; šedé sloupce – transfekované buňky po indukci exprese doxycyklinem (10^{-6} g/ml, 72 hodin). Čísla značí násobek exprese proteinu daného klonu vůči příslušné kontrole.

Pozitivní frakce buněk byly dále kultivovány v selekčním médiu bez přítomnosti doxycyklinu, čímž ustala exprese transgenu. V průběhu dalších pasáží bylo pod mikroskopem pozorováno postupné vyšednutí supermagnetických partikulí. Schopnost indukce exprese daného transgenu byla u buněk opětovně ověřena. Po této proceduře nedošlo u buněk ke zjevným morfologickým změnám. Míra proliferace a schopnost adheze nebyly ovlivněny.

4.3. Transgenní buněčné linie nesoucí fluorescenční reportér mKate2

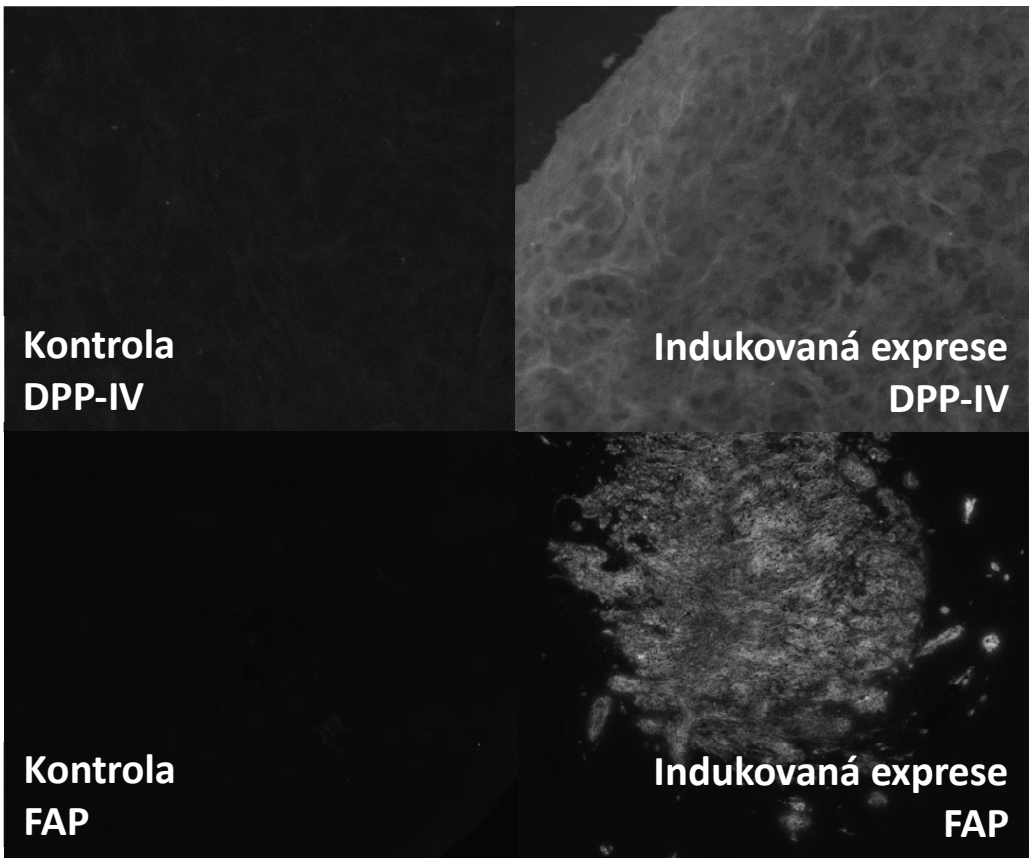
Pro umožnění intravitální detekce transgenních buněk nesoucích různé varianty genu pro DPP-IV v modelu *in-vivo* bylo využito fluorescenčního reportérového systému mKate2. Stabilně transfekované lidské glioblastomové buněčné linie U373onDPP-IV a U373onDPP-IV mut byly ve čtvrté pasáži transfekovány vektorem pcDNA4 s mKate2 a následně selektovány stabilní transfektanty pomocí antibiotika zeocinu. Nově vzniklé stabilní klony byly expandovány a byla u nich ověřena stabilní exprese mKate2. Metodami stanovení enzymové aktivity a průtokové cytometrie byla ověřena doxycyklinem zprostředkovaná exprese variant DPP-IV proteinu.

Vybrané klony byly použity pro implantaci do mozku imunodeficientních myší. Intravitální sledování rozvoje nádoru *in-vivo* probíhalo na přístroji iBox® Scientia Small Animal Imaging System (UVP, LLC BioImaging Systems).

Další využití modelu intravitální monitorace růstu xenotransplantátů pomocí fluorescenčního reportérového systému popisuje ve své disertační práci MUDr. Marek Hilšer (Hilšer 2016). Tento model je vhodný pro orientační sledování a semikvantitativní hodnocení, nikoliv však pro přesnou kvantifikaci růstu intrakraniálního tumoru (Hilser et al. 2012).

4.4. Ověření indukovatelnosti exprese DPP-IV a FAP *in-situ*

Pro další studium biologických funkcí DPP-IV a FAP v procesech gliomageneze v modelu homotopní implantace transfekovaných buněk do mozku imunodeficientních myší bylo nutné ověřit schopnost exprese transgenu rovněž *in-situ*. Buňky s indukovatelnou expresí divoké formy nebo mutované enzymově neaktivní transmembránové DPP-IV a FAP byly implantovány do mozku imunodeficientních myší NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J (The Jackson Laboratory, USA). Následující den byla zvířata náhodně rozdělena do dvou skupin. Experimentální skupině byl po celou dobu experimentu podáván doxycyklin v pitné vodě, kontrolní skupina měla jen pitnou vodu. Po čtyřech týdnech růstu nádoru byla zvířata usmrcena a byly připraveny kryořezy mozkové tkáně. Imunohistochemickými metodami s využitím specifických protilátek byla potvrzena exprese enzymově aktivní i enzymově neaktivních forem DPP-IV a FAP u skupiny zvířat, kterým byl podáván doxycyklin (obrázek č. 7).



Obrázek č. 7: Potvrzení *in-situ* inducibility exprese transgenu po sterotakticky řízené orthotopické implantaci do mozku imunodeficientní myši. Exprese *in-vivo* DPP-IV a FAP byla indukována doxycyklinem podávaným v pitné vodě při konečné koncentraci 2 mg/ml od prvního dne implantace. Segmenty mozku byly barveny za použití Anti DPP-IV E19 a Anti FAP D8 a se sekundární protilátkou (Alexa Fluor 546 a Alexa Fluor 488), zvětšení 40x.

4.5. Vliv nádorově asociovaných fibroblastů na gliomové buňky *in-vitro*

Nádorově asociované fibroblasty svojí produkcí složek extracelulární matrix, růstových faktorů, cytokinů a chemokinů významně ovlivňují biologické vlastnosti tumorů. Pro zjištění možných humorálních interakcí CAFs s buňkami glioblastomu, bylo využito kondiciované médium z nádorově asociovaných fibroblastů a byl studován vliv normálních fibroblastů na proliferaci a chemotaxi gliomových buněk.

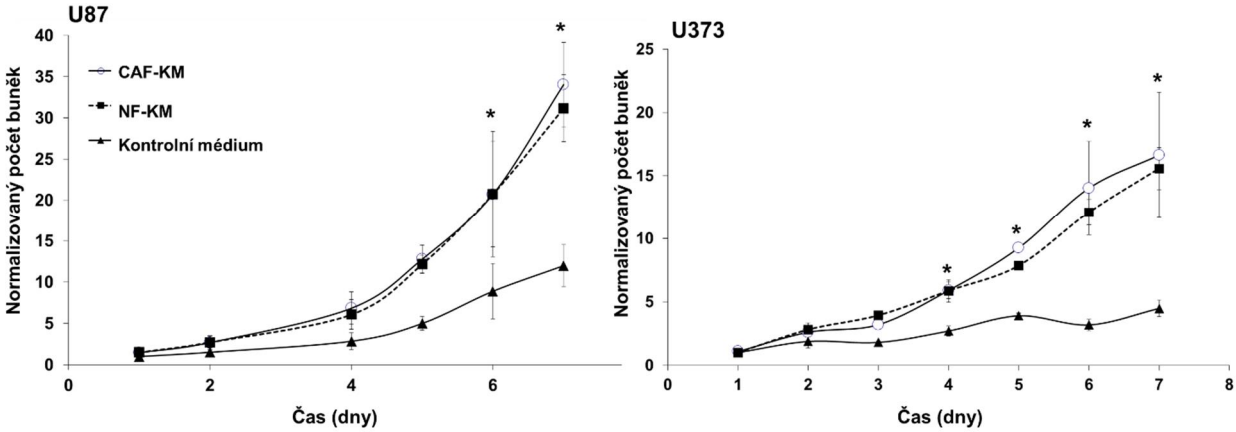
4.5.1. Kondiciované médium z kultur CAFs podporuje růst gliomových buněk *in-vitro*

Pro ověření efektu mezenchymálních buněk na růstové vlastnosti gliomových elementů, byly buňky U87 a U373 kultivovány v kondiciovaném médium z CAFs a NFs buněk. U obou buněčných linií došlo v podmínkách *in-vitro* ke zvýšení buněčného růstu během kultivace v CAF- a NF-kondiciovaných médiích v porovnání s kontrolním médiem (obrázek č. 8).

Po jednom týdnu kultivace gliomových buněk v kondiciovaném médium došlo v porovnání s kontrolou u buněk U87 v NF- a CAF-kondiciovaném médiu k nárůstu počtu buněk 2,6x respektive 2,8x. U U373 buněk došlo k 3,5x navýšení v NF-kondiciovaném médiu a 3,7x navýšení počtu buněk v CAF-kondiciovaném médiu. Nebyl pozorován statisticky

významný rozdíl v působení mezi CAF- a NF-kondiciovaného média na proliferaci glioblastomových buněk.

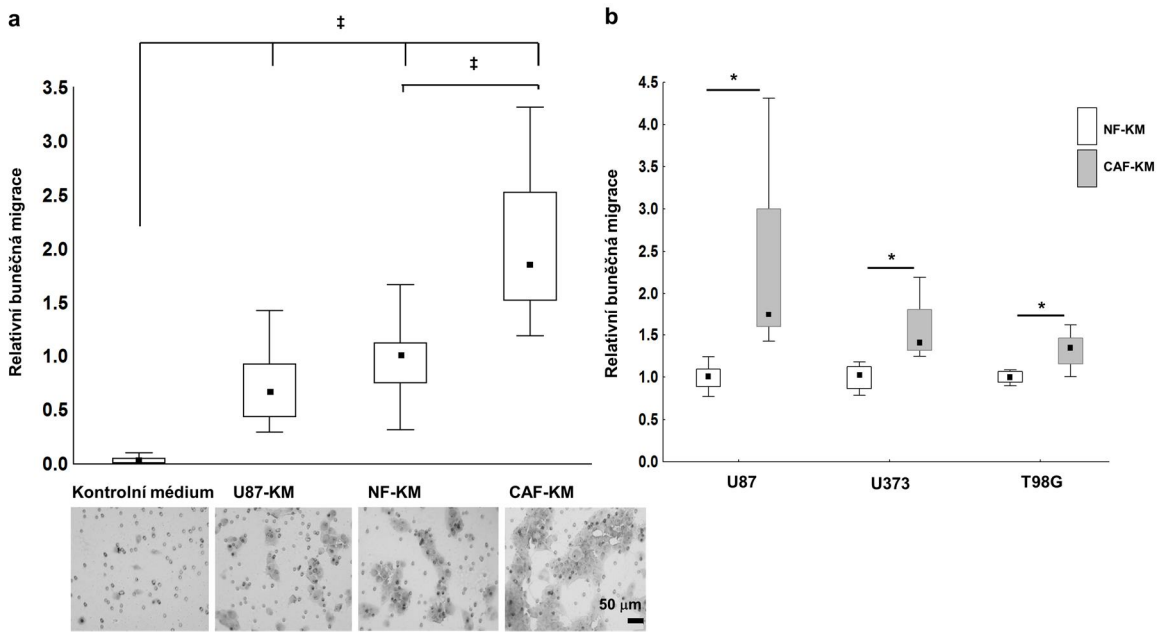
Tyto výsledky naznačují, že CAFs a NFs produkují sekreční faktory, které obdobně v podmínkách *in-vitro* podporují růst gliomových buněk.



Obrázek č. 8: Růst U87 a U373 gliomových buněk v kondiciovaném médiu z normálních (NF-KM) a nádorově asociovaných (CAF-KM) fibroblastů s přídavkem 1% FBS. Počet buněk byl normalizován k hodnotám buněk v kontrolním médiu v prvním dni experimentu. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr ±SD z alespoň dvou nezávislých experimentů provedených v kvadruplikátech. *p<0.01 (analýza rozptylu s opakovaným měřením ANOVA, Scheffého metoda mnohonásobného porovnání) pro NF- a CAF-kondiciované média vs. kontrolní médium.

4.5.2. Kondiciované médium z CAFs působí jako silnější chemoatraktant v porovnání s kondiciovaným médiem z NFs

Stromální buňky nejen podporují proliferaci transformovaných buněk, ale mají vliv i na jejich migrační potenciál. Porovnávali jsme účinek CAF- a NF-kondiciovaného média na U87 gliomové buňky přes kultivační inzert s 8 µm póry. Obě kondiciovaná média zvýšila migrační potenciál buněk U87 v porovnání s kontrolním bezsérovým médiem. U87 gliomové buňky migrovaly 2,2x více k CAF-kondiciovanému médiu ve srovnání s NF-kondiciovaným médiem (p<0,01, obrázek č. 9 a). Obdobných výsledků bylo dosaženo i u gliomových buněk U373 a T98G, kde došlo k přibližně 40% nárůstu buněčné migrace ke CAF-kondiciovanému médiu v porovnání s NF-kondiciovaným médiem (p<0,01, obrázek č. 9 b). Tyto výsledky naznačují kvalitativně jinou a/nebo kvantitativně vyšší produkci sekretovaných chemotaktických mediátorů nádorově asociovanými fibroblasty v porovnání s normálními fibroblasty.



Obrázek č. 9: a) Chemotaxe U87 gliomových buněk ke kontrolnímu (nekondiciované, bezsérové) médiu a kondiciovanému (bezsérové) médiu z kultur U87 (U87-KM), normálních fibroblastů (NF-KM) a nádorově asociovaných fibroblastů (CAF-KM). Buněčná migrace byla vyhodnocena po 24 hodinách. Pod příslušným označením jsou reprezentativní mikrofotografie buněk, které migrovaly ke specifikovanému kondiciovanému médiu. ‡p<0.01, Kruskal–Wallisův test. **b) Chemotaxe U87, U373 a T98G gliomových** buněk k bezsérovému médiu z normálních fibroblastů (NF-KM) a nádorově asociovaných fibroblastů (CAF-KM). Buněčná migrace byla vyhodnocena po osmi hodinách, *p<0.01, Mann-Whitneyův *U* test. Počet buněk nejméně ve dvou nezávislých experimentech provedených v kvadruplikátech byl normalizován k hodnotám buněčné migrace v NF-KM každého jednotlivého experimentu. Čtverce – medián; krabice – 25-75% hodnot, vousy – rozmezí odlehlých hodnot.

4.6. Příprava koimplantačního *in-vivo* modelu nádorově asociovaných fibroblastů s glioblastomovými buněčnými liniemi

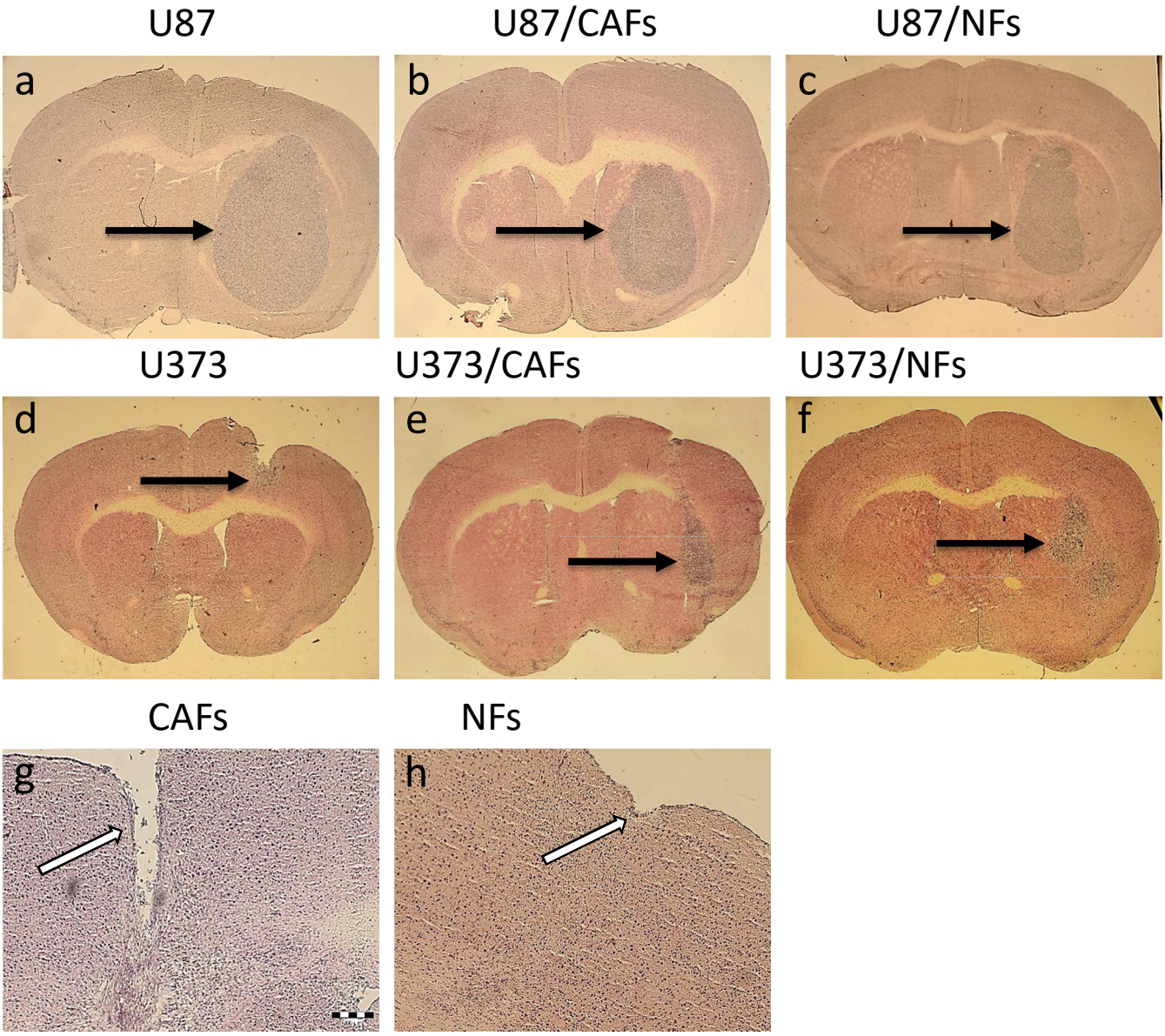
Pro studium gliomageneze *in-vivo* v kontextu komplexního mozkového prostředí jsme začali připravovat myší model stereotakticky kontrolované homotopní koimplantace buněčné směsi nádorově asociovaných fibroblastů a transformovaných gliálních elementů. Z předešlých experimentů jsme vyvodili jako minimální vhodné množství implantovaných gliomových buněk 250 000 v 5 µl buněčné suspenze, ke kterým bylo přidáno 500 000 fibroblastů. U myší se po dobu experimentu (4 týdny) neprojevovaly žádné známky zhoršení celkového stavu.

Ve skupině myší, kterým byly implantovány buňky samotné gliomové buňky U87 nebo koimplantovány společně s CAFs nebo NFs vznikly intrakraniální kulovité tumory. Vzniklé tumory měly ostře ohraničený růst bez invaze do okolní tkáně. Některé vzorky tumorů byly vyřazeny, protože došlo k růstu nádoru částečně i do extracerebrálního prostoru. K tomu došlo zvláště ve skupině myší, kde byly implantovány samotné U87 gliomové buňky. Průměrná velikost tumoru byla 32,8 mm^3 (±SD 6,58 mm^3).

Samostatně implantované případně s fibroblasty koimplantované U373 gliomové buňky daly vznik difúzním nádorům v místě vpichu buněčné suspenze. Byla pozorována zřetelná invaze tumoru do okolní tkáně. I zde došlo u několika vzorků k růstu extrakraniálního tumoru. Velikost tumorů ve všech experimentálních skupinách byla velmi malá (cca 1 mm^3), což znesnadňovalo správnou kvantifikaci objemu tumoru.

V případě vzorků, kde byly implantovány samotné fibroblasty (CAFs nebo NFs) nedošlo ke vzniku tumoru. Patrná byla jen jizva v místě vpichu jehly (obrázek č. 10).

Z těchto získaných výsledků nebylo možno posoudit vliv fibroblastů na růst experimentálního glioblastomu. U obou gliomových buněčných linií bude patrně třeba v dalším experimentu optimalizovat počet implantovaných buněk.



Obrázek č. 10: Histologické řezy mozků s (ko)implantovanými buňkami gliomových linií a fibroblasty. Černá šipka: tumor, bílá šipka: jizva v místě vpichu buněčné směsi. Zvětšení 20x (obr. a-f) a 100x (g, h), zmrazené tkáňové řezy 10 μm silné, barvení heamatoxylin a eosin.

5. Diskuze

5.1. Příprava stabilně transfekovaných lidských gliomových buněk nesoucích varianty genu pro DPP-IV, FAP a mKate (cíl I., II., III.)

Transgenní buněčné linie jsou používány v základním i aplikovaném výzkumu pro studium proteinových funkcí nejen v modelech *in-vitro*, ale i *in-vivo*. Během let byla vyvinuta řada metod pro vnesení genetické informace do genomu buňky, tkání či celých organizmů. Systémy, které zajišťují specifickou indukci genové exprese, nabízejí jedinečné výhody pro řešení rozmanitých biologických otázek. Techniky genové regulace umožňují rychlou, silnou, precizní a především reverzibilní indukci genové aktivity. Ideální systém proteinové exprese má vysokou specifitu účinku, nenarušuje základní metabolické procesy hostitelské buňky, má vysokou indukovatelnost, stravitelnost indukčního činidla, reverzibilitu a závislost na dávce indukčního činidla (Bandaranayake a Almo 2014; Saez et al. 1997).

Příprava stabilně transfekovaných buněčných linií, které exprimují specifický protein, je často pracná a časově náročná záležitost. Optimalizace podmínek transfekce, dále podmínek růstu transfekovaných buněk a selekce klonů buněk schopných exprese daného transgenu může trvat 4-6 měsíců (Almo a Love 2014). Během transfekce a příprav stabilních buněčných linií se vektor s transgenem musí dostat do buněčného jádra a integrovat do jaderné DNA buňky. Nejen sám proces transfekce *in-vitro*, ale i jeho funkční důsledek, exprese daného proteinu, může ovlivnit celý průběh přípravy a přežití transfekovaných buněk (Mielke et al. 2000). V rámci mé práce se nepodařilo připravit stabilní gliomové linie U373 nesoucí gen pro cytoplazmatickou nebo secernovanou formu genu DPP-IV. V obou případech byl několikrát optimalizován proces transfekce. Vektor pTRE-Tight spolu s transgenem tvoří cca 4,6kb velký vektor. Topologie celého komplexu DNA s kladně nabitými lipidy nebo polymery je zásadně významná pro úspěch přenosu do jádra hostitelské buňky (Cherng et al. 1999). Při transfekci lineární formy DNA lipozomem-zprostředkované transfekce dochází k nižším výtěžkům v porovnání s transferem cirkulárního plazmidu DNA. Cirkulární forma plazmidu utváří kompaktní komplex s transfekčním činidlem, který je snáze vnesen do cytoplazmy buněčnou endocytózou, zatímco lineární forma je více náchylná k degradaci (Groll et al. 2006). Na druhou stranu, při transfekci velkých plazmidů se v některých případech může jevit lineární forma více vhodná (Chancham a Hughes 2001). V našich transfekčních postupech jsme u U373 buněk používali obě formy plazmidu.

Dalším významným faktorem určujícím funkční důsledky provedené transfekce buněk je integrace rekombinantních genů. Námi použitá transfekční metoda lipofekce vede k náhodné inzerci transgenu do hostitelského genomu. Metoda neumožňuje ovlivnit přesné místo inzerce do hostitelského chromozomu, počet vnesených kopií transgenu ani výslednou kvantitu produkce proteinu. Ve srovnání s jinými metodami transferu se vyznačuje obecně velmi nízkými výtěžky (Gorman a Bullock 2000).

Důležitým kritériem úspěšné proteinové produkce v rekombinantních buňkách je udržení stability exprese transgenu po mnoho generací transfekovaných buněk. V buňkách běžně dochází k modulacím exprese proteinu nejen na molekulární úrovni vnesené DNA do hostitelského genomu, ale i dále v procesech spojených s expresí daného proteinového produktu a jeho stability. Jako součást selektivní buněčné odpovědi na vnesený gen může dojít k potlačení exprese, která při tom není spojena se ztrátou transgenu v hostitelském genomu. Remodelace chromatinu a další modulace, jako například methylace genu, acetylace histonu, fosforylace a ubiquitinace proteinu, mohou být zodpovědné za snížení a případně umlčení transkripce a následné translace proteinu (Mielke, et al. 2000; Pikaart et al. 1998).

V obecné rovině tedy není ztráta transgenu z hostitelského genomu jedinou možnou příčinou neúspěchu exprese transgenního produktu. Za dominantní bod kontroly proteinové

exprese je považována transkripce. Transkripce vneseného genu v Tet on systému umožňuje cílenou kontrolu exprese transgenu po přidavku indukčního činidla a navýšení proteinové exprese by mělo zajišťovat vysoké výtěžky nezávislé na ostatních pochodech buňky (Gossen a Bujard 1992).

Výsledek indukce exprese transgenu indukčním činidlem nám dává odpověď, zda se podařilo překonat všechny zmíněné překážky při přípravě stabilně transfekované buněčné linie. Přes několik modifikací postupu transfekce se ovšem nepodařilo získat stabilně transfekované buněčné linie U373 schopné exprese cytoplazmatické či secernované formy DPP-IV. Ve všech případech byly získány buněčné klony rezistentní na selekční antibiotika, ale po indukci exprese transgenu nebyl detekován produkt na úrovni mRNA. Pouze v případě buněčné linie nesoucí DPP-IV se signálním peptidem z Ig-kappa byl detekován solubilní avšak intracelulárně retinovaný produkt, který však již následně nebyl detekován v pozdějších pasážích dané buněčné linie. Tyto výsledky svědčí po uplatnění nežádoucích mechanizmů regulace transgenu, případně jeho negativního vlivu na exprimující buňku.

V rámci této práce se podařilo připravit klony U373 buněk exprimující enzymově aktivní a neaktivní formu FAP genu. S nárůstem počtu pasáží u vzniklých transgenních buněčných linií byl pozorován pokles exprese transgenu. Tento jev může být dán výše zmíněnými mechanizmy buňky pro umlčení exprese transgenu. Dalším možným důvodem je populační heterogenita vniklé transgenní buněčné linie. Po transfekci je třeba izolovat buněčný klon, který vzešel z jedné unikátní transfekované buňky. Pokud se jedná o směs netransfekovaných/ neexprimujících buněk, které mohou mít výhodu v rychlosti proliferace oproti buňkám schopné exprese transgenu, může v celkové populaci dojít ke snížení zastoupení subpopulace buněk schopných exprese transgenu, a tím k poklesu proteinové produkce. Během práce s transfekovanými U373 buňkami se ukázalo velmi složité získat unikátní buněčný klon, který neobsahuje buňky jiných rezistentních klonů z původní transfekované populace. U buněčné linie U373 a jejích transfekovaných analogů jsme proto experimentálně ověřili minimální hustotu buněk nezbytnou pro nasazení do kultivační nádoby. Pokud byla hustota buněk pod touto hranicí, buňky dostatečně neproliferovaly a nebyly použitelné pro další experimenty.

Van Craenenbroeck et al. (2001) demonstrovali využití Tet on systému pro regulovanou expresi reportérového proteinu. Ve své práci prezentují rozdíly v transfekci a výtěžku exprimovaného proteinu u dvou různých buněčných linií transfekovaných stejným vektorem. Výsledkem práce byly stabilně transfekované buňky s vysokou mírou proteinové produkce transgenu. Jedna z buněčných linií se jevila jako těžko transfekovatelná. V rámci jednotlivých transfekovaných klonů se značně lišil proteinový výtěžek po indukci exprese proteinu. Z výše uvedených skutečností vyplývá, že úspěšnost použití daného expresního systému v konkrétním buněčném modelu závisí na genetickém pozadí použité buněčné linie a na produkovaném proteinu.

K získání dostatečného počtu transgen-pozitivních buněk požadovaného fenotypu byla v naší práci využita metoda MACS. Buněčná populace izolovaná metodou MACS vykazuje nižší mezibuněčnou variabilitu a stálou hladinu exprese transgenního proteinu ve srovnání s buňkami selektovaným jen na základě antibiotické rezistence (Kaufman 2000; Kaufman et al. 2008). Pro zajištění stability proteinové produkce variant FAP proteinu byla využita metoda magnetické separace buněk specifickou protilátkou u buněčných linií U373onFAP a U373onFAP mut. Získané exprimující subpopulace (pozitivní frakce) byly izolovány a kultivovány pro další studium. V případě obou vzniklých transgenních buněčných linií byl s vysokým počtem pasáží pozorován nárůst frakce buněk, která exprimovala daný transgen i bez přidaného indukčního činidla. Z tohoto důvodu byly vzniklé buněčné transgenní linie používány maximálně do 30. pasáže.

Třetím cílem mé práce byla příprava transgenních buněčných liniích U373onDPP-IV a U373onDPP-IV mut exprimující fluorescenční protein mKate2. Dané buněčné linie byly

připraveny a úspěšně použity pro intravitální monitoraci růstu xenotransplantátů v mozku imunodeficientních myší (Hilser, et al. 2012).

5.2. Ověření indukovatelnosti exprese DPP-IV a FAP *in-vivo* (cíl IV.)

Tet regulační systémy rovněž umožňují silnou a tkáňově specifickou kontrolu individuálních genů ve vyšších organizmech *in-vivo* (Gossen a Bujard 1992). Možnost kontrolované indukce genové exprese vede oproti ostatním systémům k zamezení dlouhodobé a nekontrolované expresi, a tím i případným nežádoucím systémovým účinkům. Doxycyklin nebo některý z jeho derivátů, je schopen snadno procházet buněčnou membránou a má vysokou afinitu k rtTA proteinu. Koncentrace doxycyklinu potřebná k zajištění regulované genové exprese v savčích buňkách se pohybuje v hodnotách, které pravděpodobně nevykazují vedlejší účinky na úrovni celého organizmu (Böcker et al. 1981; Sprengel a Hasan 2007). Tet on systém zaručuje přesnou kontrolu genové exprese v podmínkách *in-vivo*, kdy je doxycyklin podáván orálně po transplantaci buněk do zvířecích modelů (Xia et al. 2008). Oproti jiným indukčním činidlům je schopen překonat rovněž hematoencefalickou bariéru, a tudíž může být vhodný k indukci genové exprese buněk implantovaných do mozku (Yamamoto et al. 2003). To potvrdili i naše výsledky, kdy získané transfekované buněčné linie nesoucí různé enzymové varianty transgenů pro DPP-IV a FAP byly implantovány do mozku imunodeficientních myší a po podání doxycyklinu se podařilo navodit jejich expresi *in-vivo*. Zároveň nebyly pozorovány zjevné vedlejší účinky doxycyklinu.

5.3. Vliv nádorově asociovaných fibroblastů na gliomové buňky *in-vitro* (cíl V.)

Biologické procesy související s tumorigenezí, jako je buněčný růst, diferenciace, lokální agresivita a metastatické šíření transformovaných buněk, jsou z velké části determinovány komplexními interakcemi nádorového mikroprostředí (Li, et al. 2007). Současné poznatky řadí CAFs mezi klíčové účastníky nádorového prostředí (Cirri a Chiarugi 2011). CAFs produkují složky extracelulární matrix a současně se i podílejí na proteolytické degradaci ECM, produkují a uvolňují široké spektrum lokálních mediátorů, mezi něž patří růstové faktory, které ovlivňují další stromální a nádorové buňky (Smetana, et al. 2013).

V současné době nejsou stále dostatečně popsány mechanizmy jakými se CAFs, případně buňky CAFs podobné, účastní vzniku a rozvoje gliomů. V naší laboratoři byly popsány GFAP negativní buňky z lidské glioblastomové tkáně, které exprimují charakteristické CAF markery (Ů-SMA a TE-7) (Trylcova, et al. 2015). Tento nález je v souladu s výsledky Clavreul, et al. (2012), která izolovala z lidského glioblastomu subpopulaci stromálních buněk exprimujících Ů-SMA připomínající nádorově asociované fibroblasty. Pericyty exprimující Ů-SMA mohou v centrální nervové soustavě vykazovat funkce analogické extracerebralním fibroblastům (Goritz et al. 2011). Tím se tyto buňky považují za možný lokální zdroj buněk podobných CAFs v glioblastomech. Ů-SMA pozitivní pericyty významně přispívají k mikrovaskulární proliferaci (Wesseling et al. 1995) a experimentální studie svědčí pro jejich důležitou úlohu v neovaskularizaci gliomů (Najbauer et al. 2012). Dalším možným zdrojem buněk s vlastnostmi CAFs v glioblastomu jsou hostitelské mezenchymální kmenové buňky, které jsou rekrutovány do gliomů (Behnan et al. 2014) a pravděpodobně aktivně podporují nádorovou neovaskularizaci (Birnbaum et al. 2011; Clavreul, et al. 2014).

Nádorově asociované fibroblasty izolované z lidského maligního melanomu byly použity pro studium možných parakrinních interakcí mezi mezenchymálními buňkami a buňkami gliomu. Jak buňky glioblastomu, tak i melanomu jsou neuroektodermálního původu. Navíc dřívější studie prokázaly, že biologická aktivita CAFs buněk není nezbytně závislá na typu nádoru, ze kterého pocházejí (Dvorankova, et al. 2012).

RŢst a migrace gliomových bunĚk byly signifikantnĚstimulovány CAF-kondiciovaným médiem. Pro-rŢstový efekt kondiciovaných médií je pravdĚpodobnĚzpŢsoben pŚímým vlivem na proliferaci gliomových bunĚk; proliferaţní ukazatel Ki-67 byl exprimován u vysokého procenta populace gliomových bunĚk rostoucích v kondiciovaném médiu (Trylcova, et al. 2015).

Navýġení rŢstu gliomových bunĚk v naġem experimentálním uspoŚádání bylo kvantitativnĚpodobné v podmínkách CAF- a NF-kondiciovaného média. Normální lidské fibroblasty mohou v poţáteţních fázích nádorové transformace inhibovat rŢst maligních bunĚk. Ve vyġġích stupních rozvoje nádorového onemocnĚní se vġak pŚedpokládá, ġe i normální fibroblasty pŚítomné ve stromatu nádoru rŢst transformovaných bunĚk podporují (Cornil et al. 1991).

Fibroblasty produkují ġiroké spektrum biologicky aktivních látek vţetnĚproteinŢ extracelulární matrix a rŢstových faktorŢ podporující zachování vlastností kmenových bunĚk (Prowse et al. 2007). Podobné faktory mohou stimulovat i rŢst gliomových bunĚk.

Na rozdíl od podobného prorŢstového efektu CAF- a NF-kondiciovaných médií se kvantitativnĚliġil vliv kondiciovaných médií na migraci gliomových bunĚk. CAF-kondiciované médium výraznĚji podporuje migraci gliomových bunĚk *in-vitro*. Mezi známé parakrinní faktory sekretované nádorovĚasociovanými fibroblasty mimo jiné patŚí Galektin-1. Galektin-1se podílí na pŚemĚnĚfibroblastŢ v CAFs (Valach, et al. 2012) a dokáġe zvyġovat migraci gliomových bunĚk (Camby et al. 2002; Sayegh et al. 2014). NádorovĚasociované fibroblasty produkují mimo jiné IL-6, TGF-beta, hepatocytární rŢstový faktor a chemokiny jako je CXCL-12 (Cirri a Chiarugi 2011), které rŢznými mechanizmy podporují migraci gliomových bunĚk (Sayegh, et al. 2014).

5.4. Příprava koimplantačního *in-vivo* modelu nádorově asociovaných fibroblastů s glioblastomovými buněčnými liniemi (cíl VI.)

Souţasné výzkumy poukazují na význam nádorovĚasociovaných fibroblastŢ pŚi vzniku a rozvoji nádorových onemocnĚní (Cirri a Chiarugi 2011; Navab et al. 2016). V lidském glioblastomu je pŚedpokládána minimální pŚítomnost fibroblastŢ, ale jejich funkce jsou patrnĚ vykonávány jinými bunĚţnými elementy (Clavreul, et al. 2012; Clavreul, et al. 2014; Svensson, et al. 2016; Trylcova, et al. 2015). Analýza biologických *in-vitro* a zejména *in-vivo* dŢsledkŢ kokultivace gliomových bunĚk s CAFs mŢġe odhalit obecnĚplatné funkţní vztahy v nádorovém mikroprostŚedí, významné pro rozvoj nádoru.

V rámci mé dizertaţní práce byly zahájeny *in-vivo* experimenty pro objasnĚní dŢsledkŢ interakce nádorovĚasociovaných fibroblastŢ a transformovaných gliálních elementŢ pro onkogenetické procesy v kontextu reálného nádorového mikroprostŚedí. PŚímá kokultivace rŢzných bunĚţných populací zahrnuje nejen humorální parakrinní komunikaci jednotlivých bunĚk a jejich populací, ale umoġŘuje sledovat i dŢsledky kontaktní komunikace, typicky vedoucí k epitelovĚ-mezenchymové transformaci nádorových bunĚk a k diferenciaci lidských kmenových mezenchymálních bunĚk (Bhattacharya et al. 2012).

Významným proteinem, který ovlivŘuje procesy v nádorovém mikroprostŚedí, a tím biologické chování nádoru, je fibroblastový aktivaţní protein Ť. FAP je exprimován nejen nádorovĚasociovanými fibroblasty, ale i dalġími typy stromálních a nádorových bunĚk (Busek, et al. 2016; Koczorowska et al. 2016; O'Brien a O'Connor 2008; Shan et al. 2012). Svým pŢsobením ovlivŘuje sekreci a pŢsobení proangiogenních faktorŢ a proteinŢ úţastnících se na remodelaci extracelulární matrix (pro pŚehled Busek, et al. (2016), Kelly, et al. (2012)).

Výsledky získané s vyuġitím z koimplantaţního *in-vivo* modelu nádorovĚasociovaných fibroblastŢ spoleţnĚs glioblastomovými bunĚţnými liniemi s indukovatelnou expresí FAP

proteinu by mohly pomoci pochopit vztahy jednotlivých buněčných populací v reálném nádorovém mikroprostředí.

6. Závěry

Cíl I.: nepodařilo se připravit stabilně transfekované lidské glioblastomové buněčné linie regulovatelně exprimující intracelulárně lokalizovanou či sekreční formu lidské DPP-IV.

Cíl II.: podařilo se připravit stabilně transfekované lidské glioblastomové buněčné linie U373 regulovatelně exprimující divokou formu lidského FAP s neporušenou katalytickou triádou a buňky s mutovanou, enzymově neaktivní variantou FAP proteinu.

Cíl III.: podařilo se připravit stabilně transfekované lidské glioblastomové buněčné linie s fluorescenčním reportérovým systémem mKate2, které byly použity k *in-vivo* monitoraci intrakraniálního růstu tumorů (Hilser, et al. 2012).

Cíl IV.: podařilo se prokázat indukovatelnost exprese DPP-IV a FAP proteinu a jejich variant v *in-vivo* modelu homotopní implantace transfekovaných buněk do mozku myší. Tento systém indukovatelné transgenní exprese byl úspěšně použit pro studium vlivu DPP-IV a FAP na růst modelových intrakraniálních tumorů (Busek, et al. 2016; Busek, et al. 2012).

Cíl V.: byly zahájeny *in-vitro* experimenty ke zjištění vlivu nádorově asociovaných fibroblastů na růstové vlastnosti gliomových buněk. Získané výsledky naznačují, že se mezenchymální stromální buňky svými sekretovanými faktory konkrétně podílejí na kontrole růstu a migrace transformovaných gliálních elementů secernovanými biologicky aktivními molekulami (Trylcova, et al. 2015).

Cíl VI.: byla zahájena příprava *in-vivo* koimplantačního modelu nádorově asociovaných fibroblastů spolu s gliomovými buňkami do myšího mozku.

Poděkování

Ráda bych poděkovala Prof. MUDr. Aleksimu Ředovi, DrSc., za odborné vedení mé práce, cenné rady a trpělivost. Mé poděkování patří vůbec kolegům z Laboratoře biologie nádorové buňky za jejich pomoc a praktické rady při experimentech. Zvláště bych chtěla poděkovat Doc. MUDr. Evženu Kříepelovi, CSc. za purifikaci RNA a real time RT-PCR, Mgr. Lucii Stollinové Žromové, PhD. za provedení průtokové cytometrie, MUDr. Markovi Hilšerovi, PhD. za pomoc s implantačními experimenty a Prof. MUDr. Karlovi Smetanovi, DrSc. za poskytnutí buněčných linií.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt č. 251029 a 44214) a Specifického Vysokoškolského Výzkumu (projekt č. 2015-260032).

Seznam zkratek

Ů-SMA	alfa aktin hladké svaloviny
ADA	Adenosindeaminása
AEBSF	4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluorid hydrochlorid
APCE	Enzym štěpící antiplasmin (Antiplasmin-cleaving enzyme)
BSA	Hovězí sérový albumin

CAFs	Nádorově asociované fibroblasty
CD26	Diferenciační antigen lymfocytů, znám také jako DPP-IV
CNS	Centrální nervová soustava
CSCs	Nádorové kmenové buňky
DASH	Dipeptidylpeptidáze-IV aktivitou a/nebo strukturou homologní
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxycyklin
DPP	Dipeptidylpeptidáza
ECM	Extracelulární matrix
EDTA	Kyselina ethylen-diamin-tetraoctová
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting/selekce buněk aktivovaná fluorescencí
FAP	Fibroblastový aktivační protein Ů
f.c.	Výsledná koncentrace
FBS	Fetální hovězí sérum
G-CSF	ĂGranulocyte colony-stimulating factorň
GIP	Gastrický inhibiční polypeptid
GLP	Glukagonu podobný peptid
GM-CSF	ĂGranulocyte-macrophage colony-stimulating factorň
H-Gly-Pro-AMC	Glycyl-L-prolyl-7-amidomethylkumarin
IL	Interleukin
KM	Kondiciované médium
M	mol/l
MACS	Magnetic-activated cell sorting/magnetická separace buněk
mDPP-IV	Mutovaná forma DPP-IV
MFI	Medián intenzity fluorescence
NFs	Normální dermální fibroblasty
NPY	Neuropeptid Y
NSCs	Neurální kmenové buňky
OD	Optická denzita
PBS	Fosfátový pufr
PF	Pozitivní frakce
PYY	Peptid YY
QPP	ĂQuiescent cellň prolinová dipeptidáza
RANTES	ĂRegulated on activation normal T-cell expressed and secretedň
RT-PCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
rtTA	Reverse Tc-controlled transactivator/reverzní tetracyklinem kontrolovaný transaktivátor
SDF-1	Stromal cell-derived faktor 1
SP	Substance P
TBS	Tris pufr
TE-7	Protilátka pro detekci fibroblastů, klon TE-7
T98G	Lidská gliomová buněčná linie
U373	Lidská gliomová buněčná linie
U87	Lidská gliomová buněčná linie
WHO	Světová zdravotnická organizace

wt Wild type/divoký typ
Z-Gly-Pro-AMC N-benzylokarbonyl-glycyl-L-prolyl-7-amidomethylkumarin

7. Použitá literatura

ABBOTT, C. A., D. M. YU, E. WOOLLATT, G. R. SUTHERLAND, et al. Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. Eur J Biochem, Oct 2000, 267(20), 6140-6150.
AERTGEERTS, K., I. LEVIN, L. SHI, G. P. SNELL, et al. Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha. J Biol Chem, May 20 2005, 280(20), 19441-19444.
AERTGEERTS, K., S. YE, L. SHI, S. G. PRASAD, et al. N-linked glycosylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26): effects on enzyme activity, homodimer formation, and adenosine deaminase binding. Protein Sci, Jan 2004, 13(1), 145-154.
ALMO, S. C. a J. D. LOVE Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. Current Opinion in Structural Biology, 6// 2014, 26, 39-43.
AMIN, S., P. BOFFETTA a A. L. LUCAS The Role of Common Pharmaceutical Agents on the Prevention and Treatment of Pancreatic Cancer. Gut Liver, Sep 15 2016, 10(5), 665-671.
ARSCOTT, W. T., A. E. LABAUVE, V. MAY a U. V. WESLEY Suppression of neuroblastoma growth by dipeptidyl peptidase IV: relevance of chemokine regulation and caspase activation. Oncogene, Jan 29 2009, 28(4), 479-491.
AUSTIN, K., M. A. MARKOVIC a P. L. BRUBAKER Current and potential therapeutic targets of glucagon-like peptide-2. Current Opinion in Pharmacology, 12// 2016, 31, 13-18.
AYTAC, U. a N. H. DANG CD26/dipeptidyl peptidase IV: a regulator of immune function and a potential molecular target for therapy. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, Mar 2004, 4(1), 11-18.
BANDARANAYAKE, A. D. a S. C. ALMO Recent advances in mammalian protein production. FEBS Lett, 1/21/ 2014, 588(2), 253-260.
BECKENKAMP, A., S. DAVIES, J. B. WILLIG a A. BUFFON DPPIV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy? Tumor Biology, 2016, 1-15.
BEHNAN, J., P. ISAKSON, M. JOEL, C. CILIO, et al. Recruited brain tumor-derived mesenchymal stem cells contribute to brain tumor progression. Stem Cells, May 2014, 32(5), 1110-1123.
BEN-BARUCH, A. Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors. Clin Exp Metastasis, 2008, 25(4), 345-356.
BHATTACHARYA, S. D., Z. MI, L. J. TALBOT, H. GUO, et al. Human mesenchymal stem cell and epithelial hepatic carcinoma cell lines in admixture: concurrent stimulation of cancer-associated fibroblasts and epithelial-to-mesenchymal transition markers. Surgery, Sep 2012, 152(3), 449-454.
BIRNBAUM, T., J. HILDEBRANDT, G. NUEBLING, P. SOSTAK, et al. Glioblastoma-dependent differentiation and angiogenic potential of human mesenchymal stem cells in vitro. J Neurooncol, Oct 2011, 105(1), 57-65.
BJELKE, J. R., J. CHRISTENSEN, P. F. NIELSEN, S. BRANNER, et al. Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. Biochem J, Jun 1 2006, 396(2), 391-399.
BOCCARDI, V., L. MARANO, R. R. ROSSETTI, M. R. RIZZO, et al. Serum CD26 levels in patients with gastric cancer: a novel potential diagnostic marker. BMC Cancer, Oct 15 2015, 15, 703.

BÖCKER, R., C. J. ESTLER, M. MAYWALD a D. WEBER Comparison of distribution of doxycycline in mice after oral and intravenous application measured by a high-performance liquid chromatographic method. Arzneimittel-Forschung, 1981, 31(12), 2116-2117.
BONAVIA, R., M. M. INDA, W. K. CAVENEE a F. B. FURNARI Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network. Cancer Res, Jun 15 2011, 71(12), 4055-4060.
BUSEK, P., E. BALAZIOVA, I. MATRASOVA, M. HILSER, et al. Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. Tumour Biol, Oct 2016, 37(10), 13961-13971.
BUSEK, P., R. MALIK a A. SEDO Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer. Int J Biochem Cell Biol, Mar 2004, 36(3), 408-421.
BUSEK, P. a A. SEDO. Dipeptidyl Peptidase-IV and Related Proteases in Brain Tumors. In T. LICHTOR ed. *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications.* InTech, 2013.
BUSEK, P., J. STREMENOVA, E. KREPELA a A. SEDO Modulation of substance P signaling by dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity in human glioma cell lines. Physiol Res, 2008a, 57(3), 443-449.
BUSEK, P., J. STREMENOVA a A. SEDO Dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity bearing molecules in human brain tumors--good or evil? Front Biosci, 2008b, 13, 2319-2326.
BUSEK, P., J. STREMENOVA, L. SROMOVA, M. HILSER, et al. Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity. Int J Biochem Cell Biol, May 2012, 44(5), 738-747.
BUSH, N. A. O., S. M. CHANG a M. S. BERGER Current and future strategies for treatment of glioma. Neurosurgical Review, 2016, 1-14.
CAMBY, I., N. BELOT, F. LEFRANC, N. SADEGHI, et al. Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. J Neuropathol Exp Neurol, Jul 2002, 61(7), 585-596.
CARL-MCGRATH, S., U. LENDECKEL, M. EBERT, A. B. WOLTER, et al. The ectopeptidases CD10, CD13, CD26, and CD143 are upregulated in gastric cancer. Int J Oncol, Nov 2004, 25(5), 1223-1232.
CIRRI, P. a P. CHIARUGI Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. Am J Cancer Res, 2011, 1(4), 482-497.
CLARK, B. D., E. KWON, J. MAFFIE, H. Y. JEONG, et al. DPP6 Localization in Brain Supports Function as a Kv4 Channel Associated Protein. Front Mol Neurosci, 2008, 1, 8.
CLAVREUL, A., A. ETCHEVERRY, A. CHASSEVENT, V. QUILLIEN, et al. Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment. J Neurooncol, Feb 2012, 106(3), 493-504.
CLAVREUL, A., C. GUETTE, R. FAGUER, C. TETAUD, et al. Glioblastoma-associated stromal cells (GASCs) from histologically normal surgical margins have a myofibroblast phenotype and angiogenic properties. J Pathol, May 2014, 233(1), 74-88.
CORDERO, O. J., M. IMBERNON, L. D. CHIARA, V. S. MARTINEZ-ZORZANO, et al. Potential of soluble CD26 as a serum marker for colorectal cancer detection. World J Clin Oncol, Jun 10 2011, 2(6), 245-261.
CORDERO, O. J., F. J. SALGADO a M. NOGUEIRA On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2009, 58(11), 1723-1747.
CORNIL, I., D. THEODORESCU, S. MAN, M. HERLYN, et al. Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A, Jul 15 1991, 88(14), 6028-6032.

DA FONSECA, A. C. a B. BADIE Microglia and macrophages in malignant gliomas: recent discoveries and implications for promising therapies. Clin Dev Immunol, 2013, 2013, 264124.
DANG, N. H. a C. MORIMOTO CD26: an expanding role in immune regulation and cancer. Histol Histopathol, Oct 2002, 17(4), 1213-1226.
DE MEESTER, I., C. DURINX, G. BAL, P. PROOST, et al. Natural Substrates of Dipeptidyl Peptidase IV. In J. LANGNER a S. ANSORGE eds. *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2*. Boston, MA: Springer US, 2002, p. 67-87.
DE WEVER, O., P. DEMETTER, M. MAREEL a M. BRACKE Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. Int J Cancer, Nov 15 2008, 123(10), 2229-2238.
DURINX, C., A. M. LAMBEIR, E. BOSMANS, J. B. FALMAGNE, et al. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. Eur J Biochem, Sep 2000, 267(17), 5608-5613.
DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. N Engl J Med, Dec 25 1986, 315(26), 1650-1659.
DVORANKOVA, B., P. SZABO, L. LACINA, P. GAL, et al. Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. Cells Tissues Organs, 2011, 194(6), 469-480.
DVORANKOVA, B., P. SZABO, L. LACINA, O. KODET, et al. Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. Histochem Cell Biol, May 2012, 137(5), 679-685.
FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells : a manual of basic technique*. Edtion ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, 2005. 642 p. p. ISBN 0471453293.
GAGE, F. H. Mammalian Neural Stem Cells. Science, 2000-02-25 00:00:00 2000, 287(5457), 1433-1438.
GHERSI, G., H. DONG, L. A. GOLDSTEIN, Y. YEH, et al. Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. J Biol Chem, Aug 9 2002, 277(32), 29231-29241.
GOLDSTEIN, L. A., G. GHERSI, M. L. PINEIRO-SANCHEZ, M. SALAMONE, et al. Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma. Biochim Biophys Acta, Jul 10 1997, 1361(1), 11-19.
GONZALEZ-GRONOW, M., S. KACZOWKA, G. GAWDI a S. V. PIZZO Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) is a cell-surface plasminogen receptor. Front Biosci, 2008, 13, 1610-1618.
GOODPASTER, T., A. LEGESSE-MILLER, M. R. HAMEED, S. C. AISNER, et al. An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. J Histochem Cytochem, Apr 2008, 56(4), 347-358.
GORITZ, C., D. O. DIAS, N. TOMILIN, M. BARBACID, et al. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. Science, Jul 08 2011, 333(6039), 238-242.
GORMAN, C. a C. BULLOCK Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. Curr Opin Biotechnol, Oct 2000, 11(5), 455-460.
GORRELL, M. D. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. Clin Sci (Lond), Apr 2005, 108(4), 277-292.
GOSSEN, M. a H. BUJARD Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc Natl Acad Sci U S A, Jun 15 1992, 89(12), 5547-5551.
GREEN, B. D. a P. R. FLATT Incretin hormone mimetics and analogues in diabetes therapeutics. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, Dec 2007, 21(4), 497-516.

GROLL, A. V., Y. LEVIN, M. C. BARBOSA a A. P. RAVAZZOLO Linear DNA Low Efficiency Transfection by Liposome Can Be Improved by the Use of Cationic Lipid as Charge Neutralizer. Biotechnol Prog, 2006, 22(4), 1220-1224.
HARFORD-WRIGHT, E., K. M. LEWIS a R. VINK The Potential for Substance P Antagonists as Anti-Cancer Agents in Brain Tumours. Recent Patents on CNS Drug Discovery, 2013, 8(1), 13-23.
HAVIV, I., K. POLYAK, W. QIU, M. HU, et al. Origin of carcinoma associated fibroblasts. Cell Cycle, Feb 15 2009, 8(4), 589-595.
HAVRE, P. A., M. ABE, Y. URASAKI, K. OHNUMA, et al. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. Front Biosci, 2008, 13, 1634-1645.
HILSER, M., J. TRYLCOVA, P. BUSEK a A. SEDO Limitations of macroscopic fluorescence imaging for the estimation of tumour growth in an orthotopic glioma mouse model. Folia Biol (Praha), 2012, 58(3), 128-133.
HILGER, M. Dipeptidylpeptidáza IV v ortotopických modelech gliomu. dizertační práce 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, 2016.
HOSSAIN, A., J. GUMIN, F. GAO, J. FIGUEROA, et al. Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6/gp130/STAT3 Pathway. Stem Cells, Aug 2015, 33(8), 2400-2415.
HOUGHTON, A. N., A. P. ALBINO, C. CORDON-CARDO, L. J. DAVIS, et al. Cell surface antigens of human melanocytes and melanoma. Expression of adenosine deaminase binding protein is extinguished with melanocyte transformation. J Exp Med, Jan 1 1988, 167(1), 197-212.
CHANCHAM, P. a J. A. HUGHES RELATIONSHIP BETWEEN PLASMID DNA TOPOLOGICAL FORMS AND IN VITRO TRANSFECTION. Journal of Liposome Research, 2001/01/01 2001, 11(2-3), 139-152.
CHARLES, N. A., E. C. HOLLAND, R. GILBERTSON, R. GLASS, et al. The brain tumor microenvironment. Glia, Mar 2012, 60(3), 502-514.
CHEN, T., K. AJAMI, G. W. MCCAUGHAN, M. D. GORRELL, et al. Dipeptidyl peptidase IV gene family. The DPIV family. Adv Exp Med Biol, 2003, 524, 79-86.
CHENG, J. D., R. L. DUNBRACK, JR., M. VALIANOU, A. ROGATKO, et al. Promotion of tumor growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model. Cancer Res, Aug 15 2002, 62(16), 4767-4772.
CHERNG, J. Y., N. M. SCHUURMANS-NIEUWENBROEK, W. JISKOOT, H. TALSMA, et al. Effect of DNA topology on the transfection efficiency of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid complexes. J Control Release, Aug 05 1999, 60(2-3), 343-353.
CHIRAVURI, M., F. AGARRABERES, S. L. MATHIEU, H. LEE, et al. Vesicular localization and characterization of a novel post-proline-cleaving aminodipeptidase, quiescent cell proline dipeptidase. J Immunol, Nov 15 2000, 165(10), 5695-5702.
CHRISTIANSEN, V. J., K. W. JACKSON, K. N. LEE a P. A. MCKEE Effect of fibroblast activation protein and alpha2-antiplasmin cleaving enzyme on collagen types I, III, and IV. Arch Biochem Biophys, Jan 15 2007, 457(2), 177-186.
ISHII, K., A. MIZOKAMI, T. TSUNODA, K. IGUCHI, et al. Heterogenous induction of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human prostatic fibroblasts by co-culturing with prostate cancer cells. J Cell Biochem, Dec 2011, 112(12), 3604-3611.
IWAKI-EGAWA, S., Y. WATANABE, Y. KIKUYA a Y. FUJIMOTO Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. J Biochem, Aug 1998, 124(2), 428-433.
JAVIDROOZI, M., S. ZUCKER a W. T. CHEN Plasma seprase and DPP4 levels as markers of disease and prognosis in cancer. Dis Markers, 2012, 32(5), 309-320.

KAUFMAN, R. J. Overview of vector design for mammalian gene expression. Mol Biotechnol, Oct 2000, 16(2), 151-160.
KAUFMAN, W. L., I. KOCMAN, V. AGRAWAL, H. P. RAHN, et al. Homogeneity and persistence of transgene expression by omitting antibiotic selection in cell line isolation. Nucleic Acids Res, Oct 2008, 36(17), e111.
KEANE, F. M., N. A. NADVI, T. W. YAO a M. D. GORRELL Neuropeptide Y, B-type natriuretic peptide, substance P and peptide YY are novel substrates of fibroblast activation protein-alpha. FEBS J, Apr 2011, 278(8), 1316-1332.
KELLY, T., Y. HUANG, A. E. SIMMS a A. MAZUR Fibroblast activation protein-alpha: a key modulator of the microenvironment in multiple pathologies. Int Rev Cell Mol Biol, 2012, 297, 83-116.
KENNEDY, A., H. DONG, D. CHEN a W. T. CHEN Elevation of seprase expression and promotion of an invasive phenotype by collagenous matrices in ovarian tumor cells. Int J Cancer, Jan 1 2009, 124(1), 27-35.
KIKKAWA, F., H. KAJIYAMA, K. INO, K. SHIBATA, et al. Increased adhesion potency of ovarian carcinoma cells to mesothelial cells by overexpression of dipeptidyl peptidase IV. Int J Cancer, Jul 20 2003, 105(6), 779-783.
KIKKAWA, F., H. KAJIYAMA, K. SHIBATA, K. INO, et al. Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression. Biochim Biophys Acta, Aug 1 2005, 1751(1), 45-51.
KITLINSKA, J., E. W. LEE, L. LI, J. PONS, et al. Dual role of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) in angiogenesis and vascular remodeling. Adv Exp Med Biol, 2003, 524, 215-222.
KOCZOROWSKA, M. M., S. THOLEN, F. BUCHER, L. LUTZ, et al. Fibroblast activation protein-Ŭ, a stromal cell surface protease, shapes key features of cancer associated fibroblasts through proteome and degradome alterations. Molecular Oncology, 2016, 10(1), 40-58.
KOLAR, M., P. SZABO, B. DVORANKOVA, L. LACINA, et al. Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. Biol Cell, Dec 2012, 104(12), 738-751.
KUSHWAHA, R. N., W. HAQ a S. B. KATTI Sixteen-Years of Clinically Relevant Dipeptidyl Peptidase-IV (DPP-IV) Inhibitors for Treatment of Type-2 Diabetes: A Perspective. Current Medicinal Chemistry, 2014, 21(35), 4013-4045.
LEE, E. W., M. MICHALKIEWICZ, J. KITLINSKA, I. KALEZIC, et al. Neuropeptide Y induces ischemic angiogenesis and restores function of ischemic skeletal muscles. J Clin Invest, Jun 2003, 111(12), 1853-1862.
LEE, K. N., K. W. JACKSON, V. J. CHRISTIANSEN, C. S. LEE, et al. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. Blood, Feb 15 2006, 107(4), 1397-1404.
LEITING, B., K. D. PRYOR, J. K. WU, F. MARSILIO, et al. Catalytic properties and inhibition of proline-specific dipeptidyl peptidases II, IV and VII. Biochem J, Apr 15 2003, 371(Pt 2), 525-532.
LEVY, M. T., G. W. MCCAUGHAN, C. A. ABBOTT, J. E. PARK, et al. Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. Hepatology, Jun 1999, 29(6), 1768-1778.
LI, H., X. FAN a J. HOUGHTON Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. J Cell Biochem, Jul 1 2007, 101(4), 805-815.
LIVAK, K. J. a T. D. SCHMITTGEN Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, Dec 2001, 25(4), 402-408.
LOUIS, D. N. a J. F. GUSELLA A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. Trends Genet, Oct 1995, 11(10), 412-415.

LOUIS, D. N., E. C. HOLLAND a J. G. CAIRNCROSS Glioma classification: a molecular reappraisal. Am J Pathol, Sep 2001, 159(3), 779-786.
LOUIS, D. N., H. OHGAKI, O. D. WIESTLER, W. K. CAVENEE, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol, Aug 2007, 114(2), 97-109.
LOUIS, D. N., A. PERRY, G. REIFENBERGER, A. VON DEIMLING, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol, May 9 2016.
LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR a R. J. RANDALL Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, Nov 1951, 193(1), 265-275.
MAES, M.-B., S. SCHARPÉ a I. DE MEESTER Dipeptidyl peptidase II (DPPII), a review. Clinica Chimica Acta, 5/1/ 2007, 380(1ï 2), 31-49.
MAES, M. B., A. M. LAMBEIR, K. GILANY, K. SENTEN, et al. Kinetic investigation of human dipeptidyl peptidase II (DPPII)-mediated hydrolysis of dipeptide derivatives and its identification as quiescent cell proline dipeptidase (QPP)/dipeptidyl peptidase 7 (DPP7). Biochem J, Mar 1 2005, 386(Pt 2), 315-324.
MARES, V., J. STREMENOVA, V. LISA, H. KOZAKOVA, et al. Compartment- and malignance-dependent up-regulation of gamma-glutamyltranspeptidase and dipetidylpeptidase-IV activity in human brain gliomas. Histol Histopathol, Jul 2012, 27(7), 931-940.
MASUR, K., F. SCHWARTZ, F. ENTSCHLADEN, B. NIGGEMANN, et al. DPPIV inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells. Regulatory Peptides, 12/10/ 2006, 137(3), 147-155.
MAYHEW, T. M. a D. R. OLSEN Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. J Anat, Oct 1991, 178, 133-144.
MCNICHOLAS, K., T. CHEN a C. A. ABBOTT Dipeptidyl peptidase (DP) 6 and DP10: novel brain proteins implicated in human health and disease. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(3), 262-267.
MELE, D. A., P. BISTA, D. V. BAEZ a B. T. HUBER Dipeptidyl peptidase 2 is an essential survival factor in the regulation of cell quiescence. Cell Cycle, Aug 2009, 8(15), 2425-2434.
MENTLEIN, R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. Regul Pept, Nov 30 1999, 85(1), 9-24.
MENTLEIN, R., K. HATTERMANN, C. HEMION, A. A. JUNGBLUTH, et al. Expression and role of the cell surface protease seprase/fibroblast activation protein-Ŭ(FAP-Ŭ) in astroglial tumors. Biological Chemistry, 2011, 392(3), 199-207.
MIELKE, C., M. TUMMLER, D. SCHUBELER, I. VON HOEGEN, et al. Stabilized, long-term expression of heterodimeric proteins from tricistronic mRNA. Gene, Aug 22 2000, 254(1-2), 1-8.
MIFKOVA, A., O. KODET, P. SZABO, J. KUCERA, et al. Synthetic polyamine BPA-C8 inhibits TGF-beta1-mediated conversion of human dermal fibroblast to myofibroblasts and establishment of galectin-1-rich extracellular matrix in vitro. Chembiochem, Jul 7 2014, 15(10), 1465-1470.
MONSKY, W. L., C. Y. LIN, A. AOYAMA, T. KELLY, et al. A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. Cancer Res, Nov 1 1994, 54(21), 5702-5710.
MORRISON, M. E., S. VIJAYASARADHI, D. ENGELSTEIN, A. P. ALBINO, et al. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. J Exp Med, Apr 1 1993, 177(4), 1135-1143.

MOTLIK, J., J. KLIMA, B. DVORANKOVA a K. SMETANA, JR. Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation. Theriogenology, Jan 1 2007, 67(1), 105-111.
NAJBAUER, J., P. C. HUSZTHY, M. E. BARISH, E. GARCIA, et al. Cellular host responses to gliomas. PLoS One, 2012, 7(4), e35150.
NAKAHARA, H., M. NOMIZU, S. K. AKIYAMA, Y. YAMADA, et al. A mechanism for regulation of melanoma invasion. Ligation of alpha6beta1 integrin by laminin G peptides. J Biol Chem, Nov 1 1996, 271(44), 27221-27224.
NAVAB, R., D. STRUMPF, C. TO, E. PASKO, et al. Integrin alpha11beta1 regulates cancer stromal stiffness and promotes tumorigenicity and metastasis in non-small cell lung cancer. Oncogene, Apr 14 2016, 35(15), 1899-1908.
N'nMEĽKOVÁ, J. Model experimentálnĎregulovatelné exprese dipeptidylpeptidasy IV v gliomových bunĎných liniích. Diplomová práce PŘírodovĎdecká fakulta Univerzity Karlovy, 2009.
O'BRIEN, P. a B. F. O'CONNOR Seprase: an overview of an important matrix serine protease. Biochim Biophys Acta, Sep 2008, 1784(9), 1130-1145.
OGATA, S., Y. MISUMI, E. TSUJI, N. TAKAMI, et al. Identification of the active site residues in dipeptidyl peptidase IV by affinity labeling and site-directed mutagenesis. Biochemistry, Mar 10 1992, 31(9), 2582-2587.
OHGAKI, H. a P. KLEIHUES Epidemiology and etiology of gliomas. Acta Neuropathol, Jan 2005, 109(1), 93-108.
ORIMO, A., P. B. GUPTA, D. C. SGROI, F. ARENZANA-SEISDEDOS, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell, May 6 2005, 121(3), 335-348.
OTERO-ESTEVEZ, O., L. DE CHIARA, F. J. RODRIGUEZ-BERROCAL, M. PAEZ DE LA CADENA, et al. Serum sCD26 for colorectal cancer screening in family-risk individuals: comparison with faecal immunochemical test. Br J Cancer, Jan 20 2015, 112(2), 375-381.
PALMA, C., F. NARDELLI, S. MANZINI a C. A. MAGGI Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cell lines bearing tachykinin NK1 receptors. Br J Cancer, Jan 1999, 79(2), 236-243.
PANG, R., W. L. LAW, A. C. CHU, J. T. POON, et al. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. Cell Stem Cell, Jun 4 2010, 6(6), 603-615.
PARK, H. S., H. Y. YEO, H. J. CHANG, K. H. KIM, et al. Dipeptidyl peptidase 10, a novel prognostic marker in colorectal cancer. Yonsei Med J, Nov 2013, 54(6), 1362-1369.
PARSONS, D. W., S. JONES, X. ZHANG, J. C. LIN, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science, Sep 26 2008, 321(5897), 1807-1812.
PETHIYAGODA, C. L., D. R. WELCH a T. P. FLEMING Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) inhibits cellular invasion of melanoma cells. Clin Exp Metastasis, 2000, 18(5), 391-400.
PIKAART, M. J., F. RECILLAS-TARGA a G. FELSENFELD Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. Genes Dev, Sep 15 1998, 12(18), 2852-2862.
PLZAK, J., L. LACINA, M. CHOVANEC, B. DVORANKOVA, et al. Epithelial-stromal interaction in squamous cell epithelium-derived tumors: an important new player in the control of tumor biological properties. Anticancer Res, Feb 2010, 30(2), 455-462.
POLANSKA, U. M. a A. ORIMO Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. J Cell Physiol, Aug 2013, 228(8), 1651-1657.
POLYAK, K. a W. C. HAHN Roots and stems: stem cells in cancer. Nat Med, Mar 2006, 12(3), 296-300.

POLYAK, K., I. HAVIV a I. G. CAMPBELL Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. Trends Genet, Jan 2009, 25(1), 30-38.
PROWSE, A. B., L. R. MCQUADE, K. J. BRYANT, H. MARCAL, et al. Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media. J Proteome Res, Sep 2007, 6(9), 3796-3807.
QI, S. Y., P. J. RIVIERE, J. TROJNAR, J. L. JUNIEN, et al. Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. Biochem J, Jul 1 2003, 373(Pt 1), 179-189.
RAMIREZ-MONTAGUT, T., N. E. BLACHERE, E. V. SVIDERSKAYA, D. C. BENNETT, et al. FAPalpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor. Oncogene, Jul 15 2004, 23(32), 5435-5446.
RAO, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. Nat Rev Cancer, Jul 2003, 3(7), 489-501.
REINHARD, J., N. BRÖSICKE, U. THEOCHARIDIS a A. FAISSNER The extracellular matrix niche microenvironment of neural and cancer stem cells in the brain. Int J Biochem Cell Biol, 2016.
RICHARDSON, P. J. CXCR4 and Glioblastoma. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2016, 16(1), 59-74.
ROBLEDO, M. M., R. A. BARTOLOME, N. LONGO, J. M. RODRIGUEZ-FRADE, et al. Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. J Biol Chem, Nov 30 2001, 276(48), 45098-45105.
SAEZ, E., D. NO, A. WEST a R. M. EVANS Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. Curr Opin Biotechnol, Oct 1997, 8(5), 608-616.
SAYEGH, E. T., G. KAUR, O. BLOCH a A. T. PARSA Systematic review of protein biomarkers of invasive behavior in glioblastoma. Mol Neurobiol, Jun 2014, 49(3), 1212-1244.
SEDO, A. a R. MALIK Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? Biochim Biophys Acta, Dec 17 2001, 1550(2), 107-116.
SEDO, A., R. MALIK, K. DRBAL, V. LISA, et al. Dipeptidyl peptidase IV in two human glioma cell lines. Eur J Histochem, 2001, 45(1), 57-63.
SEDO, A., R. MALIK a E. KREPELA Dipeptidyl peptidase IV in C6 rat glioma cell line differentiation. Biol Chem, Jan 1998, 379(1), 39-44.
SEDO, A. a R. MENTLEIN *Glioma cell biology*. Edtion ed. Wien ; New York: Springer, 2014. x, 468 pages p. ISBN 9783709114308 (alk. paper)
3709114306 (alk. paper).
SEDO, A., J. STREMENOVA, P. BUSEK a J. S. DUKE-COHAN Dipeptidyl peptidase-IV and related molecules: markers of malignancy? Expert Opin Med Diagn, Jun 2008, 2(6), 677-689.
SHAN, L.-H., W.-G. SUN, W. HAN, L. QI, et al. Roles of fibroblasts from the interface zone in invasion, migration, proliferation and apoptosis of gastric adenocarcinoma. Journal of Clinical Pathology, 2012, 65(10), 888.
SHAROYAN, S. G., A. A. ANTONYAN, S. S. MARDANYAN, G. LUPIDI, et al. Complex of dipeptidyl peptidase II with adenosine deaminase. Biochemistry (Moscow), 2008// 2008, 73(8), 943-949.
SINGH, S. K., C. HAWKINS, I. D. CLARKE, J. A. SQUIRE, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature, 11/18/print 2004, 432(7015), 396-401.
SMETANA, K., B. DVORANKOVA, P. SZABO, H. STRNAD, et al. Role of Stromal Fibroblasts in Cancer Originated from Squamous Epithelia. In X. BAI ed. *Dermal Fibroblasts: Histological Perspectives, Characterization and Role in Disease*. New York: Nova Sciences Publishers, 2013, p. 83-94.

SPRENGEL, R. a M. T. HASAN Tetracycline-controlled genetic switches. Handb Exp Pharmacol, 2007, (178), 49-72.
STREMENOVA, J., E. KREPELA, V. MARES, J. TRIM, et al. Expression and enzymatic activity of dipeptidyl peptidase-IV in human astrocytic tumours are associated with tumour grade. Int J Oncol, Oct 2007, 31(4), 785-792.
STRNAD, H., L. LACINA, M. KOLAR, Z. CADA, et al. Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. Histochem Cell Biol, Feb 2010, 133(2), 201-211.
STULC, T. a A. SEDO Inhibition of multifunctional dipeptidyl peptidase-IV: Is there a risk of oncological and immunological adverse effects? Diabetes Research and Clinical Practice, 5// 2010, 88(2), 125-131.
SVENSSON, A., T. RAMOS-MORENO, S. EBERSTAL, S. SCHEDING, et al. Identification of two distinct mesenchymal stromal cell populations in human malignant glioma. J Neurooncol, Oct 18 2016.
TANAKA, T., J. S. DUKE-COHAN, J. KAMEOKA, A. YARON, et al. Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV. Proc Natl Acad Sci U S A, Apr 12 1994, 91(8), 3082-3086.
TANG, W., X. WANG, Y. CHEN, J. ZHANG, et al. CXCL12 and CXCR4 as predictive biomarkers of glioma recurrence pattern after total resection. Pathologie Biologie, 9// 2015, 63(4ï 5), 190-198.
TRYLCOVA, J., P. BUSEK, K. SMETANA, JR., E. BALAZIOVA, et al. Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells in vitro. Tumour Biol, Aug 2015, 36(8), 5873-5879.
TSENG, W. W. a C. D. LIU Peptide YY and cancer: current findings and potential clinical applications. Peptides, Feb 2002, 23(2), 389-395.
VALACH, J., Z. FIK, H. STRNAD, M. CHOVANEC, et al. Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. Int J Cancer, Dec 1 2012, 131(11), 2499-2508.
VAN CRAENENBROECK, K., P. VANHOENACKER, J. E. LEYSEN a G. HAEGEMAN Evaluation of the tetracycline- and ecdysone-inducible systems for expression of neurotransmitter receptors in mammalian cells. Eur J Neurosci, Sep 2001, 14(6), 968-976.
VAN DAMME, J., S. STRUYF, A. WUYTS, E. VAN COILLIE, et al. The role of CD26/DPP IV in chemokine processing. Chem Immunol, 1999, 72, 42-56.
VANHOOF, G., F. GOOSSENS, I. DE MEESTER, D. HENDRIKS, et al. Proline motifs in peptides and their biological processing. FASEB J, Jun 1995, 9(9), 736-744.
WEN, P. Y. a S. KESARI Malignant gliomas in adults. N Engl J Med, Jul 31 2008, 359(5), 492-507.
WESLEY, U. V., A. P. ALBINO, S. TIWARI a A. N. HOUGHTON A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. J Exp Med, Aug 2 1999, 190(3), 311-322.
WESSELING, P., R. O. SCHLINGEMANN, F. J. RIETVELD, M. LINK, et al. Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immuno-light and immuno-electron microscopic study. J Neuropathol Exp Neurol, May 1995, 54(3), 304-310.
WOLF, M., S. ALBRECHT a C. MÄRKI Proteolytic processing of chemokines: Implications in physiological and pathological conditions. Int J Biochem Cell Biol, 6// 2008, 40(6ï 7), 1185-1198.
WONG, P. F., M. G. GALL, W. W. BACHOVCHIN, G. W. MCCAUGHAN, et al. Neuropeptide Y is a physiological substrate of fibroblast activation protein: Enzyme kinetics

in blood plasma and expression of Y2R and Y5R in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Peptides, 1// 2016, 75, 80-95.
XIA, X., M. AYALA, B. R. THIEDE a S. C. ZHANG In vitro- and in vivo-induced transgene expression in human embryonic stem cells and derivatives. Stem Cells, Feb 2008, 26(2), 525-533.
XIONG, S., Q. WANG, L. ZHENG, F. GAO, et al. Identification of candidate molecular markers of nasopharyngeal carcinoma by tissue microarray and in situ hybridization. Med Oncol, Dec 2011, 28 Suppl 1, S341-348.
XU, F., J. SHI, B. YU, W. NI, et al. Chemokines mediate mesenchymal stem cell migration toward gliomas in vitro. Oncol Rep, Jun 2010, 23(6), 1561-1567.
YAMAGUCHI, K., M. D. RICHARDSON, D. D. BIGNER a M. M. KWATRA Signal transduction through substance P receptor in human glioblastoma cells: roles for Src and PKCdelta. Cancer Chemother Pharmacol, Dec 2005, 56(6), 585-593.
YAMAMOTO, M., N. WADA, Y. KITABATAKE, D. WATANABE, et al. Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain. J Neurosci, Jul 30 2003, 23(17), 6759-6767.
YU, D. M., X. M. WANG, G. W. MCCAUGHAN a M. D. GORRELL Extraenzymatic functions of the dipeptidyl peptidase IV-related proteins DP8 and DP9 in cell adhesion, migration and apoptosis. FEBS J, Jun 2006, 273(11), 2447-2460.
ZHONG, J. a S. RAJAGOPALAN Dipeptidyl Peptidase-4 Regulation of SDF-1/CXCR4 Axis: Implications for Cardiovascular Disease. Front Immunol, 2015, 6, 477.
ZICHE, M., L. MORBIDELLI, P. GEPPETTI, C. A. MAGGI, et al. Substance P induces migration of capillary endothelial cells: a novel NK-1 selective receptor mediated activity. Life Sci, 1991, 48(2), PL7-11.

Seznam publikací doktoranda, které jsou podkladem dizertace:

Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity.
Busek P., Stremenova J., Sromova L., Hilser M., Balaziova E., Kosek D., **Trylcova J.**, Strnad H., Krepela E. a Sedo A.
Int J Biochem Cell Biol, May 2012, 44(5), 738-747.
IF 3,9

Limitations of macroscopic fluorescence imaging for the estimation of tumour growth in an orthotopic glioma mouse model.
Hilser M., **Trylcova J.**, Busek P. a Sedo A.
Folia Biol (Praha), 2012, 58(3), 128-133.
IF 1,17

Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells in vitro.
Trylcova J., Busek P., Smetana K. jr., Balaziova E., Dvorankova B., Mifkova A. a Sedo A.
Tumour Biol, Aug 2015, 36(8), 5873-5879.
IF 2,93