

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

Mnohočetné formy Dipeptidylpeptidázy-IV a Fibroblastového aktivačního proteinu v mozkových nádorech

Ivana Matrasová
2023

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav biochemie a experimentální onkologie,
U Nemocnice 5, Praha 2, 12853

Školitel: Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

ABSTRAKT

Proteolytické enzymy přispívají ke vzniku, rozvoji a progresi řady onemocnění. Dipeptidylpeptidáza-IV (DPP-IV) a fibroblastový aktivační protein (FAP) jsou serinové proteázy s unikátní schopností odštěpovat dipeptidy obsahující – vysoce evolučně konzervovaný – prolin na předposlední pozici N-konce substrátů/biologicky aktivních peptidů. FAP vykazuje i gelatinolytickou aktivitu, kterou uplatňuje při procesech remodelace extracelulární matrix. Gliální mozkové nádory (gliomy) vznikají transformací rezidentních gliových buněk, mozkové metastázy vznikají z cirkulujících transformovaných buněk extrakraniálních nádorů. Naše předchozí práce popsaly zvýšenou expresi DPP-IV a FAP v tkáních vysokostupňových gliomů. Přítomnost DPP-IV a FAP v tkáních mozkových metastáz nebyla do této doby popsána.

Cílem této dizertační práce bylo popsat mnohočetné formy DPP-IV a FAP, přiblížit jejich buněčný původ a možnou regulovatelnost v mozkových nádorech. DPP-IV a její molekulové MW a pI formy byly exprimovány dominantně transformovanými gliálními buňkami, FAP a jeho MW a pI formy byly přítomny v transformovaných i stromálních buňkách v tkáních GBM a mozkových metastáz. Spektrum mnohočetných forem DPP-IV a FAP v tkáních GBM ani v transformovaných gliálních buňkách pravděpodobně nebylo důsledkem glykosylace.

V tkáních GBM a mozkových metastáz jsme našli do této doby nepopsanou molekulovou formu FAP s pI 7,0-8,5. Ve stromálních buňkách byly, na rozdíl od transformovaných gliálních buněk, nalezeny formy FAP s pI 7,0-8,0. Molekulové formy FAP s pI 7,0-8,5 mohou být v tkáních GBM indukované v gliomových buňkách i v nenádorových pericytech až v kontextu nádorového mikroprostředí. Expresí FAP, nikoliv ovšem DPP-IV, byla v gliomových i stromálních buňkách přítomných v tkáních GBM a mozkových metastáz indukovaná TGF- β 1.

Poznání regulace exprese mnohočetných forem DPP-IV a FAP a jejich biologických funkcí v nádorovém mikroprostředí může v budoucnu přispět k identifikaci dalších terapeuticky významných cílů v léčbě mozkových nádorů.

Klíčová slova: dipeptidylpeptidáza-IV (DPP-IV), fibroblastový aktivační protein (FAP), mnohočetné formy, mozkové nádory, nádorové mikroprostředí, TGF- β 1

ABSTRACT

Proteolytic enzymes are known to contribute to the initiation, development and progression of a number of diseases. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) and fibroblast activation protein (FAP) are serine proteases with the unique ability to cleave dipeptides containing - highly evolutionarily conserved - proline at the penultimate position of the N-terminus of substrates/biologically active peptides. FAP also exhibits gelatinolytic activity, which it exerts during extracellular matrix remodeling processes. Glial brain tumors (gliomas) arise from resident transformed glial cells, whereas brain metastases originate from circulating transformed extracranial tumor cells. Our previous work has described an increased expression of DPP-IV and FAP in high-grade glioma tissues. The presence of DPP-IV and FAP in brain metastatic tissues has not been described to date.

The aim of this thesis was to describe the multiple forms of DPP-IV and FAP, and to describe their cellular origin and possible regulation in brain tumors. DPP-IV and its molecular MW and pI forms were expressed predominantly by transformed glial cells, whereas FAP and its MW and pI forms were expressed by transformed and stromal cells present in GBM and brain metastatic tissues. The spectrum of multiple forms of DPP-IV and FAP in GBM tissues and transformed glial cells was probably not a result of glycosylation.

We found a previously undescribed molecular form of FAP with a pI of 7,0-8,5 in GBM tissues and in brain metastases. In stromal cells, in contrast to transformed glial cells, several forms of FAP with pI 7.0-8.0 were found. Molecular forms of FAP with pI 7,0-8,5 can also be induced within glioma cells and non-tumor pericytes present in GBM tissues in the context of the tumor microenvironment. Expression of FAP, but not DPP-IV, was induced by TGF- β 1 in glioma and stromal cells present in GBM tissues and in brain metastases.

Understanding the regulation of the expression of multiple forms of DPP-IV and FAP and their biological functions in the tumor microenvironment may contribute to the identification of additional therapeutically relevant targets in the treatment of brain tumors in the future.

Key words: dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), fibroblast activation protein (FAP), multiple forms, brain tumors, tumor microenvironment, TGF- β 1.

1	Úvod.....	5
2	Hypotéza a cíle práce.....	7
3	Materiál a metodika.....	7
4	Výsledky.....	10
5	Diskuze.....	17
6	Závěry.....	20
7	Seznam použité literatury.....	20
8	Seznam příloh.....	23

1.1 PROTEÁZY

Proteázy jsou ubikvitně exprimované enzymy, které hydrolyzou peptidových a izopeptidových vazeb ireverzibilně modifikují proteiny a peptidy, čímž se podílejí na udržení celkové homeostázy organismu. Proteázy jsou jednou z největších proteinových rodin, kterou tvoří téměř 600 hydrolytických enzymů dále rozdělených podle mechanismu katalytického účinku (Rawlings & Bateman, 2021).

S rozvojem a průběhem řady patologických stavů včetně nádorových onemocnění je často spojena i deregulovaná exprese proteáz, proteolytická aktivita, na proteolýze závislá signalizace a/nebo narušená rovnováha mezi přítomností proteáz a jejich inhibitorů (Eatamadi et al., 2017; Turk et al., 2012). Proteázy se na procesech vzniku a rozvoje nádorových onemocnění mohou podílet modifikací komunikace mezi jednotlivými buněčnými populacemi nádorového mikroprostředí mechanismem proteolytické modifikace biologicky aktivních peptidů (Itoh, 2022), remodelací extracelulární matrix (Karamanos et al., 2019; Mohan et al., 2020), stimulací přechodu buňky z epitelového do mezenchymového fenotypu (EMT) (Mitschke et al., 2019) a maskováním transformovaných buněk před imunitním systémem (Muenst et al., 2016), čímž podporují růst nádoru, jeho invazivitu a schopnost metastazovat (Hanahan & Weinberg, 2011; Pandya et al., 2017).

Dipeptidylpeptidáza-IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) a fibroblastový aktivační protein (FAP, EC 3.4.21.B28) jsou serinové proteázy s mnohočetnými biologickými účinky. Změny exprese DPP-IV a FAP byly popsány v patogenetických mechanismech řady nádorových onemocnění, přičemž v těchto procesech mohou hrát roli tumor promotorů i tumor supresorů (Beckenkamp et al., 2016; Busek et al., 2022; Fitzgerald & Weiner, 2020).

1.1.1 Dipeptidylpeptidáza-IV a fibroblastový aktivační protein

Dipeptidylpeptidáza-IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) je ubikvitně exprimovaná, typicky membránově vázaná serinová proteáza typu II, jejíž hydrolytická aktivita je podmíněna homodimerizací dvou monomerních podjednotek (Mentlein, 1999). DPP-IV byla pozorována také ve vyšších molekulových strukturách (200–400 kDa) (De Meester et al., 1992; Gorrell et al., 2001; Puschel et al., 1982; Shibuya-Saruta et al., 1996). Některé práce popisují i DPP-IV v podobě tetrameru, jehož MW přesahuje 800 kDa. Dimery DPP-IV na povrchu plazmatických membrán T lymfocytů a epitelových buněk by mohly tvorbou homotetrameru ovlivňovat jejich adhezní vlastnosti a mezibuněčné interakce (Engel et al., 2003; Lambeir et al., 1997). Kromě membránově vázané DPP-IV byla v plazmě, slinách, cerebrospinální tekutině nebo seminální plazmě popsána i solubilní/secernovaná forma DPP-IV, která pravděpodobně vzniká buněčnou sekrecí nebo dosud málo popsaným mechanismem proteolytického štěpení (z angl. shedding) membránové DPP-IV (Abbott et al., 2000; Durinx et al., 2000; Lambeir et al., 1997). Glykosylací podmíněná přítomnost mnohočetných forem DPP-IV s odlišnou enzymovou aktivitou byla popsána v plazmě pacientů s diabetem mellitem druhého typu (Patrick O'Mullan, 2017) nebo ve tkáních spinocelulárního karcinomu plic (Sedo et al., 1991).

Fibroblastový aktivační protein alfa (FAP, EC 3.4.21.B28) je membránově vázaná serinová proteáza typu II poprvé popsána jako povrchový antigen transformovaných epitelových buněk (Rettig et al., 1986). FAP sdílí s DPP-IV 68% sekvenční podobnosti C-terminální domény a ve skupině DASH je nejbližším homologem DPP-IV (Goldstein et al., 1997). Hydrolytická aktivita FAP je, stejně jako u DPP-IV, podmíněna homodimerizací dvou monomerních podjednotek. Současně byl popsán i možný vznik heterodimeru s DPP-IV (Scanlan et al., 1994). Oproti DPP-IV může FAP fungovat i jako gelatináza (J. Lee et al., 2005). Na rozdíl od ubikvitně exprimované DPP-IV je FAP exprimovaný téměř výhradně v místech tkáňové remodelace, včetně nádorové tkáně. FAP byl poprvé popsán v reaktivních stromálních fibroblastech epitelálních nádorů, sarkomů měkkých tkání, při hojení ran a ve fetálních mezenchymových fibroblastech (Rettig et al., 1986). Kromě membránově vázaného FAP byla v lidské plazmě popsána solubilní forma FAP, která se do cirkulace může dostávat dosud neúplně popsaným mechanismem proteolytického štěpení membránové formy (z angl. shedding) (Mueller et al., 1999). Solubilní forma FAP může být syntetizována *de novo* jako enzym přítomný v krvi

1.1.1.1 Biologické substráty DPP-IV a FAP

DPP-IV odštěpuje X-Pro dipeptidy z N-terminálního konce řady biologicky aktivních peptidů a bílkovin obsahujících - vysoce evolučně konzervovaný - prolin na předposledním místě jejich AMK sekvence (Lambeir et al., 2003). Peptidová vazba obsahující prolin je vzhledem k jedinečné struktuře prolinu relativně stabilní vůči štěpení

většinou proteáz (Vanhoof et al., 1995). FAP štěpí, přestože s řádově nižší hydrolytickou účinností, většinu přirozených substrátů DPP-IV (Niedermeyer et al., 1998). Snížená exopeptidázová aktivita FAP je zřejmě způsobena záměnou Asp⁶⁶³ za Ala⁶⁵⁷, což vede k celkově slabšímu zápornému náboji v aktivním centru a částečné destabilizaci intermediárního komplexu FAP-substrát (Aertgeerts et al., 2005; Aertgeerts, Ye, Tennant, et al., 2004).

Mezi substráty DPP-IV obsahující X-Pro N-terminální dipeptid patří řada bioaktivních molekul např. neuropeptidů, chemokinů nebo inkrentinů s širokým spektrem biologických účinků uplatňujících se i v procesech nádorové transformace. Účinkem DPP-IV může docházet k jejich degradaci a eliminaci ale též k regulaci jejich funkcí; aktivaci nebo častěji inaktivaci, ke změně jejich receptorové preference, či změně na receptorového antagonistu (Elmansı et al., 2019). DPP-IV může tímto způsobem ovlivňovat procesy spojené s buněčnou proliferací, adhezí, migrací a apoptózou a může modulovat lokální a systémovou imunitní odpověď.

Oproti DPP-IV má FAP rovněž endopeptidázovou/gelatinolytickou aktivitu, která se uplatňuje zejména při procesech remodelace ECM, štěpením kolagenu I, III a IV *in vitro*. Mezi fyziologické substráty endopeptidázové aktivity FAP patří hydrolyticky *in vivo* nebo tepelně *in vitro* denaturovaný kolagen I (Christiansen et al., 2007; Park et al., 1999), $\alpha 2$ antiplazmin (Lee et al., 2006) a fibroblastový růstový faktor-21 (FGF-21) (Dunshee et al., 2016; Zhen et al., 2016).

1.1.1.2 Biologické funkce DPP-IV a FAP nezávislé na hydrolytické aktivitě

DPP-IV může nehydrolyticky interagovat s vazebnými partnery (Kameoka et al., 1993). DPP-IV je vazebným partnerem adenosindeaminázy (ADA), CD45 a plazminogenu 2 a zprostředkovává kontakt buňka-buňka a buňka-ECM, čímž může ovlivňovat procesy nádorové transformace nezávisle na proteolytické funkci (Aytac & Dang, 2004; De Meester et al., 1994).

Podobně jako DPP-IV je i FAP schopen tvořit funkčně významné komplexy s jinými molekulami a přímo ovlivňovat proliferaci a invazi prostřednictvím intracelulárních signálních drah a transkripční regulaci genů souvisejících s buněčným cyklem (např. PI3/Akt a SHH/GLI).

1.1.2 Další "Aktivitou a/nebo strukturou DPP-IV-podobné molekuly" (DASH)

Na základě práce naší laboratoře byla postupně definována skupina "Dipeptidylpeptidáze aktivitou a/nebo strukturou podobných" (Dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologous, DASH) molekul, mezi jejíž členy patří FAP, dipeptidylpeptidáza 6, 7, 8, 9 a 10 (Sedo & Malik, 2001). DASH molekuly ovlivňují procesy nádorové transformace regulací růstových vlastností buněk v nádorovém mikroprostředí především proteolytickou modifikací biologicky aktivních peptidů (Sedo & Malik, 2001; Waumans et al., 2015). Kromě DPP 6 a DPP 10, které nemají DPP-IV-podobnou aktivitu, mají členové této rodiny podobnou substrátovou specifitu a inhibiční profily (Gorrell et al., 2005, Lambeir et al., 2003). V některých případech je aktivita DPP-IV patrně zastupitelná DPP-IV-podobnou aktivitou ostatních členů skupiny DASH. Biologické důsledky přítomnosti spektra DASH molekul v konkrétní tkáni budou záviset na lokální dostupnosti jejich biologických substrátů a vazebných molekulárních partnerů (Busek & Sedo, 2013).

1.2 MOZKOVÉ NÁDORY

Gliální mozkové nádory (gliomy) jsou na základě stupně malignity rozděleny na nízkostupňové (stupeň 1 a 2) a vysokostupňové (stupeň 3 a 4). Nízkostupňové gliomy mohou progradovat do maligní formy, vysokostupňové gliomy jsou charakterizovány vysokou agresivitou a schopností difúzně infiltrovat do přilehlé mozkové tkáně. Glioblastoma multiforme (GBM, gliom stupně 4) je nejčastější a nejvíce agresivní formou vysokostupňového gliomu se špatnou prognózou a mediánem přežití do 15 měsíců ode dne diagnózy (Ostrom et al., 2020).

Mozkové metastázy vznikají z cirkulujících transformovaných buněk, které pocházejí z extrakraniálních tumorů, nejčastěji karcinomu plic, prsu nebo melanomu (Eichler et al., 2011). Oproti difúznímu charakteru výše popisovaného GBM, jsou mozkové metastázy, podobně jako nízkostupňové astrocytomy, dobře ohraničeny (Langley & Fidler, 2013).

1.2.1 Mikroprostředí mozkových nádorů

Nádorové mikroprostředí obsahuje kromě transformovaných buněk i různé typy netransformovaných, stromálních, buněk, mezi které patří pericyty, endotelie, fibroblasty a buňky imunitního systému (Quail & Joyce, 2013). V mikroprostředí mozkových nádorů jsou navíc přítomné rezidentní mikroglie, astrocyty a neurony.

Gliomové buňky vznikají procesem nádorové transformace gliálních buněk v mozku. Přítomnost DPP-IV byla popsána v gliomových buněčných liniích a v primárních gliomových nekmenových kulturách odvozených z GBM (Busek et al., 2008; Busek et al., 2012; Sedo et al., 2001; Sedo et al., 1998; Sedo & Revoltella, 1995). Přítomnost FAP byla pozorována v zejména gliomových buňkách exprimujících DPP-IV (Busek et al., 2008). Podle některých autorů FAP přítomný v gliomových buňkách napomáhá jejich migraci remodelací složek ECM, čímž může stimulovat růst nádoru a podporovat angiogenezi (Mentlein et al., 2011).

Nádorově asociované pericyty se vyskytují ve stěnách mikrocév v blízkosti endotelu. Mezenchymové FAP⁺ buňky s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů byly v GBM lokalizovány v blízkosti dysplastických cév (Busek et al., 2016) a parakrinně stimulovaly chemotaxi endotelových buněk, angiogenní pučení a zvýšenou migraci a růst transformovaných buněk *in vitro* (Balaziová et al., 2021).

Nádorově asociované fibroblasty (cancer associated fibroblasts, CAF) hrají důležitou roli v procesech tumorigeneze (Hanahan & Weinberg, 2011). CAF mohou vznikat z tkáňových fibroblastů nebo z mezenchymových kmenových buněk (Quante et al., 2011). Naše nepublikované výsledky i práce jiných autorů potvrzují přítomnost mezenchymových buněk s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů (CAF) v GBM (Jain et al., 2021). Role CAF je důležitá i v degradaci ECM. Vzhledem k tomu, že CAF odvozené z kožních fibroblastů stimulovaly proliferaci gliomových buněk *in vitro* (Trylcová et al., 2015), lze v procesech gliomogeneze předpokládat jejich protumorigenní funkci.

2 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Složení spektra mnohočetných forem DPP-IV a FAP může podmiňovat jejich biochemický potenciál (např. kinetické parametry, preference receptorových subtypů jimi procesovaných biologicky aktivních substrátů) s možnými biologickými důsledky. Předchozí výsledky naší laboratoře ukazují na odlišný expresní vzorec obou molekul ve tkáních glioblastomu a v nenádorové mozkové tkáni. Buněčný zdroj DPP-IV a FAP v tkáni gliálních mozkových nádorů a mozkových metastáz dosud není znám. Na základě našich i dalších literárních výsledků předpokládáme existenci mnohočetných forem DPP-IV a FAP specificky exprimovaných v různých buněčných typech (v transformovaných a stromálních buňkách) a pod vlivem jejich kontextu v nádorovém mikroprostředí gliálních mozkových nádorů a mozkových metastáz.

CÍLE PRÁCE:

1. Popsat expresní vzorec mnohočetných forem DPP-IV a FAP v tkáních gliálních nízko- a vysokostupňových mozkových nádorů a mozkových metastáz v porovnání s nenádorovou mozkovou tkání.
2. Přiblížit molekulární podstatu rozdílnosti mnohočetných forem DPP-IV a FAP v GBM provedením deglykosylačních studií.
3. Identifikovat buněčný zdroj DPP-IV a FAP v tkáních gliálních nádorů a mozkových metastáz.
4. Ověřit regulaci exprese DPP-IV a FAP a jejich molekulových forem v buněčných typech přítomných v nádorovém mikroprostředí gliálních mozkových nádorů a mozkových metastáz *in vitro*.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

3.1.1 Gliální mozkové nádory a mozkové metastázy

Tkáňový materiál byl získán v rámci několika grantových projektů ve spolupráci Laboratoře biologie nádorové buňky (LBNB) s klinickými pracovišti – Neurochirurgickým oddělením Nemocnice Na Homolce a s Neurochirurgickou a neuroonkologickou klinikou 1. LF UK a ÚVN na základě souhlasu příslušných etických komisí.

3.1.2 Permanentní buněčné linie, primární buněčné kultury

Permanentní gliomové buněčné linie U118, U138, U87, T98G, U251 byly odvozeny z GBM, gliomů 4. stupně malignity dle WHO (Cell Line Services, CLS, Německo a American Type Culture Collection, ATCC, LGC Standards,

Velká Británie). Gliomová buněčná linie U373 byla odvozena z gliomu 3. stupně malignity dle WHO (ATCC, LGC Standards). Buňky byly kultivovány dle doporučení výrobce Komerčně dostupná primární pericytární buněčná kultura (Human Brain Vascular Pericytes, HBVP) byla odvozena ze zdravé fetální mozkové tkáně. HBVP kultura byla kultivována dle doporučení výrobce. Z tkání GBM byly odvozeny gliomové nekmenové kultury (nonGSC) (Stremenova et al., 2009), gliomové kmenové kultury (glioma stem cells, GSC) (Sana et al., 2018), mezenchymové FAP⁺ kultury s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů (pFAP) (Balaziová et al., 2021) a mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů (CAF-GBM) (Trylcová et al., 2015). Z mozkových metastáz byly odvozeny mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů (CAF-MM). Z nenádorové mozkové tkáně byly odvozeny mezenchymové kultury s charakteristikami fibroblastů (KoF) (Trylcová et al., 2015). Všechny postupy byly upraveny dle předchozích zkušeností a dle protokolů Freshney R.I. (2005).

3.2 BUNĚČNÉ MODELY KOMPLEXITY NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ

3.2.1 Příprava a použití kondicionovaných médií

Buňky U373 a U87, nebo HBVP byly nasazeny do 92mm Petriho misek (Nunc, USA) potažených PolyLys v koncentraci $7,5 \times 10^3$ buněk/cm² a byly kultivovány v kompletní DMEM, resp. v kompletním PM. Po 24 hodinách a oplachu fosfátovým pufrům (PBS, 137 mM NaCl, 4 mM Na₂HPO₄, 2,68 mM KCl, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4) byla provedena výměna média za čisté, bezsérové PM. Po 72 hodinách byla kondicionovaná média (KM) odpipetována, centrifugována (4 minuty, 4 °C, 225 g), sterilně filtrována (Millex GV 0,22 µm, Millipore, Irsko) a uložena do -80 °C. Jako kontrola bylo použité PM bez expozice buňkám.

Použití KM: $7,5 \times 10^3$ buněk/cm² buněk U373, U87 nebo HBVP bylo nasazeno do 60mm Petriho misek (Nunc, USA) potažených PolyLys a 24 hodin kultivováno v kompletním DMEM, resp. PM. Po odsátí média a oplachu PBS bylo k buňkám přidáno KM. Po 72 hodinách byl proveden sběr pomocí PBS/EDTA (0,02% v/v, pH 7,4) a buněčné pelety byly uloženy do -80 °C pro další analýzu. Buňky byly kultivovány v kvadruplikátech.

3.2.2 Přímá kokultivace gliomových buněk U373 a nenádorových pericytů HBVP

3.2.2.1 Přímá kokultivace HBVP–Tagit a U373–pEGFP

Buňky HBVP byly značeny pomocí fluorescenčního barviva Tagit Violet Proliferation and Cell Tracking (Bio Legend, USA) dle doporučení výrobce. HBVP–Tagit v kompletním PM byly dle Tabulky 1 nasazeny do 92mm Petriho misek potažených PolyLys. Po devadesáti minutové inkubaci v termostatu byly k buňkám HBVP–Tagit dosazeny transgenní buňky U373–pEGFP v poměru 1:1. Směsné kultury byly sbírány v časech 24, 48, 72 hodin od nasazení, separovány na průtokovém cytometru s třídičem buněk (Cell Sorter MA900, Sony, Japonsko) na jednotlivé populace a analyzovány. Jako kontroly byly použity buňky HBVP–Tagit a U373–pEGFP, které byly kultivovány samostatně v kompletním PM na PolyLys potažených 92mm Petriho miskách.

Pro stanovení koncentrace FAP a TGF-β1 v médiu kokultivovaných buněk byla nasazena kokultura HBVP–Tagit a U373–pEGFP s příslušnými kontrolami. V intervalech 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 a 72 hodin bylo odebíráno po 500 µl média. Odebraný alikvot byl centrifugován (6 minut, 4°C, 225 g), přenesen do 1,5 ml mikrozkuhavky (low protein binding microcentrifuge tubes, Thermo Scientific, USA) a zamražen při -80°C. Objem odebraného alikvotu byl nahrazen 500 µl kompletního PM.

3.2.2.2 Separace HBVP–Tagit a U373–pEGFP z kokultury

Směsné buněčné kultury byly 2x opláchnuty PBS pH 7,4 a inkubovány s 0,5 ml trypsinu (0,25%, Biochrom, Německo). Účinek trypsinu byl zastaven DMEM bez přísady L–glutaminu a fenolové červeně (Merck, ČR), s přísadou 5% FCS a 1% EDTA. Po stanovení počtu buněk (Coulter Counter Z2, Beckman Coulter, Německo) byla směsná kultura separována na průtokovém cytometru s třídičem buněk (Cell Sorter MA900, Sony, Japonsko) s třídicí tryskou o velikosti 130 µm (LE-C3213, Sony, Japonsko). Buňky HBVP–Tagit a U373–pEGFP byly tříděny do 15ml zkumavek (Thermo Scientific, USA) s předpipetovanými 8 ml kompletního PM.

3.2.3 Stimulace gliomových a stromálních buněk rekombinantním TGF-β1

Transformované gliální buňky (permanentní, primární nonGSC), HBVP a mezenchymové FAP⁺ kultury s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů (pFAP) a mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů (CAF-GBM a CAF-MM) byly nasazeny do 92mm Petriho misek (pro HBVP a pFAP potažených PolyLys) v koncentraci $7,5 \times 10^3$ buněk/cm², do příslušných kompletních médií DMEM, resp. PM. Buňkám bylo po 72 hodinách a oplachu PBS vyměněno kompletní médium obsahující rekombinantní TGF-β1 (Preprotech, ČR) v koncentraci 2 ng/ml (Krepela et al., 2021). S kontrolními buňkami bylo zacházeno stejným způsobem, bez přísady TGF-β1.

3.3 CHARAKTERIZACE MNOHOČETNÝCH FOREM DPP-IV A FAP

3.3.1 Biochemické stanovení hydrolytické aktivity DPP-IV a FAP

Hydrolytická aktivita DPP-IV a FAP byla měřena v 96 jamkových deskách (Thermo Scientific, USA) při 37 °C, kontinuální fluorimetrickou metodou při excitační vlnové délce 380 nm a emisní vlnové délce 460 nm. DPP-IV-podobná aktivita byla stanovena pomocí fluorogenního substrátu glycyl-L-prolyl-7-aminomethylkumarinu (H-Gly-Pro-AMC, Bachem, Německo). Aktivita DPP-IV byla měřena v přítomnosti specifického inhibitoru DPP-IV, Sitagliptinu (BioVision, USA) Aktivita DPP-IV odpovídá reziduální DPP-IV-podobné aktivitě po inhibici Sitagliptinem vztažené na jeden miligram celkového proteinu.

Exopeptidázová aktivita FAP byla měřena v podobném uspořádání jako DPP-IV s následujícími modifikacemi. Aktivita FAP byla stanovena fluorogenního substrátu NS604 (získán od RNDr. Pavla Šáchy PhD, z Ústavu organické chemie a biochemie, ČR. Specifita substrátu NS604 byla ověřena pomocí FAP-specifického inhibitoru DFAP (získán od prof. Dr. Ingrid DeMeester z Laboratoře lékařské biochemie na Univerzitě v Antverpách, Belgie).

3.3.2 Detekce hydrolyticky aktivních MW a pI forem DPP-IV a FAP

Hydrolyticky aktivní formy DPP-IV a FAP byly detekovány v gelech po elektroforetické separaci SDS PAGE (MW formy) a v gelech polymerovaných na plastickém nosiči s imobilizovaným pH gradientem 3-10 (ReadyStrip™ IPG Strips, BioRad, Velká Británie) po izoelektrické fokusaci (pI formy), metodou stanovení aktivity enzymu v gelu.

3.3.3 Imunochemické metody

3.3.3.1 Enzyme-linked immunoassay (ELISA) pro DPP-IV, FAP a TGF-β1

Koncentrace DPP-IV, FAP a TGF-β1 byla měřena s využitím komerčních sad DuoSet ELISA: DPP-IV/CD26 DY 1180, FAP DY 3715 a TGF-β1 DY 240 (R&D Systems, Německo) dle doporučení výrobce.

3.3.3.2 Imunodetekce DPP-IV a FAP po western blotu

3.3.3.2.1 1D elektroforéza

Přítomnost MW forem DPP-IV a FAP byla hodnocena po elektroforetické separaci proteinů s navazující imunodetekcí. V průběhu dizertační práce byla zavedena Stain-Free metoda, využívající k normalizaci detekovaných hodnot proteinu zájmu digitální subtrakcí denzitometricky zjištěného pozadí celkového proteinu v nasazeném vzorku (Ladner et al., 2004). Po ukončení elektroforézy byl proveden přenos proteinů na PVDF membránu (0,45 μm, Merck, ČR) při konstantním napětí 10 V po dobu 60 minut (SemiDry System, BioRad). Primární protilátky proti lidským DPP-IV a FAP antiDPP-IV E19 nebo antiFAP D8 (obě Applied DNA Sciences, USA) byly ředěny v EBBB 1000x, resp. 5000x a inkubovány přes noc při 4°C. Poté byly membrány 30 minut oplachovány v TTBS a inkubovány s HRP-konjugovanou sekundární potkaní protilátkou ředěnou 20000 x v EBBB. Po dalším 30 minutovém oplachu byla aplikována Luminata Forte (Merck, ČR) a chemiluminiscenční signál byl hodnocen na přístroji ChemiDoc v režimu optimální automatické expozice. Detekovaný signál DPP-IV nebo FAP byl hodnocen a normalizován pomocí ImageLab Software (BioRad) podle doporučení výrobce.

3.3.3.2.2 2D elektroforéza

Přítomnost pI forem DPP-IV a FAP byla hodnocena po izoelektrické fokusaci (IEF) a elektroforetické separaci proteinů dle doporučení výrobce (BioRad) s navazující imunodetekcí.

3.3.4 Deglykosylace

Deglykosylace peptidovou N-glykosidázou F (PNGáza F, E.C. 3.5.1.52) byla provedena dle doporučení výrobce (Sigma Aldrich, USA).

4.1 MNOHOČETNÉ FORMY DPP-IV A FAP V TKÁNÍCH GLIÁLNIÍCH MOZKOVÝCH NÁDORŮ A MOZKOVÝCH METASTÁZ

Mnohočetné formy DPP-IV a FAP byly v tkáních gliálních mozkových nádorů a mozkových metastáz identifikovány na základě jejich elektroforetických pohyblivostí (MW formy) a izoelektrických bodů (pI formy).

DPP-IV byla ve vysokostupňových gliomech přítomna ve dvou až třech imunopozitivních, hydrolyticky aktivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí odpovídající molekulové hmotnosti MW 140-160 kDa. V bioptickém materiálu, kde byla nalezena pouze jedna imunopozitivní MW forma DPP-IV, nebyla pozorována žádná hydrolyticky aktivní MW forma DPP-IV (Matrasova et al., 2017).

FAP byl ve vysokostupňových gliomech přítomný v jedné imunopozitivní MW formě s elektroforetickou pohyblivostí odpovídající MW 120-140 kDa. Přítomnost hydrolyticky aktivních forem FAP nebyla stanovována (Matrasova et al., 2017).

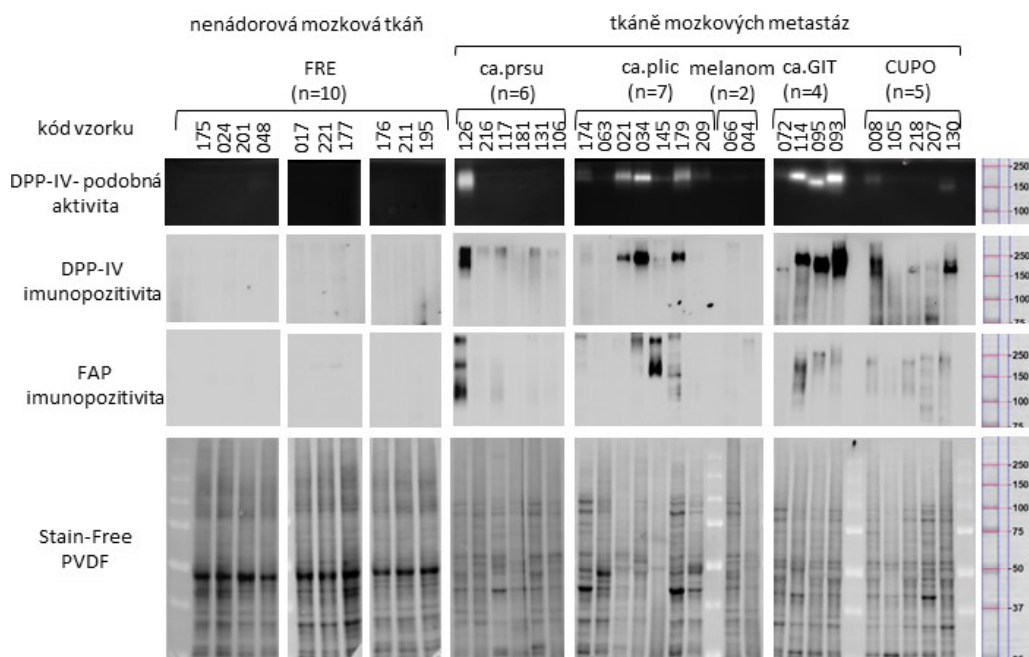
DPP-IV a FAP nebyly v gliomech stupně 2 a ve FRE přítomny v detekovatelných množstvích (Busek et al., 2016; Matrasova et al., 2017; Stremenova et al., 2007).

DPP-IV byla v tkáních mozkových metastáz přítomna v jedné až dvou imunopozitivních, hydrolyticky aktivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí odpovídající MW nad 200 kDa (obrázek č. 1).

FAP byl v tkáních mozkových metastáz přítomen v jedné až třech imunopozitivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí MW 100 kDa, 150 kDa a nad 200 kDa.

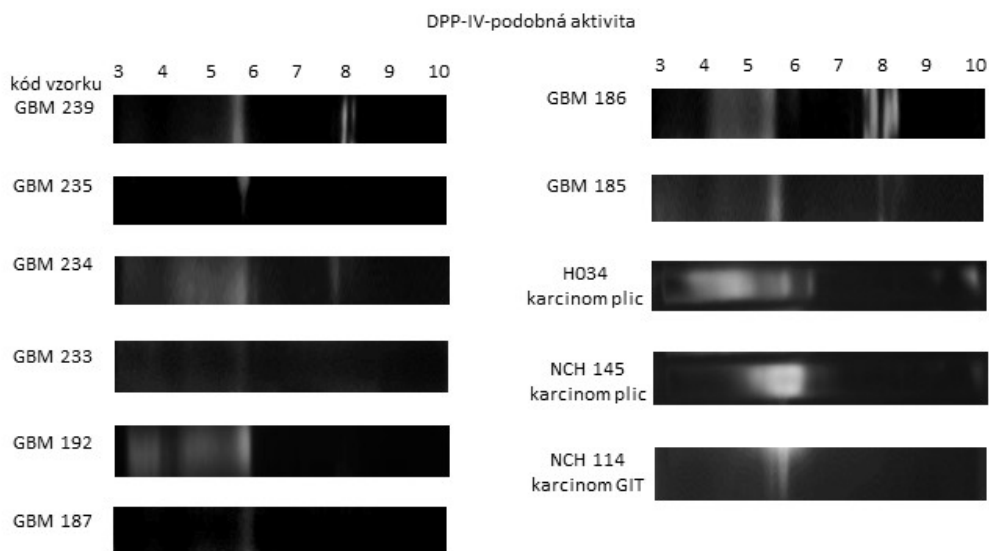
Přítomnost DPP-IV a FAP ve FRE nebyla měřitelná (obrázek č. 1).

Obrázek 1. MW formy DPP-IV a FAP v tkáních mozkových metastáz a nenádorové mozkové tkáni. DPP-IV-podobná aktivita byla detekována po elektroforetické separaci substrátem H-Gly-Pro-AMC. Imunopozitivní MW formy byly detekovány po 1D WB protilátkami antiDPP-IV E19 a antiFAP D8. Signál DPP-IV a FAP byl normalizován na celkový protein ze Stain-Free PVDF membrány. ca.prsu: karcinom prsu, ca.plic: karcinom plic, ca.GIT: karcinom gastrointestinálního traktu, CUPO: karcinomy neznámého původu, FRE: farmakorezistentní epilepsie.



V tkáních GBM a mozkových metastáz bylo po izoelektrické fokusaci pozorováno několik forem s pI 4,0-5,0, pI 5,8 a pI 8,0 nesoucích DPP-IV-podobnou aktivitu (obrázek č.2).

Obrázek 2. pl formy s DPP-IV-podobnou aktivitou v tkáních GBM a mozkových metastáz byly detekovány po izoelektrické fokusaci substrátem H-Gly-Pro-AMC. GBM: glioblastoma multiforme.

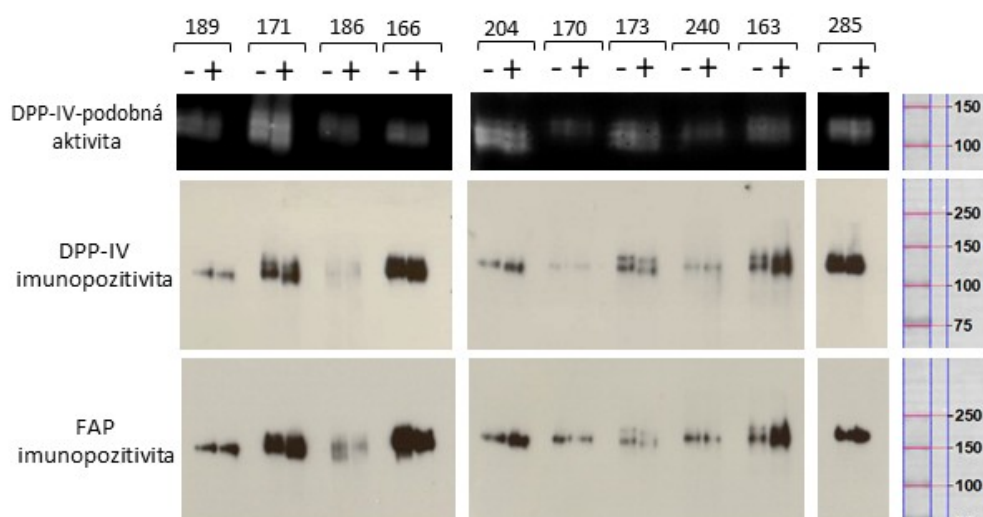


4.2 DEGLYKOSYLACE MNOHOČETNÝCH FOREM DPP-IV A FAP PŘÍTOMNÝCH V GBM

Pro přiblížení molekulární podstaty mnohočetných forem DPP-IV a FAP byla provedena celková deglykosylace DPP-IV a FAP přítomných v tkáních GBM. DPP-IV i FAP jsou glykoproteiny, jejichž sacharidová složka je vázaná N-glykosidovou vazbou. Takto vázané sacharidové řetězce mohou být odštěpovány peptidovou N-glykosidázou F (PNGáza F, EC 3.5.1.52).

Naše výsledky DPP-IV a FAP nepotvrdily vliv glykosylace na vznik mnohočetných forem DPP-IV a FAP v gliomových buněčných liniích (Matrasova et al., 2017). Expozice DPP-IV a FAP v tkáňových homogenátech GBM PNGáze F nevedla ke změně počtu pozorovaných imunopozitivních MW forem ani k poklesu hydrolytické aktivity DPP-IV. Účinkem PNGázy F se zvýšila elektroforetická pohyblivost přítomných MW forem DPP-IV a FAP v porovnání s kontrolními, PNGáze F neexponovanými vzorky (obrázek č. 3).

Obrázek 3. Deglykosylace DPP-IV a FAP přítomných v tkáních GBM. DPP-IV-podobná aktivita byla detekována po elektroforetické separaci substrátem H-Gly-Pro-AMC. Imunopozitivní MW formy DPP-IV a FAP byly detekovány po 1D WB protilátkami antiDPP-IV E19, antiFAP D8. (+): vzorek exponovaný PNGáze F, (-): vzorek bez expozice PNGáze F. GBM: glioblastoma multiforme, PNGáza F: peptidová N glykosidáza F.



4.3 IDENTIFIKACE BUNĚČNÉHO ZDROJE DPP-IV A FAP V TKÁNÍCH GLIÁLNIÍCH MOZKOVÝCH NÁDORŮ A MOZKOVÝCH METASTÁZ

K identifikaci buněčného zdroje jednotlivých mnohočetných forem DPP-IV-podobné aktivity byly provedeny experimenty s buněčnými populacemi přítomnými v mikroprostředí GBM a mozkových metastáz.

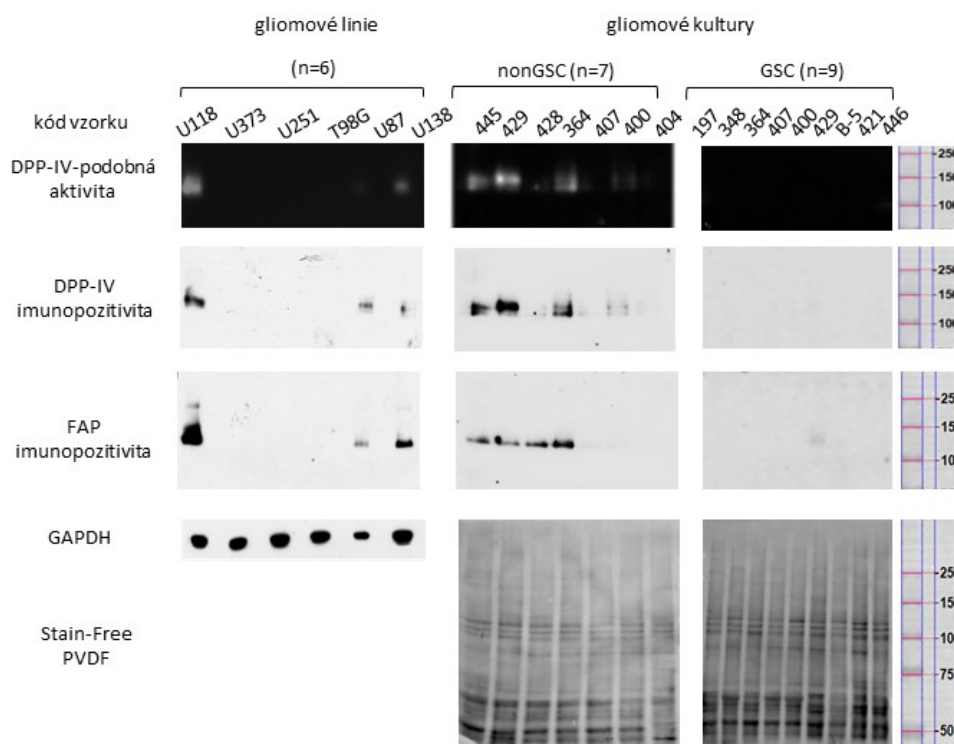
Mnohočetné formy DPP-IV a FAP v transformovaných gliálních buňkách

DPP-IV byla v gliomových liniích a nonGSC kulturách přítomna v jedné až dvou imunopozitivních, hydrolyticky aktivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí v oblasti MW 140 kDa (obrázek č. 4). V gliomových buněčných liniích byly přítomny dvě až tři hydrolyticky aktivní, imunopozitivní formy DPP-IV s pI v oblasti 5,8 (Matrasova et al., 2017).

FAP byl v gliomových liniích a nonGSC kulturách pozorován v jedné až dvou imunopozitivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí v oblasti MW 140 kDa (obrázek č. 4). V gliomových buněčných liniích byly přítomny dvě až tři imunopozitivní formy FAP s pI 5,8-6,2 a imunopozitivita FAP byla pozorována i v oblasti kyselého pH.

Přítomnost DPP-IV a FAP v GSC nebyla měřitelná (obrázek č. 4).

Obrázek 4. MW formy DPP-IV a FAP v gliomových buňkách. DPP-IV-podobná aktivita byla detekována po elektroforetické separaci substrátem H-Gly-Pro-AMC. Imunopozitivní MW formy byly detekovány po 1D WB protilátkami antiDPP-IV E19 a antiFAP D8. Signál DPP-IV a FAP byl normalizován na expresi glycerinaldehydfosfátdehydrogenázy nebo na celkový protein ze Stain-Free PVDF membrány. nonGSC: gliomové nekmenové kultury, GSC gliomové kmenové kultury.



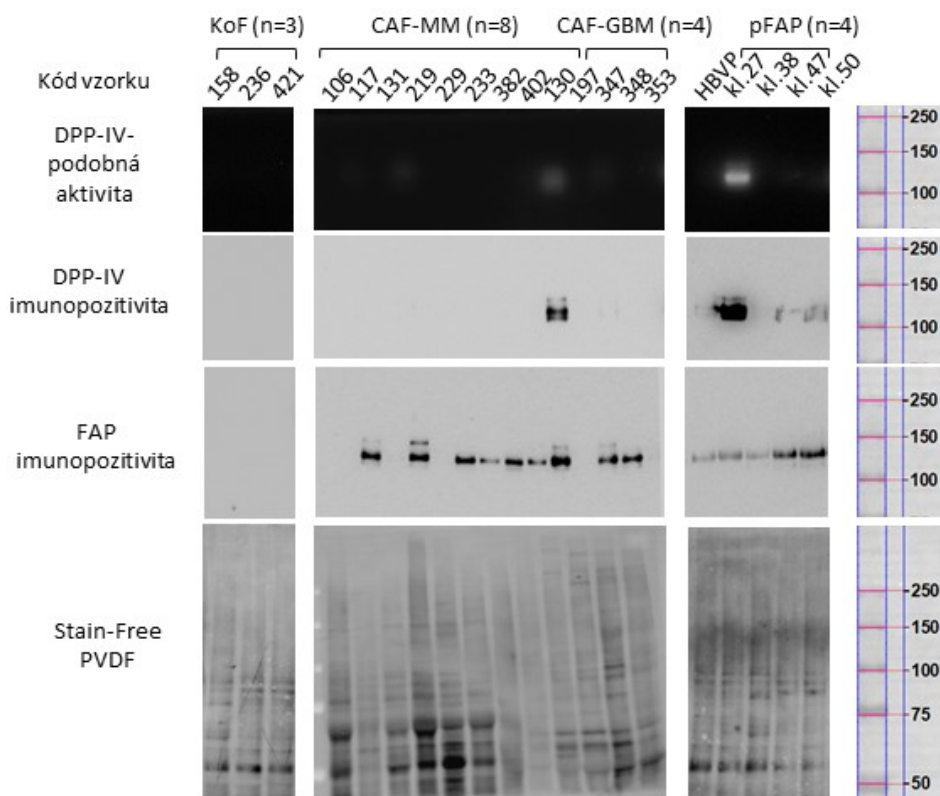
Mnohočetné formy DPP-IV a FAP ve stromálních buňkách přítomných v tkáních GBM a mozkových metastáz

Mikroprostředí mozkových nádorů je tvořeno nejen transformovanými ale i stromálními buňkami, proto byla přítomnost mnohočetných forem DPP-IV a FAP hodnocena v mezenchymových FAP⁺ kulturách s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů pFAP, v mezenchymových kulturách s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů CAF-GBM a CAF-MM, v nenádorových pericytech HBVP a v nenádorových mezenchymových kulturách s charakteristikami fibroblastů KoF.

DPP-IV byla v CAF-MM 219 a pFAP kl.27 přítomna ve dvou imunopozitivních, hydrolyticky aktivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí odpovídající MW 140 kDa. V ostatních kulturách stromálních buněk a v nenádorových buňkách KoF a HBVP nebyla DPP-IV detekovatelná (obrázek č. 5).

FAP byl v CAF-MM, CAF-GBM a pFAP přítomný v jedné až dvou imunopozitivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí odpovídající MW 120-140 kDa. V nenádorových buňkách KoF nebyla přítomnost FAP detekovatelná (obrázek č. 5).

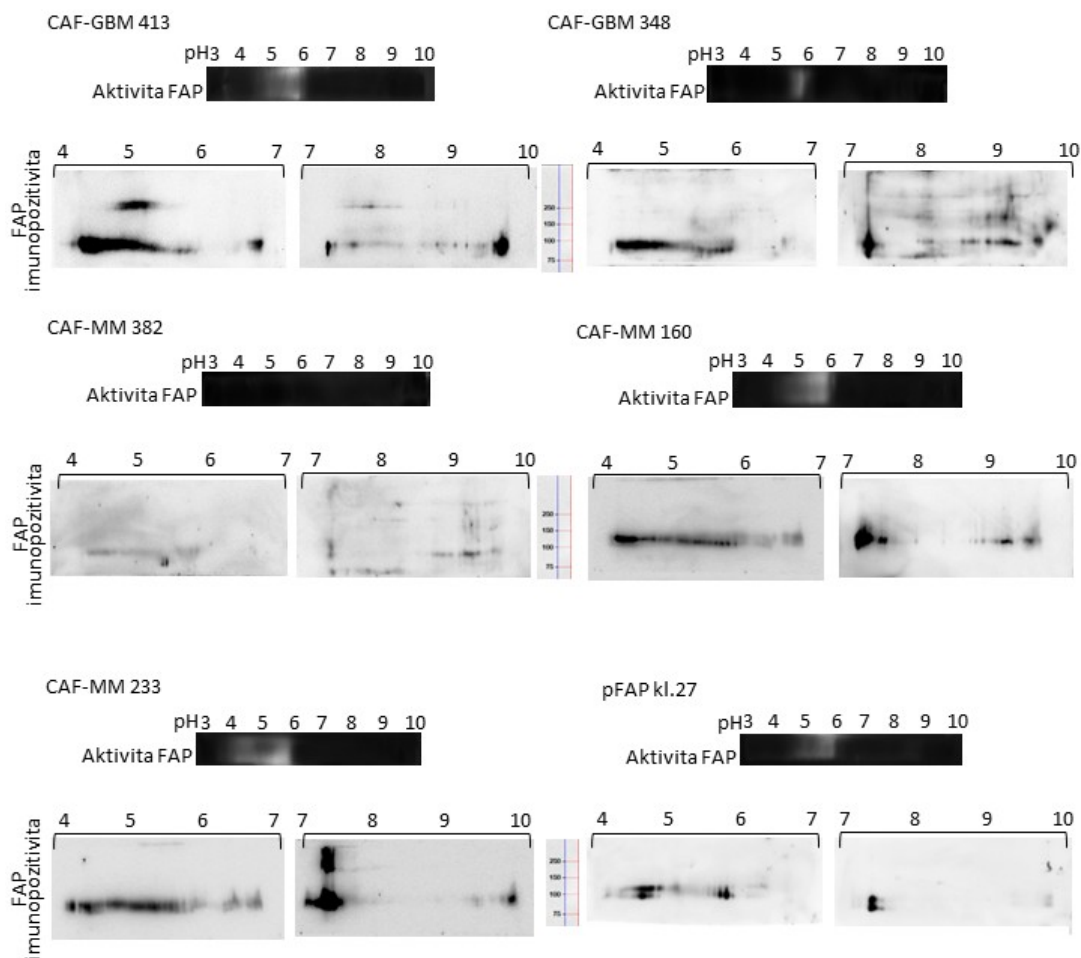
Obrázek 5. MW formy DPP-IV a FAP ve stromálních buňkách přítomných v tkáních GBM a mozkových metastáz a v nenádorových buňkách. DPP-IV-podobná aktivita byla detekována po elektroforetické separaci substrátem H-Gly-Pro-AMC. Imunopozitivní formy DPP-IV a FAP byly detekovány po 1D WB protilátkami antiDPP-IV E19, antiFAP D8. Signál DPP-IV a FAP byl normalizován na celkový protein ze Stain-Free PVDF membrány. KoF: mezenchymové kultury s charakteristikami fibroblastů odvozené z nenádorové mozkové tkáně, CAF-GBM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání GBM, CAF-MM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání mozkových metastáz, HBVP: primární pericytární buněčná kultura odvozená z nenádorové mozkové tkáně, pFAP: mezenchymové FAP⁺ kultury s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů odvozené z tkání GBM.



Vzhledem k tomu, že v CAF-GBM, CAF-MM a pFAP byla prokázána velmi nízká koncentrace proteinu DPP-IV, pI formy DPP-IV nebyly dále analyzovány.

Ve stromálních buňkách CAF-MM, CAF-GBM a pFAP byly pozorovány dvě až tři imunopozitivní, hydrolyticky aktivní formy FAP s pI 5,5-6,0. Imunopozitivita FAP s pI 4,0-5,0 byla detekována v oblasti kyselého pH fokusovaného gelu. Ve stromálních buňkách byly přítomny i formy FAP s pI 7,0-8,0 a pI 9,0-9,5. Elektroforetická mobilita pI forem FAP odpovídala MW monomeru okolo 100 kDa (obrázek č. 6).

Obrázek 6. pl formy FAP ve stromálních buňkách přítomných v tkáních GBM a mozkových metastáz. Hydrolyticky aktivní pl formy byly detekovány po izoelektrické fokusaci FAP-specifickým substrátem NS604. Imunopozitivní pl formy FAP byly detekovány po 2D WB protilátkou antiFAP D8. CAF-GBM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání GBM, CAF-MM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání mozkových metastáz, pFAP: mezenchymové FAP⁺ kultury s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů odvozené z tkání GBM.



4.4 INDUCIBILITA EXPRESE DPP-IV A FAP V BUNĚČNÝCH TYPECH PŘÍTOMNÝCH V NÁDOROVÉM MIKROPROSTŘEDÍ GLIÁLNIÍCH MOZKOVÝCH NÁDORŮ A MOZKOVÝCH METASTÁZ *IN VITRO*

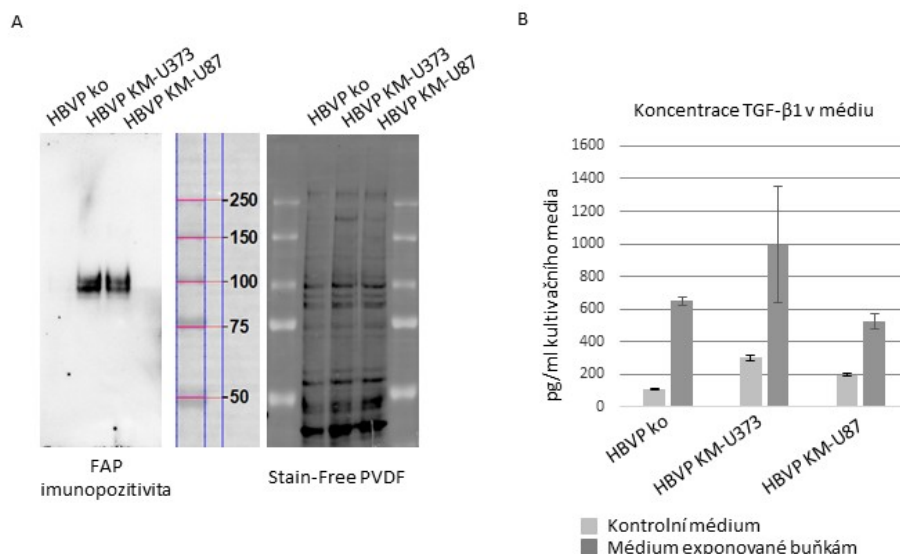
Naše výsledky prokázaly regulaci exprese FAP v různých typech buněk přítomných v mikroprostředí GBM účinkem TGF- β 1 (Krepela et al., 2021). Pro přiblížení mechanismů regulace exprese DPP-IV a FAP v mikroprostředí GBM byly provedeny experimenty využívající expozici nenádorových pericytů HBVP médiím kondicionovaným transformovanými gliálními buňkami a vice versa, přímou kokultivaci nenádorových buněk HBVP a gliomových buněk U373 a stimulaci gliomových a stromálních buněk přítomných v tkáních gliálních mozkových nádorů a mozkových metastáz rekombinantním TGF- β 1.

Expresa DPP-IV a FAP v nenádorových pericytech HBVP po expozici médiu kondicionovaném gliomovými buňkami U373 nebo U87 a vice versa.

V buňkách HBVP exponovaných KM-U373 nebo KM-U87 byly přítomny dvě imunopozitivní MW formy FAP s elektroforetickou pohyblivostí odpovídající MW 100 kDa (obrázek č. 7A). V kulturačních médiích HBVP buněk dochází k dalšímu zvýšení koncentrace TGF- β 1 (obrázek č. 7B).

Expresa a enzymová aktivita FAP a DPP-IV v gliomových buňkách U87 a U373 se po kultivaci v médiích kondicionovaných nenádorovými pericyty HBVP (KM-HBVP) statisticky významně neměnily (data neuvedena).

Obrázek 7. Vliv médií kondiciovaných gliomovými buňkami U373 a U87 na expresi FAP v nenádorových pericytech HBVP. (A) Imunopozitivní MW formy FAP byly detekovány po 1D WB protilátkou antiFAP D8. (B) Koncentrace TGF- β 1 byla stanovena metodou ELISA. Data představují průměr ze tří biologických vzorků měřených v technických triplicátech \pm SEM. KM-U87: média kondiciovaná gliomovými buňkami, KM-U373: média kondiciovaná gliomovými buňkami U373, HBVP: primární pericytární buněčná kultura odvozená z nenádorové mozkové tkáně, HBVP ko: buňky neexponované KM.



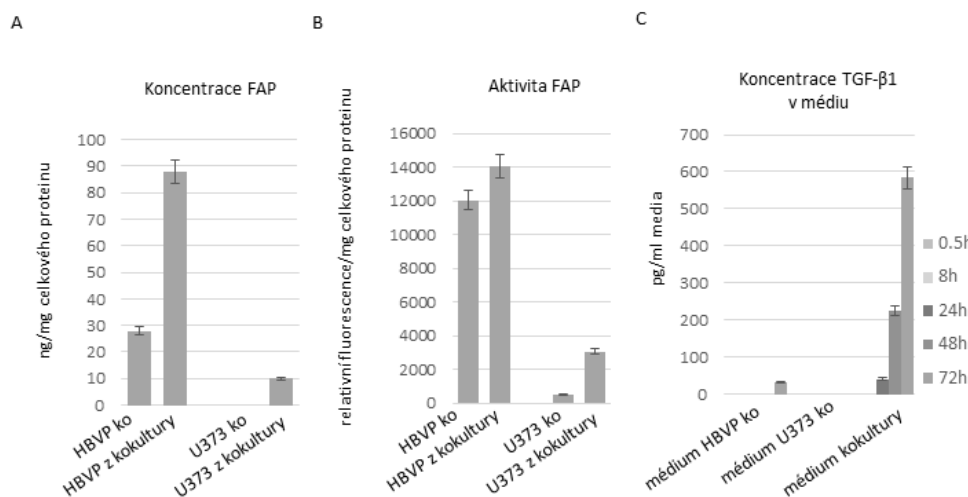
Expres DPP-IV a FAP v gliomových buňkách U373 a nenádorových pericytech HBVP po přímé kokultivaci

Pro analýzy byly jednotlivé populace separovány průtokovým cytometrem s třídičem buněk na U373-pEGFP s 79,9% čistotou a HBVP-Tagit s 87,6% čistotou. Oproti buňkám U373-pEGFP kultivovaným samostatně byl pozorován jejich statisticky významně rychlejší růst v kokultuře s HBVP-Tagit.

V podmínkách přímé kokultivace byla pozorována zvýšená aktivita a exprese FAP v nenádorových pericytech HBVP-Tagit i v gliomových buňkách. Koncentrace FAP v kokultivovaných HBVP-Tagit vzrostla 3,5x ve srovnání s koncentrací v HBVP-Tagit kultivovanými samostatně (obrázek č. 8A), enzymová aktivita FAP vzrostla 1,3x (obrázek č. 8B). Koncentrace FAP v kokultivovaných U373-pEGFP vzrostla 10x ve srovnání s koncentrací v U373-pEGFP kultivovanými samostatně (obrázek č. 8A), enzymová aktivita FAP vzrostla 4,2x (obrázek č. 8B). Přítomnost FAP v médiu kokultury nebyla detekovatelná (data neuvedena).

V médiu kokultury dochází v čase ke zvýšení koncentrace TGF- β 1 (obrázek č. 8C).

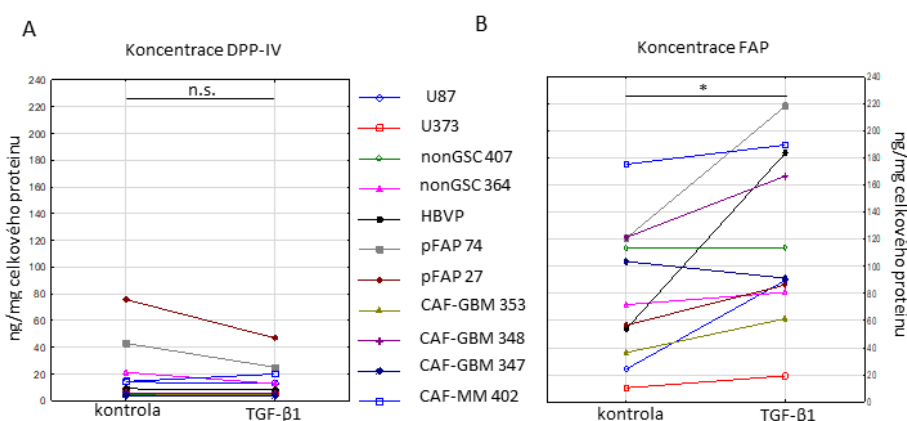
Obrázek 8. Vliv přímé kokultivace gliomových buněk U373-pEGFP a nenádorových pericytů HBVP-Tagit na expresi FAP. (A) Koncentrace FAP byla stanovena metodou ELISA. (B) Enzymová aktivita FAP byla stanovena biochemicky. (C) Koncentrace TGF- β 1 byla stanovena metodou ELISA. Pokud není uvedeno jinak, data byla získána v 72. hodině od nasazení kokultury. ko: buňky kultivované samostatně. Data představují průměr ze dvou biologických vzorků měřených v technických triplicátech \pm SEM.



Vliv TGF-β1 na expresi DPP-IV a FAP v transformovaných gliálních a stromálních buňkách přítomných v GBM a mozkových metastázách

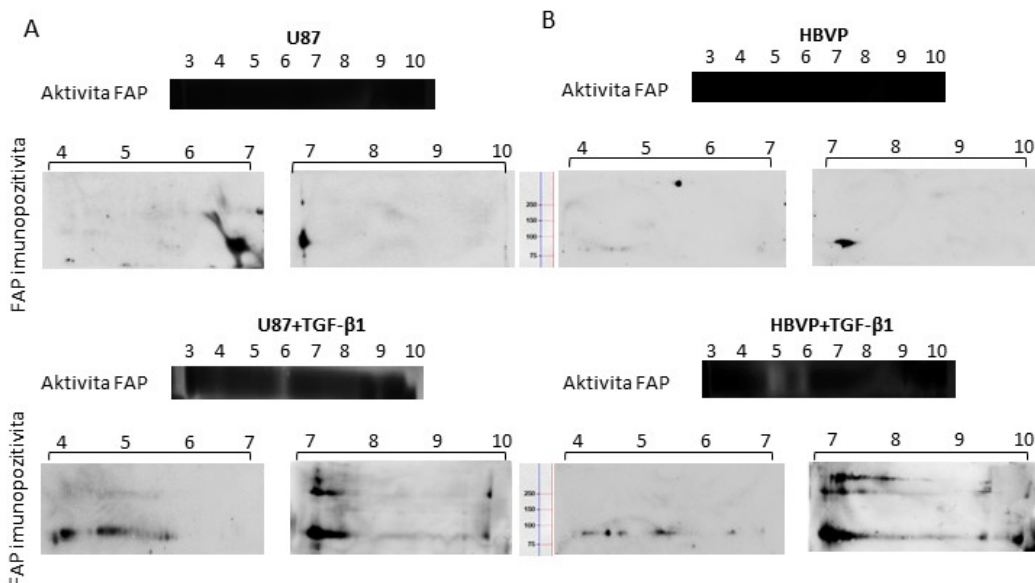
Pro expozici rekombinantnímu TGF-β1 byly použity gliomové buněčné linie, nonGSC kultury, nenádorové pericyty HBVP, mezenchymové FAP⁺ kultury s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů pFAP a mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů CAF-GBM a CAF-MM. Ve studovaných buňkách byl, na rozdíl od DPP-IV, pozorován statisticky významný nárůst koncentrace proteinu FAP vlivem TGF-β1 (obrázek č. 9A a B).

Obrázek 9. Vliv rekombinantního TGF-β1 na expresi DPP-IV a FAP v gliomových a stromálních buňkách přítomných v tkáni mozkových nádorů. Koncentrace (A) DPP-IV a (B) FAP byly stanoveny metodou ELISA. kontrola: bez expozice TGF-β1, TGF-β1: exponovaný vzorek, U87: gliomová buněčná linie, U373: gliomová buněčná linie, nonGSC: gliomové nekmenové kultury, HBVP: primární pericytární buněčná kultura odvozená z nenádorové mozkové tkáně, pFAP: mezenchymová FAP⁺ kultura odvozená z tkáni GBM. CAF-GBM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkáni GBM, CAF-MM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkáni mozkových metastáz. Wilcoxonův párový test, * $p < 0,01$, n.s.: bez statistické významnosti.



V gliomových buňkách U87 i v nenádorových pericytech vedla expozice TGF-β1 k expresi hydrolyticky aktivní formy FAP s pI 5,0-6,0, nepřítomné v nestimulovaných buňkách. Imunopozitivní formy FAP s pI 5,0-6,0, pI 7,0-8,0 a pI 9,0-9,5 byly pozorovány po indukci TGF-β1, ve srovnání s neexponovanými buňkami. Elektroforetická mobilita imunopozitivních pI forem FAP odpovídala MW 100 kDa (obrázek č. 10).

Obrázek 10. pI formy FAP v gliomových buňkách U87 a nenádorových pericytech HBVP exponovaných rekombinantnímu TGF-β1. Hydrolyticky aktivní pI formy FAP byly detekovány substrátem NS604. Imunopozitivní pI formy FAP byly detekovány protilátkou antiFAP D8. (A) U87: bez přidavku TGF-β1, U87 + TGF-β1: s přidavkem TGF-β1. (B) HBVP: bez přidavku TGF-β1, HBVP + TGF-β1: s přidavkem TGF-β1. HBVP primární pericytární kultura odvozená z nenádorové mozkové tkáně, U87: gliomová buněčná linie.



Existence mnohočetných forem DPP-IV a FAP byla popsána v bioptickém materiálu nádorových tkání, orgánů a buněčných populací včetně transformovaných astrocytů (Medeiros Mdos et al., 1991; Sedo et al., 2001). Cílem předkládané dizertační práce byl popis a analýza spektra mnohočetných forem DPP-IV a FAP přítomných v tkáních gliomů a mozkových metastáz.

Naše předchozí výsledky prokázaly významně vyšší hydrolytickou aktivitu DPP-IV, zejména její membránové frakce, koncentraci proteinu a relativní expresi transkriptu DPP-IV ve vysokostupňových gliomech oproti nenádorové tkáni mozku (Matrasova et al., 2017; Stremenova et al., 2007). Vyšší koncentrace proteinu a relativní exprese transkriptu FAP byla pozorována v tkáních vysokostupňových gliomů oproti nenádorové tkáni mozku (Busek et al., 2016; Matrasova et al., 2017; Mentlein et al., 2011; Stremenova et al., 2007).

Přítomnost DPP-IV a FAP v tkáních mozkových metastáz nebyla dosud studována.

Naše výsledky prokazují významně vyšší koncentraci proteinu a vyšší enzymovou aktivitu DPP-IV v tkáních mozkových metastáz karcinomu GIT a plic ve srovnání s nenádorovou mozkovou tkání. Zvýšená exprese DPP-IV byla popsána v premaligních adenomech a kolorektálních karcinomech ve srovnání s normální tkání tlustého střeva (Larrinaga et al., 2015). Subpopulace nádorových kmenových buněk exprimujících DPP-IV byla přítomna v primárních kolorektálních karcinomech i v jejich jaterních metastázách. Tyto buňky jsou pravděpodobně důležité pro iniciaci, progresi a chemorezistenci nádoru (Pang et al., 2010). Přítomnost DPP-IV byla popsána v různých typech primárních karcinomů plic a v řadě z nich odvozených buněčných linií. Aktivita DPP-IV byla pozorována v buňkách lidského a myšího adenokarcinomu plic. Vildagliptin, inhibitor hydrolytické aktivity DPP-IV, potlačil růst nádorových buněk v *in vivo* modelech, pravděpodobně prostřednictvím makrofágy stimulované cytotoxicity NK buněk (Jang et al., 2019). Terapeuticky využívaná inhibice hydrolytické aktivity DPP-IV gliptiny u pacientů s diabetem mellitem druhého typu a konkomitantním pokročilým karcinomem plic zvýšila dobu jejich přežití (Bishnoi et al., 2019). Oproti tomu nízká hydrolytická aktivita DPP-IV byla pozorována v buňkách lidského adenokarcinomu a dlaždicobuněčného karcinomu plic ve srovnání s buňkami odvozenými z fetální plicní tkáně (Dimitrova et al., 2012). Snížená koncentrace proteinu a relativní exprese transkriptu DPP-IV byla rovněž přítomna v buňkách lidského nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) ve srovnání s epitelovými plicními buňkami (Wesley et al., 2004). Expresi DPP-IV jsme rovněž prokázali v tkáních mozkových metastáz karcinomu prsu, kde se ovšem signifikantně neodlišovala od nenádorové mozkové tkáně. Exprese DPP-IV v nenádorových epitelových buňkách karcinomu prsu pravděpodobně podporuje jejich nádorovou transformaci zprostředkovanou epidermálním růstovým faktorem (Choi et al., 2015). Další práce popisují epitelo-mezenchymovou tranzici (EMT) transformovaných buněk odvozených z karcinomu prsu a zvýšení jejich metastatického potenciálu v důsledku inhibice hydrolytické aktivity DPP-IV (Li et al., 2020; Yang et al., 2019). V tkáních mozkových metastáz melanomu jsme pozorovali expresi DPP-IV srovnatelnou s nenádorovou mozkovou tkání. Nízká exprese DPP-IV byla pozorována v transformovaných melanocytech a v tkáních melanomů (Morrison et al., 1993; Wesley et al., 1999).

Naše výsledky dále prokazují, že rovněž koncentrace proteinu a hydrolytická aktivita FAP jsou vyšší v tkáních mozkových metastáz karcinomu GIT a plic ve srovnání s nenádorovou mozkovou tkání. V primárních extrakraniálních nádorech je FAP exprimován transformovanými buňkami i řadou buněk nádorového stromatu (Busek et al., 2018). Zvýšená exprese FAP v nádorovém stromatu adenokarcinomů tlustého střeva souvisela s agresivním vývojem onemocnění a jeho generalizací (Henry et al., 2007). Exprese FAP u pacientů s karcinomem jícnu inverzně korelovala s dobou jejich přežití (Sato et al., 2022). Zvýšená exprese FAP v nádorově asociovaných fibroblastech z karcinomu plic byla součástí epitelo-mezenchymového přechodu transformovaných buněk a jejich zvýšeného metastatického potenciálu (Wang et al., 2017). Expresi FAP jsme rovněž prokázali v tkáních mozkových metastáz karcinomu prsu, kde se signifikantně neodlišovala od nenádorové mozkové tkáně. Vysoká exprese FAP v primárních karcinomech prsu inverzně korelovala s přítomností estrogenových a progesteronových receptorů a se špatnou prognózou pacientek (Yu et al., 2015). V tkáních mozkových metastáz melanomu jsme pozorovali expresi FAP srovnatelnou s nenádorovou mozkovou tkání. Nízká exprese FAP byla pozorována v transformovaných melanocytech a v tkáních melanomů (Ramirez-Montagut et al., 2004).

DPP-IV a FAP mohou být znakem transformovaných buněk primárních extrakraniálních nádorů a ovlivňovat jejich invazivitu a metastatický potenciál. Naše ani další literární výsledky zatím neumožňují detailně popsat vliv lokálního kontextu na regulaci exprese DPP-IV a FAP v tkáních mozkových metastáz, která se může lišit od regulace v mikroprostředí primárních extrakraniálních nádorů.

Z našich výsledků vyplývá, že v tkáních vysokostupňových gliomů, mozkových metastáz a tyto tkáně konstituujících buněčných populacích jsou přítomná různá spektra mnohočetných MW a pl forem DPP-IV a FAP.

Dvě až tři imunopozitivní, hydrolyticky aktivní MW formy DPP-IV s MW 140-160 kDa jsme pozorovali v tkáních vysokostupňových gliomů, zatímco DPP-IV s MW nad 200 kDa byla nalezena pouze v tkáních mozkových

metastáz. Vznik vysokomolekulární formy DPP-IV s MW nad 200 kDa byl v literatuře popsán jako komplex DPP-IV s molekulou ADA v krevních mononukleárních buňkách (De Meester et al., 1992). Přítomnost komplexu DPP-IV s ADA je typická pro plazmatické membrány T buněk (Shibuya-Saruta et al., 1996), které jsou rovněž součástí nádorového mikroprostředí GBM. V tkáních GBM souvisí přítomnost CD4⁺ T lymfocytů s nepříznivou prognózou pacientů (Han et al., 2014). V bioptickém materiálu z tkání vysokostupňových gliomů, kde byla pozorována pouze jedna imunopozitivní MW forma DPP-IV, nebyla po elektroforetické separaci nalezena korespondující hydrolytická aktivita DPP-IV. V těchto bioptických vzorcích byla zjištěna velmi nízká aktivita DPP-IV i biochemicky, fluorescenční kontinuální metodou. De Meester pozorovala hydrolytickou aktivitu DPP IV pouze u jedné ze tří forem DPP-IV purifikovaných z mononukleárních buněk z periferní krve (De Meester et al., 1992). Hydrolytická aktivita DPP-IV byla pozorována u jedné ze čtyř forem DPP-IV izolovaných z lidské plazmy (Shibuya-Saruta et al., 1996). Absence enzymové aktivity jedné MW formy DPP-IV by mohla být způsobena citlivostí použité metody (Ludwig, 2005). Někteří autoři pozorovali sníženou hydrolytickou aktivitu DPP-IV v souvislosti s její hypersialylací (Mavropoulos et al., 2005; Patrick O'Mullan, 2017). V tkáních gliomů byla pozorována zvýšená relativní exprese transkriptu α 2,3-sialyltransferázy ve srovnání s nenádorovou mozkovou tkání. Změna sialylačního vzorce a přítomnost α 2,3- vázaných sialových kyselin byla pozorována v plazmatických membránách gliomových buněk a komponentách ECM (Yamamoto et al., 1997).

Imunopozitivita MW forem FAP byla detekována výhradně v DPP-IV pozitivních tkáních vysokostupňových gliomů a mozkových metastáz, což podporuje dříve popsanou koexpresi a hypotetizovanou koregulaci obou molekul v gliomových buňkách a tkáních (Balaziová et al., 2011; Stremenová et al., 2007). V tkáni vysokostupňových gliomů jsme našli pouze jednu molekulovou formu FAP s MW 140 kDa, zatímco v bioptickém materiálu mozkových metastáz byly pozorovány až tři MW formy FAP s MW 100 kDa, 150 kDa a 200 kDa. Podobně jako DPP-IV může i FAP nehydrolyticky interagovat s vazebnými partnery. Mueller pozoroval v transformovaných melanocytech komplex FAP s α 3 β 1 integrinem (Mueller et al., 1999). V GBM souvisela exprese α 3 β 1 integrinu v endotelových buňkách se zvýšenou vaskularizací (Bae et al., 2022). Predikovaná molekulová hmotnost lidského monomeru FAP je dle aminokyselinové sekvence 87,7 kDa. V literatuře byl popsán monomer s MW v rozmezí 90-97 kDa (Ghersis et al., 2006; Goldstein et al., 1997; K. N. Lee et al., 2005; Mori et al., 2004; O'Brien & O'Connor, 2008).

Sacharidové složky na povrchu enzymů mohou ovlivňovat jejich afinitu k substrátu a kinetiku enzymových reakcí (Mitra et al., 2006). Glykosylace DPP-IV a částečně FAP je v literatuře dobře popsána, přestože její vliv na biologickou aktivitu obou molekul nejsou jednoznačné (Aertgeerts, Ye, Shi, et al., 2004; Kahne et al., 1996; Mavropoulos et al., 2005). Krystal lidské DPP-IV obsahuje devět predikovaných míst pro vazbu sacharidového řetězce a sedm z nich je mezidruhově konzervovaných (Aertgeerts, Ye, Shi, et al., 2004). Lidský FAP má pět predikovaných míst pro vazbu sacharidového řetězce (Aertgeerts et al., 2005). Příspěvek sacharidových složek v DPP-IV a FAP může dosahovat až 30% resp. 50% z celkové MW molekuly (Escribano & Imperial, 1989; Kawasaki et al., 2009). Z výsledků předkládané práce vyplývá, že kompletní deglykosylace DPP-IV a FAP v tkáních GBM ovlivnila elektroforetickou mobilitu pozorovaných forem ve srovnání s PNGázou F neexponovanými kontrolami. Stejně pozorování bylo popsáno pro PNGázou F deglykosylované DPP-IV a FAP z gliomových buněčných linií (Matrasová et al., 2017). Enzymová aktivita DPP-IV nebyla účinkem PNGázy F ovlivněna. Aertgeerts uvádí, že přítomnost sacharidových složek v DPP-IV a FAP není nezbytná pro jejich enzymovou aktivitu, tvorbu dimeru nebo vazebné vlastnosti (Aertgeerts et al., 2004 a 2005). V řadě nádorů, včetně gliomů, byl pozorován pozmeněný obsah glykoproteinů na kvalitativní i kvantitativní úrovni (Hakomori, 1989). Na základě našich výsledků předpokládáme, že spektrum mnohočetných forem DPP-IV a FAP v GBM primárně nevzniká v důsledku přítomnosti sacharidových struktur. Biologická funkce obou molekul by ovšem mohla být v mikroprostředí GBM glykosylací ovlivněna. Buněčná adheze je ovlivněna sacharidovými složkami membránových a secernovaných proteinů (Arnal-Estape & Nguyen, 2015; Ohtsubo & Marth, 2006). Terminálně vázané sialové kyseliny udávají glykoproteinům na povrchu buněčných membrán záporný náboj, čímž mohou snižovat adhezivitu a stimulovat invazivní potenciál transformovaných buněk (Passaniti & Hart, 1988). BEHAB/brevican je proteoglykan ECM specifický pro CNS. Jeho exprese je zvýšená v gliomech a jeho proteolytická degradace může zvyšovat invazivitu gliomu (Gary et al., 1998). Viapiano popsal dvě formy BEHAB/brevicanu s odlišným obsahem sialových kyselin ve vysoko- a nízkostupňových gliomech (Viapiano et al., 2005). Brevican je substrátem FAP, který hraje roli v remodelaci ECM (Mentlein et al., 2011). Námi popsané formy FAP s pI v alkalické oblasti přítomné v tkáních GBM a mozkových metastáz by svým kladným nábojem mohly stabilizovat interakci se sialylovaným brevicanem a podporovat hydrolytický účinek FAP.

Podobně jako v tkáních vysokostupňových gliomů a mozkových metastáz jsou v gliomových liniích a gliomových nekmenových kulturách (nonGSC) přítomné dvě imunopozitivní, hydrolyticky aktivní MW formy DPP-IV. V gliomových buňkách jsme nenalezli MW formy DPP-IV nad 200 kDa, což může být způsobeno omezenou dostupností molekulárních vazebných partnerů v kultivačních podmínkách *in vitro*. Na rozdíl od spektra MW forem DPP-IV pozorovaného v tkáních GBM je v kultivovaných gliomových buňkách přítomná jedna MW forma DPP-IV s odpovídající hydrolytickou aktivitou. V tkáních GBM a mozkových metastáz jsme po izoelektrické fokusaci pozorovali několik pI forem nesoucích DPP-IV-podobnou aktivitu s pI 4,0-5,0, pI 5,8 a pI 8,0. Tři imunopozitivní

formy FAP s pI 7,0-8,5 jsme našli v tkáních GBM (Matrasova et al., 2017) a v tkáních mozkových metastáz karcinomu plic a GIT (připravováno k publikaci). Zdrojem molekulových forem s pI 5,8, nesoucích DPP-IV-podobnou aktivitu, popsaných v tkáních GBM a mozkových metastáz mohou být gliomové buňky, v jejichž modelových liniích jsme pozorovali dvě až tři imunopozitivní, hydrolyticky aktivní formy DPP-IV s pI 5,8-6,0 (Matrasova et al., 2017). Tyto pI formy DPP-IV jsou nejbližší predikovanému pI DPP-IV 5,67. V gliomových buňkách jsme imunodetekcí nenalezli molekulové formy DPP-IV s pI 4,0-5,0. Přítomnost molekulových forem DPP-IV s pI 4,4 byla popsána v krevní plazmě pacientů s diabetem mellitem druhého typu a patrně souvisela s vyšší aktivitou DPP-IV a nižším obsahem sialových kyselin ve srovnání s DPP-IV s pI 4,25 z krevní plazmy zdravých jedinců (Patrick O'Mullan, 2017). Několik k neuraminidáze citlivých pI forem DPP-IV s pI 3,0-4,0 bylo izolováno rovněž z lidské placenty (Puschel et al., 1982). Kahne se spolupracovníky pozorovali jedenáct imunoreaktivních pI forem DPP-IV v mitogeny aktivovaných lymfocytech v rozmezí pI 3,5-5,9, z nichž pět mělo enzymovou aktivitu DPP-IV a pouze dvě pI formy DPP-IV s pI 3,5 a 3,9 obsahovaly sialové kyseliny a byly citlivé k účinkům neuraminidázy. Ostatní formy DPP-IV nebyly citlivé k účinku neuraminidázy ani jiných glykosidáz (Kahne et al., 1996). Z literárních dat je patrné, že profil aktivních pI forem DPP-IV je rozmanitý a hypersialylace snižuje aktivitu DPP-IV. Na rozdíl od tkání GBM, jsme imunopozitivitu DPP-IV s pI 8,0 nedetekovali v žádných studovaných buněčných modelech a nebyla popsána ani v literatuře. Předpokládáme, že její přítomnost v GBM může být důsledkem lokálně specifických regulací posttranslačních úprav.

Obdobně jako v případě experimentů k identifikaci buněčného původu DPP-IV a jejich MW a pI forem pozorovaných v bioptickém materiálu, byly analyzovány buněčné populace přítomné v mikroprostředí vysokostupňových gliomů a mozkových metastáz *in vitro*. Molekulové formy FAP s MW v oblasti 140 kDa jsou podobné jako v tkáních vysokostupňových gliomů a mozkových metastáz přítomné v gliomových liniích, gliomových nonGSC kulturách a, oproti DPP-IV, i ve stromálních buňkách přítomných v tkáních GBM a mozkových metastáz. V gliomových ani stromálních buňkách jsme nenalezli molekulové formy FAP s MW 200 kDa, což může být způsobeno, podobně jako u DPP-IV, absencí molekulárních vazebných partnerů tvořících komplexy s molekulou FAP v kultivačních podmínkách *in vitro*. Zdrojem molekulových forem s pI 5,8, nesoucích DPP-IV-podobnou aktivitu, popsaných v tkáních GBM a mozkových metastáz, mohou být gliomové i stromální buňky, v nichž jsme pozorovali dvě až tři imunopozitivní, hydrolyticky aktivní formy FAP s pI 5,8-6,2 resp. pI 5,5-6,0. Predikovaná hodnota pI FAP dle aminokyselinové sekvence je 6,24. V gliomových a stromálních buňkách jsme pozorovali imunopozitivitu FAP s pI 4,0-5,0. Přítomnost FAP s pI 4,2–4,8 byla popsána v transformovaných buňkách karcinomu pankreatu (Escribano & Imperial, 1989) a FAP s pI 5,0 byl přítomen v melanomové buněčné linii LOX (Pineiro-Sanchez et al., 1997). Původ ani význam těchto pI forem FAP nebyl autory popsán. Ve stromálních buňkách jsme pozorovali FAP s pI 7,0-8,0 a pI 9,0-9,5. Zdrojem imunopozitivních forem FAP s pI 7,0-8,5 v tkáních GBM a mozkových metastáz tak mohou být stromální buňky. Podle dalších autorů může být exprese FAP v gliomových buňkách navozena regulačním kontextem nádorového mikroprostředí (Rohrich et al., 2019).

Jako modelový systém pro studium humorálních komunikací v nádorovém mikroprostředí jsou obecně užívány experimenty s využitím kondiciovaných médií (Chen et al., 2009; Tan et al., 2018; Yavuz et al., 2021; Zhang et al., 2020). Naše experimenty prokázaly zvýšení exprese FAP provázené zvýšením sekrece TGF- β 1 do kultivačního média v transformovaných gliálních buňkách i v nenádorových pericytech po expozici mediím kondiciovaných netransformovanými, resp. transformovanými buněčnými populacemi. Experimenty s využitím přímých kokultivací buněk jsou obecně užívány jako modelový systém pro studium komplexních, včetně kontaktních, interakcí v nádorovém mikroprostředí. Mezi typické důsledky těchto interakcí patří přechod buňky z epitelového do mezenchymového fenotypu (EMT) nebo diferenciaci do mezenchymových kmenových buněk (Bhattacharya et al., 2012). V podmínkách přímé kokultivace transformovaných gliálních buněk s nenádorovými pericyty byla našimi experimenty potvrzena zvýšená koncentrace FAP v obou populacích, za dalšího zvýšení TGF- β 1 v jejich kultivačním médiu. Expozice transformovaných gliálních buněk a nenádorových pericytů rekombinantnímu TGF- β 1 vedla k expresi molekulových pI forem FAP s pI 7,0-8,0 a pI 9,0-9,5, námi pozorovaných v komplexním bioptickém materiálu z tkání GBM (Matrasova et al., 2017) a z tkání mozkových metastáz karcinomu plic a GIT (připravováno k publikaci). Tato pozorování nasvědčují významu kontextu nádorového mikroprostředí pro modifikaci expresního vzorce molekulových forem FAP v tkáních GBM a mozkových metastáz.

Dále naše výsledky ukazují, že exprese TGF- β 1 a FAP byla nejvyšší v tkáních GBM mezenchymového subtypu a imunohistochemická analýza prokázala kolokalizaci FAP a TGF- β 1 v perivaskulární nise a parenchymu GBM. V gliomových buňkách U87 byla exprese FAP regulována signální dráhou TGF- β 1 závislou na fosforylaci Smad2/3. Fosforylovaný pSmad2/3 je transkripčním faktorem, který přímo aktivuje transkripci genu pro FAP (Krepela et al., 2021).

CÍL 1. V tkáních vysokostupňových gliomů a mozkových metastáz jsou přítomné mnohočetné formy DPP-IV a FAP. V tkáních GBM a mozkových metastáz je přítomná do této doby nepopsaná molekulová forma FAP s pI 7,0-8,5 (Matrasova et al., 2017).

CÍL 2. Spektrum mnohočetných forem DPP-IV a FAP v tkáních GBM ani v transformovaných gliálních buňkách pravděpodobně není důsledkem glykosylace.

CÍL 3. DPP-IV a její molekulové MW a pI formy jsou dominantně exprimovány transformovanými gliálními buňkami, FAP a jeho MW a pI formy jsou exprimovány transformovanými a stromálními buňkami v tkáních GBM a mozkových metastáz. Ve stromálních buňkách jsme, na rozdíl od transformovaných gliálních buněk, našli formy FAP s pI 7,0-8,0.

CÍL 4. Molekulové formy FAP s pI 7,0-8,0 mohou být v tkáních GBM indukované v gliomových buňkách i v nenádorových pericytech až v kontextu nádorového mikroprostředí. Expres FAP může být v gliomových i stromálních buňkách přítomných v tkáních GBM a mozkových metastáz indukovaná TGF- β 1.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abbott, C. A., Yu, D. M., Woollatt, E., Sutherland, G. R., McCaughan, G. W., & Gorrell, M. D. (2000). Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *Eur J Biochem*, 267(20), 6140-6150.
- Aertgeerts, K., Levin, I., Shi, L., Snell, G. P., Jennings, A., Prasad, G. S., Zhang, Y., Kraus, M. L., Salakian, S., Sridhar, V., Wijnands, R., & Tennant, M. G. (2005). Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha. *J Biol Chem*, 280(20), 19441-19444.
- Aertgeerts, K., Ye, S., Shi, L., Prasad, S. G., Witmer, D., Chi, E., Sang, B. C., Wijnands, R. A., Webb, D. R., & Swanson, R. V. (2004). N-linked glycosylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26): effects on enzyme activity, homodimer formation, and adenosine deaminase binding. *Protein Sci*, 13(1), 145-154.
- Aertgeerts, K., Ye, S., Tennant, M. G., Kraus, M. L., Rogers, J., Sang, B. C., Skene, R. J., Webb, D. R., & Prasad, G. S. (2004). Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein Sci*, 13(2), 412-421.
- Arnal-Estape, A., & Nguyen, D. X. (2015). Sweets for a bitter end: lung cancer cell-surface protein glycosylation mediates metastatic colonization. *Cancer Discov*, 5(2), 109-111.
- Aytac, U., & Dang, N. H. (2004). CD26/dipeptidyl peptidase IV: a regulator of immune function and a potential molecular target for therapy. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 4(1), 11-18.
- Bae, E., Huang, P., Muller-Greven, G., Hambardzumyan, D., Sloan, A. E., Nowacki, A. S., Marko, N., Carlin, C. R., & Gladson, C. L. (2022). Integrin α 3 β 1 promotes vessel formation of glioblastoma-associated endothelial cells through calcium-mediated macropinocytosis and lysosomal exocytosis. *Nat Commun*, 13(1), 4268.
- Balaziová, E., Busek, P., Stremenová, J., Sromová, L., Krepela, E., Lizcova, L., & Sedo, A. (2011). Coupled expression of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein-alpha in transformed astrocytic cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 354(1-2), 283-289.
- Balaziová, E., Vymola, P., Hrabal, P., Mateu, R., Zúbal, M., Tomas, R., Netuka, D., Kramar, F., Zemanová, Z., Svobodová, K., Brabec, M., Sedo, A., & Busek, P. (2021). Fibroblast Activation Protein Expressing Mesenchymal Cells Promote Glioblastoma Angiogenesis. *Cancers*, 13(13).
- Beckenkamp, A., Davies, S., Willig, J. B., & Buffon, A. (2016). DPP-IV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy? *Tumour Biol*, 37(6), 7059-7073.
- Bhattacharya, S. D., Mi, Z., Talbot, L. J., Guo, H., & Kuo, P. C. (2012). 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*, 152(3), 449-454.
- Bishnoi, R., Hong, Y. R., Shah, C., Ali, A., Skelton, W. P. t., Huo, J., Dang, N. H., & Dang, L. H. (2019). Dipeptidyl peptidase 4 inhibitors as novel agents in improving survival in diabetic patients with colorectal cancer and lung cancer: A Surveillance Epidemiology and Endpoint Research Medicare study. *Cancer Med*, 8(8), 3918-3927.
- Busek, P., Balaziová, E., Matrasova, I., Hilsler, M., Tomas, R., Syrucek, M., Zemanová, Z., Krepela, E., Belacek, J., & Sedo, A. (2016). Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. *Tumour Biol*, 37(10), 13961-13971.
- Busek, P., Duke-Cohan, J. S., & Sedo, A. (2022). Does DPP-IV Inhibition Offer New Avenues for Therapeutic Intervention in Malignant Disease? *Cancers*, 14(9).
- Busek, P., Mateu, R., Zúbal, M., Kotackova, L., & Sedo, A. (2018). Targeting fibroblast activation protein in cancer - Prospects and caveats. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 23, 1933-1968.
- Busek, P., & Sedo, A. (2013). Dipeptidyl Peptidase-IV and Related Proteases in Brain Tumors. In *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications*.
- Busek, P., Stremenová, J., & Sedo, A. (2008). Dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity bearing molecules in human brain tumors - good or evil? *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 13, 2319-2326.
- Busek, P., Stremenová, J., Sromová, L., Hilsler, M., Balaziová, E., Kosek, D., Trylcova, J., Strnad, H., Krepela, E., & Sedo, A. (2012). Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(5), 738-747.
- De Meester, I., Vanham, G., Kestens, L., Vanhoof, G., Bosmans, E., Gigase, P., & Scharpe, S. (1994). Binding of adenosine deaminase to the lymphocyte surface via CD26. *Eur J Immunol*, 24(3), 566-570.
- De Meester, I., Vanhoof, G., Hendriks, D., Demuth, H. U., Yaron, A., & Scharpe, S. (1992). Characterization of dipeptidyl peptidase IV (CD26) from human lymphocytes. *Clinica Chimica Acta*, 210(1-2), 23-34.
- Dunshee, D. R., Bainbridge, T. W., Kljavin, N. M., Zavala-Solorio, J., Schroeder, A. C., Chan, R., Corpuz, R., Wong, M., Zhou, W., Deshmukh, G., Ly, J., Sutherland, D. P., Ernst, J. A., & Sonoda, J. (2016). Fibroblast Activation Protein Cleaves and Inactivates Fibroblast Growth Factor 21. *J Biol Chem*, 291(11), 5986-5996.
- Durinx, C., Lambeir, A. M., Bosmans, E., Falmagne, J. B., Berghmans, R., Haemers, A., Scharpe, S., & De Meester, I. (2000). 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*, 267(17), 5608-5613.
- Eatemadi, A., Aiyelabegan, H. T., Negahdari, B., Mazlomi, M. A., Daraee, H., Daraee, N., Eatemadi, R., & Sadroddiny, E. (2017). Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment. *Biomed Pharmacother*, 86, 221-231.

- Eichler, A. F., Chung, E., Kodack, D. P., Loeffler, J. S., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2011). The biology of brain metastases-translation to new therapies. *Nat Rev Clin Oncol*, 8(6), 344-356.
- Elmansi, A. M., Awad, M. E., Eisa, N. H., Kondrikov, D., Hussein, K. A., Aguilar-Perez, A., Herberg, S., Periyasamy-Thandavan, S., Fulzele, S., Hamrick, M. W., McGee-Lawrence, M. E., Isales, C. M., Volkman, B. F., & Hill, W. D. (2019). What doesn't kill you makes you stranger: Dipeptidyl peptidase-4 (CD26) proteolysis differentially modulates the activity of many peptide hormones and cytokines generating novel cryptic bioactive ligands. *Pharmacol Ther*, 198, 90-108.
- Engel, M., Hoffmann, T., Wagner, L., Wermann, M., Heiser, U., Kiefersauer, R., Huber, R., Bode, W., Demuth, H. U., & Brandstetter, H. (2003). The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5063-5068.
- Escribano, M. J., & Imperial, S. (1989). Purification and Molecular Characterization of FAP, a Feto-acinar Protein Associated with the Differentiation of Human Pancreas. *Journal of Biological Chemistry*, 264(36), 21865-21871.
- Fitzgerald, A. A., & Weiner, L. M. (2020). The role of fibroblast activation protein in health and malignancy. *Cancer Metastasis Rev*, 39(3), 783-803.
- Gary, S. C., Kelly, G. M., & Hockfield, S. (1998). BEHAB/brevican: a brain-specific lectican implicated in gliomas and glial cell motility. *Curr Opin Neurobiol*, 8(5), 576-581.
- Gherzi, G., Zhao, Q., Salamone, M., Yeh, Y., Zucker, S., & Chen, W. T. (2006). The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. *Cancer Res*, 66(9), 4652-4661.
- Goldstein, L. A., Gherzi, G., Pineiro-Sanchez, M. L., Salamone, M., Yeh, Y., Flessate, D., & Chen, W. T. (1997). Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma. *Biochim Biophys Acta*, 1361(1), 11-19.
- Gorrell, M. D., Gysbers, V., & McCaughan, G. W. (2001). CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol*, 54(3), 249-264.
- Hakomori, S. (1989). Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res*, 52, 257-331.
- Han, S., Zhang, C., Li, Q., Dong, J., Liu, Y., Huang, Y., Jiang, T., & Wu, A. (2014). Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer*, 110(10), 2560-2568.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Henry, L. R., Lee, H. O., Lee, J. S., Klein-Szanto, A., Watts, P., Ross, E. A., Chen, W. T., & Cheng, J. D. (2007). Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res*, 13(6), 1736-1741.
- Chen, F. X., Ren, W. W., Yang, Y., Shen, D., Zong, Y., Xu, S., Duan, Y., Qian, Y., & Ji, Y. (2009). Reciprocal effects of conditioned medium on cultured glioma cells and neural stem cells. *J Clin Neurosci*, 16(12), 1619-1623.
- Choi, H. J., Kim, J. Y., Lim, S. C., Kim, G., Yun, H. J., & Choi, H. S. (2015). Dipeptidyl peptidase 4 promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via induction of PIN1 gene expression. *Br J Pharmacol*, 172(21), 5096-5109.
- Christiansen, V. J., Jackson, K. W., Lee, K. N., & McKee, P. A. (2007). Effect of fibroblast activation protein and alpha2-antiplasmin cleaving enzyme on collagen types I, III, and IV. *Arch Biochem Biophys*, 457(2), 177-186.
- Itoh, Y. (2022). Proteolytic modulation of tumor microenvironment signals during cancer progression. *Front Oncol*, 12, 935231.
- Jang, J. H., Janker, F., De Meester, I., Arni, S., Borgeaud, N., Yamada, Y., Gil Bazo, I., Weder, W., & Jungraithmayr, W. (2019). The CD26/DPP4-inhibitor vildagliptin suppresses lung cancer growth via macrophage-mediated NK cell activity. *Carcinogenesis*, 40(2), 324-334.
- Kahne, T., Kroning, H., Thiel, U., Ulmer, A. J., Flad, H. D., & Ansorge, S. (1996). Alterations in structure and cellular localization of molecular forms of DP IV/CD26 during T cell activation. *Cell Immunol*, 170(1), 63-70.
- Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S. F., & Morimoto, C. (1993). Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science*, 261(5120), 466-469.
- Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Neill, T., & Iozzo, R. V. (2019). Matrix modeling and remodeling: A biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. *Matrix Biol*, 75-76, 1-11.
- Kawasaki, N., Lin, C. W., Inoue, R., Khoo, K. H., Kawasaki, N., Ma, B. Y., Oka, S., Ishiguro, M., Sawada, T., Ishida, H., Hashimoto, T., & Kawasaki, T. (2009). Highly fucosylated N-glycan ligands for mannan-binding protein expressed specifically on CD26 (DPPVI) isolated from a human colorectal carcinoma cell line, SW1116. *Glycobiology*, 19(4), 437-450.
- Krepela, E., Vanickova, Z., Hrabal, P., Zubal, M., Chmielova, B., Balaziova, E., Vymola, P., Matrasova, I., Busek, P., & Sedo, A. (2021). Regulation of Fibroblast Activation Protein by Transforming Growth Factor Beta-1 in Glioblastoma Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3).
- Ladner, C. L., Yang, J., Turner, R. J., & Edwards, R. A. (2004). Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal Biochem*, 326(1), 13-20.
- Lambeir, A. M., Diaz Pereira, J. F., Chacon, P., Vermeulen, G., Heremans, K., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Meester, I., & Scharpe, S. (1997). A prediction of DPP IV/CD26 domain structure from a physico-chemical investigation of dipeptidyl peptidase IV (CD26) from human seminal plasma. *Biochim Biophys Acta*, 1340(2), 215-226.
- Lambeir, A. M., Durinx, C., Scharpe, S., & De Meester, I. (2003). Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 40(3), 209-294.
- Langley, R. R., & Fidler, I. J. (2013). The biology of brain metastasis. *Clin Chem*, 59(1), 180-189.
- Larrinaga, G., Perez, I., Sanz, B., Beitia, M., Errarte, P., Fernandez, A., Blanco, L., Etxezarraga, M. C., Gil, J., & Lopez, J. I. (2015). Dipeptidyl-Peptidase IV Activity Is Correlated with Colorectal Cancer Prognosis. *PLoS One*, 10(3).
- Lee, J., Fassnacht, M., Nair, S., Boczkowski, D., & Gilboa, E. (2005). Tumor immunotherapy targeting fibroblast activation protein, a product expressed in tumor-associated fibroblasts. *Cancer Res*, 65(23), 11156-11163.
- Lee, K. N., Jackson, K. W., Christiansen, V. J., Lee, C. S., Chun, J. G., & McKee, P. A. (2006). Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood*, 107(4), 1397-1404.
- Lee, K. N., Jackson, K. W., Christiansen, V. J., & McKee, P. A. (2005). Plasma antiplasmin-cleaving enzyme (APCE) is a soluble form of fibroblast activation protein (FAP). *Faseb Journal*, 19(4), A304-A305. <Go to ISI>://WOS:000227610702123
- Li, S., Fan, Y., Kumagai, A., Kawakita, E., Kitada, M., Kanasaki, K., & Koya, D. (2020). Deficiency in Dipeptidyl Peptidase-4 Promotes Chemoresistance through the CXCL12/CXCR4/mTOR/TGFbeta Signaling Pathway in Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3).
- Ludwig, T. (2005). Local proteolytic activity in tumor cell invasion and metastasis. *Bioessays*, 27(11), 1181-1191.
- Matrasova, I., Busek, P., Balaziova, E., & Sedo, A. (2017). Heterogeneity of molecular forms of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein in human glioblastomas. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 161(3), 252-260.
- Mavropoulos, J. C., Cuchacovich, M., Llanos, C., Aguillon, J. C., Gatica, H., Pizzo, S. V., & Gonzalez-Gronow, M. (2005). Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy augments dipeptidyl peptidase IV activity and decreases autoantibodies to GRP78/BIP and phosphoglucose isomerase in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 32(11), 2116-2124.
- Medeiros Mdos, S., Balmforth, A. J., Vaughan, P. F., & Turner, A. J. (1991). Hydrolysis of atrial and brain natriuretic peptides by the human astrocytoma clone D384 and the neuroblastoma line SH-SY5Y. *Neuroendocrinology*, 54(3), 295-302.
- Mentlein, R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept*, 85(1), 9-24.
- Mentlein, R., Hattermann, K., Hemion, C., Jungbluth, A. A., & Held-Feindt, J. (2011). Expression and role of the cell surface protease seprase/fibroblast activation protein-alpha (FAP-alpha) in astroglial tumors. *Biol Chem*, 392(3), 199-207.
- Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T. N., & Surolia, A. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem Sci*, 31(3), 156-163.
- Mitschke, J., Burk, U. C., & Reinheckel, T. (2019). The role of proteases in epithelial-to-mesenchymal cell transitions in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 38(3), 431-444.
- Mohan, V., Das, A., & Sagi, I. (2020). Emerging roles of ECM remodeling processes in cancer. *Semin Cancer Biol*, 62, 192-200.

- Mori, Y., Kono, K., Matsumoto, Y., Fujii, H., Yamane, T., Mitsumata, M., & Chen, W. T. (2004). The expression of a type II transmembrane serine protease (Seprase) in human gastric carcinoma. *Oncology*, *67*(5-6), 411-419.
- Morrison, M. E., Vijayaradh, S., Engelstein, D., Albino, A. P., & Houghton, A. N. (1993). A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J Exp Med*, *177*(4), 1135-1143.
- Mueller, S. C., Ghersi, G., Akiyama, S. K., Sang, Q. X., Howard, L., Pineiro-Sanchez, M., Nakahara, H., Yeh, Y., & Chen, W. T. (1999). A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem*, *274*(35), 24947-24952.
- Muenst, S., Laubli, H., Soysal, S. D., Zippelius, A., Tzankov, A., & Hoeller, S. (2016). The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J Intern Med*, *279*(6), 541-562.
- Niedermeyer, J., Enenkel, B., Park, J. E., Lenter, M., Rettig, W. J., Damm, K., & Schnapp, A. (1998). Mouse fibroblast-activation protein--conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease. *Eur J Biochem*, *254*(3), 650-654.
- O'Brien, P., & O'Connor, B. F. (2008). Seprase: an overview of an important matrix serine protease. *Biochim Biophys Acta*, *1784*(9), 1130-1145.
- Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, *126*(5), 855-867.
- Ostrom, Q. T., Egan, K. M., Nabors, L. B., Gerke, T., Thompson, R. C., Olson, J. J., LaRocca, R., Chowdhary, S., Eckel-Passow, J. E., Armstrong, G., Wiencke, J. K., Bernstein, J. L., Claus, E. B., Il'yasova, D., Johansen, C., Lachance, D. H., Lai, R. K., Merrell, R. T., Olson, S. H., . . . Bondy, M. L. (2020). Glioma risk associated with extent of estimated European genetic ancestry in African Americans and Hispanics. *Int J Cancer*, *146*(3), 739-748.
- Pandya, P., Orgaz, J. L., & Sanz-Moreno, V. (2017). Modes of invasion during tumour dissemination. *Mol Oncol*, *11*(1), 5-27.
- Pang, R., Law, W. L., Chu, A. C., Poon, J. T., Lam, C. S., Chow, A. K., Ng, L., Cheung, L. W., Lan, X. R., Lan, H. Y., Tan, V. P., Yau, T. C., Poon, R. T., & Wong, B. C. (2010). A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell*, *6*(6), 603-615.
- Park, J. E., Lenter, M. C., Zimmermann, R. N., Garin-Chesa, P., Old, L. J., & Rettig, W. J. (1999). Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem*, *274*(51), 36505-36512.
- Passaniti, A., & Hart, G. W. (1988). Cell surface sialylation and tumor metastasis. Metastatic potential of B16 melanoma variants correlates with their relative numbers of specific penultimate oligosaccharide structures. *J Biol Chem*, *263*(16), 7591-7603.
- Patrick O'Mullan, P. D. C., PhD Jizu Yi, PhD Chae Kim, BS Craig A. Gelfand, PhD. (2017). High-Resolution Isoelectric Separation of Dipeptidyl Peptidase IV Facilitates Molecular Understanding of Posttranslational Modifications, Enzyme Activity, and a Link to Type II Diabetes.
- Puschel, G., Mentlein, R., & Heymann, E. (1982). Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur J Biochem*, *126*(2), 359-365.
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, *19*(11), 1423-1437.
- Quante, M., Tu, S. P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S. S., Takashi, S., Baik, G. H., Shibata, W., Diprete, B., Betz, K. S., Friedman, R., Varro, A., Tycko, B., & Wang, T. C. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*, *19*(2), 257-272.
- Ramirez-Montagut, T., Blachere, N. E., Sviderskaya, E. V., Bennett, D. C., Rettig, W. J., Garin-Chesa, P., & Houghton, A. N. (2004). FAP alpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor. *Oncogene*, *23*(32), 5435-5446.
- Rawlings, N. D., & Bateman, A. (2021). How to use the MEROPS database and website to help understand peptidase specificity. *Protein Sci*, *30*(1), 83-92.
- Rettig, W. J., Chesa, P. G., Beresford, H. R., Feickert, H. J., Jennings, M. T., Cohen, J., Oettgen, H. F., & Old, L. J. (1986). Differential Expression of Cell-Surface Antigens and Glial Fibrillary Acidic Protein in Human Astrocytoma Subsets. *Cancer Research*, *46*(12), 6406-6412. <Go to ISI>://WOS:A1986E976600072
- Rohrich, M., Loktev, A., Wefers, A. K., Altmann, A., Paech, D., Adeberg, S., Windisch, P., Hielscher, T., Flechsig, P., Floca, R., Leitz, D., Schuster, J. P., Huber, P. E., Debus, J., von Deimling, A., Lindner, T., & Haberkorn, U. (2019). IDH-wildtype glioblastomas and grade III/IV IDH-mutant gliomas show elevated tracer uptake in fibroblast activation protein-specific PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, *46*(12), 2569-2580.
- Sana, J., Busek, P., Fadrus, P., Besse, A., Radova, L., Vecera, M., Reguli, S., Stollinova Sromova, L., Hilser, M., Lipina, R., Lakomy, R., Kren, L., Smrcka, M., Sedo, A., & Slaby, O. (2018). Identification of microRNAs differentially expressed in glioblastoma stem-like cells and their association with patient survival. *Sci Rep*, *8*(1), 2836.
- Sato, H., Noma, K., Ohara, T., Kawasaki, K., Akai, M., Kobayashi, T., Nishiwaki, N., Narusaka, T., Komoto, S., Kashima, H., Katsura, Y., Kato, T., Kikuchi, S., Tazawa, H., Kagawa, S., Shirakawa, Y., Kobayashi, H., & Fujiwara, T. (2022). Dual-targeted near-infrared photoimmunotherapy for esophageal cancer and cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Sci Rep*, *12*(1), 20152.
- Scanlan, M. J., Raj, B. K., Calvo, B., Garin-Chesa, P., Sanz-Moncasi, M. P., Healey, J. H., Old, L. J., & Rettig, W. J. (1994). Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(12), 5657-5661.
- Sedo, A., Krepela, E., Kasafirek, E., Kraml, J., & Kadlecova, L. (1991). Dipeptidyl peptidase IV in the human lung and spinocellular lung cancer. *Physiological Research*, *40*(3), 359-362.
- Sedo, A., & Malik, R. (2001). Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? *Biochim Biophys Acta*, *1550*(2), 107-116.
- Sedo, A., Malik, R., Drbal, K., Lisa, V., Vlasticova, K., & Mares, V. (2001). Dipeptidyl peptidase IV in two human glioma cell lines. *Eur J Histochem*, *45*(1), 57-63.
- Sedo, A., Malik, R., & Krepela, E. (1998). Dipeptidyl peptidase IV in C6 rat glioma cell line differentiation. *Biol Chem*, *379*(1), 39-44.
- Sedo, A., & Revoltella, R. P. (1995). Detection of dipeptidyl peptidase IV in glioma C6 and neuroblastoma SK-N-SH cell lines. *Biochem Cell Biol*, *73*(1-2), 113-115.
- Shibuya-Saruta, H., Kasahara, Y., & Hashimoto, Y. (1996). Human serum dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) and its unique properties. *J Clin Lab Anal*, *10*(6), 435-440.
- Stremenova, J., Busek, P., Krepela, E., Sromova, L., & Sedo, A. (2009). Expression of dipeptidyl peptidase-IV and related molecules in primary cell cultures derived from human astrocytic tumors. *Febs Journal*, *276*, 391-392. <Go to ISI>://WOS:000267069901197
- Stremenova, J., Krepela, E., Mares, V., Trim, J., Dbaly, V., Marek, J., Vanickova, Z., Lisa, V., Yea, C., & Sedo, A. (2007). Expression and enzymatic activity of dipeptidyl peptidase-IV in human astrocytic tumours are associated with tumour grade. *Int J Oncol*, *31*(4), 785-792.
- Tan, B., Shen, L., Yang, K., Huang, D., Li, X., Li, Y., Zhao, L., Chen, J., Yi, Q., Xu, H., Tian, J., & Zhu, J. (2018). C6 glioma-conditioned medium induces malignant transformation of mesenchymal stem cells: Possible role of S100B/RAGE pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, *495*(1), 78-85.
- Trylcova, J., Busek, P., Smetana, K., Jr., Balaziova, E., Dvorankova, B., Mifkova, A., & Sedo, A. (2015). Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells in vitro. *Tumour Biol*, *36*(8), 5873-5879.
- Turk, B., Turk, D., & Turk, V. (2012). Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J*, *31*(7), 1630-1643.
- Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., & Scharpe, S. (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J*, *9*(9), 736-744.
- Viapiano, M. S., Bi, W. L., Piepmeier, J., Hockfield, S., & Matthews, R. T. (2005). Novel tumor-specific isoforms of BEHAB/brevican identified in human malignant gliomas. *Cancer Res*, *65*(15), 6726-6733.
- Wang, L., Cao, L., Wang, H., Liu, B., Zhang, Q., Meng, Z., Wu, X., Zhou, Q., & Xu, K. (2017). Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*, *8*(44), 76116-76128.
- Waumans, Y., Baerts, L., Kehoe, K., Lambeir, A. M., & De Meester, I. (2015). The Dipeptidyl Peptidase Family, Prolyl Oligopeptidase, and Prolyl Carboxypeptidase in the Immune System and Inflammatory Disease, Including Atherosclerosis. *Front Immunol*, *6*, 387.
- Wesley, U. V., Albino, A. P., Tiwari, S., & Houghton, A. N. (1999). A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. *J Exp Med*, *190*(3), 311-322.
- Wesley, U. V., Tiwari, S., & Houghton, A. N. (2004). Role for dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non small cell lung carcinoma cells. *Int J Cancer*, *109*(6), 855-866.
- Yamamoto, H., Saito, T., Kaneko, Y., Kersey, D., Yong, V. W., Bremer, E. G., Mkrdichian, E., Cerullo, L., Leestma, J., & Moskal, J. R. (1997). alpha2,3-sialyltransferase mRNA and alpha2,3-linked glycoprotein sialylation are increased in malignant gliomas. *Brain Res*, *755*(1), 175-179.

- Yang, F., Takagaki, Y., Yoshitomi, Y., Ikeda, T., Li, J., Kitada, M., Kumagai, A., Kawakita, E., Shi, S., Kanasaki, K., & Koya, D. (2019). Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 Accelerates Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer Metastasis via the CXCL12/CXCR4/mTOR Axis. *Cancer Res*, 79(4), 735-746.
- Yavuz, M., Akgül, S., Kaya, E., & Demircan, T. (2021). Condition Medium of Glioblastoma Cell Lines Decreases the Viability of Glioblastoma Cells by Modulating Gene Expression Profile.
- Yu, H., Yang, J., Li, Y., & Jiao, S. (2015). [The expression of fibroblast activation protein-alpha in primary breast cancer is associated with poor prognosis]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 31(3), 370-374.
- Zhang, G. L., Qian, C., Zhang, S. Z., Tuo, Y. H., Zeng, B. Y., Ji, Y. X., & Wang, Y. Z. (2020). Effect of conditioned medium from neural stem cells on glioma progression and its protein expression profile analysis. *World J Stem Cells*, 12(11), 1396-1409.
- Zhen, E. Y., Jin, Z., Ackermann, B. L., Thomas, M. K., & Gutierrez, J. A. (2016). Circulating FGF21 proteolytic processing mediated by fibroblast activation protein. *Biochem J*, 473(5), 605-614.

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1

Matrasova, I., Busek, P., Balaziová, E., & Sedo, A. (2017). Heterogeneity of molecular forms of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein in human glioblastomas. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 161(3), 252-260, IF₂₀₁₇ 1,24

Příloha č. 2

Busek, P., Balaziová, E., Matrasova, I., Hilser, M., Tomas, R., Syrucek, M., Zemanova, Z., Krepela, E., Belacek, J., & Sedo, A. (2016). Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. *Tumour Biol*, 37(10), 13961-13971, IF₂₀₁₆ 3,65

Příloha č. 3

Krepela, E., Vanickova, Z., Hrabal, P., Zubal, M., Chmielova, B., Balaziová, E., Vymola, P., Matrasova, I., Busek, P., & Sedo, A. (2021). Regulation of Fibroblast Activation Protein by Transforming Growth Factor Beta-1 in Glioblastoma Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), IF₂₀₂₁ 6,21

Příloha č. 4

Vomelova I., Fejfarova. E., Bušek P., Šedo A. (2013). Dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein in glioma primary cell cultures and cell lines, Brain Tumor Meeting, Berlín, Německo, 23.-24.5.2013