

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Praha, 2024

Ing. Markéta Pokorná

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Analýza molekulární podstaty glioblastomu pomocí biomolekul
stanovených *in vitro* a *ex vivo*.

Deciphering the basis of glioblastoma
from *in vitro* and *ex vivo* determined biomolecules.

Ing. Markéta Pokorná

Školitel: prof. MUDr. Marie Černá, DrSc.
Konzultant: doc. Valerie Bríd O`Leary, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 04. 04. 2024

.....

Podpis:

Identifikační záznam:

POKORNÁ, Markéta; *Analýza molekulární podstaty glioblastomu pomocí biomolekul stanovených in vitro a ex vivo. [Deciphering the basis of glioblastoma from in vitro and ex vivo determined biomolecules]*; Praha, 2024; 177 stran; 3 přílohy; dizertační práce; Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav lékařské genetiky 3. LF UK. Školitel: prof. MUDr. Marie Černá, DrSc., Konzultant: doc. Valerie O`Leary, Ph.D.

Klíčová slova: *Multiformní glioblastom; gliom; nádorové kmenové buňky; nádorové mikroprostředí a niky; lncRNA; nekódující RNA; CD54; CD133; U-87 MG; PARTICL (ENSG00000286532); GAS5 (ENSG00000234741); Prominin-1; ICAM-1; Glioblastoma Multiforme*

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala prof. MUDr. Marii Černé, DrSc. za supervizi, cenné rady a vstřícnost při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. Valerii Bríd O`Leary, Ph.D. za odborné vedení a užitečné rady nejen v laboratoři. Děkuji spolupracovníkům nejen z Ústavu lékařské genetiky za přátelskou atmosféru, v které mi bylo umožněno pracovat. Všem děkuji za čas, který mi byl z jejich strany věnován. V neposlední řadě děkuji své rodině (i těm, kteří tu se mnou již nemohou být) a přátelům za podporu při plnění všech snů.

OBSAH

1 ABSTRAKT	8
2 ABSTRACT	9
3 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	10
4 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE.....	12
5 LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
5.1 KLASIFIKACE MOZKOVÝCH NÁDORŮ	13
5.1.1 GLIOBLASTOM MULTIFORME	13
5.1.1.1 Nádorové mikroprostředí glioblastomu	17
5.1.1.1.1 Nádorové kmenové buňky	20
5.1.1.1.2 Nádorové niky.....	21
5.1.1.2 Standardní postup léčby.....	24
5.2 VYBRANÉ BIOMOLEKULY	26
5.2.1 CD MOLEKULY.....	26
5.2.1.1 Adhezní molekuly	26
5.2.1.1.1 ICAM-1 / CD54	26
5.2.1.2 Prominin-1 / CD133.....	29
5.2.2 NEKÓDUJÍCÍ RNA	32
5.2.2.1 Dlouhé nekódující RNA	33
5.2.2.1.1 PARTICL	40
5.2.2.1.2 GAS5.....	42
6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
6.1 LNCRNA ASOCIOVANÉ S NÁDOROVÝM ONEMOCNĚNÍM GBM	46
6.2 LABORATORNÍ METODY	57
6.2.1 GBM BUNĚČNÁ LINIE.....	57
6.2.2 HISTOLOGICKÉ PREPARÁTY GBM TKÁNĚ.....	57
6.2.3 ALL-TRANS RETINOVÁ KYSELINA.....	58
6.2.4 TESTY PROLIFERACE.....	58
6.2.4.1 Test proliferačních schopností (Scratch-wound assay).....	58
6.2.4.2 Stanovení proliferace pomocí průtokové cytometrie	58
6.2.5 ANALÝZA NUKLEONOVÝCH KYSELIN	59
6.2.5.1 Izolace RNA z kultivovaných buněk.....	59
6.2.5.2 Izolace RNA z histologických preparátů GBM tkáně.....	59
6.2.5.3 Reverzní transkripce izolované RNA	60
6.2.5.4 Kvantitativní PCR lncRNA a endogenních kontrolních genů.....	60

6.2.6	ANALÝZA PROTEINŮ	60
6.2.6.1	Extrakce proteinu	60
6.2.6.2	Elektroforéza a western blot	61
6.2.7	CYTOGENETICKÉ METODY	61
6.2.7.1	Klasické barvení chromozomů pomocí Giemsa	62
6.2.7.2	Pruhování chromozomů	62
6.2.8	HISTOLOGICKÁ BARVENÍ	62
6.2.8.1	Histologické barvení hematoxylin – eosin	62
6.2.8.2	Histologické barvení Klüver-Barrera	63
6.2.9	IMUNOFLUORESCENČNÍ METODY	63
6.2.9.1	Detekce vybraných CD molekul u U-87 MG buněčné linie	63
6.2.9.2	Detekce vybraných CD molekul na histologických preparátech	64
6.2.9.3	Detekce GFAP (gliální fibrilární acidický protein) v histologických preparátech ..	65
6.2.9.4	Fluorescenční in situ hybridizace lncRNA PARTICL a GAS5	65
6.2.9.5	Analýza fluorescence	66
6.2.10	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	66
6.3	VÝSLEDKY	67
6.3.1	BUNĚČNÁ LINIE U-87 MG	67
6.3.2	KYSELINA ALL-TRANS-RETINOVÁ	68
6.3.3	HISTOLOGICKÁ ANALÝZA PREPARÁTŮ	69
6.3.4	ANALÝZA VYBRANÝCH MOLEKUL <i>IN VITRO</i> A <i>EX VIVO</i>	71
6.3.4.1	Adhezní molekula ICAM-1 (CD54)	71
6.3.4.2	Marker kmenových buněk prominin-1 (CD133)	73
6.3.4.3	lncRNA PARTICL	75
6.3.4.4	lncRNA GAS5	77
7	DISKUZE	79
8	ZÁVĚR	88
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	89
10	AUTORSKÉ PUBLIKACE	105
11	PŘÍLOHY	106

1 ABSTRAKT

Glioblastom multiforme (GBM) je agresivní nádor mozkové tkáně s nepříznivou prognózou a mediánem přežití 14-16 měsíců. [1] GBM je považován za onemocnění celého mozku, protože obsažené nádorové buňky jsou vysoce infiltrativní. Tato vlastnost komplikuje úplnou resekci nádoru a vede k častým recidivám, které jsou hlavní příčinou úmrtí. [1] GBM se vyznačuje molekulární i morfologickou heterogenitou. Kromě nádorových buněk obsahuje endoteliální buňky, neurony, astrocyty, oligodendrocyty, mikroglie i nebuněčné komponenty, např. apokrinní a parakrinní signální molekuly, exozomy a další. [2] Tyto složky se nacházejí v několika anatomicky odlišných oblastech tzv. nádorových nikách, které se mohou morfologicky a funkčně lišit i v rámci jednoho nádoru. Společně spolu tvoří nádorové mikroprostředí (TME). Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) jsou molekuly RNA o délce 200 nukleotidů a více, které nejsou dále translatovány. Jejich exprese je vysoce specifická a jsou zapojeny do regulace mnoha buněčných procesů. Bylo dokázáno, že některé lidské choroby včetně rakoviny jsou propojeny s deregulacemi lncRNA, což z nich dělá potenciální terapeutické cíle a biomarkery hůře diagnostikovatelných onemocnění. [3] K jejich důležitosti ve výzkumu GBM přispívá i skutečnost, že v mozkové tkáni je zastoupeno nejvíce typů lncRNA. Ty jsou zapojeny do regulačního systému a napomáhají ve vývoji a udržování velkého množství různých buněk obsažených v mozkové tkáni. [4] Studie ukazují spojitost mezi molekulami lncRNA a téměř všemi procesy zapojenými do etiopatogeneze mnoha nádorů včetně GBM. Tato práce zahrnuje aktuální přehled lncRNA spojených s GBM. Vybrané lncRNA byly v této studii vystaveny působení all-trans-retinové kyseliny (ATRA). Tento derivát vitamínu A je důležitým modulátorem mnoha biologických procesů včetně vývoje, růstu a diferenciaci normálních i nádorových buněk. [5] V některých případech je ATRA v kombinaci s dalšími účinnými látkami doporučována k léčbě difúzních gliomů včetně GBM. [6] Tato práce prokázala, že ATRA ovlivňuje expresi lncRNA v závislosti na typu TME, jež byly nasimulovány pomocí buněčné linie U-87 MG. Po vystavení ATRA byl pozorován nárůst množství pronádorové adhezní molekuly ICAM-1 a inhibice lncRNA PARTICL, markeru kmenových buněk promininu-1 a tumor supresorové lncRNA GAS5. ATRA zvýšila schopnost proliferace buněk v závislosti na TME. Tyto biomolekuly byly analyzovány *ex vivo* v histologických preparátech tkáně GBM v původním prostředí. V této práci byla poprvé identifikována lncRNA PARTICL v původní GBM tkáni a v buněčné linii U-87 MG.

2 ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is an aggressive tumour of brain tissue with unfavourable prognosis and a median survival of 14-16 months. [1] GBM is considered a disease of the whole brain because the involved cells are highly infiltrative. This feature complicates complete tumour resection and leads to frequent recurrences, which are the main cause of death. [1] GBM is characterised by both molecular and morphological heterogeneity. In addition to tumour cells, it contains endothelial cells, neurons, astrocytes, oligodendrocytes, microglia and non-cellular components, e.g. apocrine and paracrine signalling molecules, exosomes and others. [2] These components are found in several anatomically different areas, so-called tumour niches, which can be morphologically and functionally present even within a single tumour. Together, they form the tumour microenvironment (TME). Long noncoding RNAs (lncRNAs) are RNA molecules of 200 nucleotides or more in length, which are not further translated into proteins. Their expression is highly specific and they are involved in the regulation of many cellular processes. Some human diseases, including cancer, have been shown to be linked to the deregulation of lncRNAs, making them potential therapeutic targets and biomarkers of difficult-to-diagnose diseases. [3] Their importance in GBM research is also due to the fact that most types of lncRNAs are represented in brain tissue. They are involved in the regulatory system and assist in the development and maintenance of large number of different cells contained in brain tissue. [4] Studies show a connection between lncRNA molecules and almost all processes involved in the etiopatogenesis of many tumours, including GBM. This work includes an up-to-date review of lncRNAs associated with GBM. In this study, selected lncRNAs were exposed to all-trans-retinoic acid (ATRA). This vitamin A derivative is an important modulator of many biological processes including development, growth and differentiation of normal and tumour cells. [5] In some cases, ATRA, in combination with other active substances, is recommended for the treatment of diffuse gliomas, including GBM. [6] This work demonstrated that ATRA releases lncRNAs depending on the TME types, which were simulated using the U-87 MG cell line. After exposure the increase of protumor adhesion molecule ICAM-1 and the inhibition of lncRNA PARTICL, stem cell marker prominin-1 and tumour suppressor lncRNA GAS5 were observed. ATRA increased cell proliferation in a TME-dependent manner. These biomolecules were analysed *ex vivo* in the histological slides of GBM tissues in original TME. In this work, the lncRNA PARTICL was identified for the first time in the original GBM tissue and in the U-87 MG cell line.

3 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATRA	all-trans retinoic acid	all-trans-retinová kyselina
BBB	blood-brain barrier	hematoencefalická bariéra
BBTB	blood-brain tumour barrier	hematoencefalická nádorová bariéra
CAM	cell adhesion molecules	intercelulární adhezivní molekuly
CD	cluster of differentiation	označení pro antigen povrchových molekul
CD54		CD klasifikace pro ICAM-1
CD133		CD klasifikace pro prominin-1
CD133+		buňky s pozitivním nálezem proteinu CD133
CNS		centrální nervový systém
CSC	cancer stem cells	nádorové kmenové buňky
ECM	established cellular monolayer	souvislá vrstva buněk
EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor pro epidermální růstový faktor
GAS5	Growth Arrest Specific 5	lncRNA GAS5
GBM	glioblastoma multiforme	multiformní glioblastom
GSC	glioblastoma stem-like cells	glioblastomové kmenové buňky
HIF	hypoxia induced factor	transkripční faktor indukovaný hypoxií
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	intercelulární adhezivní molekula 1
IDH	isocitrate dehydrogenase	isocitrátdehydrogenáza
IFN	interferon	interferon
IL	interleukin	interleukin

LE	leading edge	proliferační pás
lncRNA	long non-coding RNA	dlouhé nekódující RNA
MGMT	O ⁶ -methylguanine-DNA-methyltransferase	O ⁶ -methylguanin-DNA methyltransferáza
ncRNA	non-coding RNA	nekódující RNA
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	nukleární faktor kappa B
NSC	neural stem cells	nervové kmenové buňky
PARTICL	Promoter of MAT2A-Antisense Radiation Induced Circulating lncRNA	dlouhá nekódující RNA PARTICL
PDGFR	platelet derived growth factor receptor	receptor pro růstový faktor odvozený z krevních destiček
PTEN	phosphatase and tensin homolog	tumor supresorový gen s fofatázovou aktivitou a sekvenční homologii s některými cytoskeletálními proteiny
sICAM-1	soluble intercellular adhesion molecule 1	solubilní izoforma molekuly ICAM-1
SNP	single nucleotide polymorphism	jednonukleotidové polymorfismy
TAM	tumor-associated macrophages	makrofágy asociované s nádory
TCGA	The Cancer Genome Atlas	americká databáze nádorových genomů
TERT	telomerase reverse transcriptase	telomerázová reverzní transkriptáza
TGF-β1	transforming growth factor β1	transformující růstový faktor β1
TME	tumor microenvironment	nádorové mikroprostředí
TMZ	temozolomide	temozolomid (cytostatikum)
U-87 MG	Uppsala 87 Malignant Glioma	glioblastomová buněčná linie U-87 MG
VCAM-1	vascular cell adhesion protein 1	vaskulární adhezivní molekula 1
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endotelový růstový faktor
WHO	World Health Organization	Světová zdravotnická organizace

4 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Rezistence vůči terapii a častá recidiva glioblastomu multiforme (GBM) je ovlivněna nádorovým mikroprostředím a specificky exprimovanými biomolekulami včetně dlouhých nekódujících RNA (lncRNA). Předpokládáme, že tyto molekuly mají jak pozitivní tak i negativní vliv na molekulární mechanismy v závislosti na daném mikroprostředí. Molekuly lncRNA a proteiny mohou hrát roli v etiopatogenezi GBM a ve vývoji nových léčebných postupů.

Cíle této práce jsou:

- Stanovit vliv all-trans-retinové kyseliny (ATRA) při její expozici na GBM buněčnou linii.
- Stanovit vliv ATRA na vybrané biomolekuly včetně lncRNA při její expozici na GBM buněčnou linii.
- Charakterizovat vlastnosti těchto biomolekul v nádorovém mikroprostředí resekované GBM tkáně pacientů s diagnózou GBM.
- Vytvořit aktuální přehled lncRNA zapojených do molekulárních procesů v GBM.

5 LITERÁRNÍ PŘEHLED

5.1 Klasifikace mozkových nádorů

Gliomy jsou nádory pocházející z gliových buněk centrálního nervového systému (CNS), jsou nejčastějšími primárními maligními nádory mozku u dospělých (80 %) a tvoří přibližně 30 % všech nádorů mozku a CNS. [7] Podle typu gliových buněk, z kterých vznikají, se gliomy dále dělí na několik podskupin. Světová zdravotnická organizace (WHO) pravidelně zveřejňuje informace o jednotlivých podskupinách, které na základě vědeckých poznatků upřesňují taxonomii velké skupiny nádorů mozku a CNS a doporučují vhodné léčebné postupy. Velká změna nastala v roce 2016, kdy byly v rámci klasifikace gliomů zohledněny nejen histologické změny, ale také molekulární změny uvnitř buněk a byla zavedena tzv. integrovaná diagnostika, která zahrnuje analýzu fenotypu i genotypu. [8] [9] Nejnovější vědecké poznatky a kritéria zavedené WHO do klasifikace mozkových nádorů v roce 2021 nadále posilují roli molekulární genetiky v diagnostice gliomů všech typů. [10] Přesné rozlišení nádorů CNS na základě histologických znaků a molekulárních abnormalit je důležité pro odhad prognózy pacienta a zařazení optimálního léčebného postupu pro dosažení co nejlepšího výsledku.

Mozkové nádory jsou rozděleny do čtyř stupňů malignity (I-IV). Nádory prvního stupně (I) se vyznačují pomalým růstem bez známek malignity, dobrou prognózou a dlouhou dobou přežití. Pro nádory druhého stupně (II) je typický pomalý difuzně infiltrativní růst. Nádory prvního a druhého stupně (tzv. nízkých stupňů) vykazují benigní vlastnosti, mohou ovšem transformovat v maligní nádory vyšších stupňů (III, IV). Pro třetí stupeň je charakteristická mitotická aktivita a anaplazie. Nejagresivnější formy, vyznačující se navíc vysokou mitotickou aktivitou, mikrovaskulární proliferací a nekrózou, jsou označeny jako nádory čtvrtého stupně. [9] [11]

5.1.1 Glioblastom multiforme

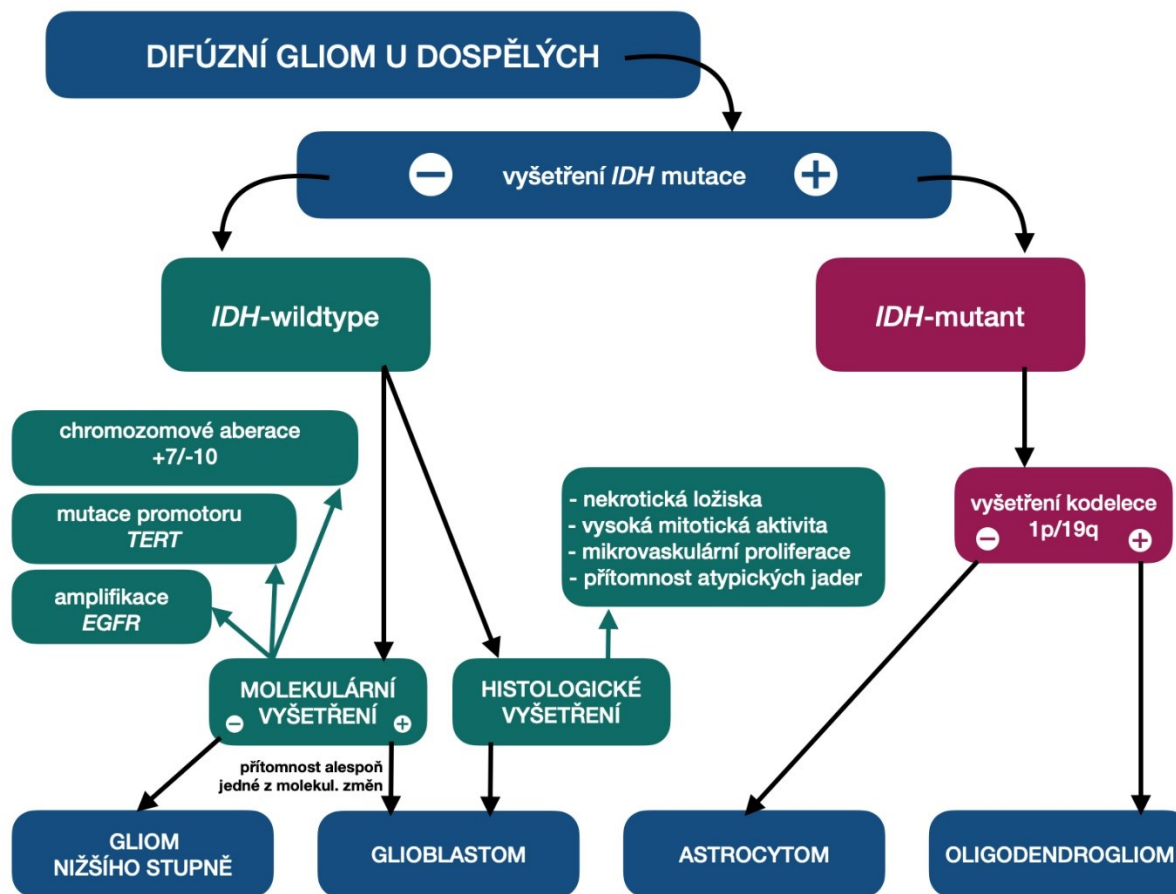
Podle klasifikace WHO z roku 2021 jsou nádory CNS rozděleny do 12 hlavních skupin podle jejich vlastností. Gliomy, které jsou jednou z největších skupin, zahrnují podtypy všech čtyř stupňů malignity. Nejagresivnějším zástupcem je glioblastom multiforme (GBM), který je nejčastěji se vyskytujícím se maligním nádorem mozku u dospělých (42,5 %). [12] Jedná se o astrocytární difuzní gliom čtvrtého stupně malignity s nepříznivou

prognózou a mediánem přežití 14-16 měsíců (bez léčby 10 měsíců). Incidence tohoto vysoce maligního nádoru je 3-4 na 100 000 obyvatel. Věk, pohlaví a etnický původ ovlivňují míru výskytu, která se exponenciálně zvyšuje s věkem od 40. roku, s průměrným věkem diagnózy v 65. roce. GBM se vyskytuje 1,59krát častěji u mužů než u žen (s největšími rozdíly v období menopauzy; se zvyšujícím se věkem se rozdíly v četnosti zmenšují) a téměř 2krát častěji u europoidní rasy ve srovnání s afroamerickými pacienty. [1] [13] Výskyt je sporadický (s výjimkami spojenými s některými dědičnými syndromy). Rizikovým faktorem se na základě studií zdá být předchozí vystavení CNS ionizujícímu záření ve středních až vysokých dávkách, obvykle během léčby jiné rakoviny např. dětské leukémie nebo při situacích radioaktivní kontaminace. [14]

Dle původní klasifikace byly GBM rozlišovány podle původu na primární, které vznikly *de novo*, a sekundární, které se vyvinuly z astrocytomů. Od roku 2021 (Obrázek 1) je primární GBM klasifikován jako *IDH*-wildtype IV. stupně, který postihuje především starší pacienty (průměrně v 62. roce). Sekundární GBM je nově klasifikován jako astrocytom IV. stupně *IDH*-mutant, který se vyskytuje častěji v mladším věku (průměrně ve 45. roce). [10] Tato klasifikace je založena na přítomnosti mutace R132 genu *IDH1* nebo mutace R172 genu *IDH2*, kódujících enzym isocitrátdehydrogenáza (IDH), který katalyzuje přeměnu isocitrátu na α -ketoglutarát v citrátovém cyklu. Mutovaná forma IDH katalyzuje navíc redukci produktu α -ketoglutarátu na D-2-hydroxyglutarát, který je považován za onkometabolit a nepřímo inhibuje transkripci tumor supresorových genů, které jsou zodpovědné za vznik IDH-mutovaných difuzních gliomů. [15]

Difuzní gliomy II. a III. stupně *IDH*-wildtype nesoucí molekulární znaky GBM jsou nově klasifikovány také jako GBM i přes nepřítomnost histologických znaků pro IV. stupeň malignity. [1] Dle nejnovější klasifikace WHO (2021) se v souvislosti s *IDH*-wildtype gliomy vyšetřují čtyři nejčastěji se vyskytující genetické alterace, z nichž pro potvrzení diagnózy GBM stačí nález jedné z molekulárních změn v kombinaci s histologickým obrazem. Amplifikace genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) na 7. chromozomu s následnou zvýšenou expresí daných receptorů je detekována u 50 % GBM *IDH*-wildtype. U poloviny těchto případů lze prokázat přítomnost intragenové delece odpovídající 267 aminokyselinám z extracelulární domény, která se projevuje neschopností vázat ligand, což vede k produkci trvale aktivní formy EGFR (EGFRvIII). Tu lze detekovat imunohistochemicky. [15] U přibližně 80 % případů GBM se nachází mutace v promotoru genu pro telomerázovou reverzní transkriptázu (TERT), která zvyšuje aktivitu telomeráz

Obrázek 1: Schématické a zjednodušené zobrazení klasifikace gliomů a identifikace daného typu podle WHO (od roku 2021). *IDH* – gen kódující isocitrátdehydrogenázu; *EGFR* - gen pro receptor epidermálního růstového faktoru; *TERT* - gen pro telomerázovou reverzní transkriptázu



a tím i prodloužení telomer. [16] Cytogenetickým biomarkerem je kombinovaný zisk celého chromozomu 7 a ztráta celého chromozomu 10 (+7/-10). [10]

Další nalezené genetické alterace, kterými jsou např. amplifikace růstového faktoru odvozeného z krevních destiček (PDGFR), onkogenní fúze genu kódující receptor pro fibroblastový růstový faktor (FGFR) s kódujícími doménami *TACC 1* (z angl. transforming acidic coiled-coil containing protein 1) či *TACC 3*, mutace *BRAF^{V600E}*, amplifikace genu pro cyklin-dependentní kinázu 4 a 6 (CDK4, CDK6), mutace / delece *PTEN* (z angl. Phosphatase and Tensin homolog) nebo genu pro fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K). Mutace či delece základních tumor supresorových genů (*RBI*, *TP53*,...) se vyskytují méně často a zatím nejsou klinicky využívány pro diagnostiku. Většina molekulárních změn se týká tří základních regulačních drah: p53 (87 %), RB1 (78 %) a PI3K/MAPK (88 %). Na základě analýzy transkriptomu a kombinací nalezených molekulárních změn, lze GBM rozdělit do čtyř homogennějších podtypů (klasický, mezenchymální, proneurální a neurální), které nejsou zatím klinicky využívány. [1] [17] [18]

Na druhé straně, stav methylace promotoru O⁶-methylguanin-DNA methyltransferázy (MGMT) je nejvíce prediktivním a prognostickým molekulárním biomarkerem. Pacienti, u kterých je se vyskytuje hypermethylace této oblasti (40 % všech případů GBM), mají lepší prognózu a odpověď na terapii alkylačními cytostatiky včetně temozolomidu. Temozolomid má schopnost alkylovat guanin v DNA a vytvářet tak kovalentní adukty. MGMT toto poškození opraví a cytostatikum je neúčinné. Pokud je promotor hypermethylován, dochází k zastavení transkripce MGMT a poškozená DNA není opravena. Pacient lépe odpovídá na léčbu. [19] Vyšetření methylace promotoru MGMT tedy přináší důležité informace prediktivního charakteru a ovlivňuje zahájení a typ léčby daného pacienta. Na základě výsledků tohoto vyšetření může být u vybraných pacientů indikována po chirurgické resekci pouze chemoterapie ve formě tablet podávaných v domácím prostředí bez zatěžujícího ozařování. [19] [20] Studie naznačují, že střední doba celkového přežití pacientů léčených radioterapií v kombinaci s podáváním temozolomidu se liší u pacientů s hypermethylovaným promotorem *MGMT* (24,59 měsíce) ve srovnání s pacienty bez hypermethylace (14,11 měsíce). [21] Vliv temozolomidu u pacientů bez hypermethylace promotoru MGMT zatím není jasně definován. [1] [21]

Existuje řada překážek pro vývoj účinné molekulární léčby u GBM, včetně intra/intertumorové heterogenity, poruch signálních drah a nedostatku aktivních a do mozku pronikajících cílených terapií. Přístupy založené na studiích molekulárních biomarkerů

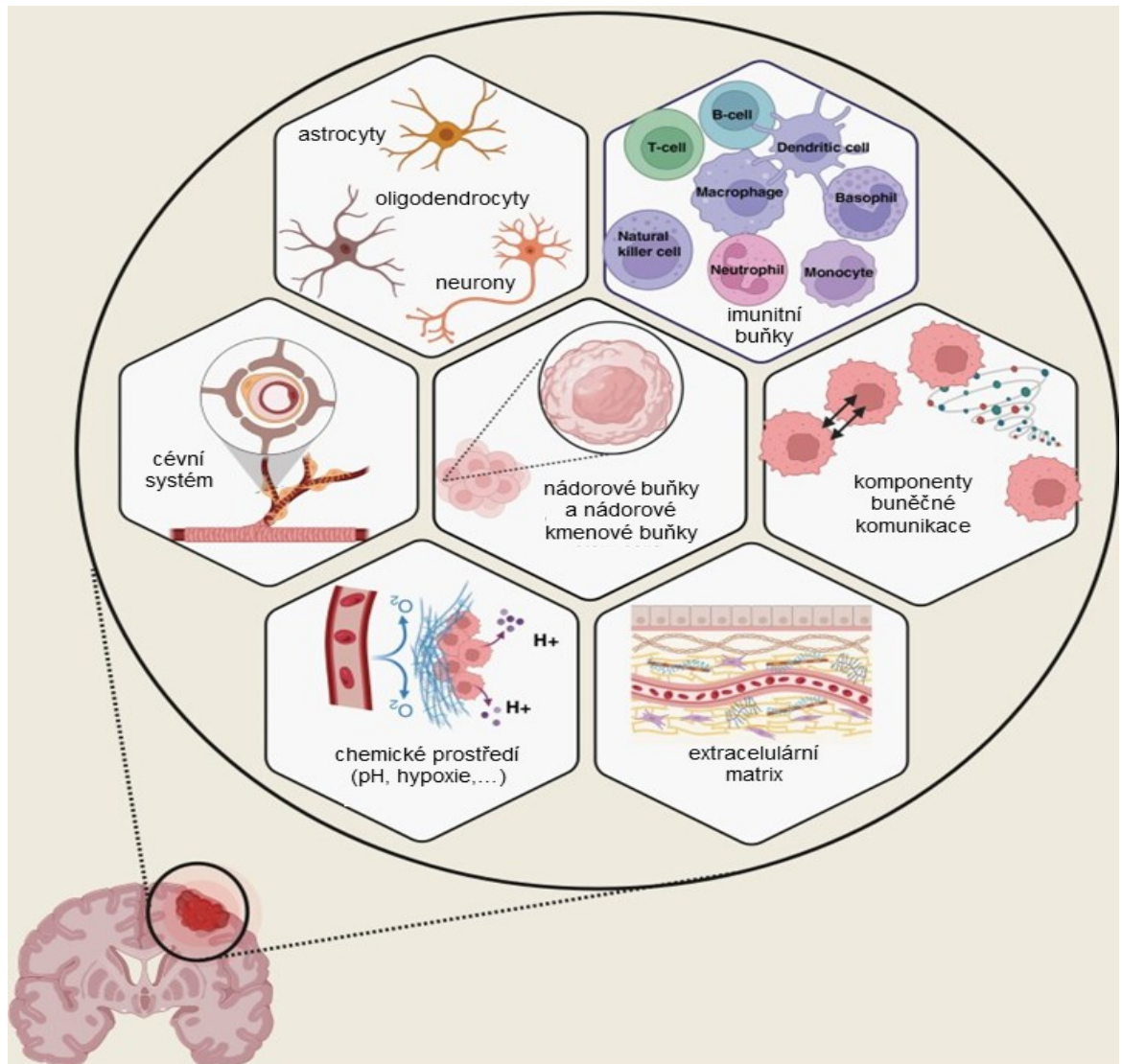
a mechanismech na zvýšení penetrace hematoencefalické bariéry by měly vést k pokrokům v cílené léčbě GBM. [1]

GBM se typicky projevuje progresivními neurologickými příznaky během dnů až týdnů. K symptomům, které indikují pacienta k vyšetření, patří příznaky zvýšeného intrakraniálního tlaku, např. bolest hlavy, nevolnost, zvracení, oční obrna, ztráta sluchu, epileptický záchvat, změněný duševní stav a únava. Základním diagnostickým vyšetřením je zobrazení mozku pomocí magnetické rezonance se zvýšeným kontrastem. Ve většině případů je v době diagnózy průměr nádoru 5-10 cm. Doporučeným způsobem léčby je maximální chirurgická resekce (ztížená infiltrací GBM buněk do okolní tkáně) s následnou chemoradioterapií, která může být individualizována na základě molekulární diagnostiky. [8] Naprostá většina GBM recidivuje do 12 měsíců s mediánem doby dožití 6 měsíců po první progresi v okolí primární léze. Prozatím není popsán žádný standardizovaný postup léčby recidivujícího GBM, je třeba individuálně zvážit možnosti reoperace, reradiace, systémové terapie nebo paliativní léčby. [1] [22]

5.1.1.1 Nádorové mikroprostředí glioblastomu

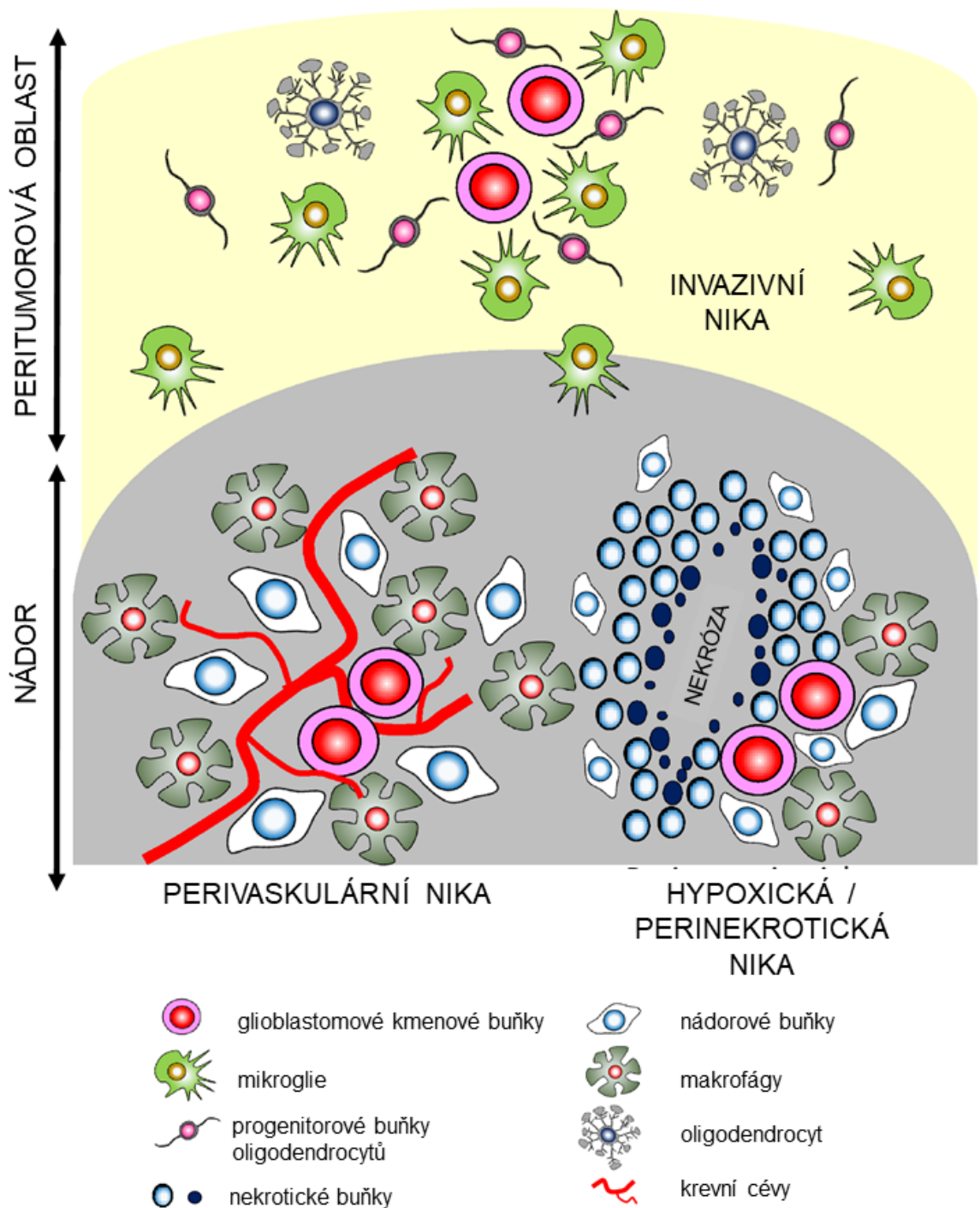
Nádorové mikroprostředí GBM je vysoce heterogenním a komplexním systémem, který se skládá z buněčných i nebuněčných složek a zahrnuje i interakce mezi nádorovými a standardními buňkami přímo v nádorové tkáni nebo v jejím blízkém okolí. V nádorovém mikroprostředí (z angl. tumor microenvironment; TME) se vyskytují kromě rakovinných buněk také endoteliální buňky, neurony, astrocyty, oligodendrocyty, rezidentní imunitní buňky např. mikroglie a cirkulující imunitní buňky infiltrující nádor. Nacházejí se zde i nebuněčné složky, jakými jsou např. apokrinní a parakrinní signální molekuly, exozomy a složky extracelulární matrix. (Obrázek 2) To vše přispívá ke vzniku hypoxických a nekrotických oblastí, k infiltraci nádorových buněk do okolní tkáně, k vaskulární proliferaci či k rezistenci vůči chemo/radioterapii. Vzhledem ke své komplexnosti a dynamice hraje TME důležitou roli v odolnosti rakovinných buněk vůči terapii. [23] [24]

Obrázek 2: Prvky nádorového mikroprostředí. Převzato a upraveno z [2].



TME je rozčleněno do několika anatomicky odlišných oblastí tzv. nádorových nik, které mohou vykazovat různé vlastnosti, a kde se vyskytují gliomové buňky s vlastnostmi kmenových buněk, tzv. nádorové kmenové buňky (angl. glioblastoma stem-like cells; GSC), které mají klíčovou úlohu v procesu tumorogeneze. V prostředí niky jsou GSC chráněny před okolními vlivy, např. extracelulárními signály pro apoptózu. Nádorové niky jednoho nádoru se mohou morfologicky a funkčně lišit, což je typické pro GBM, kde bylo popsáno více charakteristických typů nik lišících se např. mírou vaskularizace. Jednotlivé niky obsahují specifické typy buněk a proteinů, které jsou zodpovědné za specifické molekulární mechanismy a interakce s GSC v nikách. (Obrázek 3) GBM mikroprostředí je velmi dynamické, jednotlivé niky mohou podléhat změnám a v průběhu času přecházet jedna v druhou (i v reakci na terapii). [25]

Obrázek 3: Niky nádorového mikroprostředí GBM a rozložení buněk. Převzato a upraveno z [22].



5.1.1.1.1 Nádorové kmenové buňky

Nádorové kmenové buňky (z angl. cancer stem cells; CSC), také známé jako buňky iniciující nádor či buňky propagující nádor, jsou podobné normálním kmenovým buňkám a stejně jako ony se vyznačují schopností sebeobnovy a multipotence. Glioblastomové nádorové buňky (GSC) mohou diferenciovat do různých nádorových buněk, charakteristická je pro ně schopnost sebeobnovy, proliferace, migrace, reparace DNA a terapeutická odolnost. Těmito všemi vlastnostmi přispívají k progresi GBM. [26] Dále se GSC buňky prostřednictvím přímé diferenciace na endoteliální buňky podílejí na vaskularizaci nádoru. [27]

GSC představují v rámci nádoru specifickou menšinovou subpopulaci, která zahrnuje spektrum buněk od primárních kmenových buněk po progenitory v různých stádiích diferenciace. GSC vznikají neoplastickou transformací normálních nervových kmenových buněk (NSC) nebo progenitorů nebo také dediferenciací zralých gliových buněk. [28] Alternativně jsou charakterizovány pouze funkčním stavem závislým na vlivu TME. [29] GSC tvoří *in vitro* nádorové sféry (sphere formation assay) s trvalou proliferací a *in vivo* tumory po sériové transplantaci. [30] GSC se vyznačují významnou plasticitou, může tedy nastat vzájemná konverze mezi GSC a non-GSC buňkami na základě působení různých faktorů včetně nedostatku živin, hypoxie, ozařování a chemoterapeutických činidel. [30] Svými vlastnostmi se GSC podílejí na charakteristickém obrazu GBM, ke kterému patří proliferace, invazivita, udržování nádoru, maligní relaps a velmi vzácně metastazování. [31]

GSC mají schopnost se adaptovat v jednotlivých nádorových nikách a mohou tvořit subpopulace s mírně odlišnými vlastnostmi. Liší se v reakcích na molekulární signály, exprimují odlišné transkripční profily a markery. [32] [33] Účinnými mechanismy, které umožňují tyto reverzibilní změny bez změn primární sekvence DNA, jsou epigenetické modifikace, např. methylace DNA. Methylázy a demethylázy jsou, ve srovnání s NSC, v GSC deregulovány, což přispívá k heterogenitě GBM a jeho rezistenci vůči terapii. [34] GSC z hypoxických oblastí nádoru se vyznačují vysokou hladinou nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) a vysokou expresí prozánětlivých genů. Peritumorová oblast je také charakteristická vysokou hladinou NF- κ B, ale nízkou expresí prozánětlivých genů. GSC z jádra nádoru vykazují vysokou proliferační kapacitu a nízkou expresi diferenciačních markerů. Ve srovnání s periferií, jádro nádoru se liší genetickými abnormalitami. V nekrotických oblastech nádoru je výrazně hypoxické prostředí se zvýšeným výskytem GSC s expresí markerů CD133 (CD133+) a nestin. Periferní oblasti tumoru se vyznačují

zvýšenou vaskularizací, expresí diferenciačních markerů, citlivostí k chemoterapii, nízkým indexem proliferace a menším množstvím GSC. [33]

Na základě molekulární analýzy jsou GSC klasifikovány do dvou fenotypově odlišných podtypů: proneurální a mezenchymální. Mezenchymální GSC jsou spojovány s horší prognózou, vyšší proliferací a radiorezistencí. Terapie či jiné změny TME mohou vyvolat dynamický přechod z jednoho podtypu v druhý. [35] V závislosti na stavu TME a stupni tumorogeneze se GSC vyskytují v klidovém nebo v proliferativním módu. Nízká hladina kyslíku indukuje u GSC posun z proliferativního módu do klidového, který je charakterizován reverzibilní zástavou buněk v G0 fázi a vyšší odolností vůči léčbě. [34]

GSC lze identifikovat na základě určitých molekul exprimovaných typicky u těchto buněk. Užívanými biomarkery jsou povrchové molekuly CD133, CD15, CD24 a CD44; transkripční faktory SOX2 (z angl. sex determining region Y box 2; SRY-box2) a Oct-4 (z angl. octamer-binding transcription factor 4); proteiny nanog a nestin. [30] [31] Intracelulární molekuly nelze využít pro izolaci živých buněk. [33] Nejužívanějším markerem je povrchový glykoprotein CD133, pomocí kterého lze sledovat diferenciaci GSC, kdy dochází ke snížení jeho exprese na povrchu buněk [27] Markery GSC nejsou zcela specifické, v některých případech jsou používány specifitější kombinace více markerů. Pro diagnostiku v klinické praxi nejsou prozatím využívány. [30]

5.1.1.1.2 Nádorové niky

Perivaskulární nika (Obrázek 3) se vyskytuje v bezprostředním okolí cév vyživujících nádor, které se vyznačují abnormální strukturou a funkcí. [31] Cévy jsou dilatované a propustné, dochází tak ke změnám průtoku krve, které ovlivní zásobení tkáň kyslíkem. [36] Perivaskulární nika slouží jako zásobník GSC. Je složena z mnoha typů buněk (např. endoteliálních, pericytů, makrofágů, neutrofilů, GSC a dalších) a látek, díky kterým poskytuje podpůrné prostředí pro GSC. Vyznačuje se též silnou abnormální nepravidelnou vaskularizací. Krevní kapiláry nejsou pravidelně obklopeny pericyty, jak je tomu ve zdravé tkáni. Angiogeneze je indukována angiogenními faktory v čele s VEGF, který způsobuje odchlípení pericytů a degradaci bazální membrány krevních cév, jejichž následkem jsou prosakování a mikrohemoragie. [25] TGF- β je exprimován v blízkosti kapilár nádoru a podporuje životaschopnost kmenových buněk, stejně jako aktivaci opravných mechanismů DNA a expresi matrixové metaloproteinázy 9 (MMP9), která se podílí na invazi buněk a je biomarkerem progresu nádoru. [32] GSC a perivaskulární nika spolu vzájemně interagují a ovlivňují se. GSC působí na perivaskulární niku skrze produkci vysokých hladin

angiogenních faktorů včetně VEGF a tím vyvolává změny v cévní síti GBM včetně mikrovaskulární hyperplazie. [32] [37] GSC mají schopnost diferenciaci v jiné typy buněk, např. pericyty, které jsou nutné pro tvorbu nik. [36]

V místech oslabené vaskularizace dochází k pomalejšímu průtoku krve a nekonzistentnímu okysličování dané oblasti. Vznikají tak lokální místa hypoxie, která se přeměňují v místa nekrotická, pokud dojde k ucpání cévy a k úplnému odříznutí od přívodu okysličené krve. Okolní buňky reagují na vznik nekrózy prodloužením svých jader a seřazením do pravidelných řad kolem nekrózy do tvaru tzv. palisády, jež je typickým morfologickým znakem GBM. Tyto buňky se vyznačují nízkou mírou proliferace a migrují směrem z místa centrální nekrózy. Pseudopalísádové oblasti spolu s nekrotickým jádrem tvoří hypoxickou niku (Obrázek 3), někdy nazývanou perinekrotická nika. Hypoxický stres vytváří subpopulaci buněk přizpůsobenou k přežití za podmínek s omezeným příjmem živin. Rovněž dochází k Warburgově efektu, kdy nádorové buňky spotřebovávají více glukózy a přeměňují ji na laktát. [32] Z nekrotické tkáně v centru hypoxické niky jsou uvolňovány prozánětlivé signály do okolního mikroprostředí. Hypoxické prostředí podporuje expanzi GSC prostřednictvím proteinů HIF-1 a HIF-2 (z angl. hypoxia-induced factor). Podjednotky alfa těchto proteinů se vyskytují v hypoxických oblastech a po translokaci do buněčného jádra, kde vytváří heterodimery s podjednotkami beta, fungují jako transkripční faktory hypoxických genů. [38] [39] Proteiny (např. nanog, notch, TGF-1, VEGF, IL-8), jež jsou takto indukované hypoxickým mikroprostředím, jsou zapojeny do metabolismu GSC – jejich sebeobnovy, udržování fenotypu, migrace a invaze, schopnosti tumorogeneze, zapojení do angiogeneze, dediferenciaci a do ochrany před chemoterapií a radioterapií. Tím umocňují pluripotentnost GSC a podporují růst a progresi GBM. [40] [41] [42] Hypoxie také zvyšuje transdiferenciaci GSC do buněk podobných endotelu a podporuje jejich začlenění do nádorových cév, a proto je v mnoha případech pozorována mikrovaskulární hyperplazie v těsné blízkosti pseudopalísádové nekrózy. [43] [44] Tyto změny jsou významnými prognostickými markery, jež signalizují špatnou prognózu u difuzních gliomů a jejich vysoký stupeň malignity. [25] Hypoxická/perinekrotická nika indukuje metabolické změny GSC, které umožňují jejich přežití v podmínkách s omezeným přísunem živin, expresi klidového fenotypu odolného vůči léčbě a infiltraci zdravé tkáně. [34]

Přechod mezi nádorem a zdravou tkání tvoří invazivní niku (Obrázek 3), jež představuje specifické mikroprostředí. Je zde funkční krevní síť, která usnadňuje invazi nádorových buněk do okolní zdravé tkáně. [25] Ve větší míře se zde vyskytují mikroglie, astrocyty, oligodendrocyty, GSC. [34] Buňky mají dobře vyvinutou schopnost migrovat do

okolní zdravé tkáně. Migrace a invaze GSC je podporována solubilními faktory z TME, jakými jsou např. TGF- β 1 (z angl. transforming growth factor β 1) a adenosin. TGF- β 1 je vylučován mikroglie a aktivuje receptor TGF- β 2 na GSC, čímž zvyšuje buněčnou invazi. Hypoxie podporuje extracelulární produkci adenosinu v GSC, který dále reguluje buněčnou migraci a invazi přes receptor adenosinu A3. [45] Invaze buněk GBM do okolní zdravé tkáně činí úplnou chirurgickou resekci nemožnou a je částečně zodpovědná za recidivu nádoru. [25]

Vaskulární abnormality mohou ovlivnit funkci hematoencefalické bariéry (z angl. blood-brain barrier; BBB), která je složena z endoteliálních buněk tvořících kapiláry, pericytů a astrocytů. Její správné fungování je velmi důležité, neboť odděluje mozkovou tkáň od oběhového systému, je selektivně permeabilní a reguluje tedy přenos iontů a molekul mezi tkání a krví. Díky BBB je tkáň mozku do značné míry také izolovaná od imunitního systému. Komunikace mezi CNS a imunitními buňkami je vysoce regulovaná a selektivní. [25] [46] U GBM byly s různou měrou pozorovány vyšší propustnost BBB a selhání jejích bariérových vlastností v celé její ploše. Místa BBB u GBM vyznačující se nadměrnou vaskularizací a pozměněnými vlastnostmi jsou nazývána hematoencefalická nádorová bariéra (BBTB). Změna propustnosti BBB v důsledku působení GSC a zvýšené hladiny VEGF umožňuje prosakování plazmy a tekutiny do nádorové tkáně a vyvolává intersticiální tlak a edém mozku. BBTB umožňuje transport některých látek a buněk, které přes BBB neprojdou. K nádorové tkáni GBM se tak mohou v oblastech BBTB dostat např. cirkulující imunitní buňky, imunoglobuliny nebo některá protinádorová léčiva. [25] [47]

Makrofágy asociované s nádory (z angl. tumor-associated macrophages; TAM) jsou nejčastěji se vyskytujícími zánětlivými buňkami infiltrujícími GBM, které tvoří až 30 % masy GBM. [31] [42] Jejich vysoké zastoupení je spojováno s horší prognózou. Akumulace pronádorových TAM v nikách indukuje sekreci prozánětlivých cytokinů (RAGE, COX2, NF- κ B) ve větší míře, což přispívá k progresi nádoru a životaschopnosti GSC. [31] TAM se vyskytují převážně v blízkosti CD133+ GSC kolem krevních cév a v nekrotických oblastech, což umožňuje interakce TAM s GSC. [36]

TME je velmi dynamickým prostředím, které je ovlivňováno nejen chemickými faktory jako pH nebo množství kyslíku, ale i mezibuněčnými interakcemi, buněčnými metabolickými produkty a změnami v buněčném složení. Na komunikaci mezi nádorem a okolními buňkami se podílejí cytokiny, chemokiny, enzymy a růstové faktory. Dále jsou k interakcím v extracelulárním prostředí využívány exozomy, volná DNA, nekódující RNA,

horizontální přenos DNA či mezerové spoje. Důležitý zdroj přenosu informace představují cirkulující nádorové buňky. [23]

5.1.1.2 Standardní postup léčby

Standardní terapie GBM spočívá v maximální chirurgické resekci a následné radioterapii a chemoterapii. Je podrobně popsána v Adaptovaném doporučeném postupu: Gliomy mozku – diagnostika a léčba [48] aktualizovaném v roce 2022 a dostupném v Národním portálu klinických doporučených postupů.

Radiační terapie (RT) působí přímo nebo prostřednictvím reaktivních forem kyslíku (ROS), které interagují s makromolekulami DNA, lipidů a proteinů. Buňky reagují zahájením opravných mechanismů a aktivací kinázových drah kontrolních bodů, které zpomalují buněčný cyklus, aby mohla probíhat oprava DNA. V případech, kdy je DNA nevratně poškozena, je indukována apoptóza nebo senescence nebo mitotická katastrofa a následně buňka ztrácí reprodukční schopnost. Tímto mechanismem může RT bránit nádorovým buňkám v další proliferaci. Teoreticky může být každá (nádorová) buňka usmrcena pomocí RT s dostatečnou intenzitou, která je však omezena kapacitou okolní zdravé tkáně. Nastavení dávky záření při RT je ovlivněno oběma protichůdnými faktory. Různé subpopulace nádorových buněk se mezi sebou liší v reakci na RT, GSC se řadí k méně radiosenzitivním buňkám. [26] Radiorezistence GSC je spojena se změnami v mechanismech aktivace kontrolních bodů v reakci na poškození DNA. U ozářených GSC nesoucích glykoprotein CD133 (CD133+) byla pozorována nižší aktivace kaspázy 3 a pomalejší nástup apoptózy, ve srovnání s CD133- buňkami. Po ozáření CD133+ buněk byla také pozorována v reakci na poškození DNA výrazně zvýšená aktivace několika proteinů kontrolních bodů (např. kináz Chk1, Chk2, ATM a proteinu RAD17). Navíc byla detekována u GSC nadměrná exprese genů spojených s opravnými mechanismy – *RAD51*, *BRCA1* a *BRCA2*. [49] Dalším faktorem ovlivňujícím reakci nádoru na RT je mikroprostředí a jeho interakce s GSC. [25] [27] Vzhledem k tomu, že RT působí lépe na rychle proliferující buňky, GSC v klidovém stavu jsou lépe chráněny a mohou pak způsobit recidivu. [26]

Temozolomid (TMZ) je perorální alkylační cytostatikum pro léčbu GBM a anaplastických astrocytomů užívané od roku 2005. TMZ je malá lipofilní molekula (194 Da), která prochází hematoencefalickou bariérou. Podstatou jeho účinku je navázání methylové skupiny na purinové báze do polohy N⁷ a O⁶ guaninových zbytků a N³ adeninového zbytku během replikace DNA. Alkylace guaninu/adeninu vede k nesprávnému párování bází a následně k zastavení celého buněčného cyklu v G2/M fázi

a k apoptóze. [30] [50] Výše zmíněná MGMT demethyluje mutovanou bázi O⁶-methylguanin zpět na guanin a účinně tím brání zastavení buněčného cyklu. O⁶-alkylová skupina je přenesena na aktivní místo MGMT, čímž je enzym deaktivován a poté degradován pomocí ubikvitin-proteazomového systému. [50] Aktivita MGMT zvyšuje rezistenci pacientů vůči léčbě TMZ. Někteří pacienti vykazují rezistenci vůči TMZ i přes hypermethylaci promotoru genu pro MGMT, což naznačuje, že existují další faktory ovlivňující chemoterapeutickou rezistenci (např. mikroprostředí a v něm obsažené biomolekuly). [30]

5.2 Vybrané biomolekuly

5.2.1 CD molekuly

V membránách na povrchu buněk se vyskytují molekuly s různými funkcemi, které jsou souhrnně označovány jako CD (z angl. cluster of differentiation) molekuly. Mezi nimi se nachází např. receptory, ligandy nebo adhezní molekuly (angl. cell adhesion molecule; CAM). Zastoupení CD molekul je typické pro různé typy buněk i pro jejich diferenciací a proliferační stádia a mohou být tak využívány jako markery hledaných buněk. Některé CD molekuly jsou charakteristické pro patologické stavy buněk nádorů a mohly by být cílem při léčbě za pomoci monoklonálních protilátek. [51] CD molekuly jsou obecně používány k identifikaci a izolaci kmenových nádorových buněk (z angl. cancer stem cells; CSC); např. CD44 je detekována na membránách CSC u buněk rakoviny tlustého střeva, jícnu, žaludku, slinivky, prsu, vaječnicků, prostaty, plic a mozku; CD133 je spojována s rakovinou tlustého střeva, jícnu, žaludku, slinivky, plic, vaječnicků, prostaty, jater, kůže a s gliomy. Výskyt CD molekul se u jednotlivých nádorových onemocnění liší a k jejich výzkumu je potřeba přistupovat individuálně pro daný typ nádoru. K identifikaci a izolaci CSC se používají kombinace těchto markerů charakteristických pro daný typ vyšetřovaného nádoru. [26]

5.2.1.1 Adhezní molekuly

Adhezní molekuly zvyšují přilnavost buněk, účastní se přenosu signálu mezi buňkami a podílejí se na interakci buňky s okolním prostředím. Jsou součástí procesů jak fyziologických (proliferace, signalizace, diferenciací, obnova tkání, imunitní reakce), tak i patologických (angiogeneze, zánět, metastazování). [52] [53] [54] Cytokiny mohou indukovat zvýšenou expresi adhezních proteinů a tím aktivaci příslušných buněk v signální kaskádě. Nadměrná exprese může způsobit poruchy mikrocirkulace a poškození tkání. Podle strukturních vlastností se dělí na čtyři podskupiny: integriny, kadheriny, selektiny a adhezní molekuly imunoglobulinové rodiny. [51]

5.2.1.1.1 ICAM-1 / CD54

Intercelulární adhezivní molekula (ICAM-1), patří do imunoglobulinové rodiny (IgSF), je transmembránový glykoprotein, jehož velikost se pohybuje v rozmezí 60-114 kDa v závislosti na rozsahu glykosylace. [55] Je složen celkem z pěti domén – z N-koncové dvoudoménové struktury (D1 a D2) a ze tří C-terminálních domén (D3, D4, D5). [56]

Na extracelulárním C-konci tohoto glykoproteinu dochází k interakci s jinými proteiny, hydrofobní část prochází membránou.

Gen pro ICAM-1 se nachází na krátkém raménku 19. chromozomu (19p13.2), obsahuje sedm exonů oddělených šesti introny. [57] V populaci bylo popsáno několik jednonukleotidových polymorfismů (SNP) tohoto genu, některé jsou asociovány s určitými chorobami. [58] Regulace exprese ICAM-1 probíhá buněčně specifickým způsobem a závisí na dostupnosti specifických receptorů pro extracelulární signály a požadovaných transkripčních faktorů. Transkripce genu pro ICAM-1 je regulována prostřednictvím NF- κ B, který může být indukován nejrůznějšími transkripčními faktory. Posttranskripčně může docházet k alternativnímu sestřihu a tím ke vzniku několika variant tohoto proteinu včetně jeho rozpustné formy (sICAM-1). [59]

Tyto adhezivní molekuly se vyskytují v různých typech buněk nejen imunitního systému (granulocyty a lymfocyty), ale i ve fibroblastech a endoteliálních buňkách. [60] Jejich funkce je ovlivněna různými faktory např. alternativním sestřihem, mírou glykosylace, hypoxií v mikroprostředí či molekulami miRNA. Podílejí se hlavně na migraci leukocytů z krevních cév do tkání. Ve fyziologickém stavu daných buněk jsou molekuly ICAM-1 exprimovány na povrchu buněk v nižších koncentracích. Zvýšená exprese je indukována prozánětlivými cytokiny např. tumor nekrotizujícím faktorem (TNF- α), interleukinem 1 (IL-1) a interferonem (IFN), odpověď na zvýšenou hladinu cytokinů je specifická a mění se v závislosti na typu buňky. [60] [61] Vyšší hladina ICAM-1 zesiluje imunitní odpověď a zvyšuje počet leukocytů v místě zánětu. Integriny, jež jsou exprimovány na leukocytech, interagují s první a třetí doménou molekuly ICAM-1, které obsahují potřebná vazebná místa. [62] [56] Hladina exprese ICAM-1 také roste v souvislosti s virovou infekcí, oxidačním stresem nebo kyselinou retinovou. Na druhé straně exprese ICAM-1 je inhibována glukokortikoidy. [57]

Exprese ICAM-1 hraje důležitou roli při patofyziologických stavech - ateroskleróze, autoimunitách a nádorech (např. u rakoviny plic, žaludku, žlučníku, slinivky, prsu a prostaty a také v gliomech). [52] [54] [63] U gliomů vyšších stupňů (včetně GBM) byla detekována přítomnost ICAM-1, u gliomů nižších stupňů byl ICAM-1 slabě exprimován pouze v některých případech. U většiny gliomů prvního a druhého stupně nebyla přítomnost ICAM-1 potvrzena, stejně jako nebyla nalezena ve zdravé mozkové tkáni. [64] ICAM-1 a VCAM-1 se podílejí na interakci mezi GBM a imunitními buňkami a mají klíčovou roli při adhezi rakovinných buněk k endotelu v zánětlivém mikroprostředí, kde je obecně ICAM-1 exprimován ve vyšší míře. [65] Krevní cévy přítomné v GBM jsou velmi

heterogenní a vyznačují se permeabilitou, angiogenezí a zvýšenou expresí ICAM-1, která může být dále zvyšována ionizujícím zářením. [66] [67] ICAM-1 se tak podílí na rozvoji postradiačních změn zánětlivého charakteru. [68]

Expresie ICAM-1 v GBM tkáni je též indukována tkáňovým nedostatkem kyslíku, který je typickým rysem mnoha solidních nádorů včetně GBM a ovlivňuje jejich životaschopnost. [69] ICAM-1 je také zapojen do procesu migrace a invaze buněk GBM rezistentního vůči chemoterapii. [70] Inhibice ICAM-1 snížila invazi gliomu *in vitro* i *in vivo*. [71]

Solubilní izoforma molekuly ICAM-1 (sICAM-1) je odvozena z mRNA transkriptu postrádajícího transmembránovou doménu, ale vzniká i proteolytickým štěpením membránově vázané formy. [72] Její exprese je také buněčně specifická. Tato izoforma je detekovatelná v séru zdravých jedinců, zvýšená hladina poukazuje na záněty a malignity. Rozpustné formy adhezních molekul, sICAM-1 a sVCAM-1, hrají roli v procesech buněčné proliferace i invaze nádoru a angiogeneze. [73] Vyšší hladina sICAM-1 v séru se vyskytuje u pacientů s aterosklerózou, ischemickou chorobou srdeční, s roztroušenou sklerózou, některými typy rakoviny (např. rakovina prsu a plic, kolorektální karcinom) a vypovídá o míře zánětu. V několika studiích bylo využito sledování hladiny sICAM-1 v séru jako nástroj k monitorování léčby a reakcí na léčivé látky. [55] Podle dostupných studií neléčení pacienti s GBM nevykazovali vyšší hladiny sICAM-1 v séru oproti kontrolní skupině. [74] [75] Tyto rozdíly mezi odlišnými typy nádorových onemocnění pravděpodobně reflektují rozdíly v imunitní odpovědi uvnitř a vně mozku. V dostupné literatuře nebyl nalezen dostatek dat pro zhodnocení úrovně hladiny sICAM-1 v mozkomíšním moku v souvislosti s GBM. Ionizující záření indukuje zvýšení sICAM-1 v mikroprostředí GBM i v séru a expresi ICAM-1 v exponovaných buňkách. [59] [76]

V několika experimentech byly zkoumány rozličné látky a jejich vliv na expresi (s)ICAM-1 v GBM buněčných liniích. V buňkách vystavených expozici interleukinu-1 β (IL-1 β) byla pozorována zvýšená hladina ICAM-1 následována zvýšenými interakcemi mezi GBM buňkami a monocyty, které ovlivňují progresi nádoru. Množství sICAM-1 v GBM mikroprostředí také rostlo v závislosti na expozici IL-1 β . [77] IL-1 β je jeden z hlavních cytokinů v zánětlivém mikroprostředí nádoru. V GBM buněčné linii U-87 MG byla potvrzena přítomnost ICAM-1 v jádře a cytoplasmě, hladina exprese korelovala s koncentrací přidané all-trans-retinové kyseliny (ATRA). [78] Na druhé straně antiangiogenní cytostatikum tivozanib snížilo hladinu exprese ICAM-1 a tím i adhezivní schopnost GBM buněk. [79] Léčebně podávaný melatonin inhiboval IL-1 β indukovanou

expresi ICAM-1 a VCAM-1 v závislosti na dávce. Léčba melatoninem pravděpodobně přeruší interakci mezi endoteliálními buňkami a neutrofilny zprostředkovanou ICAM-1. [80]

Studie ukazují, že ICAM-1 napomáhá invazi a migraci GBM buněk a je tedy považován za pronádorovou molekulu. [70] U karcinomu plic, žaludku, prsu a dutiny ústní se tato molekula také podílí na podpoře rakovinového bujení. Na druhé straně, zvýšená exprese ICAM-1 detekovaná u kolorektálního karcinomu a Non-Hodgkinova lymfomu korelovala s příznivější prognózou. [55] [81] [82] [83] [84]

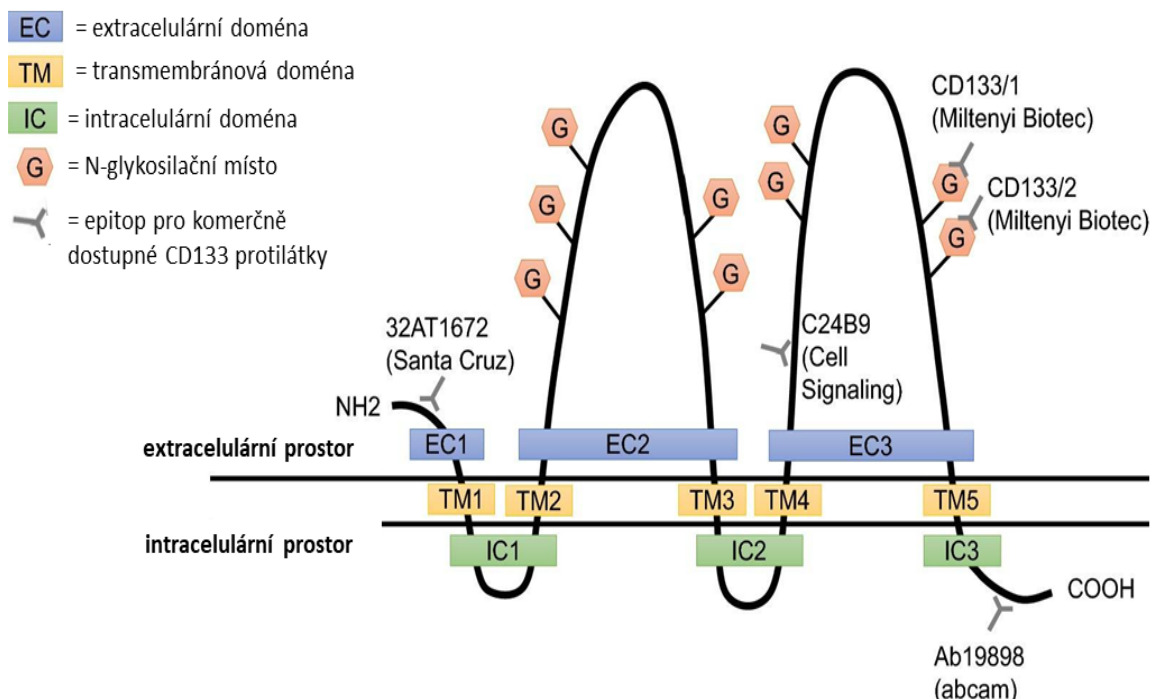
5.2.1.2 Prominin-1 / CD133

Prominin-1, známý jako CD133, je exprimován v kmenových buňkách včetně CSC a v epiteliálních buňkách mnoha tkání např. mléčné žlázy, varlat, placenty, průdušnice a trávicího traktu. Důležitou úlohu má také ve fotoreceptorových buňkách, na bičících spermii během spermatogeneze a v diferenciaci neuroepiteliálních buněk. Jeho exprese je dávana do souvislosti s některými onkologickými onemocněními např. rakovinou žaludku, prsu, vaječníku, plic, slinivky, prostaty, s melanomem a s gliomy. [85]

Prominin-1 (CD133) je transmembránový glykoprotein, kterého tvoří tři extracelulární N-terminální domény, tři intracelulární C-terminální domény a pět transmembránových domén (Obrázek 4), jež ho rozdělují na dvě velké extracelulární a dvě malé intracelulární smyčky. V extracelulárních smyčkách obsahuje devět N-glykosylačních míst a v závislosti na míře glykosylace se výsledná velikost proteinu pohybuje v rozmezí 70-120 kDa. Glykosylace mění celkovou terciární strukturu a stabilitu CD133. [86]

CD133 se vyskytuje v membránových strukturách apikálních buněčných povrchů např. v mikrokľkách a v stereocíliích. V interakci s lipidovými rafty (membránové mikrodomény bohaté na cholesterol, sfingolipidy a gangliosidy) je součástí organizace buněčné membrány a signalizace. [85] Mimo membránu byl detekován především v jádrech nádorových buněk např. karcinomu prsu, kolorektálním karcinomu a nemalobuněčném karcinomu plic. [85] [87]

Obrázek 4: Struktura promininu-1 / CD133. Převzato a upraveno z [86].



Gen *PROM1* se nachází na krátkém raménku 4. chromozomu (4p15.32), obsahuje 34 exonů a pět alternativních promotorových sekvencí (P1-P5), které kódují různé izoformy. [88] P1-P3 jsou lokalizovány v oblasti CpG ostrůvku a jejich aktivita je ovlivněna methylací, která nepřímo koreluje s množstvím mRNA CD133 v různých rakovinových buněčných liniích. Methylace promotorů by mohla vysvětlit ztrátu povrchové exprese v diferenciovaných buňkách a mohla by posloužit jako potenciální epigenetický biomarker pro stanovení prognózy a léčby. Hypoxické mikroprostředí prostřednictvím HIF-1 α zvyšuje expresi OCT4 a SOX2, které jsou přímo spojeny s P1 a zvyšují tak expresi CD133 v rakovinných buněčných liniích. [89] Změna exprese CD133 byla pozorována i v závislosti na inhibici enzymů podílejících se na modifikaci histonů. [89] Alternativním sestřihem může vzniknout i více než 28 variant proteinu CD133, jednotlivé varianty jsou tkáňově specifické a mohou plnit mírně odlišné funkce. [90] Nadto glykosylace zvyšuje počet možných variant CD133 a ztěžuje proces identifikace tohoto proteinu. [89]

Navzdory ne zcela jasné funkci CD133 byl tento protein nalezen u více typů nádorů. To svědčí o tom, že suprese CD133 indukuje změnu lokalizace β -kateninu, jehož aktivita v signální dráze Wnt je pak snížena. [86] Tato dráha hraje důležitou roli při sebeobnově

a diferenciaci CSC. [91] Řada studií prokázala, že CD133 úzce koreluje s velikostí nádoru, horší prognózou, vyšší mírou metastáz do lymfatických uzlin a rezistencí vůči terapii. [90]

CD133 je využíván pro identifikaci a izolaci kmenových buněk z rozličných tkání (kostní dřeň, mozek, ledviny, prostata, játra, slinivka, kůže) i CSC (rakovina prostaty, slinivky, plic, tlustého střeva, vaječníků). [89] Představuje jeden z hlavních markerů pro izolaci populace CSC především z gliomů a melanomů. Kvůli velkému množství variant CD133 je v některých případech identifikace CSC použita kombinace více markerů. Většina studií dokazuje, že buňky CD133+ se podílejí na iniciaci nádorů, kdežto buňky CD133- tyto vlastnosti postrádají. [90] Molekula CD133 může být maskována a buňky CD133- pak vykazují stejný účinek jako buňky CD133+. Toto zkreslení je způsobeno rozdílnou glykosylací, alternativním sestřihem, epigenetickými modifikacemi či mikroprostředím nádoru. [89]

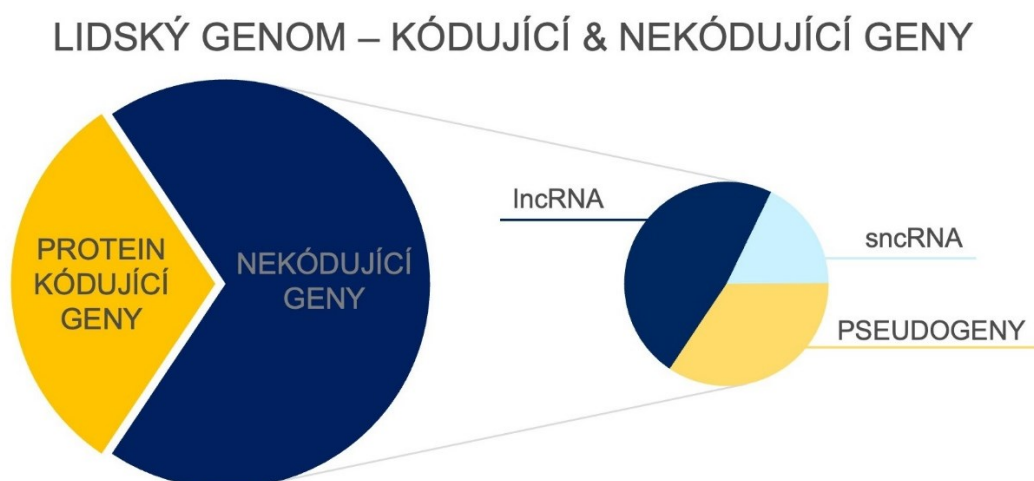
Pro identifikaci molekuly CD133 imunohistochemickými metodami a průtokovou cytometrií je zapotřebí specifické protilátky. Míra glykosylace ovlivňuje interakci mezi CD133 a danou protilátkou. Dva glykosylované epitopy, které jsou nejčastěji využívány, mohou být nedostupné pro danou interakci v důsledku rozdílné glykosylace nebo alternativního sestřihu. Dochází i ke křížovým reakcím mezi protilátkou a jinými podobnými glykosylovanými oblastmi. [86] Výsledkem je, že jednotlivé protilátky nejsou schopny rozeznat všechny sestřihové a glykosylační varianty a může tedy docházet při experimentech k nekonzistentnosti výsledků. [90]

Exprese CD133 koreluje s klinicko-patologickými parametry u gliomů a zvyšuje se se stupněm malignity. [91] U pacientů s GBM je vysoká exprese CD133 spojována s horší prognózou a také recidivou. [87] [92] V neposlední řadě může CD133 regulovat expresi VEGF a tím se podílet na neovaskularizaci a angiogenezi a podporovat tak progresi GBM. [85]

5.2.2 Nekódující RNA

V lidském genomu bylo identifikováno přes 20 000 genů (Obrázek 5) a více než 100 000 transkriptů, které nejsou dále translatovány a nekódují proteiny. [3] Nekódující RNA (ncRNA) jsou velkým heterogenním souborem funkčních molekul RNA, které jsou transkribovány z různých míst v celém genomu. I když nejsou translatovány do proteinů, mají důležitou roli v buněčných fyziologických procesech a v regulaci genové exprese. Důležitost nekódujícího transkriptomu potvrzuje přímá korelace mezi podílem ncRNA v genomu organismu a jeho vývojovou složitostí. [93] [4]

Obrázek 5: Rozložení kódujících a nekódujících genů v lidském genomu podle ENCODE Release verze 45 [94]. LncRNA – dlouhé nekódující RNA, sncRNA – krátké nekódující RNA.



Na základě jejich funkce se ncRNA dělí na dvě skupiny – provozní (housekeeping) ncRNA a regulační ncRNA. Do první skupiny patří molekuly ncRNA, které jsou transkribovány ve všech buňkách stejným způsobem a řadí se k nim např. ribozomální RNA (rRNA), transferová RNA (tRNA) a malé jaderné RNA (snRNA). Molekuly RNA s regulační funkcí ovlivňují nejen expresi genů kódujících proteiny, ale i jiné molekuly RNA. Na základě délky transkriptu jsou děleny na krátké a dlouhé nekódující RNA (lncRNA). Krátké nekódující RNA se vyznačují délkou pod 200 nukleotidů a patří k nim např. malé interferující RNA (siRNA), mikroRNA (miRNA) a další podskupiny, které se liší délkou a funkcí. Transkripty o délce větší než 200 nukleotidů patří do velké skupiny lncRNA. [4] [95] Jejich celkový počet stále stoupá díky citlivějším metodám detekce a je větší než součet všech genů kódujících proteiny. [96]

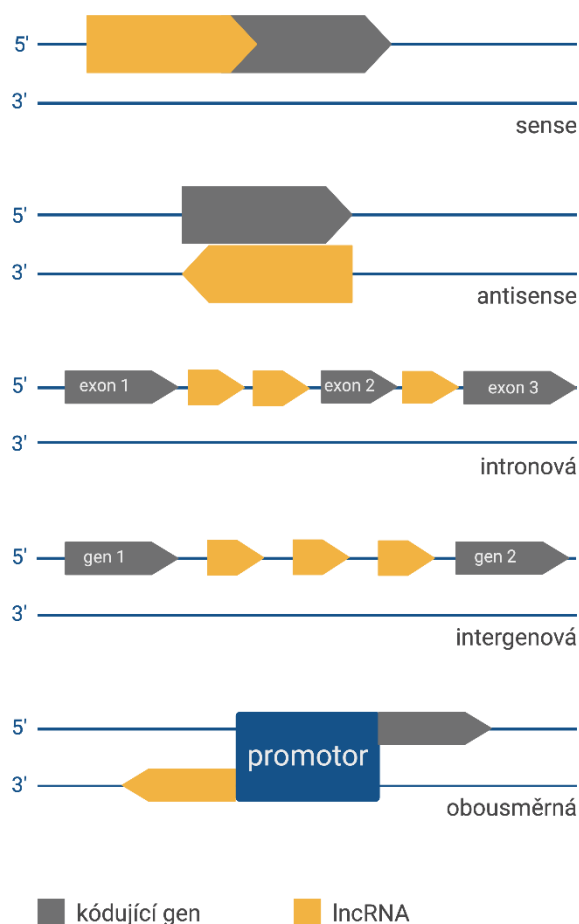
5.2.2.1 Dlouhé nekódující RNA

Molekuly lncRNA jsou velmi heterogenní a liší se délkou transkriptu (od 200 nukleotidů výše), svojí funkcí, umístěním v genomu a lokalizací v buňkách či tkáních. Obvykle jsou transkribovány polymerázou II a následně může docházet k posttranskripčním úpravám. Svojí funkcí se zapojují do mnoha buněčných procesů včetně diferenciaci a regulace exprese mnoha genů, ovlivňují i epigenetické mechanismy. [4] [95] [97] V buňkách byly detekovány v jádře, jadérku, cytoplazmě i v mitochondriích. [3] Existují důkazy o propojení některých lidských chorob včetně rakoviny s mutacemi a dysregulacemi lncRNA, což z lncRNA molekul dělá potencionální terapeutické cíle a biomarkery hůře diagnostikovatelných onemocnění. [3]

Sekvence, z kterých jsou lncRNA přepisovány, se mohou vyskytovat téměř kdekoli v lidském genomu. Na základě jejich umístění v genomu lze molekuly lncRNA rozdělit do několika větších skupin (Obrázek 6). Sekvence pro intronové lncRNA se nacházejí v intronech genů kódující protein, intergenové lncRNA (lincRNA) v oblasti mezi dvěma kódujícími geny, enhancerové lncRNA (elncRNA) jsou lokalizovány v enhancerových oblastech genů kódujících proteiny. Sekvence pro lncRNA mohou být lokalizovány i v oblastech DNA, kde se vyskytují geny kódující proteiny. Mohou se překrývat jak s exonovou, intronovou či oběma částmi genu, tak mohou překrývat celou sekvenci genu kódujícího protein. Sekvence pro lncRNA mohou být lokalizovány na obou vláknech DNA a transkribovány oběma směry. Genomové sekvence mohou být v rámci těchto transkripčních jednotek sdíleny nejen s kódujícími oblastmi ale i mezi sebou v sense i antisense směru. [3] [98]

Tyto sekvence jsou ve většině případů transkribovány RNA polymerázou II, výjimečně RNA polymerázou I nebo III. [99] Vzniklé transkripty mohou být posttranskripčně modifikovány běžným způsobem včetně navázání 7-methylguaninu na 5' konci, polyadenylace na 3' konci nebo sestřihu primárního transkriptu. [96] [97] Zpětným sestřihem transkriptu mohou vzniknout cirkulární RNA (circRNA), které jsou dalším podtypem lncRNA. Tvoří kovalentně uzavřené smyčky a jsou rezistentní vůči nukleázám. Byly detekovány v krvi i moči, což z nich činí potencionální biomarkery. Některé jsou spojovány s rakovinou hrtanu, žaludku, močového měchýře, jícnu a s gliomy. [97] [98]

Obrázek 6: Typy dlouhých nekódujících RNA (lncRNA) podle jejich lokalizace v genomu. Vytvořeno podle [100] pomocí Biorender.com.



Exprese lncRNA je vysoce specifická, rozdíly byly detekovány mezi rozdílnými tkáněmi i buňkami, při patofyziologických stavech či v závislosti na cirkadiálních rytmech. [97] [101] Skutečnost, že lncRNA vykazují výrazně vyšší stupeň tkáňové specifity ve srovnání s geny kódujícími proteiny, přispívá k teorii o lncRNA jako regulátorech genové exprese ve specifických typech buněk. [4] Nejvíce různých typů lncRNA bylo nalezeno v mozku, který je složen z velkého množství různých typů buněk, které vyžadují složitý regulační systém. Ten je ovlivňován lncRNA, které mají důležitou roli při vývoji, udržování neuronů a ovlivňují funkčnost. Soubor lncRNA lidské mozkové tkáně se od primátů odlišuje výrazněji než kódující geny, velikost tohoto souboru koreluje s vývojovou složitostí organismu. [4]

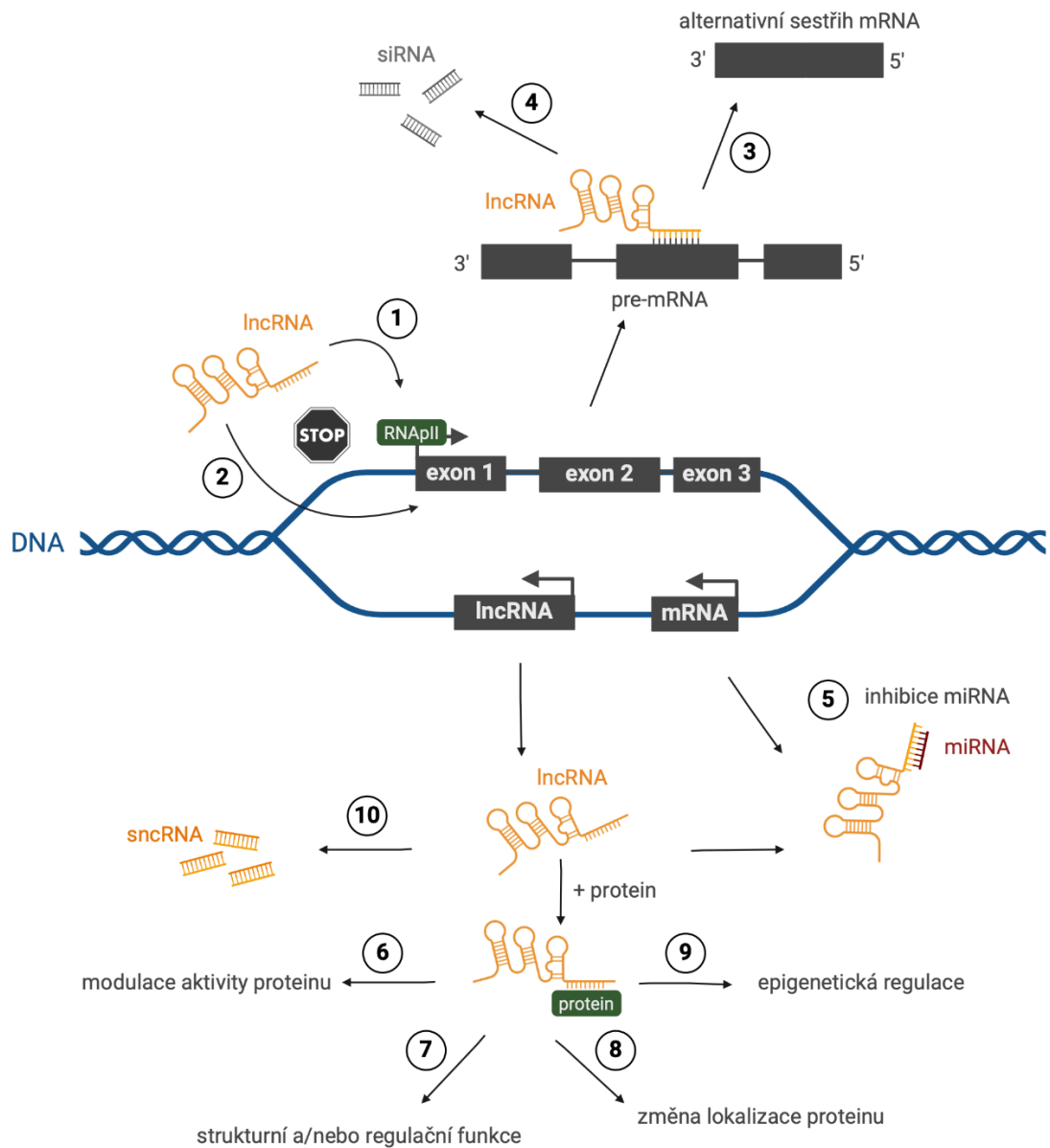
Dosavadní výzkumy dosvědčují zapojení lncRNA do téměř všech procesů regulace genové exprese (Obrázek 7), včetně inaktivace chromozomů, imprintingu, dynamiky chromatinu, modifikací proteinů a stability nukleonových kyselin. [102] Exprese lncRNA

může být ovlivněna různými faktory včetně prostředí, stresu a patofyziologickým stavem buňky. Geny pro lncRNA mohou podléhat epigenetickým modifikacím např. metylaci promotoru. [103]

U velkého množství lncRNA není přesná funkce dosud známa, podle lokalizace lncRNA lze predikovat její pravděpodobnou úlohu v buňce. Transkripty, které zůstávají v jádře, se podílejí na regulaci genové exprese, modifikaci chromatinu a imprintingu. Ty, které jsou transportovány do cytoplasmy, se účastní sestřihu mRNA, regulace translace, mohou být i prekuzory po sncRNA. [104]

Regulaci buněčných procesů lncRNA ovlivňují za pomoci interakcí RNA-RNA, RNA-DNA, RNA-protein a tvorbou větších komplexů. S DNA mohou tvořit heteroduplexy nebo triplexy (RNA-DNA-DNA) a regulovat genovou expresi *in cis* i *in trans*. *Cis* působící lncRNA (např. Xist) regulují expresi sousedních genů, *trans* působící lncRNA (např. HOTAIR) regulují expresi genů na větší vzdálenosti i na jiných chromozomech. K interakci mezi lncRNA a cílovými molekulami dochází nejen na základě sekvence a párování bází ale i za pomoci strukturního rozpoznávání. Díky své délce lncRNA mohou tvořit složité sekundární a terciární struktury, prostřednictvím kterých mohou interagovat s různými proteiny, regulátory, sekvencemi DNA i RNA. Tyto struktury také ovlivňují mechanismus účinku daných lncRNA a jejich stabilitu. [105]

Obrázek 7: Schématické znázornění vlivu dlouhých nekódujících RNA (lncRNA) na expresi genů (vytvořeno podle [106] pomocí Biorender.com). Molekuly lncRNA mohou ovlivňovat genovou expresi několika možnými způsoby: Molekuly lncRNA ovlivňují expresi inhibicí polymerázy II (1) nebo remodelací chromatinu (2). Hybridizují s pre-mRNA, obsazují jejich sestřihová místa a indukují tak alternativní sestřih primárního transkriptu (3). Vzniklý duplex může interagovat s endoribonukleázou Dicer za vzniku endogenních siRNA (4). LncRNA vazbou k mikroRNA způsobují jejich umlčení (5). Spojením se specifickým proteinem lncRNA regulují jeho aktivitu (6), jsou zapojeny do strukturálních a organizačních rolí buňky (7), mění umístění proteinu (8) a v neposlední řadě ovlivňují epigenetické procesy (9). Z lncRNA mohou také vzniknout krátké nekódující RNA (10). [42] lncRNA – dlouhé nekódující RNA; siRNA – malé interferující RNA; RNAPII – RNA polymeráza II; sncRNA – krátké nekódující RNA; miRNA – mikroRNA.

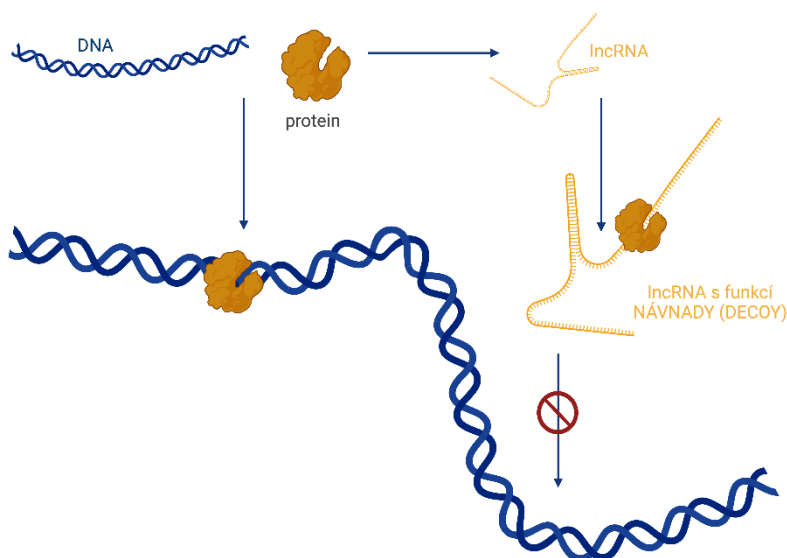


Existují čtyři základní molekulární mechanismy, jakými lncRNA mohou interagovat s okolními biomolekulami:

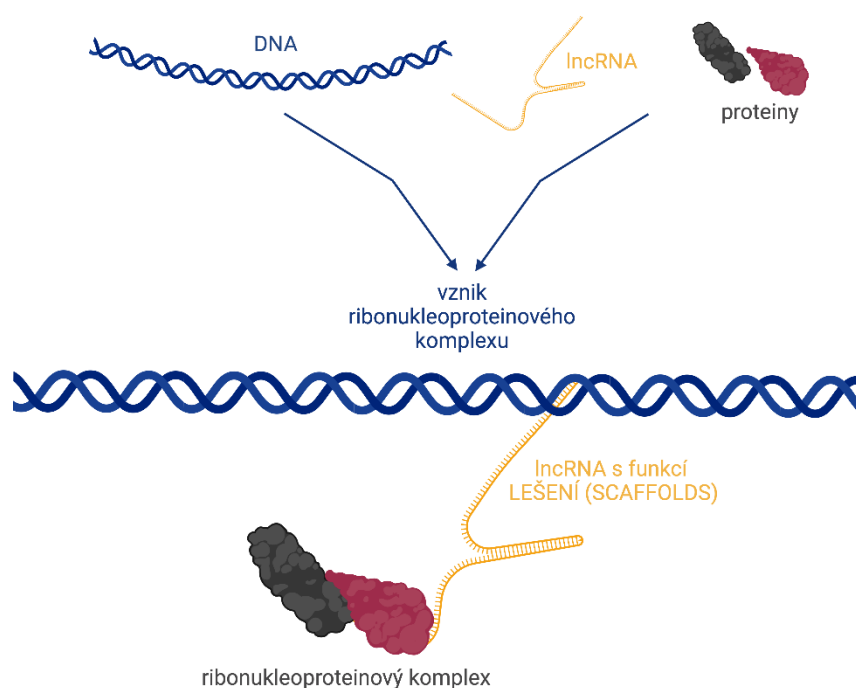
1. Signály (angl. Signals) – Tyto lncRNA jsou transkribovány na konkrétním místě v konkrétní čas. Jejich transkripce, která je specifická pro určitý buněčný typ, indukuje aktivní signální událost.
2. Návnady (angl. Decoys) – Transkripty lncRNA slouží jako návnady pro cílové proteiny, jejich navázáním je obsazeno vazebné místo a proteiny nemohou interagovat s DNA. (Obrázek 8) Takto mohou interagovat s transkripčními faktory, represory, modifikátory chromatinu i jinými proteiny. Mohou také interagovat s některými miRNA. (Obrázek 9) Dané lncRNA pak působí jako tzv. houba (angl. Sponge) pro vybrané miRNA, tj. lncRNA se naváže na miRNA a tím blokuje její působení.
3. Průvodci (angl. Guides) – Tyto molekuly lncRNA řídí umístění ribonukleoproteinových komplexů na konkrétní cílová místa. (Obrázek 10)
4. Lešení (angl. Scaffold) – Transkripty fungují jako lešení pro další molekuly, které se mohou navázat na danou lncRNA a vytvořit tak ribonukleoproteinový komplex. (Obrázek 11)

Na základě těchto mechanismů nelze striktně rozdělit lncRNA do čtyř skupin, protože poměrně velká část lncRNA využívá k regulaci buněčných procesů více než jeden z výše popsaných mechanismů a mohou tak vykonávat více funkcí. [98] [107]

Obrázek 8: LncRNA s funkcí návnady (Decoy). Transkripty lncRNA slouží jako návnady pro cílové proteiny, jejich navázáním je obsazeno vazebné místo a proteiny nemohou interagovat s DNA. Vytvořeno pomocí Biorender.com.



Obrázek 11: LncRNA s funkcí lešení (Scaffolds) fungují jako lešení pro další molekuly, které se mohou navázat na danou lncRNA a vytvořit tak ribonukleoproteinový komplex. Vytvořeno pomocí Biorender.com.



Molekuly lncRNA provázejí téměř všechny pochody v buňce, jsou zapojeny do jejího růstu, vývoje i diferenciace. Jsou zapojeny v mnoha signálních drahách včetně p53, účastní se procesu produkce růstového hormonu, metabolismu glukózy, exprese cytokinů, V(D)J rekombinace imunitních buněk i zánětu. [99] Mutace nebo změněné exprese lncRNA mohou způsobit patofyziologické změny a jsou spojovány nejen s nádorovými onemocněními a genetickými chorobami (např. fenylketonurie). Přestože určení přesné funkce dané molekuly lncRNA je složité (změna v expresi ve většině případů nezpůsobí výraznou fenotypovou změnu a nelze tak snadno propojit danou molekulu s funkcí), některým lncRNA byla na základě studií přiřčena onkogenní (MALAT1, PCA3, HOTAIR, H19, ...) nebo tumor supresorová schopnost (GAS5, MEG3, TERRA a další). [99] [98] Některé lncRNA mohou vykazovat protichůdné vlastnosti v závislosti na typu rakoviny. Molekuly lncRNA jsou specificky exprimovány u určitých typů rakoviny a některé z nich mohou být detekovány v krvi nebo v moči. S ohledem na poměrně velké množství různých typů lncRNA a jejich velkou tkáňovou specifitu se lncRNA zdají být vhodným biomarkerem. Dobrým příkladem může být lncRNA PCA3, jejíž zvýšená exprese je typická pro rakovinu prostaty a může být spolu s dalšími lncRNA MALAT1 a lncRNA-p21 detekována

neinvazivně v moči. Bylo dokázáno, že hladiny exprese některých lncRNA specifických pro daný typ rakoviny korelují s její agresivitou, stádiem, metastázemi či prognózou. [98] [108] Jsou také spojovány s rezistencí vůči terapii a následnou recidivou nádoru. [109]

Vzhledem k velkému množství typů lncRNA ve zdravé mozkové tkáni a intratumorální heterogenitě GBM tkáně, je nutné vzít v úvahu tyto transkripty při hledání nových léčebných postupů. Studie ukazují spojitost mezi molekulami lncRNA (Tabulka 1; strana 47) a mnoha procesy, které jsou zapojeny do vzniku a růstu GBM. Transkripty lncRNA jsou zapojeny do proliferace (TUG1), apoptózy buněk, imunitních procesů (DGCR5), migrace buněk, angiogeneze (H19), genomové nestability nádorových buněk, změn metabolismu nádorové tkáně, multipotence nádorových buněk a do reakcí na poškození DNA. Mohou interagovat přímo nebo skrze miRNA, za pomoci methylace nebo ovlivňují modifikaci chromatinu. [109] Regulační roli mají lncRNA také v mikroprostředí GBM, kde mohou působit na cytokiny a růstové faktory. [110] Molekuly lncRNA ovlivňují rakovinné kmenové buňky a podílejí se tak na tumorogenezi a recidivě a rezistenci vůči terapii. [109] Terapie zacílená na lncRNA by mohla v budoucnu pomoci s léčbou primárního i recidivujícího GBM. [109]

Profily exprese různých lncRNA v resekované tkáni mohou sloužit k určení stupně gliomu a k jeho podtypu. [111]

V séru pacientů byly nalezeny vyšší hladiny lncRNA ANRIL, HOTAIR, LINC00641, LINC00565, MALAT1, SAMMSON, a snížená hladina GAS5 ve srovnání se zdravými kontrolami, tyto lncRNA se mohou stát potencionálním diagnostickým biomarkerem. [2] [112] [113] [114] [115] [116] [117] S ohledem na nedostupnost tkáňových vzorků pro účely včasné diagnostiky a nejednoznačnosti zobrazovacích technik v časných stádiích onemocnění, poskytuje hodnocení profilu exprimovaných lncRNA v séru pacientů neinvazivní metodu pro časnou detekci tohoto zhoubného nádoru, která by mohla zvýšit úspěšnost léčby.

5.2.2.1.1 PARTICL

Mezi lncRNA patří molekula PARTICL (z angl. Promoter of MAT2A-Antisense Radiation Induced Circulating Long non-coding RNA), která je zapojena do regulace exprese několika dalších molekul. Gen pro tuto molekulu je lokalizován na krátkém raménku druhého chromozomu (2p11.2) v promotoru genu *MAT2A*, který kóduje podjednotku methioninadenosyltransferázy (MAT) a skrze adenosylmethionin (SAM) se podílí na

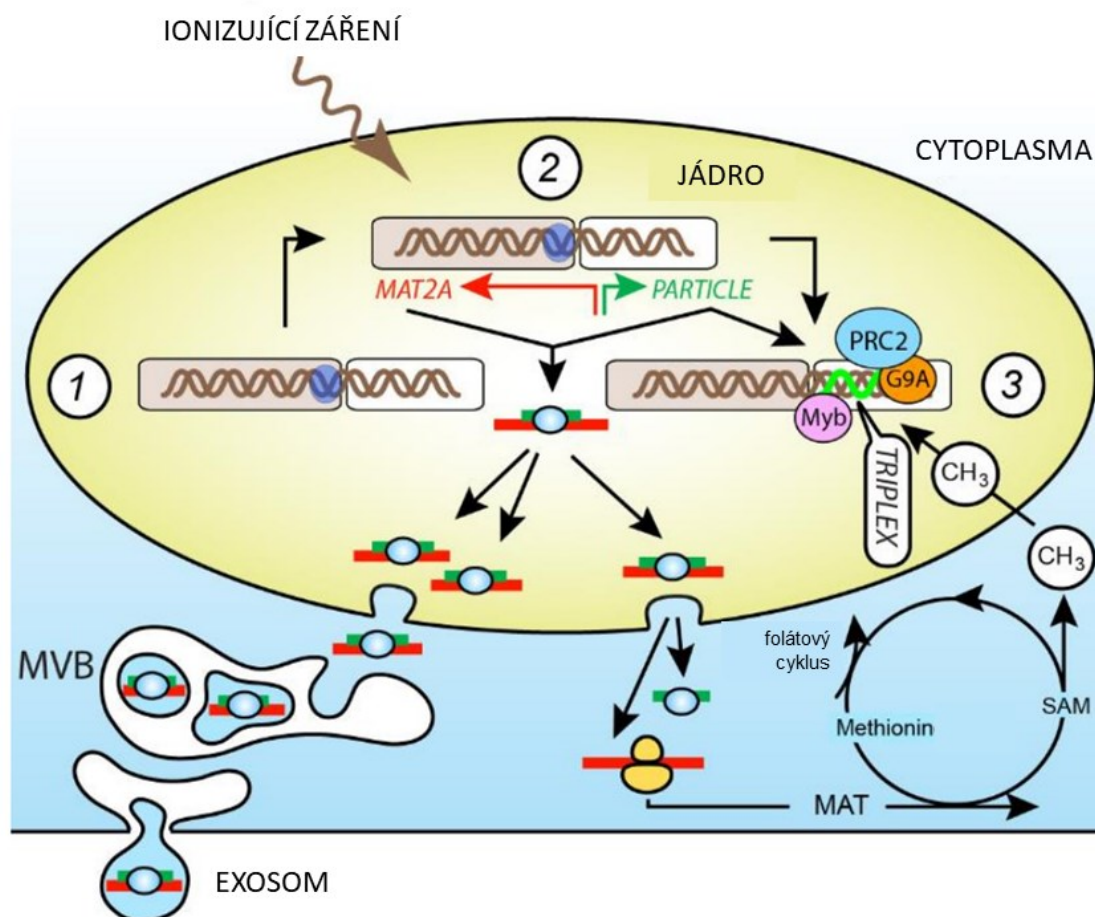
dostupnosti methyly v buňce. PARTICL je transkribován na 1432 bp dlouhý transkript, jehož přítomnost byla potvrzena analýzou EST ve všech normálních lidských tkáních, s nejvyšší hladinou ve štítné žláze a s nejnižší hladinou v mozku. [118]

Jako některé jiné lncRNA (např. MEG3) se PARTICL může účastnit specifické interakce s dvoušroubovicí DNA a vytvořit tak tzv. triplex (RNA-DNA-DNA), kdy se jednovláknová molekula lncRNA spojí s dvoušroubovicí v jejím velkém žlábků a tento komplex je stabilizován tvorbou Hoogstenových vazeb mezi molekulou lncRNA a vláknem DNA. [119] [120] Triplexová místa, kam se PARTICL může navázat, byla nalezena v mnoha různých genech a vybrané lncRNA mohou skrze tvorbu triplexu regulovat expresi některých genů. Nejvíce prostudovány jsou regulační mechanismy založené na tvorbě triplexu u zpětnovazebné regulace *MAT2A* a tumor supresorového genu *WWOX*, který je lokalizován na šestnáctém chromozomu ve fragilní oblasti *FRA216D* a je zapojen do regulace buněčných procesů nezbytných pro karcinogenezi. U pacientů s GBM je pozorován pokles exprese tohoto genu. Skutečnost, že nadměrná exprese *WWOX* je spojena se zvýšenou radiosenzitivitou GBM buněk dosvědčuje tumor supresorovou funkci *WWOX*. Hladina exprese tohoto genu je regulována některými cirkulujícími lncRNA např. PARTICL a CircMTO1. [121] Aktivita promotoru genu *WWOX* je inhibována zvýšenou hladinou PARTICL. [120]

Zvýšená hladina PARTICL byla popsána u několika lidských buněčných linií po vystavení působení nízkých dávek záření (0,25 Gy) v návaznosti na zvýšení exprese *MAT2A*. (Obrázek 12) *In vivo* byla přechodně zvýšená hladina exprese PARTICL detekována v závislosti na expozici nízkých dávek záření v rozličných tkáních, v maligní tkáni ve vyšší úrovni oproti zdravé kontrolní tkáni. Zvýšené hladiny PARTICL byly také pozorovány v plazmě pacientů po radiační terapii. [120] [122] [123] [124] [125]

Prozatímni výsledky ukazují, že jedna z možných úloh cirkulující lncRNA PARTICL spočívá v negativní regulaci tumor supresorových genů. [78] [120] [123] [126] Na základě dosavadních studií lze říci, že zapojení PARTICL do buněčných procesů je komplexní a jeho exprese může ovlivňovat chování GBM na několika úrovních, stejně tak jeho exprese a závislé geny může být ovlivněna více rozličnými faktory. Přesné mechanismy působení a důsledky je potřeba dále zkoumat, neboť PARTICL hraje důležitou roli v methylaci a tím ovlivňuje epigenetické mechanismy, které jsou podstatné nejen v procesu karcinogeneze.

Obrázek 12: Expresa lncRNA PARTICL po expozici nízkých dávek záření. Převzato a upraveno z [124]. MAT2A – methionin-adenosyltransferáza; MAT – podjednotka MAT2; SAM – S-adenosyl-methionin; PRC2 – polycomb represivní komplex 2; G9A – lysin DNA methyltransferáza; MVB – multivezikulární tělíska



5.2.2.1.2 GAS5

Další lncRNA, která je spojována s mnoha typy nádorových onemocnění, je GAS5 (z angl. Growth Arrest Specific 5). Snížená exprese této tumor supresorové lncRNA je detekována u různých typů rakoviny včetně karcinomu mléčné žlázy, rakoviny prostaty i vaječnicků a děložního čípku, kolorektálního karcinomu, rakoviny žaludku, ledvin, močového měchýře, plic, slinivky, endometria, ledvin, dále také u melanomu, osteosarkomu, neuroblastomů a gliomů. [127] GAS5 se přirozeně hromadí v buňkách po zástavě růstu, která je vyvolána např. nedostatkem živin. GAS5 ovlivňuje progresi buněčného cyklu a je nezbytný pro normální zastavení buněčného růstu. Vysoké hladiny exprese GAS5 inhibují progresi buněčného cyklu, zatímco snížená exprese GAS5 snižuje apoptózu a podporuje zrychlené dělení buněk. [127]

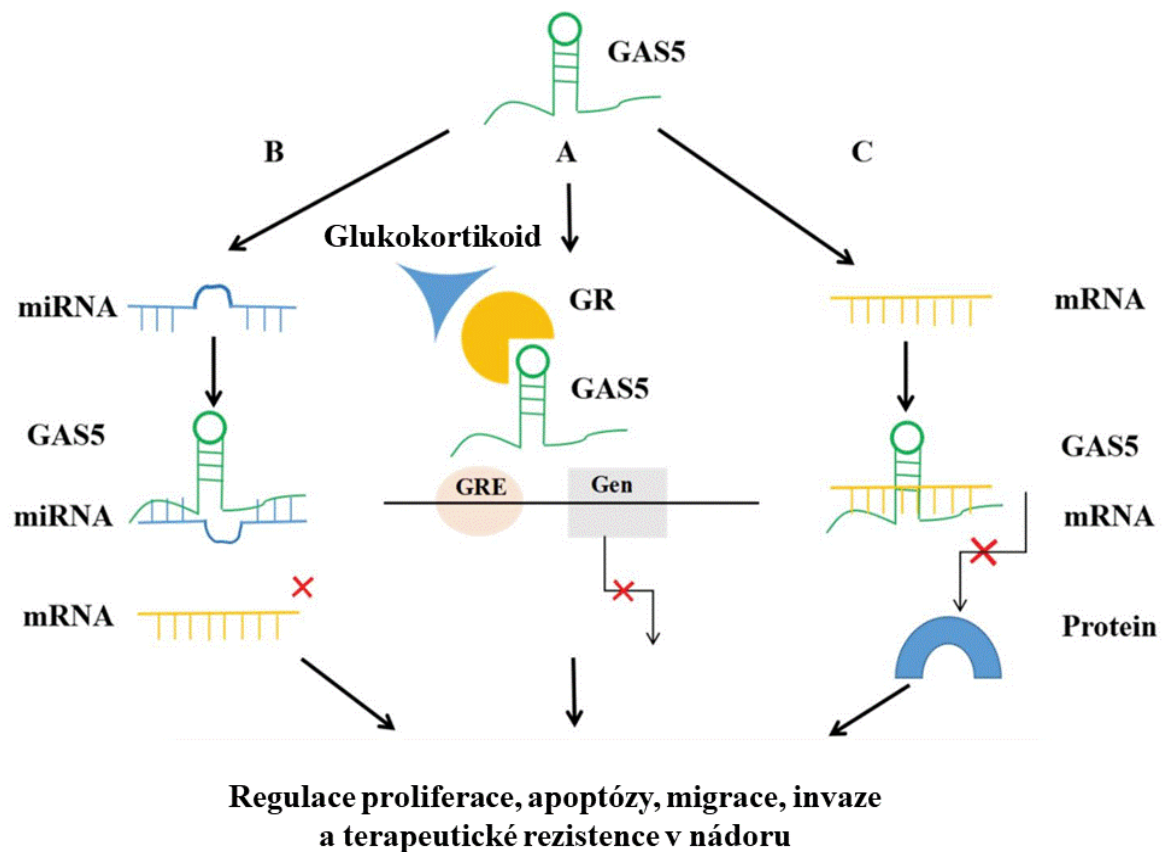
Gen *GAS5*, který byl poprvé popsán v roce 1988, je lokalizován na 1q25.1 a obsahuje 12 exonů s krátkými čtecími rámci a 11 intronů. [128] [129] Kromě lncRNA kóduje malé jaderné RNA (snoRNA), miRNA a PIWI-interagující RNA a krátký peptid (50 aminokyselin). Díky přítomnosti alternativních 5'-sestřihových míst v sedmém exonu mohou vzniknout dvě varianty lncRNA *GAS5a* a *GAS5b*. Gen obsahuje sedm nukleotidů dlouhou 5' oligopyrimidinovou sekvenci, která může působit jako *cis* regulační motiv. [130] Gen *GAS5* je vysoce polymorfní. [130] Některé *in/del* polymorfismy v genu *GAS5* (např. rs145204276) ovlivňují transkripci a funkčnost dané lncRNA buněčně specifickým způsobem a jsou spojovány s náchylností a progresem rakoviny. [131] [132] *GAS5-antisense-1* je transkript kódovaný na opačném řetězci, který je považován za tumor supresor ve spojitosti s nemalobuněčným karcinomem plic. [133]

GAS5 ve své sekundární struktuře se vyznačuje schopností přímo interagovat s DNA vazebnou doménou glukokortikoidního receptoru v reakci na fyziologický stres např. nedostatek živin. (Obrázek 13A) Tato skutečnost ovlivňuje interakci mezi DNA vazebnou doménou glukokortikoidního receptoru glukokortikoidními responzivními elementy – specifické palindromové sekvence DNA lokalizované v promotorech cílových genů. *GAS5* tak jako kompetitivní inhibitor tohoto receptoru může regulovat apoptózu. Komplementární sekvence obsažené v *GAS5* mohou interagovat i s některými jinými receptory pro steroidní hormony např. androgenním a progesteronovým receptorem. V buňkách rakoviny prostaty byla nalezena mutace těchto komplementárních sekvencí, díky které *GAS5* nemůže interagovat s androgenním receptorem. [134]

Byly popsány tři mechanismy, kterými se *GAS5* zapojuje do signálních drah a buněčných procesů. *GAS5* může sloužit jako signální molekula a může být velmi rychle transkribována jako ostatní molekuly lncRNA. Po specifické transkripci, která je aktivována danými spouštěcími mechanismy, se účastní přenosu signálu v řadě důležitých buněčných procesů. V buňkách lidské kolorektální tkáně je lncRNA *GAS5* zapojena do aktivace signální dráhy p53 skrze snoRNA a podílí se tak přímo na její regulaci. [129] *GAS5* může být také návnadou (angl. Decoys; strana 37) a umlčet svým navázáním některé další biomolekuly. (Obrázek 13B, Obrázek 13C) Kromě výše popsaného mechanismu s vazebnou doménou glukokortikoidního receptoru se *GAS5* váže např. na miR-21 (jedna z nejvíce studovaných onkogenních miRNA spojovaných se solidními nádory včetně GBM), čímž zabraňuje jejímu inhibičnímu navázání na tumor supresorové geny *PTEN* a *PDCD4*

a zvyšuje tak jejich expresi. [129] Mezi další miRNA spojenými s gliomy, u kterých byla pozorována interakce s GAS5, patří např. miR-222, miR-196a-5p, miR-10b, miR-18a-5p a miR-34a. [135] [136] [130] Tímto způsobem GAS5 brání represí tumor supresorových genů zapojených do inhibice buněčné proliferace, migrace, invaze a podpory buněčné apoptózy u některých nádorových onemocnění, jako je kolorektální karcinom, karcinom prsu a renální karcinom a také u buněčných linií včetně GSC. Dalším zdokumentovaným mechanismem působení GAS5 je transportní funkce, která může pomáhat navádět (strana 37) další biomolekuly ke specifickým místům v buňce, např. transkripční faktor E2F1 na promotor genu pro inhibitor cyklin-dependentní kinázy 1. [129]

Obrázek 13: Tři mechanismy působení lncRNA GAS5. Převzato a upraveno z [128]. GR– glukokortikoidní receptor; GRE – glukokortikoidní responzivní elementy.



Množství GAS5 v buňce může být ovlivněné také posttranskripčně, kdy v návaznosti na vysokou aktivitu kinázy signální kaskády mTOR (z angl. mammalian target of rapamycin) v aktivně rostoucích buňkách dochází k degradaci těchto transkriptů. [134]

Expresce lncRNA GAS5 je snížena v rostoucích buňkách, ale zvýšená v období stagnace růstu, což odpovídá menšímu množství GAS5 v nádorové tkáni ve srovnání se zdravou tkání. V T-lymfocytech nadměrná exprese indukuje apoptózu a snižuje počet buněk v S-fázi buněčného cyklu. [127]

GAS5 je považován za tumor supresivní lncRNA ve spojitosti s mnoha maligními nádory, u kterých byla detekována snížená exprese tohoto transkriptu. Klinicko-patologické charakteristiky, ke kterým patří doba přežití, doba bez relapsu, přítomnost vzdálených metastáz, přítomnost metastáz v lymfatických uzlinách, velikost a progresse nádoru inverzně korelují s hladinou exprese u různých typů rakovin, což naznačuje, že by se GAS5 mohl stát diagnostickým a prognostickým biomarkerem. Kromě toho má také potenciál pro monitorování terapeutických odpovědí. [128] Buněčné linie daných rakovin mají tendenci vykazovat také sníženou expresi GAS5. Experimenty ukazují, že modulace GAS5 vyvolává změny v buněčné proliferaci, apoptóze, invazi, metastázách i v terapeutické rezistenci. [134] Navíc vynucená exprese GAS5 lncRNA v nádorových buňkách inhibuje růst nádoru v modelech xenograftů, které lépe odpovídají klinickým nálezům v jednotlivých nádorech. [134] V mnoha typech buněk GAS5 zastavuje buněčný cyklus ve fázi G0 nebo G1, knockdown GAS5 je spojen s kratší délkou buněčného cyklu současně se sníženým podílem buněk v G0/G1 a zvýšeným podílem buněk v S-fázi vzhledem ke kontrolám. [134]

Tumor supresivita GAS5 je spojována s gliomy a hladina exprese této lncRNA koreluje se stupněm malignity nádoru a dobou přežití pacienta. U nižších stupňů se GAS5 transkribuje více ve srovnání s gliomy vyšších stupňů včetně GBM. [137] Nízké hladiny exprese GAS5, které byly v GBM pozorovány ve srovnání se zdravou kontrolou, korelují se špatnou prognózou. Nadměrná exprese GAS5 snížila v GBM tkáních a GBM buněčných liniích životaschopnost buněk, potlačila migraci a invazi buněk a snížila proliferaci GSC. [137] GAS5 se v souvislosti s GBM také podílí na úspěšnosti terapie cytostatikem TMZ, rezistence vůči tomuto léku je spojována s O⁶-methylguanin-DNA methyltransferázou (MGMT), (kapitola 5.1.1). Bylo publikováno, že exprese MGMT je negativně regulována miR-222, která může být umlčena navázáním lncRNA GAS5. Vyšší hladiny GAS5 v séru pacientů po chirurgické resekci a následné terapii korelovaly s lepší prognózou a menší pravděpodobností recidivy. [116]

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 LncRNA asociované s nádorovým onemocněním GBM

Byl vytvořen systematický přehled lncRNA, jejichž exprese je deregulována ve spojitosti s GBM. Změny v expresi byly detekovány *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* – v GBM buněčných liniích, v GBM primárních tkáních, v xenograftech, v tkáni resekovaných nádorů, v krvi pacientů s diagnostikovaným GBM. V komplexním přehledu je každá lncRNA identifikována svými nejběžnějšími názvy, Ensembl identifikátorem a svou chromozomovou lokací. Dále je uveden její typ a funkce ve spojitosti s GBM, směr deregulace exprese, typ experimentálního materiálu a reference.

Tabulka 1: Systematický přehled dlouhých nekódujících RNA (lncRNA) spojovaných s nádorovým onemocněním glioblastom multiforme; lncRNA – dlouhé nekódující RNA, GBM – glioblastom multiforme, TMZ – temozolomid, potenc. – potencionální.

název lncRNA / alternativní název /	lokace genu typ lncRNA Ensembl ID genu	funkce ve spojitost i s GBM	exprese ↑/↓	zapojení v GBM	provedené experimenty	zdroj
AC016405.3 / RP11-44N11.2 / / lnc-DERL1-3 /	8q24.13 obousměrná ENSG00000272384	supresorová	↓	potlačení proliferace a invaze	klinické asociace; GBM primární tkáň; GBM buněčné linie	[138]
ADAMTs9-AS2 / NONHSAT090261 /	03p14.1 antisense ENSG00000241684	onkogenní	↑	TMZ rezistence	klinické asociace; GBM buněčné linie	[139]
AGAP2-AS1 / HSALNG0091650 /	02q14.1 antisense ENSG00000255737	onkogenní	↑	proliferace, životaschopnost	GBM primární tkáň; GBM buněčné linie	[140]
AHIF / lnc-TMEM30B-9 / / HIF1A-AS2 /	14q23.2 antisense ENSG00000258777	pronádorová	↑	invaze, životaschopnost, radiační odolnost, GSC	GBM buněčné linie; GSC mezenchymální linie	[141]
ANRIL / CDKN2B-AS1 /	09p21.3 antisense ENSG00000240498	onkogenní	↑	buněčná proliferace	GBM buněčné linie; GBM tkáň; sérum GBM pacientů	[111] [113]
lncRNA-ATB	14q11.2 intergenová -	pronádorová	↑	invaze buněk	GBM buněčné linie	[142]
CASC2	10q26.11 antisense ENSG00000177640	supresorová	↓	inhibitor proliferace	GBM buněčné linie; GBM tkáň; xenograft	[143]

název lncRNA / alternativní název /	lokace genu typ lncRNA Ensembl ID genu	funkce ve spojitost i s GBM	exprese ↑/↓	zapojení v GBM	provedené experimenty	zdroj
CASC7 / lnc-AGO2-1 /	8q24.3 intergenová ENSG00000259758	supresorová	↓	inhibitor proliferace, regulace buněčného cyklu	GBM primární tkáň; GBM buněčné linie	[144]
CASC9 / LINC00981 / / RP11-697M17.1-003 /	8q21.13 intergenová ENSG00000249395	onkogenní	↑	tumorigeneze	GBM buněčné linie	[145]
CCND2-AS1	12p13.32 antisense ENSG00000255920	pronádorová	↑	proliferace a růst	GBM buněčné linie; tkáň pacientů s GBM	[146]
CRNDE / lnc-IRX3-80 /	16q12.2 antisense ENSG00000245694	onkogenní	↑	proliferace, invaze, migrace, inhibice apoptózy	GBM buněčné linie; tkáň pacientů s GBM	[147]
DCST1-AS1	01q21.3 antisense ENSG00000232093	pronádorová	↑	proliferace	klinické souvislosti; GBM primární tkáň; primární kultivace	[148]
DGCR5	22q11.21 antisense ENSG00000237517	supresorová	↓	proliferace, migrace, invaze, apoptóza	GBM buněčné linie; GBM tkáň	[149]
DLEU1-AS1	13q14.3 intergenová ENSG00000186047	potenc. biomarker	↑	proliferace, buněčný cyklus, autofagie; korelace s horší prognózou	GBM buněčné linie; GBM tkáň	[150]

název lncRNA / alternativní název /	lokace genu typ lncRNA Ensembl ID genu	funkce ve spojitost i s GBM	exprese ↑/↓	zapojení v GBM	provedené experimenty	zdroj
ECONEXIN / LINC00461 /	05q14.3 intergenová ENSG00000245526	pronádorová	↑	proliferace	GBM buněčné linie; GBM tkáň; analýza TCGA	[151]
FAM66C	12p13.31 antisense ENSG00000226711	-	↑↓	mikroprostředí nádoru	GBM buněčné linie; GBM tkáň; analýza TCGA	[152]
GAS5	01q25.1 antisense ENSG00000234741	supresorová	↓	inhibice proliferace, invaze a životaschopnosti	GBM buněčné linie; GBM tkáň; sérum GBM pacientů	[153]
H19 / D11S813E / / ASM1 /	11p15.5 intergenová ENSG00000130600	pronádorová	↑	proliferace, invaze, angiogeneze	GBM buněčné linie	[154]
HMMR-AS1	05q34 antisense ENSG00000251018	pronádorová	↑	tumorogeneze, proliferace, invaze, radiační odolnost	GBM buněčné linie	[155]
HOTAIR	12q13.13 antisense ENSG00000228630	pronádorová	↑	proliferace, invaze, rezistence vůči terapii, remodelace chromatinu	klinické asociace; tkáň/sérum pacientů s GBM; buněčné linie; xenoimplantáty; sérum pacientů	[156; 114]

název lncRNA / alternativní název /	lokace genu typ lncRNA Ensembl ID genu	funkce ve spojitost i s GBM	exprese ↑/↓	zapojení v GBM	provedené experimenty	zdroj
HOTAIRM1 / HOXA-AS1 /	07p15.2 antisense ENSG00000233429	onkogenní	↑	proliferace, invaze, životaschopnost	klinické asociace TCGA; GBM primární tkáň; GBM buněčné linie	[156]
HOXA-AS2	07p15.2 antisense ENSG00000253552	pronádorová	↑	migrace, invaze, životaschopnost	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[157]
HOXB13-AS1 / lnc-HOXB13-1 /	17q21.2 intergenová ENSG00000159184	pronádorová	↑	proliferace, progrese	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[158]
HOTTIP / HOXA-AS6 /	07p15.2 antisense ENSG00000243766	protinádorová	↓	inhibice buněčného cyklu, indukce apoptózy	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[159]
HULC / lnc-BMP6-106 /	06p24.3 intergenová ENSG00000285219	pronádorová	↑	proliferace, angiogeneze, aktivita MGMT	GBM buněčné linie; GBM tkáň od pacientů	[160]
KTN1-AS1	14q22.3 antisense ENSG00000186615	supresorová	↑	životaschopnost a invaze buněk; korelace se špatnou prognózou	GBM tkáň; GBM buněčné linie; TCGA analýza	[161]
LINC00467 / NR_026761 /	01q32.3 intergenová ENSG00000153363	pronádorová	↑	proliferace a invaze	GBM buněčné linie	[162]

název lncRNA / alternativní název /	lokace genu typ lncRNA Ensembl ID genu	funkce ve spojitost i s GBM	exprese ↑/↓	zapojení v GBM	provedené experimenty	zdroj
LINC00565	13q34 intergenová ENSG00000260910	potenc. biomarker	↑	korelace s prognózou	sérum GBM pacientů	[115]
LINC00641	14q11.2 intergenová ENSG00000258441	potenc. biomarker	↑	korelace s prognózou	sérum GBM pacientů	[115]
LINC01393	07q31.2 intergenová ENSG00000225535	potenc. biomarker	↑	progrese nádoru; korelace se špatnou prognózou	GBM tkáň; GBM buněčné linie; TCGA analýza	[163]
LINC01426	21q22.12 intergenová ENSG00000234380	onkogenní	↑	proliferace, invaze, životaschopnost	klinické asociace TCGA; GBM primární tkáň; GBM buněčné linie	[164]
LINC01446	07p12.1 intergenová ENSG00000205628	pronádorová	↑	tumorogeneze, progrese	klinické asociace; GBM buněčné linie; xenografty	[165]
LINC01494	02q35 intergenová ENSG00000228135	onkogenní	↑	proliferace, invaze	klinické asociace; GBM tkáň; GBM buněčné linie	[166]
LINC01503	9q34.11 intergenová ENSG00000233901	onkogenní; potenc. biomarker	↑	migrace, invaze, apoptóza; korelace se stupněm malignity a prognózou	GBM tkáň; GBM buněčné linie; TCGA analýza	[167]

název lncRNA / alternativní název /	lokace genu typ lncRNA Ensembl ID genu	funkce ve spojitost i s GBM	exprese ↑/↓	zapojení v GBM	provedené experimenty	zdroj
LINC01711	20q13.32 intergenová ENSG00000268941	pronádorová	↑	proliferace, migrace, invaze korelace se špatnou prognózou	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[168]
LINC02283	04q12 intergenová ENSG00000248184	onkogenní	↑	korelace s expresí PDGFRA, malignita	GSC linie od pacientů; xenoimplantáty; GBM tkáň	[169]
LINC-ROR / ROR /	18q21.31 intergenová ENSG00000258609	-	↑↓	GSC	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[170]
lnc-TALC / LNCARSR / / linc-GNAQ-7 /	09q21.31 intergenová ENSG00000233086	pronádorová	↑	rezistenci vůči TMZ, recidiva nádoru	TMZ-selektované GBM buněčné linie	[171]
MAFG-DT / MAFG-AS1-001 /	17q25.3 intergenová ENSG00000265688	pronádorová	↑	proliferace	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[172]
MALAT1	11q13.1 intergenová ENSG00000251562	-	↑↓	invaze, proliferace, migrace, apoptóza, permeabilita BBB, chemosenzitivita	klinické asociace; tkáň a sérum pacientů s GBM; GBM buněčné linie; xenograft	[112]
MATN1-AS1	01p35.2 intergenová ENSG00000186056	supresor	↓	inhibice proliferace a invaze	GBM primární tkáňové linie; GBM buněčné linie	[173]

název lncRNA / alternativní název /	lokace genu typ lncRNA Ensembl ID genu	funkce ve spojitost i s GBM	exprese ↑/↓	zapojení v GBM	provedené experimenty	zdroj
MDC1-AS	06p21.33 antisense ENSG00000224328	supresor	↓	inhibice proliferace	GBM buněčné linie	[174]
MEG3 / lnc-DLK1-3 /	14q32.2 intergenová ENSG00000214548	supresor	↓	inhibice proliferace	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[175]
MIAT	22q12.1 intergenová ENSG00000225783	onkogenní	↑	proliferace, migrace, metastáze	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[176]
MIR210HG	11p15.5 intergenová ENSG00000247095	potenc. biomarker	↑	hypoxie, invaze, TMZ rezistence; korelace se špatnou prognózou	GBM buněčné linie; xenografty; TCGA analýza; plasma GBM pacientů	[177] [178]
MNX1-AS1 / CCAT5 / / LOC645249 /	07q36.3 intergenová ENSG00000243479	onkogenní	↑	proliferace, migrace, invaze	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[179]
NCK1-AS1 / SLC35G2-AS1 / / NCK1-DT /	03q22.3 antisense ENSG00000239213	pronádorová	↑	TMZ rezistence	primární tkáň; GBM buněčné linie	[180]
NEAT1 / LINC00084 /	11q13.1 intergenová ENSG00000245532	pronádorová	↑	proliferace, glykolýza	GBM primární tkáň; buněčné linie; xenograft	[181]

název lncRNA / alternativní název /	lokace genu typ lncRNA Ensembl ID genu	funkce ve spojitost i s GBM	exprese ↑/↓	zapojení v GBM	provedené experimenty	zdroj
PART1	05q12.1 antisense ENSG00000152931	supresorová	↓	inhibice progresu a růstu nádoru	klinické asociace TCGA; GBM tkáň; GBM buněčné linie	[182]
PARTICL / PARTICLE /	2p11.2 cirkulující ENSG00000286532	regulace supresorů	-	mikroprostředí nádoru, dynamika chromatinu	GBM buněčné linie GBM tkáň	[78] [126]
PCAT1 / PCA1 /	08q24.21 intergenová ENSG00000253438	-	↑↓	životaschopnost, oprava DNA	GBM buněčné linie	[183]
PVT1 / lncRNA1331 /	08q24.2 intergenová ENSG00000249859	onkogenní	↑	tumorogeneze, progrese	GBM tkáň; GBM buněčné linie; xenoimplantáty	[184]
RBPMS-AS1	08p12 antisense ENSG00000254109	protinádorová	↓	radiosenzitivita, apoptóza	GBM tkáň; GBM buněčné linie; xenoimplantáty	[185]
RPSAP52	12q14.3 antisense ENSG00000241749	potenc. biomarker	↑	korelace se špatnou prognózou	klinické asociace; GBM primární tkáň; GBM buněčné linie	[186]
RUNX1-IT1	21q22.12 intergenová ENSG00000159216	pronádorová	↑	buněčný cyklus, proliferace	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[187]

název lncRNA / alternativní název /	lokace genu typ lncRNA Ensembl ID genu	funkce ve spojitost i s GBM	exprese ↑/↓	zapojení v GBM	provedené experimenty	zdroj
SAMMSON / LINC01212 /	03p13 intergenová ENSG00000240405	onkogenní; potenc. biomarker	↑	proliferace, životaschopnost, invaze, apoptóza	GBM tkáň; GBM buněčné linie; sérum GBM pacientů	[188]
SOX2-OT	3q26.3 překrývající ENSG00000242808	potenc. biomarker	↑	migrace a invaze; korelace se stupněm nádoru	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[181]
TALNEC2 / LINC01116 /	02q31.1 intergenová ENSG00000163364	pronádorová	↑	tumorogeneze, radiační odolnost	klinické asociace TCGA; GBM primární tkáň; GBM buněčné linie	[189]
TP73-AS1 / lnc-LRRC47-78 / / KIAA0495 /	01p36.32 antisense ENSG00000227372	potenc. biomarker	↑	korelace s prognózou; rezistence a metabolismus TMZ v GSC	klinické asociace TCGA; GSC linie	[190]
TSLC1-AS1 / lnc-NXPE2-1 / / RP11-713B9 /	11q23.2 antisense ENST00000546273	supresorová	↓	inhibice buněčné proliferace, migrace a invaze	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[111]
TUSC7 / LINC00902 /	03q13.31 antisense ENSG00000243197	supresorová	↓	inhibice, rezistence vůči TMZ, malignita nádoru	GBM buněčné linie; tkáň pacientů s GBM TMZ rezistentních	[191]
TUG1	22q12.2 antisense ENSG00000253352	-	↑↓	propustnost BBB, kmenovost buněk	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[192]

název lncRNA / alternativní název /	lokace genu typ lncRNA Ensembl ID genu	funkce ve spojitost i s GBM	exprese ↑/↓	zapojení v GBM	provedené experimenty	zdroj
TUNAR	14q32.2 intergenová ENSG00000250366	-	↑	regulace progresu nádoru, buněčný cyklus	GBM buněčné linie	[193]
UCA1 / UCAT1 / / onco-lncRNA-36 /	19p13.12 intergenová ENSG00000214049	pronádorová	↑	proliferace, invaze, migrace; glykolýza	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[194]
XIST	Xq13.2 intergenová ENSG00000229807	pronádorová	↑	permeabilita BBB, angiogeneze, proliferace CSC, migrace, invaze	GBM tkáň; GBM buněčné linie	[195]
ZEB1-AS1	10p11.22 antisense ENSG00000237036	pronádorová	↑	buněčná proliferace, migrace, invaze	GBM buněčné linie	[196]
ZBED3-AS1	05q13.3 antisense ENSG00000250802	potenc. biomarker	↓	TMZ rezistence	TMZ-rezistentní GBM buněčné linie a tkáň	[197]

6.2 Laboratorní metody

6.2.1 GBM buněčná linie

Pro kultivaci buněčné linie Uppsala 87 Malignat Glioma {(U-87 MG); ECACC #89081402} bylo použito Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium {(DMEM); Gibco™ #11965092} s přidavkem 10% roztoku fetálního bovinního séra {(FBS); Gibco™ #A4766801} a s 1% antibiotickým roztokem penicilinu a streptomycinu {Sigma-Aldrich #P0781}. Buňky byly kultivovány v inkubátoru s 5% obohacením CO₂ při 37 °C {Innova CO-48} s výměnou média každé tři dny. Po dosažení 80% konfluence byly buňky pasážovány za pomoci trypsinu a kyseliny ethylendiamintetraoctové {(EDTA); Gibco™ #25200056}.

6.2.2 Histologické preparáty GBM tkáně

Pacienti (n = 4) s diagnózou GBM (rok 2019) podstoupili chirurgickou resekci ve většině případů následovanou chemoterapií temozolomidem (Tabulka 2) a byli léčeni podle standardního protokolu (kapitola 5.1.1.2) ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady v Praze. Resekovaná tkáň byla zalita do parafínu a za pomoci mikrotomu byly vytvořeny 5µm řezy, z kterých byly zhotoveny histopatologické preparáty.

Tabulka 2: Přehled informací k histologickým preparátům. TMZ – temozolomid; *IDH* – gen kódující isocitrátdehydrogenázu.

pacient	pohlaví	rok narození	rok diagnózy	rok úmrtí/*	primární nádor	<i>IDH</i> mutace	léčba TMZ
P1	Ž	1962	2019	2019 / 1	ano	wildtype	-
P2	M	1949	2019	2020 / 9	ano	pozitivní	netolerována
P3	M	1952	2019	2020 / 15	ano	wildtype	ano
P4	M	1943	2019	2020 / 18	ano	wildtype	ano

*počet měsíců od diagnózy do začátku paliativní péče

6.2.3 All-trans retinová kyselina

All-trans retinová kyselina {(ATRA); Thermo Scientific Chemicals #207341000} byla rozpuštěna v dimethylsulfoxidu {(DMSO); Sigma-Aldrich #D8418}, čímž byl vytvořen zásobní roztok o koncentraci 10 mM, který byl před aplikací rozpuštěn v DMEM na konečnou koncentraci 100 μ M. K buňkám U-87 MG bylo přidáno určité množství zásobního roztoku ATRA pro vytvoření koncentrační řady v rozmezí 10^{-7} - 10^{-4} M. Buňky byly exponovány po dobu až 7 dnů.

6.2.4 Testy proliferace

6.2.4.1 Test proliferačních schopností (*Scratch-wound assay*)

Buňky U-87 MG byly kultivovány v 6-jamkové kultivační destičce {Thermo Scientific #130184} do 80% konfluence. Uprostřed každé jamky v páse širokém 10 mm byly buňky seškrábnuty, čímž vznikl tzv. proliferační pás (LE, z angl. leading edge), díky kterému bylo možné měřit základní parametry buněčné migrace. Po opakovaném promytí jamek fosfátem pufovaným solným roztokem {(PBS); Gibco™ #10010023} bylo přidáno DMEM s ATRA v rozsahu koncentrací 10^{-7} M - 10^{-4} M. Exponované buňky byly pozorovány po dobu 7 dnů ve dvou rozličných zónách: tedy v souvislé vrstvě buněk (ECM, z angl. established cellular monolayer) a v zóně LE. Proliferační schopnosti buněk byly monitorovány pomocí mikroskopu {Nikon Eclipse TS100}. Po 7 dnech byly migrační schopnosti exponovaných i neexponovaných buněk posouzeny za pomoci hodnocení genové exprese, které předcházela izolace RNA z buněk vyskytujících se v obou zónách, a za pomoci průtokové cytometrie.

6.2.4.2 Stanovení proliferace pomocí průtokové cytometrie

Ke kultivovaným buňkám (LE i ECM zóny) byl na posledních 48 hodin přidán roztok 2'-deoxy-5-ethynyluridinu {(EdU); Invitrogen™ #C10632}, který se inkorporuje do DNA během syntézy místo thymidinu, jehož je analogem. Oddělené buňky byly centrifugovány při $4000 \times g$, resuspendovány v 4% paraformaldehydu {Thermo Scientific Chemicals #J19943.K2} rozpuštěném v PBS. Po 15minutové inkubaci ve tmě byly buňky promyty ve 3 ml PBS s 1% přídatkem hovězího sérového albuminu {(BSA); Sigma-Aldrich #A7030} s následnou centrifugací $4000 \times g$. Buňky byly resuspendovány v reakčním roztoku z kitu Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay Kit {Invitrogen™ #C10632} po dobu 15 minut. Reakční směs byla inkubována po dobu 30 min ve tmě při

laboratorní teplotě. Buňky byly před přenesením do speciálních zkušev pro měření průtokovým cytometrem {Corning #352054} promyty podle dodaného protokolu. Procento buněk v S-fázi bylo stanoveno standardními metodami průtokové cytometrie {BD Biosciences #BD FACSVersTM}. Data byla analyzována pomocí programu BD FACSuiteTM.

6.2.5 Analýza nukleonových kyselin

6.2.5.1 Izolace RNA z kultivovaných buněk

Buňky z LE i ECM byly lyzovány pomocí 2-merkaptoethanolu {Sigma-Aldrich #M6250} a z lyzátu byla izolována RNA pomocí kitu GenEluteTM Mammalian Total RNA Miniprep Kit {Sigma-Aldrich #RTN350-1KT} spočívajícího v interakci mezi RNA a silikagelovou membránou. Během izolace byl přesně dodržen pracovní protokol pro daný kit. Koncentrace celkové RNA byla spektrofotometricky změřena a její čistota stanovena vypočítáním poměru absorbancí při 260 nm a při 280 nm {Thermo Scientific NanoDrop 1000}. Izolovaná RNA byla skladována v -80 °C.

6.2.5.2 Izolace RNA z histologických preparátů GBM tkáně

Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) byly izolovány z histologických preparátů tkáně GBM dle [198]. Z preparátů byla odstraněna veškerá GBM tkáň pomocí ostré čepce, která byla předem vyčištěna xylenem. Odebrané vzorky byly deparafinovány přidáním 1 ml xylenu a následnou inkubací ve vodní lázni při 56 °C po dobu 10 minut. Směs byla centrifugována při 14 000 RPM při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Tento krok byl následně dvakrát opakován vždy s likvidací supernatantu. Po čtvrté centrifugaci (2 minuty) byl ke vzorkům přidán 1 ml absolutního ethanolu a směsi byly opět centrifugovány 10 minut s likvidací supernatantu. Pro odstranění ethanolu byly vzorky centrifugovány 5 minut. Po přidání 500 µl PBS a následné centrifugaci byly vzorky inkubovány v 37 °C po dobu 5 minut. K směsi bylo přidáno 400 µl lyzačního pufru, který byl připraven smícháním 20 mM Tris HCl pH 8,0 {Sigma-Aldrich #1185-53-1}; 1 mM CaCl₂ {Penta #10043-52-4}; 0,5% dodecylsulfátu sodného {Sigma-Aldrich #151-21-3} a proteinázy K. Po hodinové inkubaci při 56 °C byly vzorky přemístěny na led. Po 2 minuty trvající inkubaci s 1 ml trizolu {Sigma-Aldrich #93289} bylo přidáno ke každému vzorku 200 µl chloroformu {Sigma-Aldrich #67-66-3} s následnou 5minutovou inkubací. Celá směs byla centrifugována při 13 000 RPM v 4 °C. Poté byly odděleny jednotlivé fáze. RNA byla

precipitována přidáním 600 µl isopropylalkoholu {Lach:Ner #20037} a následnou inkubací při -20 °C přes noc. Následující den byly vzorky stočeny při 13 000 RPM v 4 °C po dobu 15 minut. Po odstranění supernatantu bylo přidáno ke každému vzorku 500 µl chlazeného 75% ethanolu. Po 15minutové centrifugaci při 10 000 RPM a 4 °C byl supernatant odstraněn a peleta sušena při 37 °C 5 minut. Izolovaná RNA byla naředěna 40 µl vody a její koncentrace a čistota změřena spektrofotometricky.

6.2.5.3 Reverzní transkripce izolované RNA

K přečištění RNA izolované z kultivovaných buněk a histologických preparátů a následné reverzní transkripci byl využity kity ezDNase™ Enzyme {Invitrogen™ #11766051} a SuperScript™ IV First-Strand Synthesis Systém {Invitrogen™ #18091050}. Reverzní transkripce proběhla podle doporučeného teplotního protokolu v termocykleru {Bio-Rad C1000 Thermal Cycler}. Transkribovaná cDNA byla skladována v -20 °C a dále zpracována pomocí kvantitativní PCR.

6.2.5.4 Kvantitativní PCR lncRNA a endogenních kontrolních genů

Byla provedena kvantitativní PCR genů pro lncRNA PARTICL a GAS5 a pro gen *GAPDH* jako endogenní kontrolu. Reakce byla sestavena z transkribované cDNA (až do 4 µl), 10 µl TaqMan™ Gene Expression Master Mix {Applied Biosystems™ #4369016}, vody bez nukláz {Qiagen #17000} a TaqMan™ Gene Expression Assay {Applied Biosystems™ #4331182}, které byly předem navrženy pro dané lncRNA a endogenní kontrolu. V reakcích negativních kontrol nebyla obsažena templátová cDNA. Kvantitativní PCR byla nastavena na 2 min - 50 °C, 10 min - 95 °C a poté na 40 cyklů, každý 15 s - 95 °C a 1 min - 60 °C v StepOnePlus™ Real-Time PCR Systém {Applied Biosystems™ #4376600}. Výsledné prahové hodnoty cyklů (C_t) byly relativně kvantifikovány ($2^{(-\Delta\Delta C_t)}$), vzorky neexponované ATRA byly normalizovány na hodnotu jedna a následně porovnány s exponovanými vzorky pomocí MS Excel.

6.2.6 Analýza proteinů

6.2.6.1 Extrakce proteinu

Pro extrakci proteinů z buněk U-87 MG byl použit T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent {Thermo Scientific™ #78510} doplněný inhibitory proteáz {Roche #04693116001}. Po přidání 100 µl roztoku 1×10^6 buněk byla směs homogenizována

a sonifikována pro narušení membrány po dobu 20 s {Diagenode Bioruptor[®]}. Homogenát byl centrifugován po dobu 5 minut při 10 000 × g pro odstranění buněčných zbytků. Koncentrace proteinů byla stanovena bicinchonovou metodou {(BCA); Thermo Scientific[™] #23227}.

6.2.6.2 Elektroforéza a western blot

K buněčným lyzátům (25 µg, 10 µl) bylo přidáno 2,5 µl NuPAGE[™] LDS Sample Buffer 4X {Invitrogen[™] #NP0007}, směs byla zahřívána po dobu 5 minut při 70 °C a poté nanesena na 12% Bis-Tris polyakrylamidový gel {Invitrogen[™] #NP0342BOX} v pufru {Invitrogen[™] #NP0001}. Elektroforéza byla nastavena na 180 V a 4 °C. Separované proteiny byly přeneseny na blotovací membránu {Whatman[®] #WHA10416294} za standardních podmínek s přidáním 5% BSA v tris-pufrovaném fyziologickém roztoku obohaceném o Tween 20 {Sigma-Aldrich #P9416} (TBST), který blokuje nežádoucí interakce mezi membránou a později přidávanými protilátkami. Membrána byla inkubovaná přes noc při 4 °C s králičími monoklonálními protilátkami proti molekule prominin-1 {(anti-CD133); Abcam #ab216323}, s králičími monoklonálními protilátkami proti ICAM-1 {(anti-CD54); Cell Signaling Technology #4915} nebo s myšimi monoklonálními protilátkami proti GAPDH {(anti-GAPDH); Santa Cruz Biotechnology #sc-47724}. Po promytí TBST byly membrány inkubovány po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě v přítomnosti sekundárních protilátek: anti-králičích kozích protilátek konjugovaných s alkalickou fosfatázou {Sigma-Aldrich #A-3687} nebo anti-myších kozích protilátek {Sigma-Aldrich #A-3562}. Vybrané proteiny CD133, CD54 a GAPDH byly vizualizovány pomocí barvicího roztoku p-toluidinu {Sigma-Aldrich #B0274} a nitroterazoliové modři {Sigma-Aldrich #N5514}. Western bloty byly fotografovány pomocí FluorChem HD2 {Alpha Innotec} se specifickými intenzitami pro proteinové pásy, které byly kvantifikovány pomocí programu ImageJ {NIH}.

6.2.7 Cytogenetické metody

Buňky byly kultivovány do 60-70% konfluency s expozicí ATRA (10⁻⁴ M), promyty PBS a inkubovány po dobu 17 hodin v kultivačním médiu obohaceném o mitotický jed kolchicin {Thermo Scientific Chemicals #227125000} o koncentraci 250 µl/ml při 37 °C. Po 17 hodinách byly buňky uvolněny z kultivační nádoby za pomoci roztoku trypsinu. K uvolněným buňkám byl přidán 37 °C teplý hypotonický roztok a směs byla inkubována při 37 °C po dobu 20 minut. Po opakovaném propláchnutí hypotonickým roztokem

a centrifugaci $1000 \times g$ po dobu 10 min byla peleta resuspendována ve fixačním roztoku složeném z 3 dílu methanolu {Lach:Ner #20038} a 1 dílu ledové kyseliny octové {Lach:Ner #10047}, v kterém byla dalších 20 minut uchovávána při 4 °C. Po centrifugaci a opakování předchozího kroku byla výsledná peleta resuspendována ve 200 μ l kyseliny octové. Roztok buněčné suspenze (25 μ l) byl aplikován z výšky na studená mokrá předem sterilizovaná mikroskopická skříčka, která byla dále sušena při teplotě 50 °C po dobu 15 min.

6.2.7.1 Klasické barvení chromozomů pomocí Giemsa

Mikroskopická skříčka s buněčnou suspenzí byla ve vertikální poloze ponořena do barvicího roztoku, který byl připraven smícháním fosfátového pufru o pH 6,8 dle Sörensena (SPB) a Giemsa roztoku {Thermo Scientific Chemicals #B21172.18} v poměru 20:1 po dobu 5 minut. Skříčka byla promyta destilovanou vodou pro odstranění přebytečného barviva a poté usušena na vzduchu. Při 1000násobném (10×100) zvětšení pomocí optického mikroskopu {Olympus BX43} byly pozorovány jednobarevné metafázové chromozomy.

6.2.7.2 Pruhoání chromozomů

Mikroskopická skříčka s buněčnou suspenzí byla zahřáta na 95 °C po dobu 20 minut. Poté byla skříčka ponořena na 20 s do SPB, do kterého byl přidán trypsin s výslednou koncentrací 2 μ g/ml. Působení trypsinu bylo zastaveno následným ponořením sklíček do SPB obohaceného o FBS s konečnou koncentrací 10 %. Po 30 s byla skříčka vytažena a opláchnuta čistým SPB a ponechána na vzduchu oschnout. Skříčka byla horizontálně položena do roztoku smíchaného z 1 dílu Wrigthova roztoku {Sigma-Aldrich #32857} a z 3 dílů hydrionu {Micro Essential Laboratory #60784-226} po dobu 1 minuty. Po obarvení byla skříčka opláchnuta destilovanou vodou a ponechána na vzduchu přes noc. Při 1000násobném zvětšení (10×100) byly pozorovány pruhované chromozomy v metafázi.

6.2.8 Histologická barvení

6.2.8.1 Histologické barvení hematoxylin – eosin

Preparáty byly odparafinovány ponořením do xylenu {Lach:Ner #20060} třikrát po dobu 10 minut a do absolutního ethanolu {VWR Avantor #20821} třikrát po dobu 5 minut. Poté byly preparáty rehydratovány ponořením do 90% a 75% ethanolu po 5 minutách a promyty pod tekoucí vodou po dobu 2 minut. Preparáty byly obarveny pomocí

roztoku hematoxylinu, který byl připraven podle standardního protokolu pro přípravu dle Mayera [199]. Po promytí pod tekoucí vodou (15 minut) byly preparáty ponořeny do roztoku eosinu {Thermo Scientific Chemicals #152885000} na dobu 2 minut a poté ponořeny do 70% a 95% ethanolu. Dehydratace preparátů byla provedena ponořením do absolutního ethanolu třikrát po dobu 5 minut. Barvení bylo dokončeno ponořením do xylenu na celkovou dobu 30 minut, po 10 minutách byl xylen vyměněn za nový. Po obarvení byly preparáty překryty krycím sklíčkem.

6.2.8.2 Histologické barvení Klüver-Barrera

Histologické preparáty byly zbaveny parafínu ponořením do xylenu po dobu 30 minut (se 3 výměnami xylenu po 10 minutách). K odstranění xylenu byl použit absolutní ethanol: preparáty byly třikrát ponořeny do absolutního ethanolu po dobu 5 minut. Pro následnou hydrataci byl použit 95% ethanol po dobu 5 minut. Preparáty byla obarveny 0,1% roztokem Luxol Fast Blue {Thermo Scientific Chemicals #212171000} přes noc při 50 °C. Další den byly preparáty oplachovány v 95% ethanolu po dobu 1 minuty a následně omyty tekoucí vodou. Po ponoření do 0,05% roztoku uhličitanu lithného (15 sekund) byly preparáty ponořeny do 70% ethanolu (se 2 výměnami ethanolu po 1 minutě). Ve třetí histologické kyvetě se 70% ethanolem byly preparáty ponechány 10 minut. Po mikroskopické kontrole byly preparáty omyty tekoucí vodou a opláchnuty v destilované vodě. Druhé barvení 0,1% roztokem krystalové violeti {Penta #548 62 9} trvalo 10 minut při 37 °C. Následně byly preparáty ponechány v roztoku 95% ethanolu a dvou kapek 10% kyseliny octové po dobu 7 minut. Pro lepší diferenciaci byly preparáty ponořeny do 95% ethanolu a absolutního ethanolu po jedné minutě. Po mikroskopické kontrole byly preparáty dehydratovány v absolutním ethanolu (se 2 výměnami ethanolu po 5 minutách). Barvení bylo dokončeno ponořením preparátu do xylenu na 30 minut (se 3 výměnami xylenu po 10 minutách). Připravené preparáty byly překryty krycím sklíčkem.

6.2.9 Imunofluorescenční metody

6.2.9.1 Detekce vybraných CD molekul u U-87 MG buněčné linie

Buňky U-87 MG byly kultivovány na mikroskopických sklíčkách. Po dosažení 80% konfluence bylo médium odstraněno a buňky byly dvakrát promyty PBS. Pro zafixování buněk byla sklíčka inkubována v 4% paraformaldehydu po dobu 1 hodiny. Po opětovném promytí v PBS byla sklíčka ponořena do TBS s přídavkem 0,5% Triton™ X-100

{Sigma-Aldrich #9036-19-5} na 1 hodinu. Po promytí v čistém TBS byla sklíčka ponořena do blokovacího roztoku (TBS; 5% FBS; 0,5% Triton) po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byly buňky inkubovány v blokovacím roztoku obsahujícím anti-CD54 nebo anti-CD133 v poměru 200:1 při 4 °C. Po promytí buněk v čistém TBST po dobu 15 minut, které bylo třikrát opakováno, následovala hodinová inkubace v přítomnosti sekundárních protilátek s fluorescenčním barvivem Alexa Fluor 488 {ThermoFischer #A30006} při laboratorní teplotě ve tmě. Sklíčka byla opět třikrát promyta TBST a sušena ve tmě. Na sklíčka byl aplikován ochranný film ProLong™ Gold Antifade Mountant {Invitrogen™ #P36930} obsahující fluorescenční barvivo DAPI {Invitrogen™ #D1306} pro zvýraznění jader. Ke sběru dat byl použit konfokální systém Leica TCS SP8X {Leica Microsystems} s objektivem HCX PL APO 40×, excitačními lasery o vlnové délce 405 nm a 488 nm a s příslušným programem.

6.2.9.2 Detekce vybraných CD molekul na histologických preparátech

Histologické preparáty byly zbaveny parafínu ponořením do xylenu po dobu 30 minut (se 3 výměnami xylenu po 10 minutách). K odstranění xylenu byl použit absolutní ethanol: preparáty byly třikrát ponořeny do absolutního ethanolu po dobu 5 minut. Pro následnou hydrataci byl použit 95% ethanol po dobu 5 minut. Po deparafinizaci byly preparáty ponořeny do roztoku do PBS s 0,4% Triton™ X-100 (PBST) na 30 minut. Po promytí v čistém PBS (3 × 10 minut) byly preparáty ponořeny do blokovacího roztoku (PBS; 5% BSA) na 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byly buňky inkubovány v blokovacím roztoku obsahujícím anti-CD54 nebo anti-CD133 v poměru 200:1. Po promytí buněk v PBST po dobu 15 minut, které bylo třikrát opakováno, následovala hodinová inkubace v přítomnosti sekundárních protilátek s fluorescenčním barvivem Alexa Fluor 488 při laboratorní teplotě ve tmě. Sklíčka byla třikrát promyta PBS a sušena ve tmě. Na sklíčka byl aplikován ochranný film ProLong™ Gold Antifade Mountant obsahující fluorescenční barvivo DAPI pro zvýraznění jader. Ke sběru dat byl použit konfokální systém Leica TCS SP8X s objektivem HCX PL APO 40×, excitačními lasery o vlnové délce 405 nm a 488 nm a s příslušným programem.

6.2.9.3 Detekce GFAP (gliální fibrilární acidický protein) v histologických preparátech

Histologické preparáty byly zbaveny parafínu ponořením do xylenu po dobu 30 minut (se 3 výměnami xylenu po 10 minutách). K odstranění xylenu byl použit absolutní ethanol: preparáty byly třikrát ponořeny do absolutního ethanolu po dobu 5 minut. Pro následnou hydrataci byl použit 95% ethanol po dobu 5 minut. Po deparafinizaci byly preparáty ponořeny do roztoku do PBST na 30 minut. Po promytí v čistém PBS (3 × 10 minut) byly preparáty ponořeny do blokovacího roztoku (PBS; 5% BSA) na 1 hodinu při laboratorní teplotě. Histologické preparáty byly ošetřeny dle protokolu pro dvojité barvení dodaného s protilátkami anti-CD54, anti-CD133 a anti-GFAP (myší monoklonální protilátky proti markeru astrocytů – GFAP; {ThermoFischer #53-9892-S2} v poměru 200:1. Na preparáty byly aplikovány kombinace anti-CD54 s anti-GFAP a anti-CD133 s anti-GFAP. Po promytí buněk v PBST po dobu 15 minut, které bylo třikrát opakováno, následovala hodinová inkubace v přítomnosti sekundárních protilátek s fluorescenčním barvivem Alexa Fluor 488 při laboratorní teplotě ve tmě. Sklíčka byla třikrát promyta PBS a sušena ve tmě. Na sklíčka byl aplikován ochranný film ProLong™ Gold Antifade Mountant obsahující fluorescenční barvivo DAPI pro zvýraznění jader. Ke sběru dat byl použit konfokální systém Leica TCS SP8X s objektivem HCX PL APO, excitačními lasery o vlnové délce 405 nm a 488 nm a s příslušným programem. Kolokalizace mezi signálem pro GFAP a CD54 / CD133 byla stanovena pomocí doplňků programu ImageJ (Just Another Colocalisation Plugin a Colocalization Finder).

6.2.9.4 Fluorescenční *in situ* hybridizace lncRNA PARTICL a GAS5

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) byla provedena podle pokynů pro Stellaris® RNA FISH pro histologické preparáty. Histologické preparáty byly ponořeny do xylenu na 10 minut, po výměně xylenu byly ponořeny podruhé na 5 minut. Poté byly preparáty ponořeny do absolutního ethanolu dvakrát po 10 minutách s výměnou ethanolu, do 95% ethanolu na 10 minut a do 70% ethanolu na 1 hodinu. Po promytí pomocí PBS (2-5 minut) byly preparáty vloženy do roztoku proteinázy K 10 µg/ml {Qiagen #19131} rozpuštěné v PBS o teplotě 37 °C s inkubací 20 minut ve stejné teplotě. Deparafinace byla dokončena promýváním v PBS (2 × 2-5 minut). Preparáty byly položeny do promývacího pufu Stellaris RNA FISH Wash Buffer A {Biosearch Technologies #SMF-WA1-60} na 2-5 minut. Preparáty, na které byl nanesen hybridizační puf, byly inkubovány ve tmě při

37 °C za udržení vlhkosti přes noc. FISH sondy, které byly navrženy pomocí Stellaris Designer software pro konkrétní dlouhé nekódující RNA PARTICL (NR_038942.1) a GAS5 (NR_152521.1), byly obsaženy v hybridizačním pufru. Po promytí preparátů v promývacím pufru po dobu 30 minut při 37 °C bylo nanášeno barvivo DAPI s inkubací 30 minut při 37 °C. Po promytí bylo přidáno montážní médium {Vector Laboratories #H-1000} a krycí sklíčko. K vyhodnocení fluorescence byl použit konfokální systém Leica TCS SP8X s objektivem HCX PL APO 40×, excitačními lasery o vlnové délce 488 nm a 509 nm a s příslušným programem.

6.2.9.5 Analýza fluorescence

Data získána z konfokálního mikroskopu byla kvantifikována za pomoci analýzy intenzity v programu ImageJ. Neupravené RGB fotografie byly převedeny do 8bitového černobílého formátu a analýzou stupňů šedi zjištěna intenzita v místech specifického fluorescenčního značení. Analýza intenzity signálu byla provedená vždy ve více oblastech zájmu (ROI; z angl. region of interest) v jedné zóně a dále statisticky vyhodnocena. Rovněž byla měřena plocha fluorescenčních oblastí, k čemuž byla využita funkce programu ImageJ.

6.2.10 Statistické zpracování dat

K statistickému zpracování dat byl použit program MS Excel. Pro porovnání dat dvou odlišných skupin byl použit dvouvýběrový t-test. Data jsou prezentována jako střední hodnoty \pm směrodatná odchylka s hladinou významnosti $p = 0,05$.

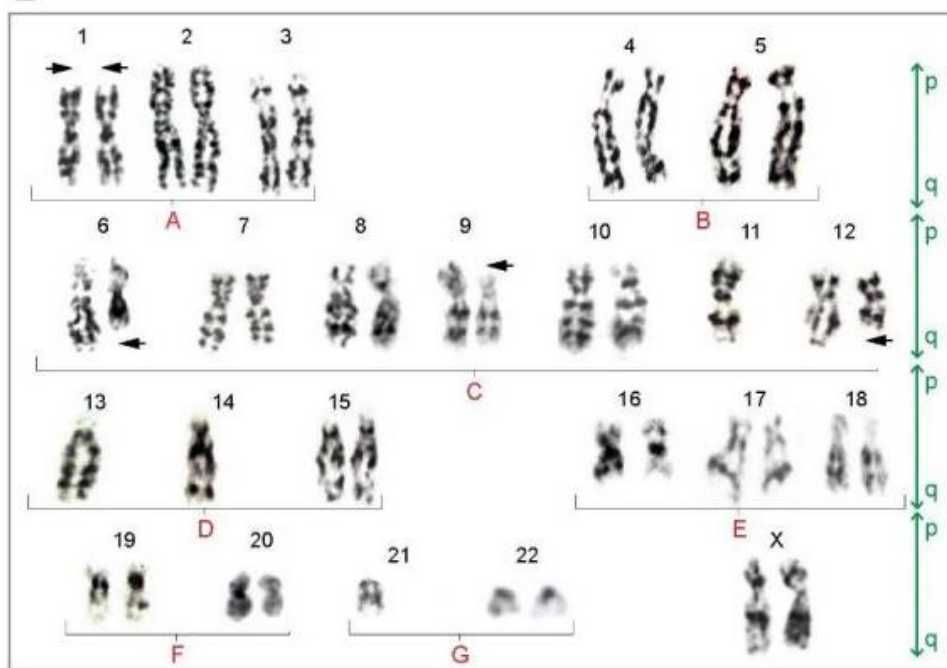
6.3 Výsledky

6.3.1 Buněčná linie U-87 MG

Buněčná linie U-87 MG byla získána v roce 1966 ve Švédsku z tkáně od 44leté pacientky s diagnostikovaným GBM. [200] Zadáním klíčových slov pro GBM a jednotlivé GBM buněčné linie bylo potvrzeno, že U-87 MG je nejvíce používanou GBM linií pro výzkum tohoto nádoru.

Byl sestaven karyotyp buněčné linie U-87 MG z 10. pasáže (P#10) pro potvrzení jejího původu. (Obrázek 14) Během každé následující pasáže byla odebrána část buněk pro cytogenetickou analýzu. Byly odhaleny četné chromozomální abnormality – delece na krátkých raménkách prvních chromozomů, abnormality na krátkých raménkách chromozomů 9, delece na dlouhých raménkách chromozomů 6, mezichromatidové výměny i dicentrické chromozomy a difragmenty. U většiny zkoumaných mitóz byla pozorována monozomie u chromozomů č. 11, 13, 14 a 21. Skutečnost, že karyotypy sestavené z jednotlivých pasáží (až do P#17) nebyly identické a u některých chromozomů (5, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 17 a 18) byly pozorovány změny s vyšším číslem pasáže, vypovídá o dynamičnosti této buněčné linie.

Obrázek 14: Sestavený ženský karyotyp U-87 MG s monozií chromozomu 11, 13, 14 a 21. Šipky vyznačují delece.

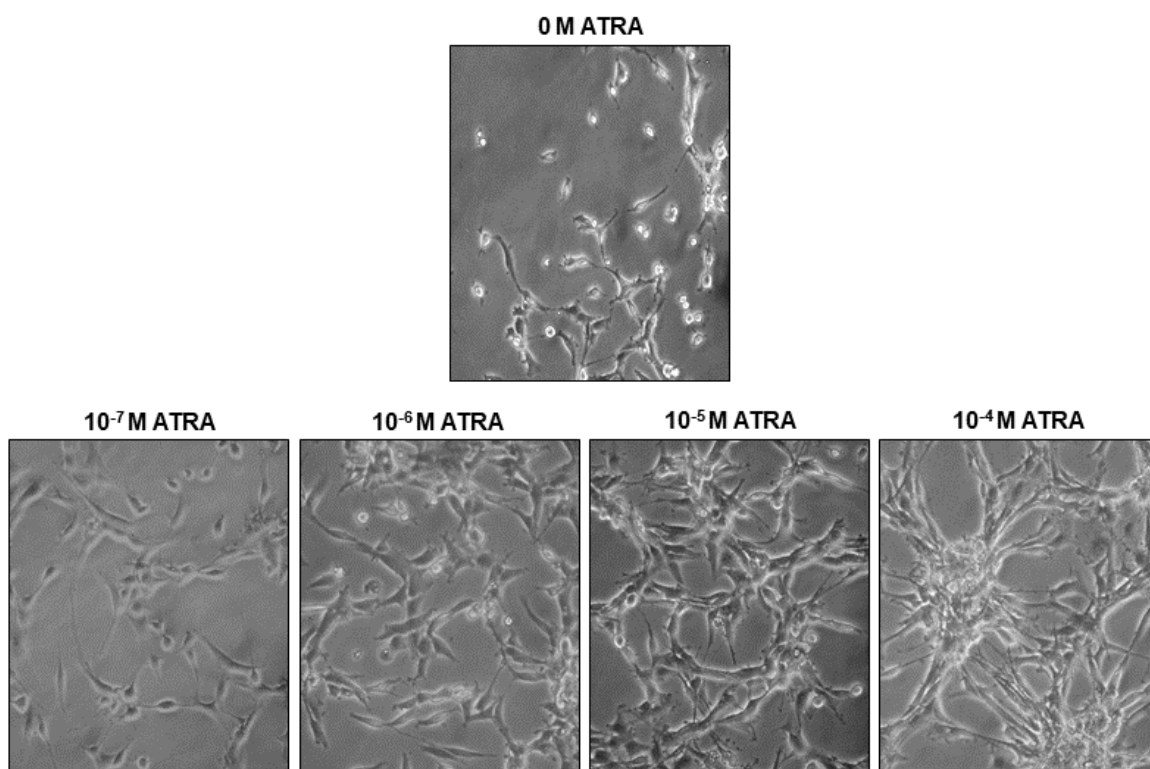


6.3.2 Kyselina all-trans-retinová

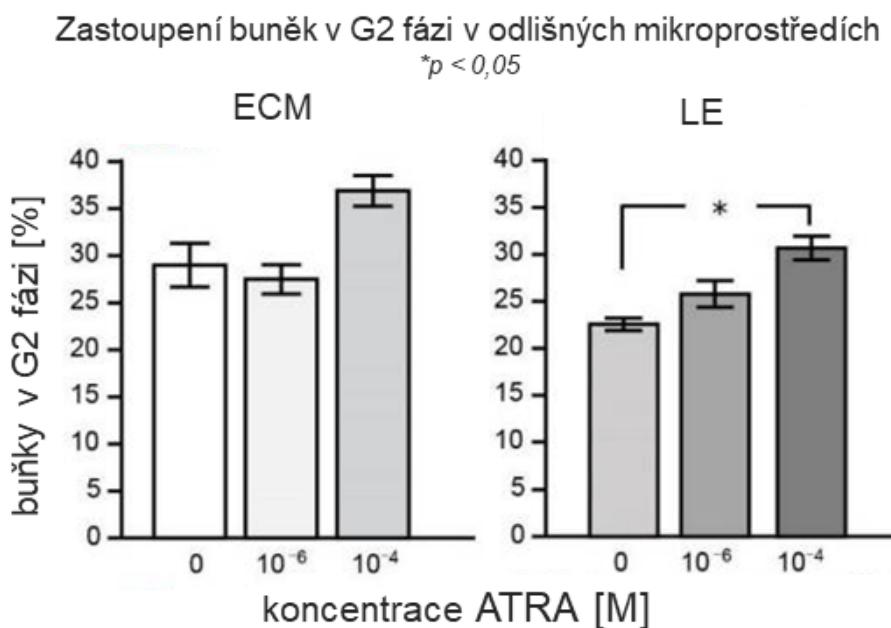
Kyselina all-trans-retinová (ATRA), derivát vitamínu A, je důležitým modulátorem mnoha biologických procesů. ATRA je spojována s diferenciací, potlačením proliferace a apoptózou u některých nádorových buněk včetně GBM buněčných linií. [5] V některých případech je ATRA v kombinaci s dalšími účinnými látkami doporučována k léčbě difuzních gliomů (i GBM). [6]

Bylo zjištěno, že ATRA ovlivňuje buňky linie U-87 MG rozličným způsobem v závislosti na mikroprostředí. ATRA ovlivňuje proliferaci U-87 MG buněk v zóně LE v závislosti na její koncentraci. (Obrázek 15) Při vyšší koncentraci ATRA ($c_{\text{ATRA}} = 10^{-4} \text{ M}$) buňky vykazovaly zvýšenou schopnost ($p = 0,028$) proliferace ve srovnání s neexponovanými buňkami. (Obrázek 16) V zóně ECM nebyla pozorována statisticky významná změna.

Obrázek 15: Vliv koncentrace ATRA na buněčnou linii U-87 MG v zóně proliferace.



Obrázek 16: Proliferační aktivita U-87 MG (P#5) po expozici ATRA ve dvou odlišných mikroprostředích – ECM a LE. Histogramy byly vytvořeny z cytometrických dat; * $p < 0,05$.

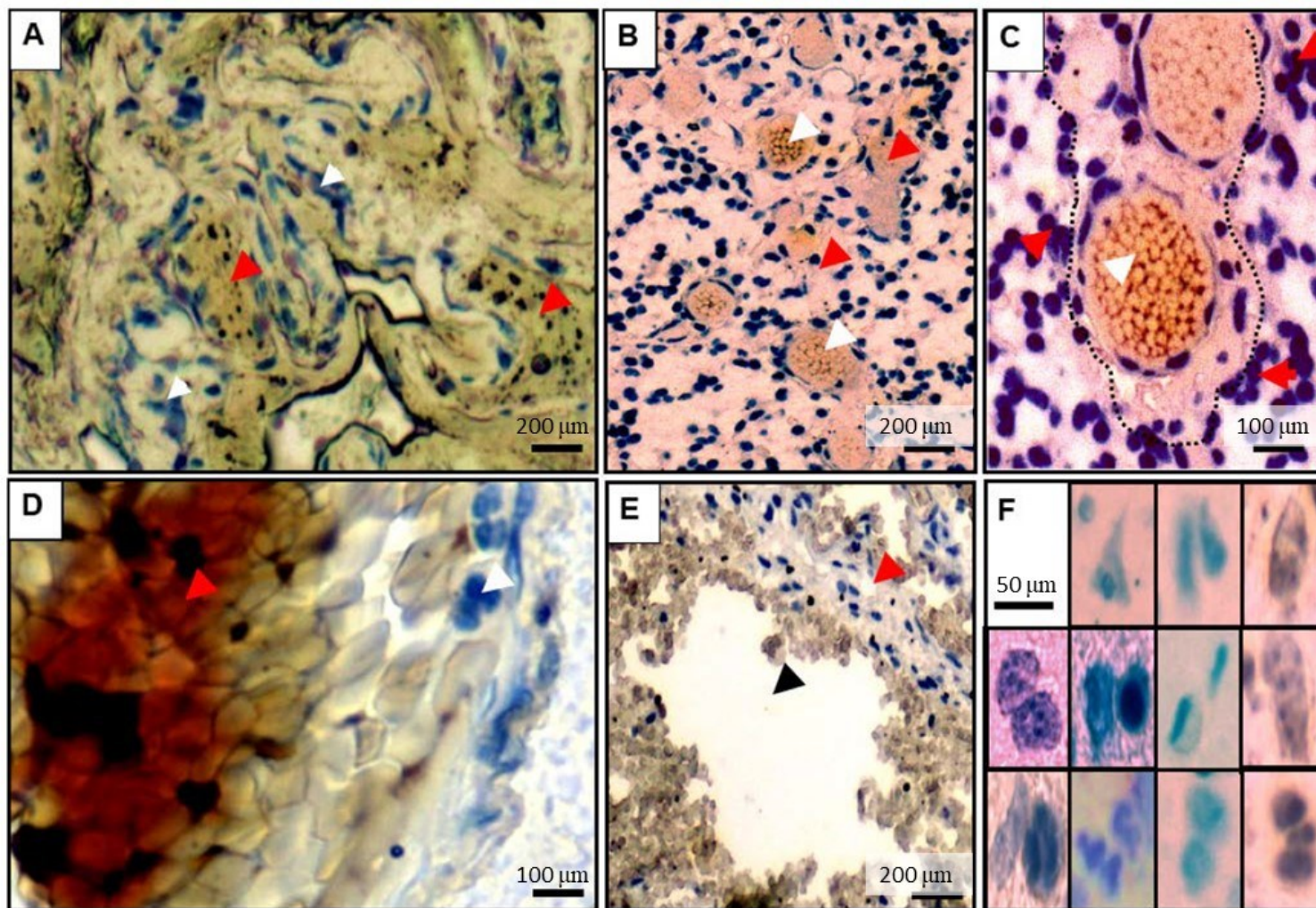


6.3.3 Histologická analýza preparátů

U všech zkoumaných histologických preparátů GBM tkáně získané od pacientů s diagnózou tohoto nádoru byly pozorovány po obarvení hematoxylin-eosinem histopatologické znaky typické pro GMB, které odpovídaly IV. stupni malignity podle WHO a klinickému stavu pacientů. Přestože se pacienti lišili v reakci na léčbu TMZ (Tabulka 2), histologické rysy byly podobné. Tkáň jednoho vzorku byla velmi heterogenní s nekrózami obklopenými pseudopalisádujícími buňkami, mnohočetnými mitózami, zvýšenou mikrovaskularizací, shluky proliferujících buněk, nekrózami, anaplaziemi a morfologickými atypiami jader i celých buněk. Mezi jednotlivými vzorky pacientů nebyly pozorovány významné rozdíly.

Obrázek 17: Histopatologické znaky GBM po chirurgické resekci a barvení hematoxylinem a eosinem: (A) shluky nádorových buněk (bílá šipka) a nekrotické oblasti (červené šipky); (B, C) vysoce vaskularizované oblasti nádoru s proliferativními buňkami (červené šipky) přiléhající k mikrocévám (bílé šipky); (D) heterochromní polymorfní jádra (bílá šipka) spojená s rozsáhlou nekrózou (červená šipka); (E) proliferující buňky (červená šipka) obklopující apoptické zóny (černá šipka); (F) pleomorfní jádra vyskytující se v nádorových buňkách.

Obrázek 17: Histologické znaky GBM popsané výše.



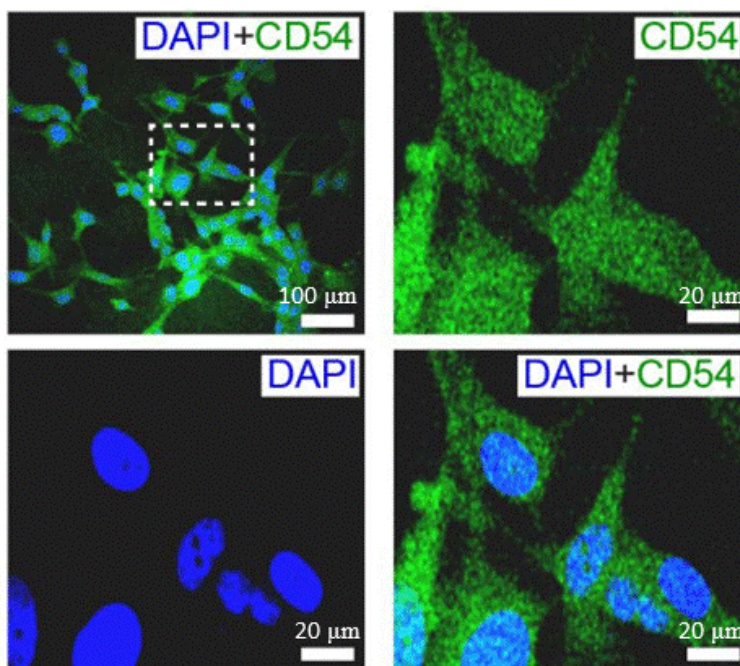
6.3.4 Analýza vybraných molekul *in vitro* a *ex vivo*

6.3.4.1 Adhezní molekula ICAM-1 (CD54)

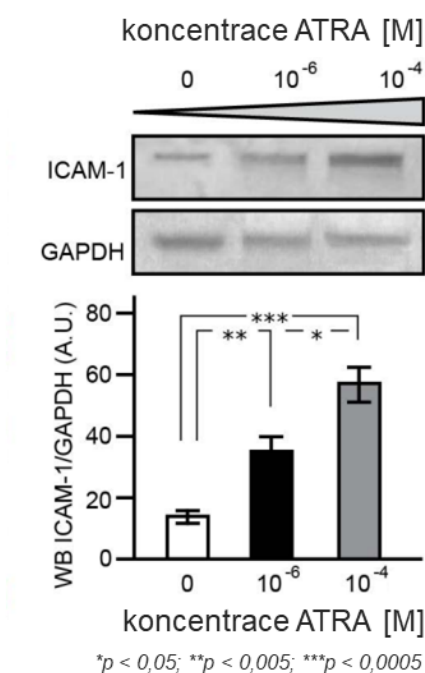
ICAM-1 je exprimována v gliomech vyšších stupňů (včetně GBM), u většiny gliomů prvního a druhého stupně nebyla přítomnost ICAM-1 potvrzena stejně jako ve zdravé mozkové tkáni. [64] Studie ukazují, že ICAM-1 je zapojena do procesu migrace a invaze buněk GBM rezistentního vůči chemoterapii. [70]

U buněčné linie U-87 MG byla ICAM-1 detekována rovnoměrně v celé populaci kultivovaných buněk. V buňkách této linie se vyskytuje v jádře a v cytoplasmě. (Obrázek 18) Expres ICAM-1 byla analyzována pomocí metody western blot za standardních podmínek a po přidání ATRA o různých koncentracích. Bylo zjištěno, že se zvyšujícími koncentracemi přidané ATRA se zvyšuje exprese ICAM-1 v buňkách U-87 MG. Při porovnání buněk exponovaných ($c_{\text{ATRA}} = 10^{-6}$ M) po dobu 7 dnů a buněk neexponovaných byla zjištěna statisticky významná změna ($1,2 \pm 4 \%$; $p = 0,005$) v množství ICAM-1. Při zvýšení koncentrace ATRA ($c_{\text{ATRA}} = 10^{-4}$ M) bylo naměřeno další statisticky významné zvýšení množství ICAM-1 ($3,3 \pm 3 \%$; $p = 0,0004$). (Obrázek 19)

Obrázek 18: Imunohistochemická detekce ICAM-1 v buňkách U-87 MG (CD54 - Alexa fluor 488, zelená; DAPI, modrá – buněčná jádra).

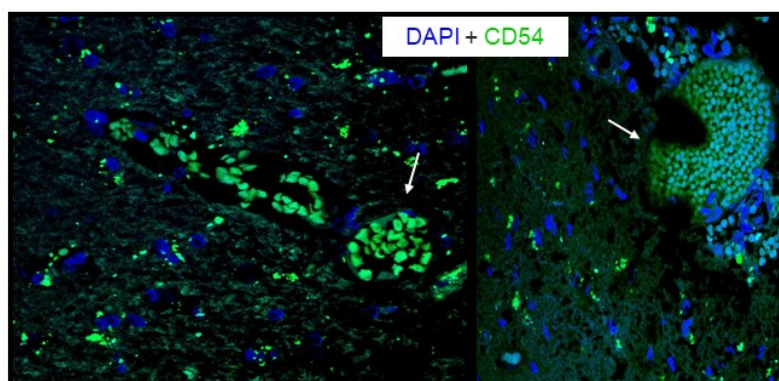


Obrázek 19: Analýza exprese ICAM-1 v buňkách U-87 MG vystavených ATRA pomocí metody western blot.



V histologických preparátech tkáně pacientů s diagnózou GBM byl protein ICAM-1 imunohistochemicky detekován v celém rozsahu tkáně. (Obrázek 20, zeleně) V preparátech byla rozpoznána místa s vyšší koncentrací tohoto proteinu v porovnání se zbytkem tkáně. (Obrázek 20 – označeno šipkami) Zvýšená intenzita ICAM-1 byla zjištěna v menších ohraničených zónách, které byly identifikovány jako oblasti mikrovaskulární proliferace, jež jsou charakteristické pro GBM. Výsledky z měření hladiny fluorescenční intenzity v jednotlivých vzorcích poukazují na rozdíly mezi jednotlivými pacienty a korelují s rozdíly v terapeutických přístupech mezi nimi (Tabulka 2). Porovnání mezi jednotlivými pacienty ukázalo statisticky významné rozdíly mezi P2 a P3 ($p = 0,0005$) a mezi P2 a P4 ($p = 0,0037$).

Obrázek 20: Imunohistochemická detekce ICAM-1 (zeleně) v histologických preparátech.

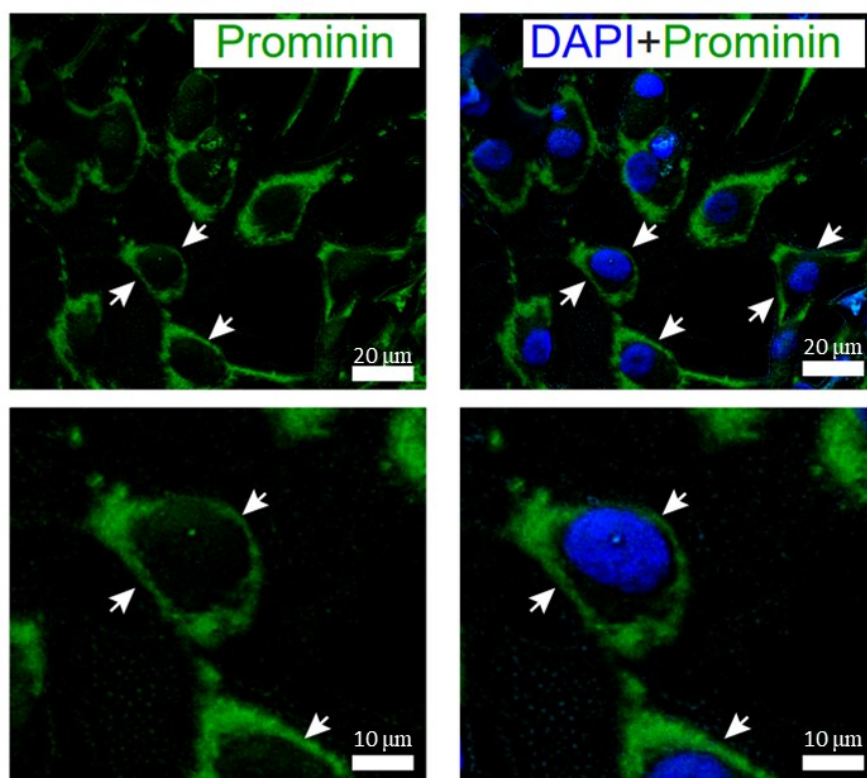


6.3.4.2 Marker kmenových buněk prominin-1 (CD133)

Expres CD133 koreluje s klinicko-patologickými parametry u gliomů a zvyšuje se se stupněm malignity. [91] Pro identifikaci CD133 imunohistochemickými metodami a průtokovou cytometrií je zapotřebí užití specifické protilátky, společná interakce může být ovlivněna mírou glykosylace CD133.

Přítomnost CD133 byla zkoumána pomocí protilátek anti-CD133 {abcam #ab216323}, které vykazují vysokou specifitu pro tento protein. CD133 byl detekován v cytoplazmě U-87 MG naprosté většiny buněk ($92,4 \pm 3 \%$) v mikroskopickém zorném poli (FoV = 20). CD133 nebyl detekován v perinukleárním prostoru. (Obrázek 21 – bílé šipky)

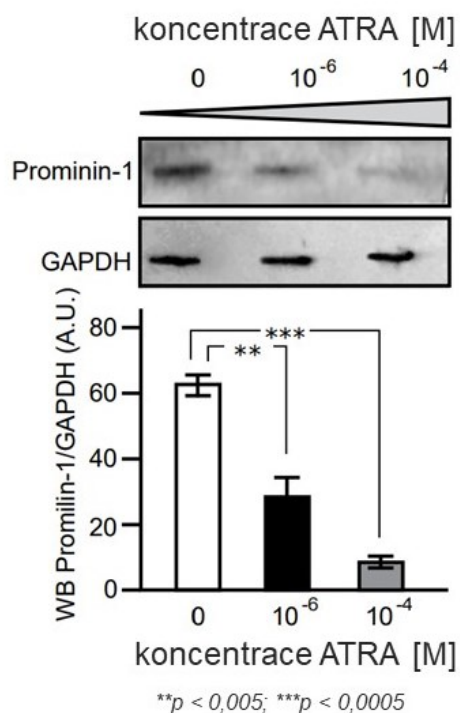
Obrázek 21: Imunohistochemická detekce promininu-1 / CD133 v buňkách U-87 MG.



Expres proteinu CD133 byla analyzovaná po sedmidenní expozici ATRA v různých koncentracích pomocí metody western blot. Množství CD133 negativně korelovalo s koncentrací ATRA, která byla přidána k buňkám při kultivaci. Při porovnání buněk exponovaných ($c_{ATRA} = 10^{-6}$ M) po dobu 7 dnů a buněk neexponovaných byl zjištěn

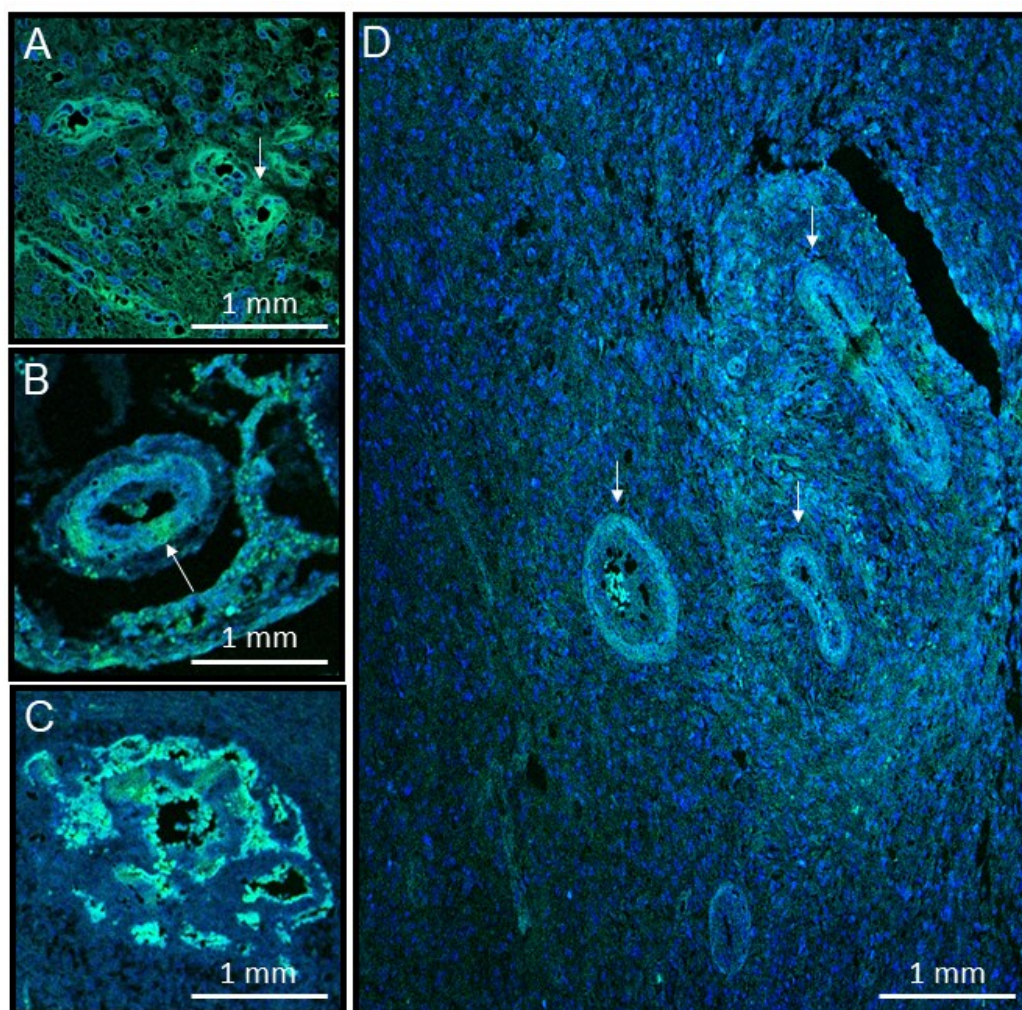
významný pokles ($p = 0.003$) množství exprimovaného CD133, při vyšší koncentraci ATRA ($c_{\text{ATRA}} = 10^{-4}$ M) byl pokles výraznější ($p = 0.000024$). (Obrázek 22)

Obrázek 22: Analýza exprese promininu-1 / CD133 v buňkách U-87 MG vystavených ATRA pomocí metody western blot.



V histologických preparátech tkáně pacientů s diagnózou GBM byla potvrzena přítomnost proteinu CD133 imunohistochemicky. Vyšší koncentrace tohoto glykoproteinu byla detekována v palisádujících buňkách kolem nekrotických oblastí (Obrázek 23 – bílé šipky), které jsou charakteristickým znakem GBM a byly pozorovány ve všech zkoumaných histologických preparátech pacientů P1-P4. Protein CD133 nebyl kolokalizován s GFAP, který nebyl detekován v pseudopalisádách. Byla analyzována síla intenzity signálu CD133 ve vzorcích pacientů P1-P4. Nejvyšší intenzita signálu byla zaznamenána ve vzorku GBM tkáně pacienta P2 (Obrázek 23C), u kterého nebyla tolerována adjuvantní terapie temozolomidem.

Obrázek 23: Imuhistochemická detekce promininu-1 / CD133 (zeleně) v histologických preparátech.



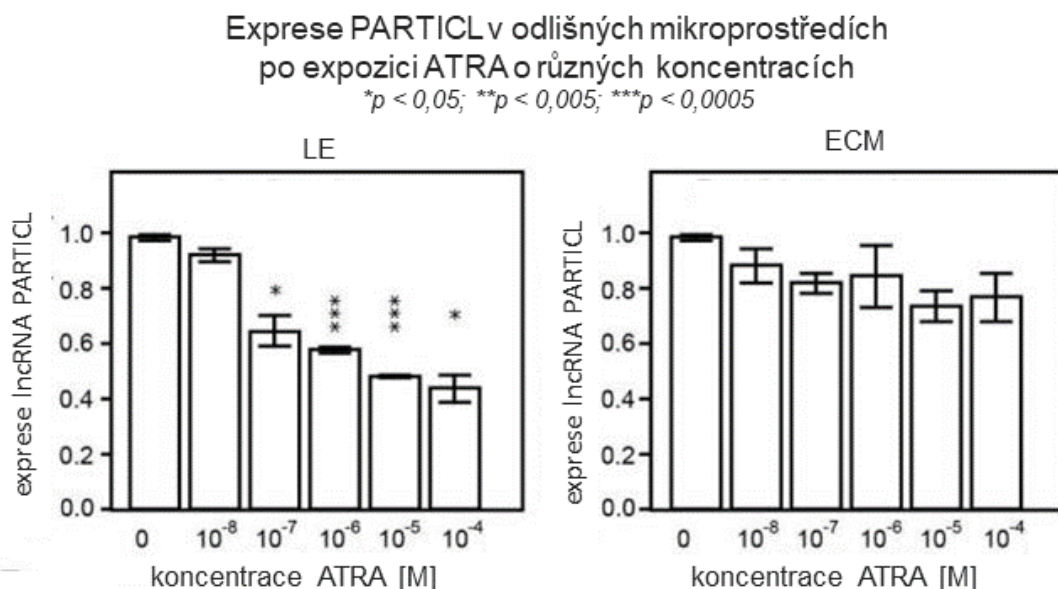
6.3.4.3 *lncRNA PARTICL*

Dlouhá nekódující RNA *PARTICL* hraje důležitou roli v methylaci a tím ovlivňuje epigenetické mechanismy, které jsou podstatné nejen v procesu karcinogeneze. [122] Zvýšená hladina *PARTICL* byla popsána u několika lidských buněčných linií po vystavení působení nízkých dávek záření (0,25 Gy) v návaznosti na zvýšení exprese *MAT2A*. [124]

Pomocí analýzy dat získaných kvantitativní PCR bylo zjištěno, že hladina exprese *lncRNA PARTICL* je proměnlivá v závislosti na koncentraci ATRA a typu mikroprostředí. Buněčná linie U-87 MG byla vystavena po dobu 7 dnů expozici ATRA v různých koncentracích (10^{-7} - 10^{-4} M) ve dvou odlišných mikroprostředích – v zóně LE a v zóně ECM. V zóně LE byla detekována snížená exprese *PARTICL* ve srovnání s neexponovanými kontrolami. Hladina exprese inverzně korelovala se zvyšující se koncentrací ATRA.

V druhém mikroprostředí, zóně ECM při zachování stejných podmínek a koncentrace ATRA se tento trend neprokázal. (Obrázek 24)

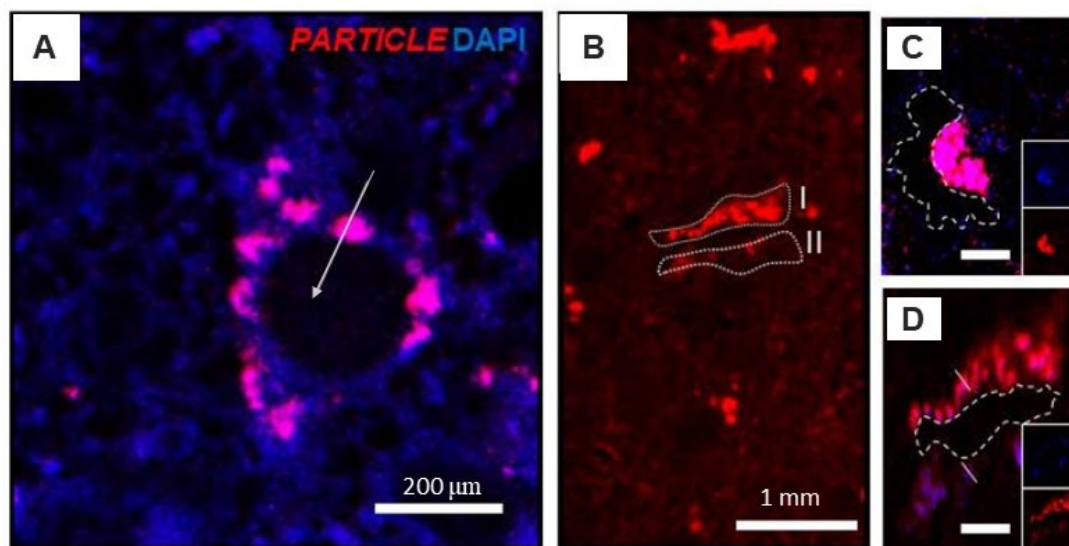
Obrázek 24: Porovnání relativně kvantifikované exprese PARTICL ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) k GAPDH ve dvou odlišných mikroprostředích.



Hladina exprese PARTICL byla porovnávána i v průběhu kultivace buněk mezi jednotlivými pasážemi. Expresa PARTICL v buňkách U-87 MG exponovaných ATRA o koncentraci 10^{-4} M významně poklesla ($p = 0,029$) při porovnání pasáže č. 5 (P#5) a pasáže č. 15 (P#15).

V histologických preparátech tkáně pacientů s diagnózou GBM byla lncRNA PARTICL detekována v jádrech nádorových buněk v nekrotických a perinekrotických oblastech. Tato buněčná jádra se vyznačovala atypickým tvarem. V jiných kompartmentech jaderných buněk nebyla přítomnost lncRNA PARTICL zjištěna. V těchto oblastech nebyla zaznamenána rovnoměrná exprese lncRNA PARTICL, pomocí imunohistochemických metod byla vyšší koncentrace PARTICL detekována vždy na jedné straně (peri)nekrotické niky. (Obrázek 25) Přítomnost lncRNA PARTICL v tkáni GBM byla potvrzena za pomoci metody kvantitativní PCR. Detekce PARTICL v deparafinovaných histologických preparátech GBM tkáně pacientů pomocí qPCR svědčí o výrazném zvýšení exprese PARTICL v GBM tkáni.

Obrázek 25: Exprese PARTICL v histologických preparátech. (A) Konfokální mikrofotografie exprese PARTICL (růžová) vedle bezbuněčných oblastí nádoru (šedá šipka). Přítomnost jader zobrazena DAPI barvením (modrá). (B, C, D) Exprese PARTICL (I a II analyzované oblasti) převážně na jedné straně bezjaderných oblastí (C, D - ohraničené oblasti); měřítko 1 mm.



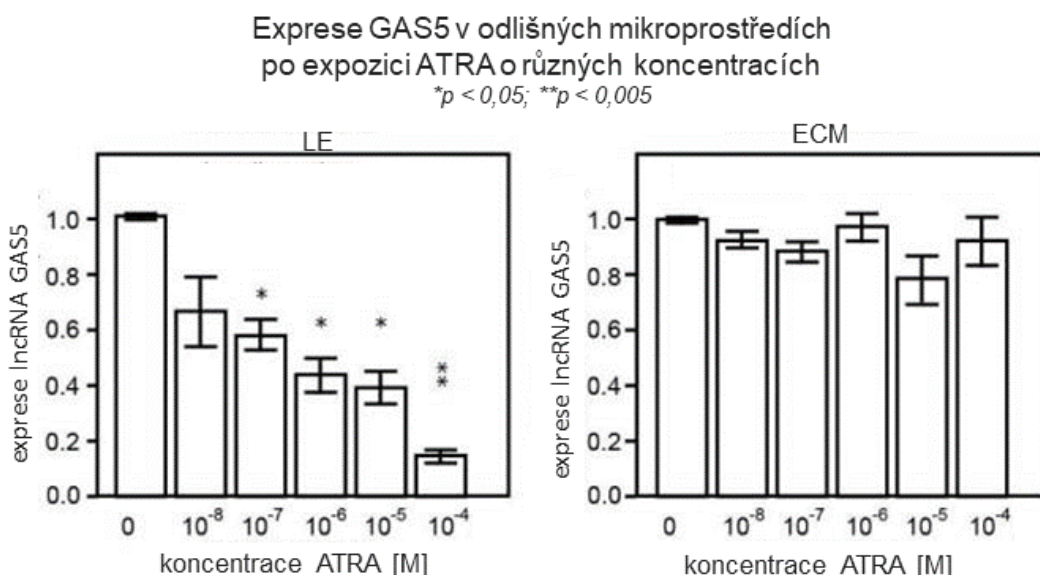
6.3.4.4 *lncRNA GAS5*

GAS5 je považován za tumor supresivní lncRNA ve spojitosti s mnoha maligními nádory, u kterých byla detekována snížená exprese tohoto transkriptu. Klinicko-patologické charakteristiky, ke kterým patří doba přežití, doba bez relapsu, přítomnost vzdálených metastáz, přítomnost metastáz v lymfatických uzlinách, velikost a progresse nádoru inverzně korelují s hladinou exprese této lncRNA u různých typů rakovin. [128]

Analýzou dat získaných kvantitativní PCR bylo zjištěno, že hladina exprese lncRNA GAS5 se mění v závislosti na koncentraci ATRA a typu mikroprostředí. Buněčná linie U-87 MG byla vystavena po dobu 7 dnů expozici ATRA v různých koncentracích (10^{-7} - 10^{-4} M) ve dvou odlišných mikroprostředích – v zóně LE a v zóně ECM. V zóně LE došlo k výraznému poklesu exprese GAS5 ve srovnání s neexponovanými kontrolami. Hladina exprese GAS5 inverzně korelovala se zvyšující se koncentrací ATRA. V druhém mikroprostředí, zóně ECM při zachování stejných podmínek a koncentrace ATRA nebyly patrné významné změny v expresi GAS5. (Obrázek 26)

Hladina exprese GAS5 byla porovnáována i v průběhu kultivace buněk mezi jednotlivými pasážemi. Exprese GAS5 v buňkách U-87 MG exponovaných ATRA o koncentraci 10^{-4} M významně vzrostla ($p = 0,019$) při porovnání P#5 a P#15.

Obrázek 26: Porovnání relativně kvantifikované exprese GAS5 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) k GAPDH ve dvou odlišných mikroprostředích.



V histologických preparátech tkáně pacientů s diagnózou GBM byla lncRNA GAS5 identifikována v cytoplasmě a v perinukleárním prostoru buněk rozličných nádorových mikroprostředích, v nichž se lišila i mírou exprese. Vyšší hladiny byly pozorovány v nekrotických oblastech ve srovnání s přilehlými proliferativními zónami (až 82% nárůst; $p = 0,003$) Rozdíly v expresi GAS5 byly znatelné i mezi jednotlivými pacienty a to v závislosti na reakci na adjuvantní terapii. Ve vzorcích GBM tkáně pacientů, u kterých byla zaznamenána pozitivní odpověď na TMZ terapii (P3 a P4), byla hladina exprese této tumor supresorové lncRNA významně vyšší ve srovnání s pacientem, u kterého TMZ nebyl tolerován. U tohoto pacienta byl GAS5 exprimován v hypoxických oblastech ve vyšších hladinách, ve srovnání s tkání z jiných typů nik. Těchto výsledků bylo dosaženo pomocí metod *in situ* hybridizace, amplifikace lncRNA GAS5 izolované z histologických preparátů se nezdařila.

7 DISKUZE

Glioblastom multiforme je nejčastějším a nejagresivnějším maligním mozkovým nádorem u dospělých, který odolává postupům konvenční terapie. Ta se aktuálně skládá z maximální možné chirurgické resekce a následné radioterapie a chemoterapie. [12] GBM je považován za onemocnění celého mozku, protože obsažené nádorové buňky jsou vysoce infiltrativní. Tato jejich vlastnost komplikuje úplnou resekci nádoru a vede k častým recidivám, které jsou hlavní příčinou úmrtí. [1] I přes poměrně nízkou incidenci 3-4 případy na 100 000 obyvatel, je nezbytné se zabývat výzkumem tohoto onemocnění kvůli jeho závažnosti a vysoké mortalitě. Průměrně se léčení pacienti dožívají 14-16 měsíců od první diagnózy, pouze 5-10 % pacientů se dožívá 5 let od manifestace choroby. [1] Účinnost léčby i pokrok ve výzkumu jsou znesnadňovány charakteristickými vlastnostmi tohoto nádoru, především schopností se infiltrovat do okolní zdravé tkáně a velkou heterogenitou nádorové tkáně.

V nádorovém mikroprostředí (TME) GBM se vyskytují kromě rakovinných buněk také endoteliální buňky, neurony, astrocyty, oligodendrocyty, rezidentní imunitní buňky např. mikroglie, cirkulující imunitní buňky infiltrující nádor a nebuněčné složky, jakými jsou např. apokrinní a parakrinní signální molekuly, exozomy a složky extracelulární matrix. [2]. TME je rozčleněno do několika anatomicky odlišných oblastí tzv. nádorových nik, které se mohou morfologicky a funkčně lišit i v rámci jednoho nádoru. Jednotlivé niky obsahují specifické typy buněk a proteinů, které jsou zodpovědné za specifické molekulární mechanismy a interakce s glioblastovými nádorovými kmenovými buňkami (GSC) v nikách. Tkáň celého nádoru je velmi různorodá a je tedy pochopitelné, že jednotlivé oblasti se mohou lišit i v reakci na terapeutické postupy. GBM mikroprostředí je velmi dynamické a jednotlivé niky mohou tak podléhat změnám a v průběhu času přecházet jedna v druhou (i v reakci na terapii). [25] Kvůli těmto charakteristickým vlastnostem je velmi obtížné vytvořit model pro výzkum molekulárních mechanismů a pro vývoj nových léčiv, který by kvalitně simuloval heterogenní mikroprostředí GBM a jeho proměnlivost.

Jedním ze základních modelů pro studium molekulárních mechanismů jsou buněčné nádorové linie. Mezi nejpoužívanější buněčné GBM linie patří U-87 MG, U-251 MG (U-373 MG), T98-G, A-172, které jsou odvozeny z odebrané tkáně od pacientů s diagnostikovaným GBM. [201] Jednotlivé linie se liší svými vlastnostmi včetně exprimovaných proteinů, počtu chromozomů a epigenomu. Tato práce byla zaměřena na

buněčnou linii U-87 MG, která je nejužívanější buněčnou linií pro výzkum GBM. Využití buněčných linií pro studium vlivů různých látek na daný nádor, v tomto případě ATRA na GBM, má několik výhod. Buněčné linie jsou poměrně snadno dostupné v určitém standardu. Lze je jednoduše kultivovat a manipulovat s nimi za opakovatelných podmínek. Protože jsou odvozeny z nádorové tkáně, vyznačují se podobnými vlastnostmi. Ty lze jednodušeji definovat, protože nejsou ovlivněny dalšími složkami nádoru. Jednotlivé buněčné linie jsou homogenní a působení zkoumaných látek není ovlivněno interakcemi s okolním prostředím. Odpadají též etická hlediska v případě některých metod. Využití buněčných linií jako modelu pro výzkum nádoru obzvláště GBM má také nesporně několik negativ. V buňkách buněčné linie dochází ke genetickým změnám včetně chromozomálních aberací v průběhu pasážování. U buněčné linie U-87 MG, pro kterou je typické velké množství chromozomálních aberací [202], bylo v této studii pozorováno zvýšení aberací v průběhu pasážování již od 10. pasáže. Po 16. pasáži byla pozorována výrazná polyploidie u většiny chromozomů. Toto zjištění podporuje studie [203], jež se zabývala změnami charakteristik buněčné linie U-87 MG při 100. pasážování. U-87 MG je dynamická buněčná linie a mění své vlastnosti v průběhu pasážování. Pro zachování stability a reprodukovatelnosti experimentálních dat je tedy třeba se vyvarovat dlouhodobému pasážování a provádět experimenty ve stejných nebo velmi blízkých pasážích. Mezi opakujícími chromozomálními aberacemi nalezenými v této buněčné linii byly pozorovány delece na krátkých raménkách prvních chromozomů, abnormality na krátkých raménkách chromozomů 9, delece na dlouhých raménkách chromozomů 6, mezichromatidové výměny i dicentrické chromozomy a difragmenty. U většiny zkoumaných mitóz byla pozorována monozomie u chromozomů č. 11, 13, 14 a 21. Sestavené karyotypy z jednotlivých pasáží nebyly identické, což potvrzuje dynamičnost U-87 MG.

V prostředí buněčné linie chybí buněčné i nebuněčné komponenty reálného TME, které je v případě GBM velmi heterogenní. [2] I přestože buněčná linie nemůže vhodně imitovat komplexnost nádorového prostředí, v této práci se povedlo nasimulovat alespoň dvě odlišná mikroprostředí pomocí buněčné linie U-87 MG. V těchto dvou mikroprostředích byly pozorovány odlišné reakce na stejný podnět ve formě vystavení působení all-trans-retinové kyseliny (ATRA).

ATRA jako derivát vitamínu A je důležitým modulátorem mnoha biologických procesů včetně vývoje, růstu a diferenciac normálních i nádorových buněk. [5] Pod názvem tretinoin je využíván k léčbě některých dermatitid a akutní promyelocytární leukémie s rizikem některých nežádoucích účinků včetně syndromu kyseliny retinové. [204] Podle

jedné studie [205] by mohl být vznik gliomů iniciován nerovnováhou v metabolismu endogenní kyseliny retinové a jejich receptorů. V některých případech je ATRA v kombinaci s dalšími účinnými látkami doporučována k léčbě difúzních gliomů, i GBM. [6] Bylo prokázáno, že ATRA inhibuje proliferaci některých gliomových buněčných linií včetně U-251 MG. [206] Během experimentů této práce bylo zjištěno, že ATRA ovlivňuje buňky linie U-87 MG rozličným způsobem v závislosti na mikroprostředí. V oblasti LE byla pozorována vyšší míra proliferace v důsledku expozice ATRA, v prostředí ECM tento efekt nebyl pozorován. Rozdílné účinky ATRA na zkoumaná mikroprostředí spolu s opačným účinkem na jiné gliomové buněčné linie poukazuje na nejednoznačnou roli ATRA v onkologické terapii. K potvrzení této hypotézy přispívají i další výsledky experimentů této práce, kde byl zkoumán vliv ATRA na vybrané biomolekuly s pro- i proti- nádorovými účinky.

Transmembránový glykoprotein ICAM-1, známý také jako molekula CD54, se vyskytuje v různých typech buněk např. v granulocytech a lymfocytech, ale i ve fibroblastech a endoteliálních buňkách. [60] Fyziologicky je exprimován na povrchu těchto buněk v nižších koncentracích, zvýšená exprese je indukována např. TNF- α , IL-1, oxidačním stresem nebo kyselinou retinovou a zesiluje imunitní odpověď. [57] [60] [61] Exprese ICAM-1 byla pozorována v buňkách rozličných nádorů včetně rakoviny plic, žaludku, žlučníku, slinivky, prsu a prostaty a také v gliomech. [52] [54] [63] ICAM-1 je exprimován v gliomech vyšších stupňů (včetně GBM), u většiny gliomů prvního a druhého stupně nebyla přítomnost ICAM-1 potvrzena, stejně tak ve zdravé mozkové tkáni. [64] Studie ukazují, že ICAM-1 je zapojen do procesu migrace a invaze buněk GBM rezistentního vůči chemoterapii. [70] Jeho inhibice snížila invazi gliomu *in vitro* i *in vivo*. [71] ICAM-1, který napomáhá invazi a migraci GBM buněk, je tedy považována za pronádorovou molekulu ve spojení s GBM. [70] V buněčné linii U-87 MG byl ICAM-1 detekován v jádrech a cytoplazmě buněk celé populace. Na zvyšující se koncentraci ATRA reagovaly buňky zvýšenou expresí tohoto glykoproteinu. ATRA v nižších i vyšších koncentracích indukuje zvýšenou expresi pronádorové molekuly ICAM-1. To potvrzují data z experimentů na jiných typech nádorů. [207] Zaměření na adhezni molekulu ICAM-1 nabízí potenciál pro překonání rezistence GBM vůči antiangiogenní léčbě a pro zlepšení prognózy tohoto agresivního nádorového onemocnění. [70]

Transmembránový glykoprotein prominin-1, známý také jako molekula CD133, je využíván pro identifikaci a izolaci kmenových buněk z rozličných tkání včetně kostní dřeně, mozku a ledvin, i k identifikaci nádorových kmenových buněk např. rakoviny prostaty,

slinivky, vaječníků a v gliomech. [89] Exprese CD133 koreluje s klinicko-patologickými parametry u gliomů a zvyšuje se se stupněm malignity. [91] Hypoxické mikroprostředí zvyšuje expresi CD133 v rakovinných buněčných liniích. [89] Pro identifikaci CD133 za pomoci protilátek je zapotřebí zvážit jejich specifčnost, protože společná interakce může být ovlivněna mírou glykosylace CD133 nebo existencí alternativních sestřihových variant. Je prokázáno, že CD133 úzce koreluje s velikostí nádoru, horší prognózou, vyšší mírou metastáz do lymfatických uzlin a rezistencí vůči terapii. [90] Detekce markeru kmenových buněk CD133 pomohla lépe charakterizovat buněčnou linii U-87 MG. Tento glykoprotein byl zjištěn v cytoplazmě většiny buněk. Expozice ATRA vyvolala u buněk inverzní expresní odpověď – se zvyšující koncentrací bylo detekováno snižující se množství CD133. Tato data přispívají k potvrzení dříve publikovaných informací, že ATRA inhibuje maligní charakteristiky CD133+ buněk v buněčných liniích různých nádorových onemocnění např. rakoviny štítné žlázy. [208] Dle [209] ATRA může indukovat diferenciaci a apoptózu gliomových buněk. Exprese CD133, která koreluje s klinicko-patologickými vlastnostmi gliomů, je inhibována ATRA. U-87 MG obsahuje velké množství CD133+ buněk, lze ji tedy využít pro výzkum GSC.

V lidském genomu bylo identifikováno přes 20 000 genů a více než 100 000 transkriptů, které nejsou dále translatovány a nekódují proteiny (ncRNA). [3] Důležitost nekódujícího transkriptomu potvrzuje existence přímé korelace mezi podílem ncRNA v genomu organismu a jeho vývojovou složitostí. Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) jsou molekuly RNA o délce větší 200 nukleotidů. Svoji funkcí se zapojují do mnoha buněčných procesů včetně diferenciaci a regulace exprese mnoha genů, ovlivňují i epigenetické mechanismy. [4] U velkého množství lncRNA není přesná funkce dosud známa, podle lokalizace lncRNA lze predikovat její pravděpodobnou úlohu v buňce. Některé lncRNA jsou spojovány s nádorovou aktivitou, mohou vykazovat onkogenní i tumor supresorové vlastnosti, u některých byla prokázána obojí aktivita v závislosti na typu rakoviny. Různé molekuly lncRNA jsou specificky exprimovány u určitých typů rakoviny a některé z nich mohou být detekovány v krvi (Příloha III, strana 148) nebo v moči a zdají se být vhodným neinvazivním biomarkerem. [98] S ohledem na skutečnost, že ve zdravé mozkové tkáni bylo nalezeno nejvíce typů lncRNA [4], a na intratumorální heterogenitu GBM tkáně, je žádoucí vzít v úvahu tyto transkripty při hledání nových léčebných postupů.

Dlouhá nekódující RNA PARTICL (ENSG00000286532) hraje důležitou roli v metylaci a tím ovlivňuje epigenetické mechanismy, které jsou podstatné nejen v procesu karcinogeneze. [122] Zvýšená hladina exprese PARTICL byla popsána po vystavení nízkým

dávkám záření (0,25 Gy) *in vitro* u několika lidských buněčných linií v návaznosti na zvýšení exprese MAT2A a *in vivo* v maligní tkáni. [124] Prozatímní výsledky ukazují, že jedna z možných úloh cirkulující lncRNA PARTICL spočívá v negativní regulaci tumor supresorových genů. [120] [123] PARTICL byla detekována i v buněčné linii U-87 MG. Hladina její exprese byla proměnlivá v závislosti na typu mikroprostředí a na koncentraci ATRA. Se zvyšující se koncentrací ATRA byl PARTICL exprimován v nižších koncentracích v proliferačním pásu. V druhém typu mikroprostředí tento trend nebyl pozorován, což zdůrazňuje důležitost mikroprostředí v regulaci biomolekul v nádoru. Hladina exprese byla také porovnáвана v průběhu dlouhodobého pasážování, kdy docházelo k významnému poklesu této lncRNA. Na základě těchto dat a dosavadních studií lze říci, že zapojení PARTICL do buněčných procesů je komplexní a jeho exprese může ovlivňovat chování GBM na několika úrovních, stejně tak jeho exprese a závislé geny mohou být ovlivněny více rozličnými faktory včetně mikroprostředí. Molekulární mechanismy zapojení PARTICL do regulace procesů v GBM nejsou zatím známy, ale pozorované změny v expresi v GBM buněčné linii přikládají této lncRNA důležitost ve spojitosti s možným novým terapeutickým využitím.

GAS5 (ENSG00000234741) je řazena mezi tumor supresorové lncRNA a její snížená exprese je detekována u různých typů rakoviny včetně karcinomu mléčné žlázy, rakoviny prostaty i vaječnicků a děložního čípku, kolorektálního karcinomu, rakoviny žaludku, ledvin, močového měchýře, plic, slinivky, endometria, ledvin, dále také u melanomu, osteosarkomu, neuroblastomů a gliomů. [127] U gliomů je prokázána negativní korelace mezi expresí GAS5 a stupněm malignity gliomu, hladina exprese je také spojována s dobou přežití. V gliomech nižších stupňů se GAS5 transkribuje více ve srovnání s gliomy vyšších stupňů včetně GBM. [137] Transkript GAS5 byl v U-87 MG detekován a jeho exprese reagovala v závislosti na mikroprostředí a na expozici ATRA. V zóně LE byl pozorován pokles této lncRNA jako odpověď na zvyšující se koncentraci ATRA. V průběhu dlouhodobého pasážování bylo naopak pozorováno zvýšení exprese GAS5. V této práci bylo prokázáno, že exprese tumor supresorové lncRNA GAS5 je inhibována expozicí ATRA v závislosti na mikroprostředí. Snížená exprese GAS5 působí proti aktivaci apoptózy a podporuje zrychlené dělení buněk, na druhé straně zvýšená exprese GAS5 inhibuje progresi buněčného cyklu. [127]

Na základě molekulární analýzy vybraných biomolekul *in vitro* nelze jednoznačně určit přínos ATRA v terapii GBM. Expozice ATRA zvyšuje expresi transmembránového glykoproteinu ICAM-1. Ten napomáhá invazi a migraci GBM buněk a je považován za

pronádorovou molekulu ve spojení s GBM. [70] Zvýšená exprese této biomolekuly při terapii není žádoucí. Na druhé straně exprese markeru nádorových kmenových buněk CD133, která koreluje s klinicko-patologickými vlastnostmi gliomů, je inhibována ATRA. U obou detekovaných lncRNA byla exprese ovlivněna expozicí ATRA v závislosti na mikroprostředí. Expese lncRNA PARTICL, která má schopnosti inhibovat tumor supresorové geny, klesá po expozici ATRA. To by mohl být žádoucí efekt při vývoji nových terapeutických postupů. Naproti tomu exprese lncRNA GAS5, která je považována za tumor supresorovou molekulu a hladina její exprese koreluje s dobou přežití, klesá v závislosti na expozici ATRA. Pro jednoznačné stanovení funkce a vlivu ATRA v terapii GBM je nutné otestovat dopad na více molekul a věnovat pozornost také nádorovému mikroprostředí a jednotlivým nikám. GBM buňky se liší v reakci na ATRA v závislosti na typu mikroprostředí, jak bylo prokázáno v této dizertační práci.

Vybrané biomolekuly byly také analyzovány v histologických preparátech tkáně resekovaných nádorů od pacientů s diagnostikovaným GBM, kde mohly být analyzovány v jejich přirozeném mikroprostředí. Pomocí histologických preparátů lze dobře zachytit komplexnost nádorového mikroprostředí a charakterizovat histologické vlastnosti celého tumoru. Na druhou stranu, dojde k zastavení biologických dějů a mikroprostředí je zachyceno pouze v daném okamžiku. Histologické vlastnosti jsou ve velké míře používány pro potvrzení diagnózy nejen GBM, nově i v kombinaci s molekulární diagnostikou. [10] V této práci byly analyzovány histologické preparáty vytvořené z resekované GBM tkáně od čtyř pacientů. Po obarvení byly pozorovány histologické znaky typické pro GBM a odpovídající IV. stupni malignity v souladu s dostupnými informacemi. [10] [42] Nálezy odpovídaly též klinickému stavu pacientů. Tkáň v rámci jednoho vzorku byla velmi heterogenní s nekrotickými obklopenými palisádovými buňkami, mnohočetnými a atypickými mitózami, zvýšenou mikrovaskularizací, shluky proliferujících buněk, nekrotickými, anaplaziemi a morfologickými atypickými jádry i celých buněk. Přestože se pacienti lišili v reakci na léčbu TMZ, histologické rysy různých vzorků byly velmi podobné. V porovnání s touto skutečností, v expresi dříve zmíněných biomolekul byly nalezeny rozdíly kopírující rozdíly v odpovědi na léčbu.

Adhezní protein ICAM-1 byl exprimován v celé sledované části tkáně, v některých místech byla jeho koncentrace vyšší. Ty byly identifikovány jako oblasti mikrovaskulární proliferace. V této práci byly nalezeny významné rozdíly mezi pacientem netolerujícím TMZ a pacienty reagujícími na adjuvantní terapii. Vztah mezi mírou exprese ICAM-1 a reakcí na TMZ terapii nebyl prozatím potvrzen. CD133 nebyl detekován v celém rozsahu

tkáně GBM, což odpovídá modelu nádorových nik s obsahem CD133+ buněk. [87] CD133 byl detekován především ve dvou oblastech – v palisádujících buňkách obklopujících nekrózy a ve stěnách cév. Tato místa exprese byla již dříve pozorována v jiných experimentech. [210] Též byly pozorovány rozdíly v expresi CD133 mezi jednotlivými pacienty. Nejvyšší koncentrace CD133 byla zaznamenána u pacienta později netolerujícího TMZ.

V této práci byla poprvé identifikována lncRNA PARTICL v tkáni GBM. Její exprese nebyla rovnoměrná, opisovala heterogenitu tkáně. Spolu s výsledky z experimentů s buněčnou linií lze tvrdit, že exprese PARTICL v GBM je závislá na typu nádorového mikroprostředí. Zvýšená exprese byla detekována v nádorových buňkách sousedících s nekrotickými oblastmi. Tyto buňky převažovaly více na jedné straně nekrotického výklenku. To naznačuje možné zapojení do proliferace nádorových buněk jako modulátoru směru růstu nádoru. Již dříve byla prokázána pronádorová role této lncRNA. [120] Detekce GAS5 v histologických preparátech P1-P4 potvrzuje dřívější studie o přítomnosti této lncRNA v GBM tkáni. [153] Bylo prokázáno, že exprese tumor supresorové lncRNA GAS5 inverzně koreluje s celkovým přežitím pacientů s diagnózou GBM. [2] [130] Této skutečnosti odpovídají i rozdíly mezi hladinami expresí GAS5 jednotlivých pacientů. U pacienta netolerujícího TMZ byla detekována výrazně nižší exprese této tumor supresorové lncRNA ve srovnání s ostatními pacienty.

I přes nízký počet vzorků tato studie naznačuje několik trendů, které by při potvrzení na větším množství vzorků mohly přinést pokrok v terapii GBM. Byla poprvé identifikována lncRNA PARTICL v resekované tkáni GBM. S ohledem na skutečnost, že zvýšení její exprese je indukováno vystavením záření, mohla by tato lncRNA mít roli v radiorezistenci některých GBM buněk. Tomu nasvědčuje i fakt, že gen *WWOX*, který je spojován s radiosenzitivitou GBM buněk, je regulován cirkulujícími lncRNA včetně PARTICL. [120] [121]

V průběhu této práce byl také vytvořen systematicky přehled lncRNA molekul, které byly zkoumány ve spojení s GBM. Jejich exprese je vysoce specifická, rozdíly byly detekovány mezi rozdílnými tkáněmi i buňkami i při patofyziologických stavech. [97] [101] Bylo dokázáno, že některé lidské choroby včetně rakoviny jsou propojeny s deregulacemi lncRNA, což z těchto molekul dělá potencionální terapeutické cíle a biomarkery hůře diagnostikovatelných onemocnění. [3] Klinicky využívaným biomarkerem je lncRNA PCA3. V roce 2012 byl americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA; z angl. Food and Drug Administration) schválen diagnostický test karcinomu prostaty založený na

detekci lncRNA PCA3 v moči. [98] Deregulované hladiny různých lncRNA byly detekovány také v krvi pacientů s diagnostikovaným GBM. (Příloha 3, strana 152) Na základě probíhajících výzkumů a dostupných dat by mohla být vytvořena sada lncRNA deregulovaných u GBM pacientů tzv. lncRNA podpis, který by mohl pomoci s včasnou diagnózou, přesnější prognózou a s monitorováním odpovědi na léčbu.

K důležitosti lncRNA ve výzkumu GBM přispívá již dříve zmíněná skutečnost, že v mozkové tkáni je zastoupeno nejvíce typů lncRNA. Ty jsou zapojeny do regulačního systému, který napomáhá vývoji a udržování velkého množství různých buněk obsažených v mozkové tkáni. [4] Studie ukazují spojitost mezi molekulami lncRNA a téměř všemi procesy zapojenými do tumorogeneze. Přestože určení přesné funkce dané molekuly lncRNA je složité (změna v expresi ve většině případů nezpůsobí výraznou fenotypovou změnu a nelze tak snadno propojit danou molekulu s funkcí), některým lncRNA byla na základě studií přiřčena ve spojitosti s GBM funkce onkogenní (MIAT, HOTAIR, SAMMSON, ...), tumor supresorová (GAS5, MEG3, PART1 a další) nebo diagnostická (SOX2-OT, MIR210HG,...). Molekuly lncRNA jsou zapojeny do mnoha procesů v GBM - proliferace (MIAT), apoptózy buněk (MALAT1), invaze buněk (lncRNA-ATB), angiogeneze (HULC), reakce na poškození DNA (PCAT1), regulace buněčného cyklu (CASC7), regulace mikroprostředí nádoru (FAM66C), hypoxie (MIR210HG), propustnosti BBB (TUG1), progresu nádoru (TUNAR), recidivy (lnc-TALC), TMZ rezistence (ADAMTs9-AS2), radiční odolnosti (HMMR-AS1) a dalších. (Tabulka 1, strana 46) Jak bylo prokázáno v této práci, při experimentech s lncRNA ve spojitosti s GBM, je nutné věnovat pozornost heterogenitě GBM tkáně a možným odlišným reakcím v jednotlivých nikách.

K lncRNA, které jsou největší skupinou nekódujících transkriptů (Obrázek 5, strana 32), je v poslední době upnuta velká pozornost. Jejich výzkum se neustále rozvíjí a každý rok je identifikováno mnoho dalších transkriptů. [211] Pro utřídění a sdílení informací bylo vytvořeno několik databází specializovaných na lncRNA, některé byly použity při psaní této práce (např. LNCipedia 5.2; lncRNAfunc). Databáze obsahují mnohá data k jednotlivým lncRNA, včetně alternativních jmen a různých identifikátorů např. ID genu, Hugo nomenklatury, Ensembl identifikátorů genu i transkriptu. Ve většině databází nejsou uvedeny všechny údaje a všechny názvy pro danou lncRNA, některé používají i vlastní systém identifikace lncRNA. To ztěžuje hledání informací o konkrétní molekule lncRNA nejen v databázích, ale i v odborných článcích.

Přínosem by bylo používání jednotného značení lncRNA nebo využití jedné z existujících identifikačních signatur, aby nedocházelo např. k záměně nebo duplikaci jednotlivých molekul. Vzhledem k neustále novým objevům v souvislosti s lncRNA dochází v mnoha případech po odhalení funkce dané molekuly k jejímu přejmenování. [212] Data k této molekule je pak nutné dohledávat pod dvěma i více názvy, které lze snadno identifikovat jako více odlišných lncRNA. Pro lepší přehlednost byly lncRNA v přehledu vytvořeném v této práci popsány nejen výčtem nejužívanějších názvů, ale i lokalizací jejich genů na chromozomech a použitím Ensembl genového identifikátoru (ENSG). Podobné výzvě čelí i klasifikace gliomů, kdy je často využíván pojem gliom i pro experimenty s GBM buněčnými liniemi a pro tkáň pacientů s potvrzenou diagnózou GBM.

8 ZÁVĚR

Výsledky z provedených experimentů v rámci této práce lze shrnout do několika bodů:

- Bylo prokázáno, že ATRA, derivát vitamínu A, v závislosti na její koncentraci a typu nádorového mikroprostředí ovlivňuje buněčnou linii U-87 MG. V zóně proliferace se buňky exponované ATRA vyznačují zvýšenou schopností proliferace ve srovnání s buňkami neexponovanými.
- Po expozici ATRA byly stanoveny rozdíly v expresi vybraných biomolekul v buněčné linii U-87 MG:
 - Exprese transmembránového glykoproteinu ICAM-1/CD54, považovaného za pronádorovou molekulu ve spojitosti s GBM, byla významně zvýšena expozicí ATRA o různých koncentracích.
 - Marker nádorových kmenových buněk prominin-1/CD133 byl exprimován méně a jeho exprese negativně korelovala s koncentrací ATRA.
 - Exprese lncRNA PARTICL, která patří mezi negativní regulátory tumor supresorových genů, byla poprvé detekována u U-87 MG. V zóně proliferačního pásu, po expozici ATRA byla exprimována v menší míře.
 - Exprese tumor supresorové lncRNA GAS5 byla inhibována po expozici ATRA. V zóně proliferace byl pozorován její pokles jako odpověď na zvyšující se koncentraci ATRA.
- Výše zmíněné biomolekuly byly analyzovány v histologických preparátech tkáně GBM resekované od pacientů s touto diagnózou. Byly pozorovány rozdíly mezi jednotlivými pacienty, kteří se lišili v odpovědi na terapii TMZ. Cirkulující lncRNA PARTICL byla poprvé detekována v tkáni GBM.
- Byl vytvořen seznam lncRNA zapojených do molekulárních procesů v GBM. Pro lepší přehled byly použity identifikátory jednotlivých lncRNA

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MELHEM, Jawad; DETSKY, Jay; LIM-FAT, Mary a PERRY, James. Updates in IDH-Wildtype Glioblastoma. online. *Neurotherapeutics*. 2022, roč. 19, č. 6, s. 1705-1723. ISSN 1933-7213. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01251-6>. [cit. 2023-04-13].
- [2] REZAEI, Omidvar; TAMIZKAR, Kasra; SHARIFI, Guive; TAHERI, Mohammad a GHAFOURI-FARD, Soudeh. Emerging Role of Long Non-Coding RNAs in the Pathobiology of Glioblastoma. online. *Frontiers in Oncology*. 2021, roč. 10. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.625884>. [cit. 2023-04-02].
- [3] FERNANDES, Juliane; ACUÑA, Stephanie; AOKI, Juliana; FLOETER-WINTER, Lucile a MUXEL, Sandra. Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. *Non-Coding RNA*. 2019, roč. 5, č. 1. ISSN 2311-553X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ncrna5010017>.
- [4] WARD, Melanie; MCEWAN, Callum; MILLS, James a JANITZ, Michael. Conservation and tissue-specific transcription patterns of long noncoding RNAs. *Journal of Human Transcriptome*. 2015, roč. 1, č. 1, s. 2-9. ISSN 2332-4015. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/23324015.2015.1077591>.
- [5] CIMINI, Annamaria a IPPOLITI, Rodolfo. Innovative Therapies against Human Glioblastoma Multiforme. *ISRN Oncology*. 2011, roč. 2011, s. 1-12. ISSN 2090-5661. Dostupné z: <https://doi.org/10.5402/2011/787490>.
- [6] DI BELLA, Giuseppe; LECI, Jovan; RICCHI, Alessandro a TOSCANO, Rosilde. Recurrent Glioblastoma Multiforme (grade IV - WHO 2007): a case of complete objective response - concomitant administration of Somatostatin / Octreotide, Retinoids, Vit E, Vit D3, Vit C, Melatonin, D2 R agonists (Di Bella Method. online. *Neuro-endocrinology letters*. 2015, roč. 36, č. 2, s. 127-132. ISSN 0172-780X. [cit. 2023-06-02].
- [7] GOODENBERGER, McKinsey a JENKINS, Robert. Genetics of adult glioma. online. *Cancer Genetics*. 2012, roč. 205, č. 12, s. 613-621. ISSN 22107762. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2012.10.009>. [cit. 2023-04-08].
- [8] GROCHANS, Szymon; CYBULSKA, Anna; SIMIŃSKA, Donata; KORBECKI, Jan; KOJDER, Klaudyna et al. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. online. *Cancers*. 2022, roč. 14, č. 10. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers14102412>. [cit. 2023-04-08].
- [9] LOUIS, David; PERRY, Arie; REIFENBERGER, Guido; VON DEIMLING, Andreas; FIGARELLA-BRANGER, Dominique et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. online. *Acta Neuropathologica*. 2016, roč. 131, č. 6, s. 803-820. ISSN 0001-6322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>. [cit. 2023-04-08].
- [10] LOUIS, David; PERRY, Arie; WESSELING, Pieter; BRAT, Daniel; CREE, Ian et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. online. *Neuro-Oncology*. 2021, roč. 23, č. 8, s. 1231-1251. ISSN 1522-8517. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>. [cit. 2023-04-08].
- [11] LAPOINTE, Sarah; PERRY, Arie a BUTOWSKI, Nicholas. Primary brain tumours in adults. online. *The Lancet*. 2018, roč. 392, č. 10145, s. 432-446. ISSN 01406736. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30990-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30990-5). [cit. 2023-04-08].
- [12] Glioblastoma Multiforme. online. In: KANDERI, T a GUPTA, V. *Glioblastoma Multiforme*. StatPearls Publishing, s. 1-20. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558954/>. [cit. 2023-04-08].
- [13] CARRANO, Anna; JUAREZ, Juan; INCONTRI, Diego; IBARRA, Antonio a GUERRERO CAZARES, Hugo. Sex-Specific Differences in Glioblastoma. *Cells*. 2021, roč. 10, č. 7. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells10071783>.
- [14] OSTROM, Quinn; FAHMIDEH, Maral; COTE, David; MUSKENS, Ivo; SCHRAW, Jeremy et al. Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. online. *Neuro-Oncology*. 2019, roč. 21, č. 11, s. 1357-1375. ISSN 1522-8517. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz123>. [cit. 2023-04-14].

- [15] HENDRYCH, Michal; VALEKOVÁ, Hana; KAZDA, Tomáš; LAKOMÝ, Radek; ŠÁNA, Jiří et al. Integrated diagnostics of diffuse gliomas. *Klinická Onkologie*. 2020, roč. 33, č. 4, s. 248-259. ISSN 0862495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2020248>.
- [16] OLYMPIOS, Nathalie; GILARD, Vianney; MARGUET, Florent; CLATOT, Florian; DI FIORE, Frédéric et al. TERT Promoter Alterations in Glioblastoma: A Systematic Review. online. *Cancers*. 2021, roč. 13, č. 5. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers13051147>. [cit. 2023-04-11].
- [17] Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. online. *Nature*. 2008, roč. 455, č. 7216, s. 1061-1068. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature07385>. [cit. 2023-04-14].
- [18] STEPONAITIS, Giedrius a TAMASAUSKAS, Arimantas. Mesenchymal and Proneural Subtypes of Glioblastoma Disclose Branching Based on GSC Associated Signature. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 9. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22094964>.
- [19] HEGI, Monika; DISERENS, Annie-Claire; GORLIA, Thierry; HAMOU, Marie-France; DE TRIBOLET, Nicolas et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005, roč. 352, č. 10, s. 997-1003. ISSN 0028-4793. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70164-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70164-X).
- [20] WICK, Wolfgang; PLATTEN, Michael; MEISNER, Christoph; FELSBERG, Jörg; TABATABAI, Ghazaleh et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2012, roč. 13, č. 7, s. 707-715. ISSN 14702045. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70164-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70164-X).
- [21] ALNAHHAS, Iyad; ALSAWAS, Mouaz; RAYI, Appaji; PALMER, Joshua; RAVAL, Raju et al. Characterizing benefit from temozolomide in MGMT promoter unmethylated and methylated glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. online. *Neuro-Oncology Advances*. 2020, roč. 2, č. 1. ISSN 2632-2498. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdaa082>. [cit. 2023-04-13].
- [22] HIDE, Takuichiro; SHIBAHARA, Ichiyo a KUMABE, Toshihiro. Novel concept of the border niche: glioblastoma cells use oligodendrocytes progenitor cells (GAOs) and microglia to acquire stem cell-like features. *Brain Tumor Pathology*. 2019, roč. 36, č. 2, s. 63-73. ISSN 1433-7398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10014-019-00341-2>.
- [23] SHARMA, Pratibha; AAROE, Ashley; LIANG, Jiyong a PUDUVALLI, Vinay. Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. *Neuro-Oncology Advances*. 2023, roč. 5, č. 1. ISSN 2632-2498. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdad009>.
- [24] DAPASH, Mark; HOU, David; CASTRO, Brandyn; LEE-CHANG, Catalina a LESNIAK, Maciej. The Interplay between Glioblastoma and Its Microenvironment. online. *Cells*. 2021, roč. 10, č. 9. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells10092257>. [cit. 2023-04-20].
- [25] HAMBARDZUMYAN, Dolores a BERGERS, Gabriele. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends in Cancer*. 2015, roč. 1, č. 4, s. 252-265. ISSN 24058033. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.10.009>.
- [26] ARNOLD, Christoph; MANGESIUS, Julian; SKVORTSOVA, Ira-Ida a GANSWINDT, Ute. The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Frontiers in Oncology*. 2020, roč. 10. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00164>.
- [27] ALVES, Ana; GOMES, Izabela; CARLONI, Adriana; ROSA, Marcela; DA SILVA, Luciane et al. Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives. 2021, roč. 12, č. 1. ISSN 1757-6512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02231-x>.
- [28] SCHIFFER, Davide; MELLAI, Marta; BOVIO, Enrica; BISOGNO, Ilaria; CASALONE, Cristina et al. Glioblastoma niches: from the concept to the phenotypical reality. *Neurological Sciences*. 2018, roč. 39, č. 7, s. 1161-1168. ISSN 1590-1874. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3408-0>.
- [29] SCHIFFER, Davide; MELLAI, Marta; ANNOVAZZI, Laura; CALDERA, Valentina; PIAZZI, Angela et al. Stem Cell Niches in Glioblastoma: A Neuropathological View. online. *BioMed Research*

- International*. 2014, roč. 2014, s. 1-7. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2014/725921>. [cit. 2023-05-07].
- [30] KANG, Hyunkoo; LEE, Haksoo; KIM, Dahye; KIM, Byeongsoo; KANG, JiHoon et al. Targeting Glioblastoma Stem Cells to Overcome Chemoresistance: An Overview of Current Therapeutic Strategies. *Biomedicines*. 2022, roč. 10, č. 6. ISSN 2227-9059. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061308>.
- [31] TANG, Xuejia; ZUO, Chenghai; FANG, Pengchao; LIU, Guojing; QIU, Yongyi et al. Targeting Glioblastoma Stem Cells: A Review on Biomarkers, Signal Pathways and Targeted Therapy. online. *Frontiers in Oncology*. 2021, roč. 11. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.701291>. [cit. 2023-05-06].
- [32] PRAGER, Briana; BHARGAVA, Shruti; MAHADEV, Vaidehi; HUBERT, Christopher a RICH, Jeremy. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. online. *Trends in Cancer*. 2020, roč. 6, č. 3, s. 223-235. ISSN 24058033. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.01.009>. [cit. 2023-05-06].
- [33] KALKAN, Rasime. Glioblastoma Stem Cells as a New Therapeutic Target for Glioblastoma. *Clinical Medicine Insights: Oncology*. 2015, roč. 9. ISSN 1179-5549. Dostupné z: <https://doi.org/10.4137/CMO.S30271>.
- [34] URIBE, Daniel; NIECHI, Ignacio; RACKOV, Gorjana; ERICES, José; SAN MARTÍN, Rody et al. Adapt to Persist: Glioblastoma Microenvironment and Epigenetic Regulation on Cell Plasticity. online. *Biology*. 2022, roč. 11, č. 2. ISSN 2079-7737. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biology11020313>. [cit. 2023-05-07].
- [35] HALLIDAY, John; HELMY, Karim; PATTWELL, Siobhan; PITTEK, Kenneth; LAPLANT, Quincey et al. In vivo radiation response of proneural glioma characterized by protective p53 transcriptional program and proneural-mesenchymal shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014, roč. 111, č. 14, s. 5248-5253. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1321014111>.
- [36] ADERETTI, Diana; HIRA, Vashendriya; MOLENAAR, Remco a VAN NOORDEN, Cornelis. The hypoxic peri-arteriolar glioma stem cell niche, an integrated concept of five types of niches in human glioblastoma. online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2018, roč. 1869, č. 2, s. 346-354. ISSN 0304419X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.04.008>. [cit. 2023-05-06].
- [37] AKINDONA, Funto; FREDERICO, Stephen; HANCOCK, John a GILBERT, Mark. Exploring the origin of the cancer stem cell niche and its role in anti-angiogenic treatment for glioblastoma. online. *Frontiers in Oncology*. 2022, roč. 12. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.947634>. [cit. 2023-05-06].
- [38] SEIDEL, Sascha; GARVALOV, Boyan; WIRTA, Valtteri; VON STECHOW, Louise; SCHÄNZER, Anne et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α . online. *Brain*. 2010, roč. 133, č. 4, s. 983-995. ISSN 1460-2156. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/brain/awq042>. [cit. 2023-04-23].
- [39] SOEDA, A; PARK, M; LEE, D; MINTZ, A; ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS, A et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α . online. *Oncogene*. 2009, roč. 28, č. 45, s. 3949-3959. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/onc.2009.252>. [cit. 2023-04-23].
- [40] ZAGZAG, David; LUKYANOV, Yevgeniy; LAN, Li; ALI, M; ESENCAY, Mine et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. online. *Laboratory Investigation*. 2006, roč. 86, č. 12, s. 1221-1232. ISSN 00236837. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700482>. [cit. 2023-04-23].
- [41] LI, Zhizhong; BAO, Shideng; WU, Qiulian; WANG, Hui; EYLER, Christine et al. Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. online. *Cancer Cell*. 2009, roč. 15, č. 6, s. 501-513. ISSN 15356108. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.018>. [cit. 2023-04-23].
- [42] LAKOMÝ, Radek; KAZDA, Tomáš a ŠLAMPÁ, Pavel. *Gliomy: současná diagnostika a léčba*. 2. vydání. Jessenius. Praha: Maxdorf, 2018. ISBN 978-80-7345-561-3.

- [43] SODA, Yasushi; MARUMOTO, Tomotoshi; FRIEDMANN-MORVINSKI, Dinorah; SODA, Mie; LIU, Fei et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011, roč. 108, č. 11, s. 4274-4280. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1016030108>. [cit. 2023-04-23].
- [44] RICCI-VITIANI, Lucia; PALLINI, Roberto; BIFFONI, Mauro; TODARO, Matilde; INVERNICI, Gloria et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*. 2010, roč. 468, č. 7325, s. 824-828. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature09557>.
- [45] TORRES, Ángelo; ERICES, Jose; SANCHEZ, Fabiola; EHRENFELD, Pamela; TURCHI, Laurent et al. Extracellular adenosine promotes cell migration/invasion of Glioblastoma Stem-like Cells through A3 Adenosine Receptor activation under hypoxia. *Cancer Letters*. 2019, roč. 446, s. 112-122. ISSN 03043835. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.004>.
- [46] ABBOTT, N. Joan. Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2013, roč. 36, č. 3, s. 437-449. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9608-0>.
- [47] WANG, Da; WANG, Chao; WANG, Liang a CHEN, Yue. A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment. *Drug Delivery*. 2019, roč. 26, č. 1, s. 551-565. ISSN 1071-7544. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1616235>.
- [48] SMRČKA, Martin; BELANOVÁ, Renata; FADRUS, Pavel; HERMANOVÁ, Markéta; KAZDA, Tomáš et al. *Gliomy mozku – diagnostika a léčba: Adaptovaný doporučený postup*. 3. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2022. ISSN CZ.03.2.63/0.0/0.0/15_039/0008221.
- [49] BAO, Shideng; WU, Qiulian; MCLENDON, Roger; HAO, Yueling; SHI, Qing et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006, roč. 444, č. 7120, s. 756-760. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature05236>.
- [50] ZHANG, Jihong; F.G. STEVENS, Malcolm a D. BRADSHAW, Tracey. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Current Molecular Pharmacology*. 2012, roč. 5, č. 1, s. 102-114. ISSN 18744672. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1874467211205010102>.
- [51] *Cellular and Molecular Immunology*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 2018. ISBN 0-7216-4024-9.
- [52] HAYES, Sarah a SEIGEL, Gail. Immunoreactivity of ICAM-1 in Human Tumors, Metastases and Normal Tissues. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009, roč. 2009, č. 26, s. 553–560. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2713456/>.
- [53] LIN, Yi-Chu; SHUN, Chia-Tung; WU, Ming-Shiang a CHEN, Ching-Chow. A Novel Anticancer Effect of Thalidomide: Inhibition of Intercellular Adhesion Molecule-1–Mediated Cell Invasion and Metastasis through Suppression of Nuclear Factor- κ B. online. *Clinical Cancer Research*. 2006, roč. 12, č. 23, s. 7165-7173. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1393>. [cit. 2023-02-21].
- [54] ROLAND, Christina; HARKEN, Alden; SARR, Michael a BARNETT, Carlton. ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. online. *Surgery*. 2007, roč. 141, č. 6, s. 705-707. ISSN 00396060. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2007.01.016>. [cit. 2023-02-23].
- [55] BUI, Triet; WIESOLEK, Hannah a SUMAGIN, Ronen. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. online. *Journal of Leukocyte Biology*. 2020, roč. 108, č. 3, s. 787-799. ISSN 0741-5400. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0220-549R>. [cit. 2023-02-24].
- [56] YANG, Yuting; JUN, Chang-Duk; LIU, Jin-huan; ZHANG, Rongguang; JOACHIMIAK, Andrzej et al. Structural Basis for Dimerization of ICAM-1 on the Cell Surface. online. *Molecular Cell*. 2004, roč. 14, č. 2, s. 269-276. ISSN 10972765. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00204-7). [cit. 2023-02-17].
- [57] VAN DE STOLPE, A. a VAN DER SAAG, P. Intercellular adhesion molecule-1. online. *Journal of Molecular Medicine*. 1996, roč. 74, č. 1, s. 13-33. ISSN 0946-2716. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF00202069>. [cit. 2023-02-16].

- [58] IWAO, Mutsumi; MORISAKI, Hiroko a MORISAKI, Takayuki. Single-nucleotide polymorphism g.1548G A (E469K) in human ICAM-1 gene affects mRNA splicing pattern and TPA-induced apoptosis. online. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004, roč. 317, č. 3, s. 729-735. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.101>. [cit. 2023-02-25].
- [59] KESANAKURTI, D; CHETTY, C; RAJASEKHAR MADDIRELA, D; GUJRATI, M a RAO, J. Essential role of cooperative NF- κ B and Stat3 recruitment to ICAM-1 intronic consensus elements in the regulation of radiation-induced invasion and migration in glioma. online. *Oncogene*. 2013, roč. 32, č. 43, s. 5144-5155. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/onc.2012.546>. [cit. 2023-02-24].
- [60] HUBBARD, Andrea K a ROTHLEIN, Robert. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. online. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000, roč. 28, č. 9, s. 1379-1386. ISSN 08915849. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00223-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00223-9). [cit. 2023-02-17].
- [61] ROEBUCK, Kenneth a FINNEGAN, Alison. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. online. *Journal of Leukocyte Biology*. 1999, roč. 66, č. 6, s. 876-888. ISSN 0741-5400. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jlb.66.6.876>. [cit. 2023-02-24].
- [62] SPRINGER, Timothy A. Adhesion receptors of the immune system. online. *Nature*. 1990, roč. 346, č. 6283, s. 425-434. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/346425a0>. [cit. 2023-02-17].
- [63] YAMANAKA, Ryuya; TANAKA, Ryuichi a SAITO, Takafumi. Immunohistochemical Analysis of Tumor-infiltrating Lymphocytes and Adhesion Molecules (ICAM-1, NCAM) in Human Gliomas. online. *Neurologia medico-chirurgica*. 1994, roč. 34, č. 9, s. 583-587. ISSN 0470-8105. Dostupné z: <https://doi.org/10.2176/nmc.34.583>. [cit. 2023-02-25].
- [64] KUPPNER, M; MEIR, E; HAMOU, M a TRIBOLET, N. Cytokine regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression on human glioblastoma cells. online. *Clinical and Experimental Immunology*. 1990, roč. 81, č. 1, s. 142-148. ISSN 1365-2249. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05305.x>. [cit. 2023-02-26].
- [65] LAI, Sheng-Wei; HUANG, Bor-Ren; LIU, Yu-Shu; LIN, Hsiao-Yun; CHEN, Chun-Chuan et al. Differential Characterization of Temozolomide-Resistant Human Glioma Cells. online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, roč. 19, č. 1. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms19010127>. [cit. 2023-03-01].
- [66] MINAJEVA, Ave; KASE, Marju; SARETOK, Mikk; ADAMSON-RAIESTE, Aidi; KASE, Sandra et al. Impact of Blood Vessel Quantity and Vascular Expression of CD133 and ICAM-1 on Survival of Glioblastoma Patients. online. *Neuroscience Journal*. 2017, roč. 2017, s. 1-8. ISSN 2314-4262. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2017/5629563>. [cit. 2023-03-03].
- [67] LUMNICZKY, Katalin; SZATMÁRI, Tünde a SÁFRÁNY, Géza. Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain. online. *Frontiers in Immunology*. 2017, roč. 8, č. 517, s. 1-13. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00517>. [cit. 2023-03-07].
- [68] ÖSTERREICHER, Jan; MEINEKE, Viktor; MACELA, Aleš a BEUNINGEN, Dirk. Úloha adhezních molekul v mechanismech rozvoje zánětlivých postradiačních změn - I. intercelulární adhezní molekula (ICAM-1). *Vojenské zdravotnické listy: odborný časopis vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů*. 2001, roč. , č. 5, s. 250-253. ISSN 0372-7025. Dostupné z: <https://doi.org/616-001.28-002:547.96>.
- [69] WINNING, Sandra; SPLETTSTOESSER, Frank; FANDREY, Joachim a FREDE, Stilla. Acute Hypoxia Induces HIF-Independent Monocyte Adhesion to Endothelial Cells through Increased Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression: The Role of Hypoxic Inhibition of Prolyl Hydroxylase Activity for the Induction of NF- κ B. online. *The Journal of Immunology*. 2010, roč. 185, č. 3, s. 1786-1793. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903244>. [cit. 2023-03-07].
- [70] PIAO, Yuji; HENRY, Verlene; TIAO, Ningyi; PARK, Soon; MARTINEZ-LEDESMA, Juan et al. Targeting intercellular adhesion molecule-1 prolongs survival in mice bearing bevacizumab-resistant glioblastoma. online. *Oncotarget*. 2017, roč. 8, č. 57, s. 96970-96983. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18859>. [cit. 2023-03-07].
- [71] PIAO, Y.; LIANG, J.; HOLMES, L.; ZURITA, A.; HENRY, V. et al. Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy is associated with myeloid cell infiltration, stem cell accumulation, and a mesenchymal

- phenotype. online. *Neuro-Oncology*. 2012, roč. 14, č. 11, s. 1379-1392. ISSN 1522-8517. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos158>. [cit. 2023-02-26].
- [72] RAMOS, Theresa; BULLARD, Daniel a BARNUM, Scott. ICAM-1: Isoforms and Phenotypes. online. *The Journal of Immunology*. 2014, roč. 192, č. 10, s. 4469-4474. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400135>. [cit. 2023-02-24].
- [73] BANKS, RE; GEARING, AJ; HEMINGWAY, IK; NORFOLK, DR; PERREN, TJ et al. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. online. *British Journal of Cancer*. 1993, roč. 68, č. 1, s. 122-124. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/bjc.1993.298>. [cit. 2023-03-07].
- [74] SALMAGGI, A; EOLI, M; FRIGERIO, S; CIUSANI, E; SILVANI, A et al. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and plasma thrombomodulin levels in glioblastoma patients. online. *Cancer Letters*. 1999, roč. 146, č. 2, s. 169-172. ISSN 03043835. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(99\)00255-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(99)00255-4). [cit. 2023-02-24].
- [75] KOPER, O.; KAMIŃSKA, J.; SAWICKI, K.; RESZEĆ, J.; RUTKOWSKI, R. et al. Cerebrospinal fluid and serum IL-8, CCL2, and ICAM-1 concentrations in astrocytic brain tumor patients. online. *Irish Journal of Medical Science (1971 -)*. 2018, roč. 187, č. 3, s. 767-775. ISSN 0021-1265. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11845-017-1695-8>. [cit. 2023-02-25].
- [76] YOO, Ki-Chun; KANG, Jae-Hyeok; CHOI, Mi-Young; SUH, Yongjoon; ZHAO, Yi et al. Soluble ICAM-1 a Pivotal Communicator between Tumors and Macrophages, Promotes Mesenchymal Shift of Glioblastoma. online. *Advanced Science*. 2022, roč. 9, č. 2. ISSN 2198-3844. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/advs.202102768>. [cit. 2023-02-24].
- [77] SHEN, Ching-Kai; HUANG, Bor-Ren; YEH, Wei-Lan; CHEN, Chao-Wei; LIU, Yu-Shu et al. Regulatory effects of IL-1 β in the interaction of GBM and tumor-associated monocyte through VCAM-1 and ICAM-1. online. *European Journal of Pharmacology*. 2021, roč. 905. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174216>. [cit. 2023-02-25].
- [78] POKORNÁ, Markéta; HUDEC, Michael; JUŘÍČKOVÁ, Iva; VÁCHA, Michael; POLÍVKOVÁ, Zdeňka et al. All-Trans Retinoic Acid Fosters the Multifarious U87MG Cell Line as a Model of Glioblastoma. online. *Brain Sciences*. 2021, roč. 11, č. 6. ISSN 2076-3425. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/brainsci11060812>. [cit. 2023-02-26].
- [79] MOMENY, Majid; MOGHADDASKHO, Farima; GORTANY, Narges; YOUSEFI, Hassan; SABOURINEJAD, Zahra et al. Blockade of vascular endothelial growth factor receptors by tivozanib has potential anti-tumour effects on human glioblastoma cells. online. *Scientific Reports*. 2017, roč. 7, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep44075>. [cit. 2023-03-03].
- [80] LAI, Sheng-Wei; LIU, Yu-Shu; LU, Dah-Yuu a TSAI, Cheng-Fang. Melatonin Modulates the Microenvironment of Glioblastoma Multiforme by Targeting Sirtuin 1. online. *Nutrients*. 2019, roč. 11, č. 6. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu11061343>. [cit. 2023-03-06].
- [81] JOHNSON, J; STADE, B; HOLZMANN, B; SCHWÄBLE, W a RIETHMÜLLER, G. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989, roč. 86, č. 2, s. 641-644. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.2.641>. [cit. 2023-03-06].
- [82] FUJIHARA, Tomofumi; YASHIRO, Masakazu; INOUE, Toru; SAWADA, Tetsuji; KATO, Yasuyuki et al. Decrease in ICAM-1 expression on gastric cancer cells is correlated with lymph node metastasis. online. *Gastric Cancer*. 1999, roč. 2, č. 4, s. 221-225. ISSN 1436-3291. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s101200050067>. [cit. 2023-03-06].
- [83] TACHIMORI, Akiko; YAMADA, Nobuya; SAKATE, Yoji; YASHIRO, Masakazu; MAEDA, Kiyoshi et al. Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. online. *European Journal of Cancer*. 2005, roč. 41, č. 12, s. 1802-1810. ISSN 09598049. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.04.036>. [cit. 2023-03-06].
- [84] TEROL, M; LÓPEZ-GUILLERMO, A; BOSCH, F; VILLAMOR, N; CID, M et al. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 in non-Hodgkin's lymphoma: relationship with tumor dissemination and prognostic importance. online. *Journal of Clinical Oncology*. 1998, roč. 16, č. 1, s. 35-40. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.1.35>. [cit. 2023-02-24].

- [85] BARZEGAR BEHROOZ, Amir; SYAHIR, Amir a AHMAD, Syahida. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. online. *Journal of Drug Targeting*. 2019, roč. 27, č. 3, s. 257-269. ISSN 1061-186X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1479756>. [cit. 2023-05-20].
- [86] GLUMAC, Paige a LEBEAU, Aaron. The role of CD133 in cancer: a concise review. online. *Clinical and Translational Medicine*. 2018, roč. 7, č. 1. ISSN 2001-1326. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0198-1>. [cit. 2023-05-23].
- [87] AHMED, Syed; JAVED, Gohar; LAGHARI, Altaf; BAREEQA, Syeda; FARRUKH, Saba et al. CD133 Expression in Glioblastoma Multiforme: A Literature Review. online. *Cureus*. 2018, roč. 10, č. 10. ISSN 2168-8184. Dostupné z: <https://doi.org/10.7759/cureus.3439>. [cit. 2023-05-20].
- [88] SHMELKOV, Sergey; ST.CLAIR, Ryan; LYDEN, David a RAFII, Shahin. AC133/CD133/Prominin-1. 2005, roč. 37, č. 4, s. 715-719. ISSN 13572725. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.08.010>.
- [89] IROLLO, Elena a PIROZZI, Giuseppe. CD133: to be or not to be, is this the real question?. *American Journal of Translational Research*. 2013, roč. 5, č. 6, s. 563-581.
- [90] WANG, DONGYANG; GUO, YUANXU; LI, YANQING; LI, WEILING; ZHENG, XIAOJING et al. Detection of CD133 expression in U87 glioblastoma cells using a novel anti-CD133 monoclonal antibody. online. *Oncology Letters*. 2015, roč. 9, č. 6, s. 2603-2608. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3079>. [cit. 2023-05-23].
- [91] SABUNGA, Olivia; KAELAN, Cahyono; ZAINUDDIN, Andi; SUNGOWATI, Ni; CANGARA, Muhammad et al. Expression of CD133 Cancer Stem Cell Marker in IDH-Mutant and IDH-wildtype (Isocitrate Dehydrogenase) Astrocytoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2022, roč. 23, č. 9, s. 3051-3059. ISSN 2476-762X. Dostupné z: <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.9.3051>.
- [92] VORA, Parvez; VENUGOPAL, Chitra; SALIM, Sabra; TATARI, Nazanin; BAKHSHINYAN, David et al. The Rational Development of CD133-Targeting Immunotherapies for Glioblastoma. online. *Cell Stem Cell*. 2020, roč. 26, č. 6, s. 832-8446. ISSN 19345909. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.04.008>. [cit. 2023-05-23].
- [93] TAFT, Ryan; PHEASANT, Michael a MATTICK, John. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays*. 2007, roč. 29, č. 3, s. 288-299. ISSN 02659247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bies.20544>.
- [94] GENCODE. online. In: <https://www.encodegenes.org>. 2024. Dostupné z: <https://www.encodegenes.org/human/stats.html>. [cit. 2024-01-31].
- [95] KAZIMIERCZYK, ; KASPROWICZ, ; KASPRZYK, a WRZESINSKI, . Human Long Noncoding RNA Interactome: Detection, Characterization and Function. online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 3. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21031027>. [cit. 2023-03-19].
- [96] QUINN, Jeffrey a CHANG, Howard. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature Reviews Genetics*. 2016, roč. 17, č. 1, s. 47-62. ISSN 1471-0056. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.10>.
- [97] CHAN, Jia a TAY, Yvonne. Noncoding RNA: RNA Regulatory Networks in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, roč. 19, č. 5. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms19051310>.
- [98] BHAN, Arunoday; SOLEIMANI, Milad a MANDAL, Subhrangsu. Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. online. *Cancer Research*. 2017, roč. 77, č. 15, s. 3965-3981. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2634>. [cit. 2023-03-22].
- [99] MATTICK, John; AMARAL, Paulo; CARNINCI, Piero; CARPENTER, Susan; CHANG, Howard et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. ISSN 1471-0072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8>.
- [100] GROMESOVÁ, Barbora; KUBACZKOVÁ, Veronika; BOLLOVÁ, Božena; SEDLAŘÍKOVÁ, Lenka a ŠEVČÍKOVÁ, Sabina. Potential of Long Non-coding RNA Molecules in Diagnosis of Tumors. *Klinická onkologie*. 2016, roč. 29, č. 1, s. 20-28. ISSN 0862495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko201620>.

- [101] RAY, Indrani a GOSWAMI, Srikanta. Circadian rhythm genes in cancer: insight into their functions and regulation involving noncoding RNAs. *Chronobiology International*. 2021, roč. 38, č. 9, s. 1231-1243. ISSN 0742-0528. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/07420528.2021.1928157>.
- [102] BUGNON, L; EDERA, A; PROCHETTO, S; GERARD, M; RAAD, J et al. Secondary structure prediction of long noncoding RNA: review and experimental comparison of existing approaches. online. *Briefings in Bioinformatics*. 2022, roč. 23, č. 4. ISSN 1467-5463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/bib/bbac205>. [cit. 2023-03-25].
- [103] KWOK, Zhi a TAY, Yvonne. Long noncoding RNAs: links between human health and disease. online. *Biochemical Society Transactions*. 2017, roč. 45, č. 3, s. 805-812. ISSN 0300-5127. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/BST20160376>. [cit. 2023-03-24].
- [104] DERRIEN, Thomas; JOHNSON, Rory; BUSSOTTI, Giovanni; TANZER, Andrea; DJEBALI, Sarah et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*. 2012, roč. 22, č. 9, s. 1775-1789. ISSN 1088-9051. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>.
- [105] CHILLÓN, Isabel a MARCIA, Marco. The molecular structure of long non-coding RNAs: emerging patterns and functional implications. online. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2020, roč. 55, č. 6, s. 662-690. ISSN 1040-9238. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1828259>. [cit. 2023-03-24].
- [106] ŠÁŇA, Jiří; FALTEJSKOVÁ, Petra; SVOBODA, Marek a SLABÝ, Ondřej. Dlouhé nekódující RNA a jejich význam u nádorových onemocnění. *Klinická onkologie*. 2012, roč. 25, č. 4, s. 246-254. ISSN 0862-495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2012246>.
- [107] GAO, Na; LI, Yueheng; LI, Jing; GAO, Zhengfan; YANG, Zhenzhen et al. Long Non-Coding RNAs: The Regulatory Mechanisms, Research Strategies, and Future Directions in Cancers. online. *Frontiers in Oncology*. 2020, roč. 10. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.598817>. [cit. 2023-03-25].
- [108] *LncRNAfunc: database*. online. Dostupné z: <https://ccsm.uth.edu/lncRNAfunc/index.html>. [cit. 2023-03-24].
- [109] STACKHOUSE, Christian; GILLESPIE, G. a WILLEY, Christopher. Exploring the Roles of lncRNAs in GBM Pathophysiology and Their Therapeutic Potential. online. *Cells*. 2020, roč. 9, č. 11. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells9112369>. [cit. 2023-04-02].
- [110] LIU, Xian; XIAO, Xinyu; HAN, Xue; YAO, Lan a LAN, Wei. Natural flavonoids alleviate glioblastoma multiforme by regulating long non-coding RNA. online. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023, roč. 161. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114477>. [cit. 2023-04-02].
- [111] YADAV, Bhupender; PAL, Sonali; RUBSTOV, Yury; GOEL, Akul; GARG, Manoj et al. lncRNAs associated with glioblastoma: From transcriptional noise to novel regulators with a promising role in therapeutics. online. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2021, roč. 24, s. 728-742. ISSN 21622531. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.03.018>. [cit. 2023-04-02].
- [112] CHEN, Wei; XU, Xin-Ke; LI, Jun-Liang; KONG, Kuan-Kei; LI, Hui et al. MALAT1 is a prognostic factor in glioblastoma multiforme and induces chemoresistance to temozolomide through suppressing miR-203 and promoting thymidylate synthase expression. *Oncotarget*. 2017, roč. 8, č. 14, s. 22783-22799. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15199>.
- [113] SUN, Youlu; JING, Yuesong a ZHANG, Yuxin. Serum lncRNA-ANRIL and SOX9 expression levels in glioma patients and their relationship with poor prognosis. online. *World Journal of Surgical Oncology*. 2021, roč. 19, č. 1. ISSN 1477-7819. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12957-021-02392-2>. [cit. 2024-01-28].
- [114] TAN, Sze; PASTORI, Chiara; PENAS, Clara; KOMOTAR, Ricardo; IVAN, Michael et al. Serum long noncoding RNA HOTAIR as a novel diagnostic and prognostic biomarker in glioblastoma multiforme. online. *Molecular Cancer*. 2018, roč. 17, č. 1. ISSN 1476-4598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0822-0>. [cit. 2023-05-09].
- [115] AMER, Rehab; EZZ EL ARAB, Lobna; ABD EL GHANY, Dalia; SAAD, Amr; BAHIE-ELDIN, Nermeen et al. Prognostic utility of lncRNAs (LINC00565 and LINC00641) as molecular markers in

- glioblastoma multiforme (GBM). online. *Journal of Neuro-Oncology*. 2022, roč. 158, č. 3, s. 435-444. ISSN 0167-594X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11060-022-04030-7>. [cit. 2023-05-12].
- [116] SHEN, Jie; HODGES, Tiffany; SONG, Renduo; GONG, Ye; CALIN, George et al. Serum HOTAIR and GAS5 levels as predictors of survival in patients with glioblastoma. online. *Molecular Carcinogenesis*. 2018, roč. 57, č. 1, s. 137-141. ISSN 08991987. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mc.22739>. [cit. 2023-05-19].
- [117] XIE, Jingwei; WANG, Xinjun; LIU, Shanshan; CHEN, Chao; JIANG, Fengze et al. LncRNA SAMMSON overexpression distinguished glioblastoma patients from patients with diffuse neurosarcoidosis. online. *NeuroReport*. 2019, roč. 30, č. 12, s. 817-821. ISSN 0959-4965. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001278>. [cit. 2024-01-28].
- [118] OMIM®: *PROMOTER OF MAT2A ANTISENSE RADIATION-INDUCED CIRCULATING LONG NONCODING RNA*. online. In: OMIM® An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Dostupné z: <https://www.omim.org/entry/616350>. [cit. 2023-03-11].
- [119] LI, Yue; SYED, Junetha a SUGIYAMA, Hiroshi. RNA-DNA Triplex Formation by Long Noncoding RNAs. online. *Cell Chemical Biology*. 2016, roč. 23, č. 11, s. 1325-1333. ISSN 24519456. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.09.011>. [cit. 2023-03-11].
- [120] O'LEARY, Valerie; SMIDA, Jan; BUSKE, Fabian; CARRASCOSA, Laura; AZIMZADEH, Omid et al. PARTICLE triplexes cluster in the tumor suppressor WWOX and may extend throughout the human genome. online. *Scientific Reports*. 2017, roč. 7, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07295-5>. [cit. 2023-03-11].
- [121] KOŚLA, K; KAIUZIŃSKA, Ź a BEDNAREK, AK. The WWOX gene in brain development and pathology. *Experimental Biology and Medicine*. 2020, roč. 245, č. 13, s. 1122-1129. ISSN 1535-3702. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1535370220924618>.
- [122] O'LEARY, Valerie; HAIN, Sarah; MAUGG, Doris; SMIDA, Jan; AZIMZADEH, Omid et al. Long non-coding RNA PARTICLE bridges histone and DNA methylation. online. *Scientific Reports*. 2017, roč. 7, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01875-1>. [cit. 2023-03-11].
- [123] O'LEARY, Valerie; OVSEPIAN, Saak; SMIDA, Jan a ATKINSON, Michael. PARTICLE – The RNA podium for genomic silencers. online. *Journal of Cellular Physiology*. 2019, roč. 234, č. 11, s. 19464-19470. ISSN 0021-9541. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcp.28739>. [cit. 2023-03-11].
- [124] O'LEARY, Valerie Bríd; OVSEPIAN, Saak Victor; CARRASCOSA, Laura Garcia; BUSKE, Fabian Andreas; RADULOVIC, Vanja et al. PARTICLE, a Triplex-Forming Long ncRNA, Regulates Locus-Specific Methylation in Response to Low-Dose Irradiation. online. *Cell Reports*. 2015, roč. 11, č. 3, s. 474-485. ISSN 22111247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.043>. [cit. 2023-03-11].
- [125] O'LEARY, Valerie; MAUGG, Doris; SMIDA, Jan; BAUMHOER, Daniel; NATHRATH, Michaela et al. The long non-coding RNA PARTICLE is associated with WWOX and the absence of FRA16D breakage in osteosarcoma patients. *Oncotarget*. 2017, roč. 8, č. 50, s. 87431-87441. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21086>.
- [126] POKORNÁ, Markéta; KÚTNA, Viera; OVSEPIAN, Saak; MATĚJ, Radoslav; ČERNÁ, Marie et al. Biomolecules to Biomarkers? U87MG Marker Evaluation on the Path towards Glioblastoma Multiforme Pathogenesis. online. *Pharmaceutics*. 2024, roč. 16, č. 1. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010123>. [cit. 2024-01-28].
- [127] YANG, Xiaoyan; XIE, Zhizhong; LEI, Xiaoyong a GAN, Runliang. Long non-coding RNA GAS5 in human cancer (Review). *Oncology Letters*. 2020, roč. 20, č. 3, s. 2587-2594. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11809>.
- [128] YU, Yaya a HANN, Swei. Novel Tumor Suppressor lncRNA Growth Arrest-Specific 5 (GAS5) In Human Cancer. *OncoTargets and Therapy*. 2019, roč. 12, s. 8421-8436. ISSN 1178-6930. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/OTT.S221305>.
- [129] ZHOU, Yang a CHEN, Binghai. GAS5-mediated regulation of cell signaling (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2020. ISSN 1791-2997. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11435>.

- [130] TORAIH, Eman; ALGHAMDI, Saleh; EL-WAZIR, Aya; HOSNY, Marwa; HUSSEIN, Mohammad et al. Dual biomarkers long non-coding RNA GAS5 and microRNA-34a co-expression signature in common solid tumors. *PLOS ONE*. 2018, roč. 13, č. 10. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198231>.
- [131] KAUR, Jesminder; SALEHEN, Nur'ain; NORAZIT, Anwar; RAHMAN, Amirah; MURAD, Nor et al. Tumor Suppressive Effects of GAS5 in Cancer Cells. *Non-Coding RNA*. 2022, roč. 8, č. 3. ISSN 2311-553X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ncrna8030039>.
- [132] YUAN, Jupeng; ZHANG, Nasha; ZHENG, Yan; CHEN, Yi-Dong; LIU, Jie et al. LncRNA GAS5 Indel Genetic Polymorphism Contributes to Glioma Risk Through Interfering Binding of Transcriptional Factor TFAP2A. online. *DNA and Cell Biology*. 2018, roč. 37, č. 9, s. 750-757. ISSN 1044-5498. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/dna.2018.4215>. [cit. 2023-05-19].
- [133] WU, Ying; LYU, Hui; LIU, Hongbing; SHI, Xuefei; SONG, Yong et al. Downregulation of the long noncoding RNA GAS5-AS1 contributes to tumor metastasis in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*. 2016, roč. 6, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep31093>.
- [134] PICKARD, Mark a WILLIAMS, Gwyn. Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Tumour Suppressor GAS5 LncRNA. online. *Genes*. 2015, roč. 6, č. 3, s. 484-499. ISSN 2073-4425. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/genes6030484>. [cit. 2023-05-18].
- [135] JI, Jiali; DAI, Xiaolan; YEUNG, Sai-Ching a HE, Xuexin. The role of long non-coding RNA GAS5 in cancers. online. *Cancer Management and Research*. 2019, roč. 11, s. 2729-2737. ISSN 1179-1322. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S189052>. [cit. 2023-05-18].
- [136] HUANG, Haoyu; JIANG, Ran; LIAN, Zhenwei; ZHANG, Wenjuan; HU, Zuqing et al. MiR-222/GAS5 is involved in DNA damage and cytotoxic effects induced by temozolomide in T98G cell line. *Journal of Applied Toxicology*. 2019, roč. 39, č. 5, s. 726-734. ISSN 0260437X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jat.3762>.
- [137] WU, Shuang; REN, Kaixi; ZHAO, Jing; LI, Juan; JIA, Bo et al. LncRNA GAS5 represses stemness and malignancy of gliomas via elevating the SPACA6-miR-125a/let-7e Axis. *Frontiers in Oncology*. 2022, roč. 12. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.803652>.
- [138] REN, Siyang a XU, Yinghui. AC016405.3, a novel long noncoding RNA, acts as a tumor suppressor through modulation of TET2 by microRNA-19a-5p sponging in glioblastoma. online. *Cancer Science*. 2019, roč. 110, č. 5, s. 1621-1632. ISSN 1347-9032. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/cas.14002>. [cit. 2023-05-09].
- [139] YAN, Yuanliang; XU, Zhijie; CHEN, Xi; WANG, Xiang; ZENG, Shuangshuang et al. Novel Function of LncRNA ADAMTS9-AS2 in Promoting Temozolomide Resistance in Glioblastoma via Upregulating the FUS/MDM2 Ubiquitination Axis. online. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019, roč. 7. ISSN 2296-634X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00217>. [cit. 2023-05-09].
- [140] ZHENG, Yonghui; LU, Sumei; XU, Yanhong a ZHENG, Jiaolin. Long non-coding RNA AGAP2-AS1 promotes the proliferation of glioma cells by sponging miR-15a/b-5p to upregulate the expression of HDGF and activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, roč. 128, s. 521-530. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.121>.
- [141] DAI, Xuejun; LIAO, Keman; ZHUANG, Zhijun; CHEN, Binghong; ZHOU, Zhiyi et al. AHIF promotes glioblastoma progression and radioresistance via exosomes. *International Journal of Oncology*. 2018. ISSN 1019-6439. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4621>.
- [142] MA, Chun-Chun; XIONG, Zhang; ZHU, Guan-Nan; WANG, Chao; ZONG, Gang et al. Long non-coding RNA ATB promotes glioma malignancy by negatively regulating miR-200a. online. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2016, roč. 35, č. 1. ISSN 1756-9966. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0367-2>. [cit. 2023-05-15].
- [143] SKIRIUTE, Daina; STAKAITIS, Rytis; STEPONAITIS, Giedrius; TAMASAUSKAS, Arimantas a VAITKIENE, Paulina. The Role of CASC2 and miR-21 Interplay in Glioma Malignancy and Patient Outcome. online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 21. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21217962>. [cit. 2023-05-15].

- [144] GONG, Xin; LIAO, Xiaoyun a HUANG, Mengyi. LncRNA CASC7 inhibits the progression of glioma via regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway. online. *Pathology - Research and Practice*. 2019, roč. 215, č. 3, s. 564-570. ISSN 03440338. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.01.018>. [cit. 2023-05-15].
- [145] LIU, Hongjiang; LI, Chen; YANG, Jiankai; SUN, Yuchen; ZHANG, Shun Yao et al. Long noncoding RNA CASC9/miR-519d/STAT3 positive feedback loop facilitate the glioma tumorigenesis. online. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2018, roč. 22, č. 12, s. 6338-6344. ISSN 15821838. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jcmm.13932>. [cit. 2023-05-09].
- [146] ZHANG, Hua; WEI, Dai-Lin; WAN, Long; YAN, Shao-Feng a SUN, Yan-Hui. Highly expressed lncRNA CCND2-AS1 promotes glioma cell proliferation through Wnt/ β -catenin signaling. online. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017, roč. 482, č. 4, s. 1219-1225. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.016>. [cit. 2023-05-12].
- [147] ZHAO, Zijin; LIU, Miaomiao; LONG, Wenyong; YUAN, Jian; LI, Haoyu et al. Knockdown lncRNA CRNDE enhances temozolomide chemosensitivity by regulating autophagy in glioblastoma. online. *Cancer Cell International*. 2021, roč. 21, č. 1. ISSN 1475-2867. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02153-x>. [cit. 2023-05-15].
- [148] HU, S.; YAO, Y.; HU, X. a ZHU, Y. LncRNA DCST1-AS1 downregulates miR-29b through methylation in glioblastoma (GBM) to promote cancer cell proliferation. *Clinical and Translational Oncology*. 2020, roč. 22, č. 12, s. 2230-2235. ISSN 1699-048X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02363-1>.
- [149] HE, Zongze; LONG, Juan; YANG, Chen; GONG, Bo; CHENG, Meixiong et al. LncRNA DGCR5 plays a tumor-suppressive role in glioma via the miR-21/Smad7 and miR-23a/PTEN axes. *Aging*. 2020, roč. 12, č. 20, s. 20285-20307. ISSN 1945-4589. Dostupné z: <https://doi.org/10.18632/aging.103800>.
- [150] LV, Qiao-Li; WANG, Li-Chong; LI, Dang-Chi; LIN, Qian-Xia; SHEN, Xiao-Li et al. Knockdown lncRNA DLEU1 Inhibits Gliomas Progression and Promotes Temozolomide Chemosensitivity by Regulating Autophagy. online. *Frontiers in Pharmacology*. 2020, roč. 11. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.560543>. [cit. 2023-05-12].
- [151] DEGUCHI, S; KATSUSHIMA, K; HATANAKA, A; SHINJO, K; OHKA, F et al. Oncogenic effects of evolutionarily conserved noncoding RNA ECONEXIN on gliomagenesis. *Oncogene*. 2017, roč. 36, č. 32, s. 4629-4640. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nc.2017.88>.
- [152] LIU, Dan; WAN, Yue; QU, Ning; FU, Qiang; LIANG, Chao et al. LncRNA-FAM66C Was Identified as a Key Regulator for Modulating Tumor Microenvironment and Hypoxia-Related Pathways in Glioblastoma. online. *Frontiers in Public Health*. 2022, roč. 10. ISSN 2296-2565. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.898270>. [cit. 2023-05-12].
- [153] LI, Guoxiong; CAI, Yingqian; WANG, Chuanmei; HUANG, Min a CHEN, Jiansheng. LncRNA GAS5 regulates the proliferation, migration, invasion and apoptosis of brain glioma cells through targeting GSTM3 expression. The effect of LncRNA GAS5 on glioma cells. *Journal of Neuro-Oncology*. 2019, roč. 143, č. 3, s. 525-536. ISSN 0167-594X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03185-0>.
- [154] WANG, Guo; LIN, Xiaoyan; HAN, Han; ZHANG, Hongxu; LI, Xiaoli et al. LncRNA H19 promotes glioblastoma multiforme development by activating autophagy by sponging miR-491-5p. online. *Bioengineered*. 2022, roč. 13, č. 5, s. 11440-11455. ISSN 2165-5979. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2065947>. [cit. 2023-05-15].
- [155] LI, Junyang; JI, Xiangjun a WANG, Handong. Targeting Long Noncoding RNA HMMR-AS1 Suppresses and Radiosensitizes Glioblastoma. online. *Neoplasia*. 2018, roč. 20, č. 5, s. 456-466. ISSN 14765586. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.02.010>. [cit. 2023-05-09].
- [156] LI, Qi; DONG, Chengya; CUI, Jiayue; WANG, Yubo a HONG, Xinyu. Over-expressed lncRNA HOTAIRM1 promotes tumor growth and invasion through up-regulating HOXA1 and sequestering G9a/EZH2/Dnmts away from the HOXA1 gene in glioblastoma multiforme. online. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018, roč. 37, č. 1. ISSN 1756-9966. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0941-x>. [cit. 2023-05-09].
- [157] GAO, Yana; YU, Hai; LIU, Yunhui; LIU, Xiaobai; ZHENG, Jian et al. Long Non-Coding RNA HOXA-AS2 Regulates Malignant Glioma Behaviors and Vasculogenic Mimicry Formation via the MiR-

- 373/EGFR Axis. online. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018, roč. 45, č. 1, s. 131-147. ISSN 1015-8987. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000486253>. [cit. 2023-05-12].
- [158] XIONG, Yu; KUANG, Wei; LU, Shigang; GUO, Hua; WU, Miaoqing et al. Long noncoding RNA HOXB 13- AS 1 regulates HOXB 13 gene methylation by interacting with EZH 2 in glioma. online. *Cancer Medicine*. 2018, roč. 7, č. 9, s. 4718-4728. ISSN 2045-7634. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cam4.1718>. [cit. 2023-05-09].
- [159] XU, Li-Min; CHEN, Lei; LI, Feng; ZHANG, Run; LI, Zong-yang et al. Over-expression of the long non-coding RNA HOTTIP inhibits glioma cell growth by BRE. 2016, roč. 35, č. 1. ISSN 1756-9966. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0431-y>.
- [160] YIN, Tiantian; WU, Jing; HU, Yuchen; ZHANG, Min a HE, Jie. Long non-coding RNA HULC stimulates the epithelial–mesenchymal transition process and vasculogenic mimicry in human glioblastoma. online. *Cancer Medicine*. 2021, roč. 10, č. 15, s. 5270-5282. ISSN 2045-7634. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cam4.4083>. [cit. 2023-05-11].
- [161] MU, Yulong; TANG, Qiang; FENG, Haiyan; ZHU, Luwen a WANG, Yan. LncRNA KTN1-AS1 promotes glioma cell proliferation and invasion by negatively regulating miR-505-3p. online. *Oncology Reports*. 2020, roč. 44, č. 6, s. 2645-2655. ISSN 1021-335X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/or.2020.7821>. [cit. 2023-05-12].
- [162] ZHANG, Yin; JIANG, Xuefeng; WU, Zhisheng; HU, Daling; JIA, Junli et al. Long Noncoding RNA LINC00467 Promotes Glioma Progression through Inhibiting P53 Expression via Binding to DNMT1. online. *Journal of Cancer*. 2020, roč. 11, č. 10, s. 2935-2944. ISSN 1837-9664. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/jca.41942>. [cit. 2023-05-09].
- [163] LI, Deheng; HU, Junda; LI, Sen; ZHOU, Changshuai; FENG, Mingtao et al. LINC01393, a Novel Long Non-Coding RNA, Promotes the Cell Proliferation, Migration and Invasion through MiR-128-3p/NUSAP1 Axis in Glioblastoma. online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, roč. 24, č. 6. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms24065878>. [cit. 2023-05-12].
- [164] CAO, Jingwei; TANG, Zhanbin a SU, Zhiqiang. Long non-coding RNA LINC01426 facilitates glioblastoma progression via sponging miR-345-3p and upregulation of VAMP8. online. *Cancer Cell International*. 2020, roč. 20, č. 1. ISSN 1475-2867. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01416-3>. [cit. 2023-05-15].
- [165] ZHANG, Li; WANG, Qin; WANG, Fei; ZHANG, Xiang; ZHANG, Li et al. LncRNA LINC01446 promotes glioblastoma progression by modulating miR-489-3p/TPT1 axis. online. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018, roč. 503, č. 3, s. 1484-1490. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.067>. [cit. 2023-05-15].
- [166] LI, Chang; HU, Guozhang; WEI, Bo; WANG, Le a LIU, Naijie. PlncRNA LINC01494 Promotes Proliferation, Migration And Invasion In Glioma Through miR-122-5p/CCNG1 Axis/p. online. *OncoTargets and Therapy*. 2019, roč. 12, s. 7655-7662. ISSN 1178-6930. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/OTT.S213345>. [cit. 2023-05-10].
- [167] WEI, Pan; JIANG, Jing; XIAO, Ming; ZENG, Mengfei; LIU, Xingzhi et al. The transcript ENST00000444125 of lncRNA LINC01503 promotes cancer stem cell properties of glioblastoma cells via reducing FBXW1 mediated GLI2 degradation. online. *Experimental Cell Research*. 2022, roč. 412, č. 1. ISSN 00144827. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113009>. [cit. 2023-05-12].
- [168] SHREE, Bakhya; SENGAR, Suryansh; TRIPATHI, Shraddha a SHARMA, Vivek. LINC01711 promotes transforming growth factor-beta (TGF-β) induced invasion in glioblastoma multiforme (GBM) by acting as a competing endogenous RNA for miR-34a and promoting ZEB1 expression. online. *Neuroscience Letters*. 2023, roč. 792. ISSN 03043940. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136937>. [cit. 2023-05-12].
- [169] GOENKA, Anshika; SONG, Xiao; TIEK, Deanna; IGLESIA, Rebeca; LU, Minghui et al. Oncogenic long noncoding RNA LINC02283 enhances PDGF receptor A-mediated signaling and drives glioblastoma tumorigenesis. online. *Neuro-Oncology*. 2023. ISSN 1522-8517. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noad065>. [cit. 2023-05-12].
- [170] KOVALENKO, Tatyana; YADAV, Bhupender; ANUFRIEVA, Ksenia; RUBTSOV, Yury; ZATSEPIN, Timofey et al. Functions of long non-coding RNA ROR in patient-derived glioblastoma

- cells. online. *Biochimie*. 2022, roč. 200, s. 131-139. ISSN 03009084. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.05.015>. [cit. 2023-05-15].
- [171] WU, Pengfei; CAI, Jinquan; CHEN, Qun; HAN, Bo; MENG, Xiangqi et al. Lnc-TALC promotes O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression via regulating the c-Met pathway by competitively binding with miR-20b-3p. online. *Nature Communications*. 2019, roč. 10, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10025-2>. [cit. 2023-05-10].
- [172] ZHAO, Hao; LI, Jun; YAN, Xin a BIAN, Xinchao. LncRNA MAFG-AS1 Suppresses the Maturation of miR-34a to Promote Glioblastoma Cell Proliferation. online. *Cancer Management and Research*. 2021, roč. 13, s. 3493-3501. ISSN 1179-1322. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S274615>. [cit. 2023-05-12].
- [173] HAN, Na; YANG, Li; ZHANG, Xiaoxi; ZHOU, Yangmei; CHEN, Rui et al. LncRNA MATN1-AS1 prevents glioblastoma cell from proliferation and invasion via RELA regulation and MAPK signaling pathway. *Annals of Translational Medicine*. 2019, roč. 7, č. 23, s. 784-784. ISSN 23055839. Dostupné z: <https://doi.org/10.21037/atm.2019.11.36>.
- [174] YUE, Hongsheng; ZHU, Jie; XIE, Shugang; LI, Fangfang a XU, Qun. MDC1-AS, an antisense long noncoding RNA, regulates cell proliferation of glioma. online. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016, roč. 81, s. 203-209. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.03.002>. [cit. 2023-05-15].
- [175] ZHANG, Shoudan a GUO, Wenshi. Long non-coding RNA MEG3 suppresses the growth of glioma cells by regulating the miR-96-5p/MTSS1 signaling pathway. online. *Molecular Medicine Reports*. 2019. ISSN 1791-2997. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10659>. [cit. 2023-05-15].
- [176] AMIRMAHANI, Farzane; VALLIAN, Sadeq a ASADI, Malek. The LncRNA MIAT is identified as a regulator of stemness-associated transcript in glioma. *Molecular Biology Reports*. 2023, roč. 50, č. 1, s. 517-530. ISSN 0301-4851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07962-5>.
- [177] HO, Kuo-Hao; SHIH, Chwen-Ming; LIU, Ann-Jeng a CHEN, Ku-Chung. Hypoxia-inducible lncRNA MIR210HG interacting with OCT1 is involved in glioblastoma multiforme malignancy. online. *Cancer Science*. 2022, roč. 113, č. 2, s. 540-552. ISSN 1347-9032. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/cas.15240>. [cit. 2023-05-12].
- [178] MIN, Weijie; DAI, Dongwei; WANG, Jiaqi; ZHANG, Dandan; ZHANG, Yuhui et al. Long Noncoding RNA miR210HG as a Potential Biomarker for the Diagnosis of Glioma. online. *PLOS ONE*. 2016, roč. 11, č. 9. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160451>. [cit. 2024-01-28].
- [179] GAO, Yan; XU, Yongchuan; WANG, Jue; YANG, Xue; WEN, Lulu et al. LncRNA MNX1-AS1 Promotes Glioblastoma Progression Through Inhibition of miR-4443. online. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2019, roč. 27, č. 3, s. 341-347. ISSN 0965-0407. Dostupné z: <https://doi.org/10.3727/096504018X15228909735079>. [cit. 2023-05-10].
- [180] CHEN, Mingsheng; CHENG, Yingying; YUAN, Zhihai; WANG, Fenglu; YANG, Lei et al. NCK1-AS1 Increases Drug Resistance of Glioma Cells to Temozolomide by Modulating miR-137/ TRIM24. online. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2020, roč. 35, č. 2, s. 101-108. ISSN 1084-9785. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3054>. [cit. 2023-05-10].
- [181] ZHOU, Ke; ZHANG, Chi; YAO, Hui; ZHANG, Xuewen; ZHOU, Youxin et al. Knockdown of long non-coding RNA NEAT1 inhibits glioma cell migration and invasion via modulation of SOX2 targeted by miR-132. online. *Molecular Cancer*. 2018, roč. 17, č. 1. ISSN 1476-4598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0849-2>. [cit. 2023-05-10].
- [182] JIN, Zheng; PIAO, Lianhua; SUN, Guangchao; LV, Chuanxiang; JING, Yi et al. PLong Non-Coding RNA PART1 Exerts Tumor Suppressive Functions in Glioma via Sponging miR-190a-3p and Inactivation of PTEN/AKT Pathway/p. online. *OncoTargets and Therapy*. 2020, roč. 13, s. 1073-1086. ISSN 1178-6930. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/OTT.S232848>. [cit. 2023-05-10].
- [183] ZHANG, Penghai; LIU, Yang; FU, Changyu; WANG, Ce; DUAN, Xingbang et al. Knockdown of long non-coding RNA PCAT1 in glioma stem cells promotes radiation sensitivity. *Medical Molecular Morphology*. 2019, roč. 52, č. 2, s. 114-122. ISSN 1860-1480. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00795-018-0209-8>.

- [184] LV, Tao; JIN, Yichao; MIAO, Yifeng; XU, Tianqi; JIA, Feng et al. LncRNA PVT1 promotes tumorigenesis of glioblastoma by recruiting COPS5 to deubiquitinate and stabilize TRIM24. online. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2022, roč. 27, s. 109-121. ISSN 21622531. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.11.012>. [cit. 2023-05-12].
- [185] LI, Wenyang; CUI, Yan; MA, Wenjia; WANG, Ming; CAI, Yang et al. LncRNA RBPMS-AS1 promotes NRG1 transcription to enhance the radiosensitivity of glioblastoma through the microRNA-301a-3p/CAMTA1 axis. online. *Translational Oncology*. 2022, roč. 15, č. 1. ISSN 19365233. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101282>. [cit. 2023-05-12].
- [186] WANG, Shuwei; GUO, Xinru; LV, Wenyang; LI, Yanteng; ZHANG, Leiming et al. PLncRNA RPSAP52 Upregulates TGF- β 1 to Increase Cancer Cell Stemness and Predict Postoperative Survival in Glioblastoma/p. online. *Cancer Management and Research*. 2020, roč. 12, s. 2541-2547. ISSN 1179-1322. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S227496>. [cit. 2023-05-15].
- [187] WU, Zhongbao. MiR-195 connects lncRNA RUNX1-IT1 and cyclin D1 to regulate the proliferation of glioblastoma cells. *International Journal of Neuroscience*. 2023, roč. 133, č. 1, s. 13-18. ISSN 0020-7454. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00207454.2021.1881090>.
- [188] NI, Hongzao; WANG, Kai; XIE, Peng; ZUO, Jiandong; LIU, Wenguang et al. LncRNA SAMMSON Knockdown Inhibits the Malignancy of Glioblastoma Cells by Inactivation of the PI3K/Akt Pathway. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2021, roč. 41, č. 1, s. 79-90. ISSN 0272-4340. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00833-2>.
- [189] BRODIE, Shlomit; LEE, Hae; JIANG, Wei; CAZACU, Simona; XIANG, Cunli et al. Correction: The novel long non-coding RNA TALNEC2, regulates tumor cell growth and the stemness and radiation response of glioma stem cells. *Oncotarget*. 2021, roč. 12, č. 26, s. 2546-2547. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27383>.
- [190] MAZOR, Gal; LEVIN, Liron; PICARD, Daniel; AHMADOV, Ulvi; CARÉN, Helena et al. The lncRNA TP73-AS1 is linked to aggressiveness in glioblastoma and promotes temozolomide resistance in glioblastoma cancer stem cells. online. *Cell Death & Disease*. 2019, roč. 10, č. 3. ISSN 2041-4889. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1477-5>. [cit. 2023-05-10].
- [191] SHANG, Chao; TANG, Wei; PAN, Chen; HU, Xuanhao a HONG, Yang. Long non-coding RNA TUSC7 inhibits temozolomide resistance by targeting miR-10a in glioblastoma. online. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2018, roč. 81, č. 4, s. 671-678. ISSN 0344-5704. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3522-y>. [cit. 2023-05-10].
- [192] KATSUSHIMA, Keisuke; NATSUME, Atsushi; OHKA, Fumiharu; SHINJO, Keiko; HATANAKA, Akira et al. Targeting the Notch-regulated non-coding RNA TUG1 for glioma treatment. *Nature Communications*. 2016, roč. 7, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ncomms13616>.
- [193] DAI, Jinhua; MA, Jianbo; YU, Bixia; ZHU, Zhankun a HU, Yanqin. [ARTICLE WITHDRAWN] Long Noncoding RNA TUNAR Represses Growth, Migration, and Invasion of Human Glioma Cells Through Regulating miR-200a and Rac1. online. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2018, roč. 27, č. 1, s. 107-115. ISSN 0965-0407. Dostupné z: <https://doi.org/10.3727/096504018X15205622257163>. [cit. 2023-05-15].
- [194] XIN, Haibin; LIU, Nina; XU, Xiaosheng; ZHANG, Jinwu; LI, Yu et al. Knockdown of lncRNA-UCA1 inhibits cell viability and migration of human glioma cells by miR-193a-mediated downregulation of CDK6. online. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019, roč. 120, č. 9, s. 15157-15169. ISSN 0730-2312. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcb.28777>. [cit. 2023-05-10].
- [195] CHENG, Zhihua; LI, Zhenshengnan; MA, Ke; LI, Xiaoyu; TIAN, Nan et al. Long Non-coding RNA XIST Promotes Glioma Tumorigenicity and Angiogenesis by Acting as a Molecular Sponge of miR-429. online. *Journal of Cancer*. 2017, roč. 8, č. 19, s. 4106-4116. ISSN 1837-9664. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/jca.21024>. [cit. 2023-05-10].
- [196] GHAFOURI-FARD, Soudeh; ASKARI, Arian; BEHZAD MOGHADAM, Kimia; HUSSEN, Bashdar; TAHERI, Mohammad et al. A review on the role of ZEB1-AS1 in human disorders. online. *Pathology - Research and Practice*. 2023, roč. 245. ISSN 03440338. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154486>. [cit. 2023-05-15].

- [197] DONG, Jiajun; PENG, Yilong; ZHONG, Minggu; XIE, Zhengyuan; JIANG, Zongyuan et al. Implication of lncRNA ZBED3-AS1 downregulation in acquired resistance to Temozolomide and glycolysis in glioblastoma. online. *European Journal of Pharmacology*. 2023, roč. 938. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175444>. [cit. 2023-05-12].
- [198] KUMAR, Kiran; OLI, Ajaykumar; HALLIKERI, Kaveri; SHILPASREE, A a GONI, Mallikarjun. An optimized protocol for total RNA isolation from archived formalin-fixed paraffin-embedded tissues to identify the long non-coding RNA in oral squamous cell carcinomas. *MethodsX*. 2022, roč. 9. ISSN 22150161. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101602>.
- [199] *Histological methods for CNS*. online. In: Histological methods for CNS. Tokyo: IGAKUKEN. Dostupné z: <https://pathologycenter.jp/method-e/he.html>. [cit. 2023-05-30].
- [200] ALLEN, Marie; BJERKE, Mia; EDLUND, Hanna; NELANDER, Sven a WESTERMARK, Bengt. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. online. *Science Translational Medicine*. 2016, roč. 8, č. 354. ISSN 1946-6234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6853>. [cit. 2023-06-03].
- [201] DE VLEESCHOUWER, Steven (ed.). *Glioblastoma*. online. 1. Brisbane: Codon Publications, 2017. ISBN 9780994438126. Dostupné z: <https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017>. [cit. 2023-06-08].
- [202] CLARK, Michael; HOMER, Nils; O'CONNOR, Brian; CHEN, Zugen; ESKIN, Ascia et al. U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. online. *PLoS Genetics*. 2010, roč. 6, č. 1. ISSN 1553-7404. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000832>. [cit. 2023-06-03].
- [203] ZENG, Yu; WANG, Xizhao; WANG, Jizhou; YI, Renhui; LONG, Hao et al. The Tumorigenicity of Glioblastoma Cell Line U87MG Decreased During Serial In Vitro Passage. online. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2018, roč. 38, č. 6, s. 1245-1252. ISSN 0272-4340. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0592-7>. [cit. 2023-06-09].
- [204] PATATANIAN, E. a THOMPSON, D. Retinoic acid syndrome: a review. online. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2008, roč. 33, č. 4, s. 331-338. ISSN 02694727. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2008.00935.x>. [cit. 2023-06-09].
- [205] MAWSON, Anthony. Retinoids in the treatment of glioma: a new perspective. online. *Cancer Management and Research*. ISSN 1179-1322. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S32449>. [cit. 2023-06-09].
- [206] LU, Jianrong; ZHANG, Feng; ZHAO, Daqing; HONG, Liu; MIN, Jie et al. ATRA-inhibited proliferation in glioma cells is associated with subcellular redistribution of β -catenin via up-regulation of Axin. *Journal of Neuro-Oncology*. 2008, roč. 87, č. 3, s. 271-277. ISSN 0167-594X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9518-4>.
- [207] XU, Li-min; ZHENG, Yue-juan; WANG, Ying; YANG, Yang; CAO, Fan-fan et al. Celastrol Inhibits Lung Infiltration in Differential Syndrome Animal Models by Reducing TNF- α and ICAM-1 Levels while Preserving Differentiation in ATRA-Induced Acute Promyelocytic Leukemia Cells. *PLoS ONE*. 2014, roč. 9, č. 8. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105131>.
- [208] MEI, Dan; LV, Bin; CHEN, Bo; XIAO, Shan; JIANG, Jie et al. All-trans retinoic acid suppresses malignant characteristics of CD133-positive thyroid cancer stem cells and induces apoptosis. online. *PLOS ONE*. 2017, roč. 12, č. 8. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182835>. [cit. 2023-06-10].
- [209] ZANG, Chuanbing; WÄCHTER, Marlies; LIU, Hongyu; POSCH, Maximilian; FENNER, Martin et al. Ligands for PPAR γ and RAR Cause Induction of Growth Inhibition and Apoptosis in Human Glioblastomas. *Journal of Neuro-Oncology*. 2003, roč. 65, č. 2, s. 107-118. ISSN 0167-594X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/B:NEON.0000003728.80052.a8>.
- [210] CHRISTENSEN, Karina; SCHRØDER, Henrik a KRISTENSEN, Bjarne. CD133 identifies perivascular niches in grade II-IV astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology*. 2008, roč. 90, č. 2, s. 157-170. ISSN 0167-594X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9648-8>.

- [211] PINKNEY, Holly; WRIGHT, Brandon a DIERMEIER, Sarah. The lncRNA Toolkit: Databases and In Silico Tools for lncRNA Analysis. *Non-Coding RNA*. 2020, roč. 6, č. 4. ISSN 2311-553X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ncrna6040049>.
- [212] SEAL, Ruth; CHEN, Ling-Ling; GRIFFITHS-JONES, Sam; LOWE, Todd; MATHEWS, Michael et al. A guide to naming human non-coding RNA genes. *The EMBO Journal*. 2020, roč. 39, č. 6. ISSN 0261-4189. Dostupné z: <https://doi.org/10.15252/emj.2019103777>.

10 AUTORSKÉ PUBLIKACE

Pokorná M.; Hudec M.; Juříčková I.; Vácha M.; Polívková Z.; Kútna V.; Pala J.; Ovsepian S. V.; Černá M.; O'Leary V. B.:

All-Trans Retinoic Acid Fosters the Multifarious U87MG Cell Line as a Model of Glioblastoma.

Brain Sci. 2021; 11(6):812. PMID: 34207434; PMCID: PMC8234004.
doi: 10.3390/brainsci11060812

<https://www.mdpi.com/2076-3425/11/6/812>

Pokorná M.; Kútna V.; Ovsepian S. V.; Matěj R.; Černá M.; O'Leary V. B.:

Biomolecules to Biomarkers? U87MG marker Evaluation on the Path towards Glioblastoma Multiforme Pathogenesis.

Pharmaceutics. 2024; 16(1):123. PMID: 38258133; PMCID: PMC10818292
doi: 10.3390/pharmaceutics16010123

<https://www.mdpi.com/1999-4923/16/1/123>

Pokorná M.; Černá M.; Boussios S.; Ovsepian S. V.; O'Leary V. B.:

LncRNAs as Biomarkers of Glioblastoma Multiforme

Přehledový článek zaslán do *Biomedicines*; 2024

11 PŘÍLOHY

PŘÍLOHA I:

Strana 107

All-Trans Retinoic Acid Fosters the Multifarious U87MG Cell Line as a Model of Glioblastoma. (Pokorná M.; Hudec M.; Juříčková I.; Vácha M.; Polívková Z.; Kútina V.; Pala J.; Ovsepian S. V.; Černá M.; O'Leary V. B)

PŘÍLOHA II:

Strana 121

Biomolecules to Biomarkers? U87MG Marker Evaluation on the Path towards Glioblastoma Multiforme Pathogenesis. (Pokorná M.; Kútina V.; Ovsepian S. V.; Matěj R.; Černá M.; O'Leary V. B)

PŘÍLOHA III:

Strana 137

LncRNAs as biomarkers of glioblastoma multiforme. (Pokorná M.; Černá M.; Boussios S.; Ovsepian S. V.; O'Leary V. B)