

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína
Studijní obor: Biochemie a patobiochemie

Ivana Matrasová

Mnohočetné formy dipeptidylpeptidázy-IV a fibroblastového aktivačního proteinu
v mozkových nádorech

Multiple forms of dipeptidyl peptidase IV and fibroblast activation protein in brain tumors

Dizertační práce

Vedoucí dizertační práce: prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

Praha, 2023

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, 10.3.2023

Jméno – IVANA MATRASOVÁ

podpis

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM:

MATRASOVÁ, Ivana. *Mnohočetné formy dipeptidylpeptidázy-IV a fibroblastového aktivačního proteinu v mozkových nádorech [Multiple molecular forms of dipeptidyl peptidase IV and fibroblast activation protein in brain tumors]*. Praha, 2023. 120 stran, 4 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova. 1. lékařská fakulta, Ústav biochemie a experimentální onkologie. Školitel Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

OBSAH

Seznam zkratek.....	8
1 Úvod.....	10
1.1 Proteázy.....	10
1.1.1 Dipeptidylpeptidáza-IV a fibroblastový aktivační protein.....	11
1.1.2 Další “Aktivitou a/nebo strukturou DPP-IV-podobné molekuly“ (DASH).....	20
1.2 Mozkové nádory.....	21
1.2.1 Mikroprostředí mozkových nádorů.....	22
2 Hypotéza a cíle práce.....	25
3 Materiál a metodika.....	26
3.1 Biologický materiál.....	26
3.1.1 Gliální mozkové nádory a mozkové metastázy.....	26
3.1.2 Permanentní buněčné linie, primární buněčné kultury.....	26
3.2 Buněčné modely komplexity nádorového mikroprostředí.....	27
3.2.1 Příprava a použití kondiciovaných médií.....	27
3.2.2 Přímá kokultivace gliomových buněk U373 a nenádorových pericytů HBVP.....	28
3.2.3 Stimulace gliomových a stromálních buněk rekombinantním TGF- β 1.....	29
3.3 Charakterizace mnohočetných forem DPP-IV a FAP.....	30
3.3.1 Příprava buněčného lyzátu.....	30
3.3.2 Biochemické stanovení hydrolytické aktivity DPP-IV a FAP.....	30
3.3.3 Detekce hydrolytický aktivních MW a pI forem DPP-IV a FAP.....	31
3.3.4 Imunochemické metody.....	32
3.3.5 Deglykosylace.....	35
3.4 Statistika.....	35
4 Výsledky.....	36
4.1 Mnohočetné formy DPP-IV a FAP v tkáních gliálních mozkových nádorů a mozkových metastáz.....	36
4.2 Deglykosylace mnohočetných forem DPP-IV a FAP přítomných v GBM.....	39
4.3 Identifikace buněčného zdroje DPP-IV a FAP v tkáních gliálních mozkových nádorů a mozkových metastáz.....	40
4.4 Inducibilita exprese DPP-IV a FAP v buněčných typech přítomných v nádorovém mikroprostředí gliálních mozkových nádorů a mozkových metastáz <i>in vitro</i>	47
5 Diskuze.....	54
6 Závěry.....	61

7	Seznam použité literatury.....	63
8	Seznam příloh.....	76
8.1	Příloha č. 1.....	76
8.2	Příloha č. 2.....	86
8.3	Příloha č. 3.....	98
8.4	Příloha č. 4.....	119

SEZNAM ZKRATEK

α SMA	α aktin hladké svaloviny (α smooth muscle actin)
ADA	Adenosindeamináza (adenosine deaminase)
AMK	Aminokyselina
APCE	Enzym štěpící α 2-antiplasmin (antiplasmin cleaving enzyme)
CAF-GBM	Mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z GBM
CAF-MM	Mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z mozkových metastáz
CSC	Nádorové kmenové buňky (cancer stem cells)
CXCR4	Receptor SDF-1 α
DASH	Aktivitou a/nebo strukturou DPP-IV-podobné molekuly
DPP	Dipeptidylpeptidáza
EBBB	Blokační činidlo PVDF membrán před imunodetekcí (every blot blocking buffer)
ECM	Extracelulární matrix
EMT	Epitelo-mezenchymová tranzice (epithelial-mesenchymal transition)
FN	Fibronektin
GBM	Glioblastoma Multiforme
GHRH	Hormon uvolňující růstový hormon (growth hormone releasing hormone)
GRP	Peptid uvolňující gastrin (gastrin-releasing peptide)
GSC	Gliomové kmenové buňky (glioma stem cells)
HBVP	Primární pericytární buněčná kultura (human brain vascular pericytes)
HBVP-Tagit	HBVP značené fluorescenčním barvivem
H-Gly-Pro-AMC	Glycyl-L-prolyl-7-aminomethylkumarin
IDH	Izocitrátdehydrogenáza
IL	Interleukin
KM	Kondiciované médium
KM-HBVM	Médium kondiciované nenádorovými pericyty HBVP
KM-U373	Médium kondiciované gliomovými buňkami U373
KM-U87	Médium kondiciované gliomovými buňkami U87
MW	Molekulová hmotnost

NPY	Neuropeptid Y (neuropeptide Y)
NS 604	Substrát specifický pro FAP
PDGFR	Receptor pro růstový faktor odvozený krevních destiček (platelet derived growth factor receptor)
pFAP	Mezenchymové FAP ⁺ kultury s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů odvozené z GBM
Pg	Plazminogen
pI	Izoelektrický bod
PTEN	Homolog fosfatázy a tenzinu (phosphatase and tensin homolog)
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expression and secreted
SDF-1 α	Faktor 1 α odvozený ze stromálních buněk (stromal cell-derived factor 1 α)
SP	Substance P
TGF- β	Transformující růstový faktor- β
TNF- α	Faktor nekrotizující nádory- α (tumor necrosis factor α)
TTBS	Oplachovací roztok (0,05% tween v pufru TBS pH 7,5)
uPAR	Receptor plazminového aktivátoru urokinázového typu
U373	Gliomová buněčná linie
U373-pEGFP	Gliomová buněčná linie U373 značená fluorescenčním barvivem
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

1.1 PROTEÁZY

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

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

Proteolýza je relativně jednoduchá posttranslační modifikace, při které vznikají produkty s odlišnou strukturou a případně i biologickou funkcí. Pro vznik a rozvoj nádorových onemocnění je důležité pochopení komplexního vlivu a proteolytických kaskád v mikroprostředí nádoru (Vizovisek et al., 2021). (i) Proteázy v nádorovém mikroprostředí mohou pocházet z transformovaných buněk nebo z buněk nádorového stromatu, např. imunitních buněk a buněk mezenchymového typu (Hanahan & Coussens, 2012). (ii) Spektrum proteáz se může lišit na kvalitativní a kvantitativní úrovni (Ludwig, 2005). (iii) Proteázy mohou být v buňce přítomné v multiproteinových komplexech a tyto komplexy mohou ovlivňovat proteolytickou aktivitu (Eatemadi et al., 2017). (iv) V nádorovém mikroprostředí se vzájemně ovlivňují různé proteázy z různých rodin (Sevenich & Joyce, 2014).

Dipeptidylpeptidáza-IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) a fibroblastový aktivační protein (FAP, EC 3.4.21.B28) jsou serinové proteázy s mnohočetnými biologickými účinky. Změny exprese DPP-IV a FAP byly popsány v patogenetických mechanismech řady nádorových

onemocnění, přičemž v těchto procesech mohou hrát roli tumor promotorů i tumor supresorů (Beckenkamp et al., 2016; Busek et al., 2022; Fitzgerald & Weiner, 2020).

V současné době je známo několik genových produktů s různým stupněm sekvenční podobnosti a DPP-IV-podobnou aktivitou. Na základě práce naší laboratoře byla postupně definována skupina “Dipeptidylpeptidáze aktivitou a/nebo strukturou podobných“ (Dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologous, DASH) molekul, mezi jejíž členy patří fibroblastový aktivační protein (FAP), dipeptidylpeptidáza 6, 7, 8, 9 a 10 (Sedo & Malik, 2001). DASH molekuly ovlivňují procesy nádorové transformace regulací růstových vlastností buněk v nádorovém mikroprostředí především proteolytickou modifikací biologicky aktivních peptidů (Sedo & Malik, 2001; Waumans et al., 2015).

1.1.1 Dipeptidylpeptidáza-IV a fibroblastový aktivační protein

Dipeptidylpeptidáza-IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) byla poprvé popsána jako glycyloprolyl β -naftylamidáza (Hopsu-Havu & Glenner, 1966). Později byla prokázána její totožnost s diferenciacním antigenem T lymfocytů (CD26), potkaním glykoproteinem gp110 a myší thymocyty-aktivující molekulou (THAM) (McCaughan et al., 1990; Ulmer et al., 1990; Vivier et al., 1991). DPP-IV je exprimována řadou tkání včetně endotelových buněk, což ji činí přístupnou cirkulujícím peptidovým substrátům (Fukasawa et al., 1981). Gen pro DPP-IV dosahuje 70×10^3 párů bazí a je lokalizován na chromozomu 2 (2q24.2). Je tvořen 26 exony, které kódují 766 aminokyselin velký protein (Misumi et al., 1992; Wagner et al., 2016). Gen pro lidskou DPP-IV kóduje dva mRNA transkripty, jeden o velikosti $4,2 \times 10^3$ párů bazí, jehož distribuce není v organismu omezena a menší $2,8 \times 10^3$ párů bazí, který byl přítomen v placentě, ledvinách, játrech a plicích. Přestože byly popsány i další minoritní sestřihové varianty, jejich význam zůstává nejasný (Abbott et al., 1994; Bernard et al., 1994).

DPP-IV je ubikvitně exprimovaná, typicky membránově vázaná serinová proteáza typu II, jejíž hydrolytická aktivita je podmíněna homodimerizací dvou monomerních podjednotek (Mentlein, 1999). DPP-IV byla pozorována také ve vyšších molekulových strukturách (200–400 kDa) (De Meester et al., 1992; Gorrell et al., 2001; Puschel et al., 1982; Shibuya-Saruta et al., 1996). Některé práce popisují i DPP-IV v podobě tetrameru, jehož MW přesahuje 800 kDa. Dimery DPP-IV na povrchu plazmatických membrán T lymfocytů a epitelových buněk by mohly tvorbou homotetrameru ovlivňovat jejich adhezni vlastnosti a mezibuněčné interakce (Engel et al., 2003; Lambeir et al., 1997). Kromě membránově vázané DPP-IV byla v plazmě, slinách, cerebrospinální tekutině nebo seminální plazmě popsána i

solubilní/secernovaná forma DPP-IV, která pravděpodobně vzniká buněčnou sekrecí nebo dosud málo popsaným mechanismem proteolytického štěpení (z angl. shedding) membránové DPP-IV (Abbott et al., 2000; Durinx et al., 2000; Lambeir et al., 1997). Glykosylací podmíněná přítomnost mnohočetných forem DPP-IV s odlišnou enzymovou aktivitou byla popsána v plazmě pacientů s diabetem mellitem druhého typu (O'Mullan et al., 2017) nebo ve tkáních spinocelulárního karcinomu plic (Sedo et al., 1991). Membránová i solubilní forma DPP-IV, stejně jako hydrolytická aktivita DPP-IV, byly zvýšeny v B lymfoidních buňkách stimulovaných interferony α , β , γ (Bauvois et al., 2000). Zvýšená exprese DPP-IV byla pozorována během diferenciaci naivních T buněk do maturovaných Th1 lymfocytů po stimulaci interleukinem-12 (IL-12) (Cordero et al., 1997). Transkript DPP-IV byl pozorován ve viscerální tukové tkáni obézních pacientů a solubilní DPP-IV byla pozorována v adipocytech kultivovaných *ex vivo* (Sell et al., 2015). Stimulace lidských adipocytů izolovaných z viscerální tekutiny faktorem nekrotizujícím nádory- α (TNF- α) vedla ke zvýšení koncentrace solubilní DPP-IV oproti nestimulovaným adipocytům, ovšem bez odpovídající korelace s mRNA transkriptem DPP-IV. Toto pozorování naznačuje vznik solubilní DPP-IV mechanismem proteolytického štěpení membránově vázané DPP-IV (Sizarov et al., 2011).

Fibroblastový aktivační protein alfa (FAP, EC 3.4.21.B28) je membránově vázaná serinová proteáza typu II poprvé popsána jako povrchový antigen transformovaných epitelových buněk (Rettig et al., 1986). Na základě analýzy genové sekvence bylo později potvrzeno, že FAP je identický se seprázou, povrchovou proteázou detekovanou v invadopodiích melanomových buněk (Monsky et al., 1994). Gen pro FAP dosahuje 73×10^3 párů bazí a je lokalizován na chromozomu 2 (2q23), kde je tvořen 26 exony, které kódují 760 AMK velký protein. Vzhledem k lokalizaci v genomu (2q23) je pravděpodobné, že vznikl genovou duplikací genu DPP-IV (Abbott et al., 2000). FAP sdílí s DPP-IV 68% sekvenční podobnosti C-terminální domény a ve skupině DASH je nejbližším homologem DPP-IV (Goldstein et al., 1997). Hydrolytická aktivita FAP je, stejně jako u DPP-IV, podmíněna homodimerizací dvou monomerních podjednotek. Současně byl popsán i možný vznik heterodimeru s DPP-IV (Scanlan et al., 1994). Oproti DPP-IV může FAP fungovat i jako gelatináza (J. Lee et al., 2005).

Na rozdíl od ubikvitně exprimované DPP-IV je FAP exprimovaný téměř výhradně v místech tkáňové remodelace, včetně nádorové tkáně. FAP byl poprvé popsán v reaktivních stromálních fibroblastech epiteliálních nádorů, sarkomů měkkých tkání, při hojení ran a ve fetálních mezenchymových fibroblastech (Rettig et al., 1986). Kromě membránově vázaného

FAP byla v lidské plazmě popsána solubilní forma FAP, která se do cirkulace může dostávat dosud neúplně popsáním mechanismem proteolytického štěpení membránové formy (z angl. shedding) (Mueller et al., 1999). Solubilní forma FAP může být syntetizována *de novo* jako enzym přítomný v krevní plazmě štěpící α 2-antiplasmin (antiplasmin cleaving enzyme, APCE) (Lee et al., 2006). V nádorově asociovaných fibroblastech odvozených z leptomeningeální tkáně může být exprese FAP stimulována např. transformujícím růstovým faktorem (TGF- β), tetradekanoylforbolacetátem (TFA), kyselinou retinovou (RA) nebo retinolem (H. Chen et al., 2009; Chung et al., 2014; příloha č.3, Krepela et al., 2021; Rettig et al., 1994). V melanocytech a primárních melanomových buňkách byla exprese FAP indukovaná ultrafialovým zářením UV A a UV B (Waster et al., 2011).

1.1.1.1 Biologické substráty DPP-IV a FAP

DPP-IV odštěpuje X-Pro dipeptidy z N-terminálního konce řady biologicky aktivních peptidů a bílkovin obsahujících - vysoce evolučně konzervovaný - prolin na předposledním místě jejich AMK sekvence (Lambeir et al., 2003). Peptidová vazba obsahující prolin je vzhledem k jedinečné struktuře prolinu relativně stabilní vůči štěpení většinou proteáz (Vanhoof et al., 1995). Kromě odštěpování N-koncových X-Pro dipeptidů může DPP-IV, s řádově nižší účinností, odštěpovat i dipeptidy obsahující na předposlední pozici glycin, valin, threonin nebo leucin (Lorey et al., 2000; Lorey et al., 2003). Katalytická triáda složená z aminokyselin Ser⁶³⁰, Asp⁷⁰⁸ a His⁷⁴⁰ je lokalizovaná mezi 140 aminokyselinovými zbytky C-terminálního úseku a orientovaná do extracelulárního prostoru (Ogata et al., 1992). FAP sdílí s DPP-IV přibližně 70% sekvenci homologii C-terminální domény, kde je uložena i katalytická triáda obou proteáz (Goldstein et al., 1997). FAP štěpí, přestože s řádově nižší hydrolytickou účinností, většinu přirozených substrátů DPP-IV (Niedermeyer et al., 1998). Snížená exopeptidázová aktivita FAP je zřejmě způsobena záměnou Asp⁶⁶³ za Ala⁶⁵⁷, což vede k celkově slabšímu zápornému náboji v aktivním centru a částečné destabilizaci intermediárního komplexu FAP-substrát (Aertgeerts et al., 2005; Aertgeerts, Ye, Tennant, et al., 2004).

Mezi substráty DPP-IV obsahující X-Pro N-terminální dipeptid patří řada bioaktivních molekul např. neuropeptidů, chemokinů nebo inkrentinů s širokým spektrem biologických účinků uplatňujících se i v procesech nádorové transformace. Účinkem DPP-IV může docházet k jejich degradaci a eliminaci ale též k regulaci jejich funkcí; aktivaci nebo častěji inaktivaci, ke změně jejich receptorové preference, či změně na receptorového antagonistu

(Elmansi et al., 2019). DPP-IV může tímto způsobem ovlivňovat procesy spojené s buněčnou proliferací, adhezí, migrací a apoptózou a může modulovat lokální a systémovou imunitní odpověď. Ze substrátů DPP-IV jsou níže uvedeny ty, které se uplatňují v procesech gliomogeneze.

Hormon uvolňující růstový hormon (growth hormone releasing hormone, GHRH, 44 AMK) patří mezi první popsané substráty DPP-IV v lidské plazmě. GHRH má dva přirozené funkční receptory pGHRHR a SV1. Přítomnost GHRH byla popsána v řadě nádorů včetně maligních gliomů (Schally et al., 2008), v nichž korelovala s horší prognózou pacientů (Mezey et al., 2014). Biologická aktivita GHRH je terminována hydrolytickou aktivitou DPP-IV, čemuž jde zabránit přidávkem Diprotinu A, inhibitoru DPP-IV (Frohman et al., 1986).

Neuropeptid Y (NPY, 36 AMK) byl detekován v centrálním i periferním nervovém systému, v tukové tkáni nebo β buňkách Langerhansových ostrůvků (Brundl et al., 2018; Lee & Herzog, 2009). Neuropeptidy se vážou do receptorů RY1-RY5 (Sundstrom et al., 2013), které patří do rodiny receptorů spřažených s G proteiny (Li et al., 2011). NPY má silnou afinitu k receptorům RY1 a RY2, hojně distribuovaných v mozkové tkáni (Eva et al., 2006; Kopp et al., 2002). Účinkem DPP-IV dochází ke vzniku biologicky aktivního derivátu NPY (3-36) (Frerker et al., 2007) s jinou receptorovou preferencí (Kitlinska et al., 2006). Interakce NPY s RY5 pravděpodobně participuje na regulaci migrace a proliferace endotelových buněk během angiogeneze, včetně nádorové angiogeneze (Zukowska-Grojec et al., 1998). V buňkách neuroblastomu stimulovala vazba NPY na RY2 a RY5 růst nádoru a vaskularizaci (Kitlinska, 2007).

Substance P (SP, 11 AMK) je neurotransmitter signalizující přes tachykininový receptor (NK1R) spřažený s G proteinem. SP je růstový faktor s autokrinním i parakrinním účinkem (Palma et al., 1999). Nezkrácená forma SP je v plazmě štěpitelná kromě DPP-IV i angiotensin-konvertujícím enzymem (ACE) (Nyberg et al., 1984). DPP-IV štěpí SP na fragmenty 3-11 a 5-11, jejichž afinita vůči přirozenému receptoru NK1R klesá (Mentlein, 1999). SP se pravděpodobně podílí na atrahování imunitních buněk do místa zánětu. Genový knockout receptoru NK1R v myším modelu měl negativní vliv na migraci neutrofilů do místa zánětu (Ahluwalia et al., 1998). Přítomnost SP a NK1R byla popsána v mozkových nádorech *in situ* (Harford-Wright et al., 2013). Práce naší laboratoře ukazují, že v transformovaných gliálních buňkách dochází účinkem DPP-IV k inaktivaci SP a ztrátě jejího signalizačního potenciálu (Busek, Stremenova, Krepela, et al., 2008).

Regulated on activation, normal T cell expression and secreted (RANTES, CCL5, 68 AMK) patří do chemokinové rodiny CC (Zlotnik & Yoshie, 2000). Vazbou do přirozených receptorů CCR spřažených s G proteiny indukuje migraci a infiltraci leukocytů do místa zánětu (Meurer et al., 1993). RANTES je exprimován CD8⁺ T buňkami, epitelovými buňkami a fibroblasty v reakci na patologické procesy včetně zánětu a nádorové transformace (Hedayati-Moghadam et al., 2021; Chen et al., 2018; Szabo et al., 2003). Účinkem DPP-IV dochází ke vzniku zkrácené formy RANTES a terminaci jeho biologické aktivity. Zkrácená forma RANTES má negativní vliv do chemotaxi monocytů, zatímco chemotaktické vlastnosti T buněk nebyly za stejných podmínek ovlivněny. Je pravděpodobné že aktivace T lymfocytů probíhá nezávisle na hydrolytické aktivitě DPP-IV (Iwata et al., 1999). Exprese RANTES/CCR5 byla popsána v transformovaných gliálních buňkách a gliomových kmenových buňkách (Kranjc et al., 2019). Hydrolytický účinek DPP-IV na RANTES by mohl podporovat tumor-supresivní roli DPP-IV v procesech gliomageneze.

Faktor 1a odvozený ze stromálních buněk (stromal cell-derived factor 1, SDF-1 α , CXCL12, 89 AMK) je jedna z forem vznikajících alternativním sestřihem z jednoho genu (Ghadge et al., 2011). SDF-1 α je nejlépe popsána forma s širokou orgánovou distribucí včetně mozkové tkáně (Ratajczak et al., 2006). CXCR4, chemokinový receptor specifický pro SDF-1 α , je exprimován progenitorovými buňkami a je důležitý v průběhu embryogeneze (Zaruba & Franz, 2010) a pro některé typy malignit a metastáz (Balkwill, 2003; Dewan et al., 2006; Luker & Luker, 2006). Po aktivaci ligandem SDF-1 α spouští fosforylaci mitogeny aktivovaných proteinkináz (MAPK) související s přežíváním a blokuje apoptózu gliomových buněk *in vitro* (Richardson, 2016). Práce naší laboratoře i jiných autorů popisuje zvýšenou expresi receptoru CXCR4 v tkáních lidských glioblastomů (GBM), jež souvisí s horší prognózou onemocnění (Richardson, 2016; Stremenova et al., 2007; Tang et al., 2015). Hydrolytickým účinkem DPP-IV vzniká zkrácená forma SDF-1 α , která nemá chemotaktické účinky a současně může fungovat jako receptorový antagonist CXCR4 receptoru (Van Damme et al., 1999). Nízká exprese DPP-IV v transformovaných buňkách neuroblastomu korelovala s nízkou koncentrací inaktivovaného SDF-1 α , což vedlo ke zvýšenému metastatickému potenciálu těchto buněk (Arscott et al., 2009). Znovuzavedení DPP-IV do buněk neuroblastomu navodilo návrat k jejich nemalignímu fenotypu (Arscott et al., 2009).

Peptid uvolňující gastrin (gastrin-releasing peptide, GRP, 27 AMK) je peptid tvořený proteolytickou úpravou 148 AMK prekurzoru (Spindel et al., 1984). Patří do bombesinové rodiny a je hojně exprimovaný v neuroendokrinním systému (Spindel et al., 1993). Jeho přirozeným receptorem je GRP receptor (GRPR, BB2). Exprese GRPR byla popsána

v gliomových buněčných liniích a maligních gliomech (Farias et al., 2008; Pinski et al., 1994). Antagonisté GRPR inhibovali růst gliomových buněčných linií U138 a U87 v myších xenograftových modelech (Kiaris & Schally, 1999; Pinski et al., 1994) Hydrolytickým účinkem DPP-IV vznikají dva štěpné produkty (3-27) a (5-27) (Lambeir et al., 2001). Fyziologická úloha GRP *in vivo* nebyla dosud objasněna (Reeve et al., 1983).

Eotaxin (CCL11) je 74 AMK velký člen chemokinové rodiny CC, secernovaný Th2 buňkami. Hydrolytickým účinkem DPP-IV se snižuje vazebná afinita eotaxinu k receptoru CCR3, čímž je narušena jeho přirozená funkce atrahovat eozinofily (Struyf et al., 1999). Zvýšená exprese eotaxinu a CCR3 v glioblastomech korelovala se špatnou prognózou celkového přežití (Tian et al., 2016).

Mezi biologické substráty exopeptidázové aktivity, které FAP sdílí s DPP-IV, patří NPY, SP (K. N. Lee et al., 2005). V tkáni hepatocelulárního karcinomu byla pozorována přítomnost NPY a jeho receptoru Y2R v buňkách na rozhraní stromatu a parenchymu nádoru, což pravděpodobně umožňuje jejich přístup k FAP v aktivovaných mezenchymových buňkách (Wong et al., 2016). *In vitro* štěpí FAP lysyl-oxidáze-1 podobnou oxidázu (lysyl-oxidase like 1 oxidase, LOXL1) katalyzující zesíťování kolagenu a elastinu, neutrofilů aktivující peptid CXCL-5, kolonie stimulující faktor 1 (colony stimulating factor 1, CSF-1) a uplatňuje se tak při zánětlivých procesech (Zhang et al., 2019).

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

Kolagen I patří do kolagenové superrodiny a jeho exprese byla popsána v gliomech na rozdíl od nenádorové mozkové tkáně. V tkáni lidských GBM byla přítomnost prokolagenu I pozorována v proliferujících buňkách mozkových obalů a v nádorových cévách (Paulus et al., 1988). FAP se podílí na proteolytické degradaci kolagenu I, čímž reguluje buněčnou adhezi. Nádorově asociované makrofágy (TAM) infiltrují do mikroprostředí nádoru, kde potlačují protinádorovou odpověď a podporují růst nádoru. TAM adherují k proteolyticky štěpenému kolagenu I účinkem FAP (Koyama et al., 2000; Mazur et al., 2016). Muliaditan předpokládá, že kolagen I pomáhá udržovat fenotyp TAM exprimujících FAP. Kolagen I se tak může podílet na “výchově“ infiltrovaných imunitních buněk exprimujících FAP, které podporují růst a invazi nádoru (Muliaditan et al., 2018).

$\alpha 2$ antiplazmin je přirozený inhibitor plazminu. *Plazmin* je serinová proteáza s širokou substrátovou specifitou přítomná v krvi, degradující fibrin. Štěpením $\alpha 2$ antiplazminu účinkem FAP dochází ke vzniku zkrácených derivátů $\alpha 2$ antiplazminu, které až čtyřikrát účinněji inhibují hydrolytický účinek plazminu na fibrin, tedy fibrinolýzu (Zhang et al., 2019). Štěpení $\alpha 2$ antiplazminu molekulou FAP tímto způsobem potlačuje fibrinolýzu (Lee et al., 2006).

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

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

Adenosindeamináza (ADA, EC 3.5.4.4), je ubikvitně exprimovaný enzym lokalizovaný intracelulárně i na povrchu buněčných membrán, kde může tvořit komplexy s molekulou DPP-IV (De Meester et al., 1994; Kameoka et al., 1993; Sauer et al., 2012). ADA katalyzuje deaminaci adenosinu a deoxyadenosinu, který je pro T lymfocyty toxický (Dong & Morimoto, 1996). Komplex ADA s DPP-IV na povrchu T lymfocytů stimuluje sekreci cytokinů a interleukinů, čímž může zajistit větší odolnost T buněk vůči inhibici zprostředkované adenosinem (Dang & Morimoto, 2002; Fan et al., 2003). Význam komplexu ADA-DPP-IV v gliomech nebyl popsán. Lze předpokládat jeho roli v imunoregulaci – potlačováním imunosupresivního účinku endogenního adenosinu na funkci T lymfocytů.

Plazminogen (Pg) je glykoprotein krevní plazmy syntetizovaný v játrech ve formě několika zymogenů (Raum et al., 1980). V cirkulaci jsou dominantní dvě formy Pg 1 a Pg 2 s rozdílnou vazebnou afinitou k DPP-IV (Brockway & Castellino, 1972). Pg1 a Pg2 sdílí stejnou aminokyselinovou sekvenci, ale podléhají rozdílné glykosylaci (Ferraroni & Hayes, 1979; Hayes, 1979; O'Rourke et al., 1979) a liší se biologickým účinkem (Ito et al., 1985). Sialylace zvyšuje schopnost vazby Pg 2 s DPP-IV (Pirie-Shepherd et al., 1995). Vazba Pg2 k DPP-IV exprimované na povrchu transformovaných buněk karcinomu prostaty aktivuje signalizační kaskádu využívající změny intracelulární koncentrace Ca^{2+} a produkci MMP 9, což má za následek zvýšenou invazivitu buněk *in vitro* (Gonzalez-Gronow et al., 2001).

Tyrosinfosfatáza (CD45, EC. 3.1.4.48) je transmembránový glykoprotein typu I, patřící do superrodiny tyrosinových fosfatáz (protein tyrosin phosphatase, PTP). Signalizace

PTP je nezbytná pro regulaci signalizačních drah ve fyziologických i patologických dějích, včetně procesů nádorové transformace (Tonks, 2006; Yi & Lindner, 2008). CD45 defosforylací ovlivňuje funkce protonkogenních proteintyrosinkináz rodiny Src. Vazba DPP-IV na CD45 byla popsána v aktivovaných T buňkách, kde reguluje funkci některých proteintyrosinkináz, např. Lck (leukocyte-specific protein tyrosine kinase) nezbytných pro signalizaci receptorů T lymfocytů (Ishii et al., 2001; Torimoto et al., 1991).

Fibronektin (FN) je glykoprotein poprvé popsáný na povrchu netransformovaných buněk (Hynes, 1973). FN je komponentou ECM a vazbou do integrinových receptorů na povrchu buněk zprostředkovává komunikaci mezi extra- a intracelulárním prostředím (Hynes, 2002). Jeho biologická funkce je spojená s adhezí, proliferací a migrací buněk. Nízká exprese FN byla pozorována v řadě transformovaných buněk ve srovnání s netransformovanými buňkami *in vitro* a v nádorovém stromatu *in vivo* (Gallimore et al., 1977; Kahn & Shin, 1979; Stenman & Vaheri, 1981). V novějších studiích byla zvýšená exprese FN popsána v gliomech (Liao et al., 2018), karcinomu ledvin (Ou et al., 2019) nebo žlučového měchýře (Cao et al., 2015). Zvýšená exprese FN koreluje s invazivitou buněk v karcinomu ovárií (Franke et al., 2003), primárního osteosarkomu (Shi et al., 2019), karcinomu kolorekta (Yi et al., 2016) a s horší prognózou onemocnění. Vazba DPP-IV na fibronektinu je zprostředkována její C-terminální doménou bohatou na cystein a předpokládá se, že je důležitá pro zprostředkování adheze při orgánově specifickém metastazování (Cheng et al., 1998).

Podobně jako DPP-IV je i FAP schopen tvořit funkčně významné komplexy s jinými molekulami a přímo ovlivňovat proliferaci a invazi prostřednictvím intracelulárních signálních drah a transkripční regulaci genů souvisejících s buněčným cyklem (např. PI3/Akt a SHH/GLI). FAP proteolyticky degraduje homolog fosfatázy a tenzinu (phosphatase and tensin homolog, PTEN), který je přirozeným inhibítorem signální dráhy PI3/Akt. Účinkem FAP dochází k inaktivaci PTEN a aktivaci signální dráhy PI3K/AKT v GBM, která podporuje buněčnou proliferaci a invazi (Zhao et al., 2017). Aktivace SHH/GLI v GBM je zřejmě zprostředkována zkrácenou formou GLI1 (se získanou funkcí, gain function), a protože tato forma reguluje i další geny CD24, CD44 a vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF), stimuluje buněčný růst, invazi a angiogenezi v gliomu (Doheny et al., 2020).

β **integriny** jsou transmembránové adhezivní molekuly zajišťující kontakt buňky s komponentami extracelulární matrix. Schopnost transformovaných melanocytů invadovat byla důsledkem vazby FAP k integrinu $\alpha 3\beta 1$ v přítomnosti kolagenu I (Mueller et al., 1999).

Receptor plazminogenového aktivátoru urokinázového typu (uPAR) uPAR je exprimován výhradně na povrchu transformovaných buněk, což z něj dělá vhodného kandidáta v nádorové diagnostice (Mahmood & Rabbani, 2021). Přítomnost heterogenního komplexu FAP-uPAR- β 1 integrin byla pozorována v plazmatických membránách transformovaných melanocytů. Pericelulární proteolytická aktivita tohoto komplexu pravděpodobně přispívá k remodelaci ECM a zvýšené schopnosti transformovaných buněk metastazovat (Artym et al., 2002).

1.1.1.3 DPP-IV a FAP v nádorových onemocněních

Snížená exprese sérové / solubilní DPP-IV byla popsána u pacientů s karcinomem plic (Blanco-Prieto et al., 2015), prostaty (Nazarian et al., 2014), žaludku (Boccardi et al., 2015), kolorekta (De Chiara et al., 2009), v melanomech (Matic et al., 2012) a v maligním mezotheliomu (Fujimoto et al., 2014). Tumor-supresorová funkce DPP-IV byla potvrzena znovuzavedením DPP-IV do transformovaných buněk odvozených z neuroblastomu (Arscott et al., 2009), nemalobuněčného karcinomu plic (Wesley et al., 2004) nebo melanomu (Wesley et al., 1999), které vedlo k restauraci nemaligního buněčného fenotypu.

Sérové koncentrace DPP-IV by mohly být vhodným prognostickým ukazatelem karcinomů kolorekta a žaludku (Boccardi et al., 2015; De Chiara et al., 2014). DPP-IV byla popsána v pleurálním mezotheliomu (Angevin et al., 2017) a papilárních karcinomů štítné žlázy (Lee et al., 2017), adenokarcinomů nebo karcinomu kolorekta (Larrinaga et al., 2015). DPP-IV byla pozorována také v transformovaných buňkách kmenového charakteru (CSC) odvozených z maligního mezotheliomu nebo v CSC odvozených karcinomu kolorekta a v leukemických kmenových buňkách (LSC) izolovaných z krve pacientů trpících chronickou myeloidní leukémií (Ghani et al., 2011; Herrmann et al., 2014; Pang et al., 2010).

Oproti ubikvitně exprimované DPP-IV je exprese FAP za fyziologických podmínek u dospělých jedinců omezená. Přítomnost FAP je spojována s mnoha patologickými stavy, mezi které patří fibróza, artritida, ateroskleróza nebo metabolická, autoimunitní či nádorová onemocnění. Přítomnost FAP je spojená s invazivitou některých nádorů, vzhledem k jeho schopnosti ovlivňovat procesy spojené s remodelací ECM (Liu et al., 2012). FAP byl popsán v karcinomu prsu (Yu et al., 2015), kolorekta (Henry et al., 2007), pankreatu (Shi et al., 2012), plic (Wang et al., 2017), ovárií (Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2007) nebo maligních gliomech (příloha č.2, Busek et al., 2016). Ve většině případů je zvýšená exprese FAP spojována s horší prognózou onemocnění. V nádorech je FAP exprimován i řadou buněk

nádorového stromatu, včetně mezenchymových kmenových buněk (mesenchymal stem cells, MSC) a nádorově asociovaných fibroblastů (cancer associated fibroblasts, CAF). Zvýšená exprese FAP by mohla být součástí procesu přechodu buňky z epitelového do mezenchymového fenotypu (EMT). V průběhu této tranzice dochází ke změně fenotypu epitelové buňky, která ztrácí svoji polaritu a vzniká vřetenovitá buňka nezávislá na buněčných spojích a bazální membráně, produkuje složky ECM, má zvýšenou schopnost motility a odolnost vůči apoptóze (Kalluri & Weinberg, 2009).

Tumor-supresorová role FAP byla pozorována v transformovaných melanocytech, jejichž maligní fenotyp byl potlačen transgenně zavedeným FAP. Implantace buněk se znovu zavedeným FAP nevedla ke vzniku nádoru v myším modelu *in vivo* (Ramirez-Montagut et al., 2004).

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

Jak bylo uvedeno v úvodu této práce, DASH molekuly ovlivňují procesy nádorové transformace regulací růstových vlastností transformovaných, stromálních i imunitních buněk především hydrolytickou modifikací biologicky aktivních peptidů (Sedo & Malik, 2001; Waumans et al., 2015). Kromě DPP 6 a DPP 10, které nemají DPP-IV-podobnou aktivitu, mají členové této rodiny podobnou substrátovou specifitu a inhibiční profily (Gorrell et al., 2005, Lambeir et al., 2003). V některých případech je aktivita DPP-IV patrně zastupitelná DPP-IV-podobnou aktivitou ostatních členů skupiny DASH. Biologické důsledky přítomnosti spektra DASH molekul v konkrétní tkáni budou záviset na lokální dostupnosti jejich biologických substrátů a vazebných molekulárních partnerů (Busek & Sedo, 2013).

Dipeptidylpeptidáza 8 a dipeptidylpeptidáza 9 (DPP 8, EC 3.4.14.5, DPP 9, EC 3.4.14.5) jsou lokalizovány především intracelulárně a DPP-IV-podobnou aktivitu vykonávají ve formě monomeru (Abbott et al., 2000; Bjelke et al., 2006; Qi et al., 2003). DPP 8 a DPP 9 sdílí 77% aminokyselinovou identitu a mají podobné biochemické vlastnosti (Ajami et al., 2003). Přesto myší homozygoti nesoucí gen pro inaktivní mutDPP 9 přežily pouze 8–24 hodin po narození a biologická funkce molekuly DPP 9 nebyla kompenzována biologickou funkcí molekuly DPP 8 (Justa-Schuch et al., 2016). DPP 9 byla popsána ve dvou izoformách (Ajami et al., 2004), a na rozdíl od DPP 8 obsahuje v N-terminálním konci signální sekvenci pro jadernou lokalizaci (Justa-Schuch et al., 2014). Substrátovou specifitou se DPP 8 velmi podobá DPP-IV, s níž se její AMK sekvence shoduje z 19% (Qi et al., 2003). DPP 8 a DPP 9, podobně jako DPP-IV, kromě své hydrolytické aktivity interagují nehydrolyticky s komponentami ECM (Yu et al., 2006).

Dipeptidylpeptidáza-II (DPP-II, DPP 7, QPP, EC 3.4.14.2) je intracelulární proteáza primárně lokalizovaná ve vezikulárním systému (Leiting et al., 2003). DPP-II je exprimovaná ubikvitně a mohla by sloužit jako marker lysozomů (McDonald et al., 1968). Hydrolytická aktivita DPP-II s pH optimem v kyselé oblasti je závislá na předchozí glykosylaci. Dvě izoformy a dvě sestřihové varianty DPP-II byly pozorovány v homogenátu potkaního mozku (Araki et al., 2001; Mentlein & Struckhoff, 1989). Přestože doposud nejsou pro DPP-II popsány přirozené substráty *in vivo*, *in vitro* byla prokázána její schopnost štěpit, přestože s nižší katalytickou účinností, substanci P (SP), přirozený substrát DPP-IV (Mentlein & Struckhoff, 1989). Vzhledem ke schopnosti DPP-II hydrolyzovat tripeptidy Gly-Pro-X je předpokládána její účast i na degradaci kolagenu. Hydrolytická aktivita DPP-II klesá s prodlužující se délkou peptidového řetězce substrátu (Eisenhauer & McDonald, 1986; McDonald & Schwabe, 1980). DPP-II je označována jako regulátor “klidových“ (z angl. quiescent) B lymfocytů, protože inhibice DPP-II přispívala k jejich apoptóze. Tento efekt nebyl pozorován u aktivovaných B buněk chronické leukocytární leukémie (CLL). DPP-II by tak mohla být prognostickým indikátorem CLL (Danilov et al., 2010).

Dipeptidylpeptidáza 6 a dipeptidylpeptidáza 10 jsou integrální proteiny typu II bez DPP-IV-podobné aktivity z důvodu záměny aminokyseliny serin za kyselinu asparagovou, respektive glycin v aktivním centru (Chen et al., 2006; Kin et al., 2001). S DPP-IV sdílí DPP 6 a DPP 10 33 % resp. 32 % sekvenční podobnosti (Chen et al., 2003; Qi et al., 2003). Jejich přítomnost byla pozorována v membránách neuronálních buněk. DPP 6 i DPP 10 mohou tvořit součásti napěťově řízených iontových kanálů pro draselné ionty Kv4/Kv6, jejichž úlohou je prodloužení depolarizace a zvýšení akčního potenciálu membrány. Po vazbě DPP 6 nebo DPP 10 do Kv4 dochází k tvorbě komplexu se zvýšenou proudovou hustotou a inaktivaci Kv4 (Ren et al., 2005).

1.2 MOZKOVÉ NÁDORY

Gliální mozkové nádory, gliomy (někdy označovány také jako “primární mozkové nádory“), vznikají transformací astrocytů, oligodendrocytů nebo ependymálních buněk. Dle Světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO) byly dříve gliomy na základě histologických kritérií rozděleny na astrocytární, oligodendrogliální, smíšené oligoastrocytární a ependymální. Na základě stupně malignity jsou gliomy rozděleny na nízkostupňové (stupeň 1 a 2) a vysokostupňové (stupeň 3 a 4). Nízkostupňové gliomy mohou

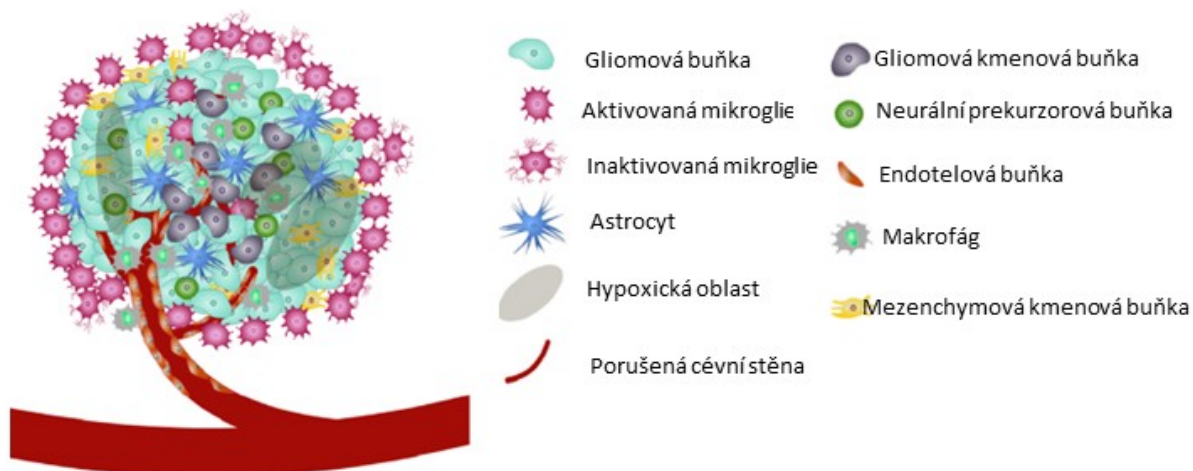
progradovat do maligní formy, vysokostupňové gliomy jsou charakterizovány vysokou agresivitou a schopností difúzně infiltrovat do přilehlé mozkové tkáně. V současné době jsou vysokostupňové gliomy u dospělých jedinců klasifikovány dle mutace v genu izocitrátdehydrogenázy (IDH). Gliomy stupně 3 obsahují IDH mutace a podle přítomné nebo nepřítomné kodelece na chromozomu 1p/19q se dále dělí na oligodendrogliomy a astrocytomy. V gliomech stupně 4 (Glioblastoma multiforme, GBM), je IDH nemutovaný (Louis et al., 2021). GBM je nejčastější a nejvíce agresivní formou vysokostupňového gliomu se špatnou prognózou a mediánem přežití do 15 měsíců ode dne diagnózy (Ostrom et al., 2020). Mezi histopatologické parametry, které jsou typické pro GBM, patří četná nekrotická ložiska, mikrovaskulární proliferace, zvýšená mitotická aktivita a přítomnost pleomorfních buněk (Wen & Kesari, 2008). Tyto tumory jsou rezistentní vůči v současné době používaným terapiím a vzhledem k jejich vysoce infiltrativnímu charakteru je není možné chirurgicky dostatečně radikálně odstranit (Stupp et al., 2017).

Mozkové metastázy (někdy označovány jako “sekundární mozkové nádory“) vznikají z cirkulujících transformovaných buněk, které pocházejí z extrakraniálních tumorů, nejčastěji karcinomu plic, prsu nebo melanomu (Eichler et al., 2011). Pro tento typ nádorů jsou typické časté mutace v genech pro IDH a p53 a delece na chromozomu 19q (Reya et al., 2001; Wilson et al., 2014; Young et al., 2015). Diseminace tumorigenních buněk do vzdálených orgánů je několikastupňový proces vyžadující invazi do přilehlé tkáně, přežití v krevním oběhu a schopnost usadit se v cílovém orgánu. Pro úspěšnou adaptaci tumorigenní buňky v novém prostředí je důležitý kooperativní vztah nádorových a stromálních buněk (Obenauf & Massague, 2015). Oproti difúznímu charakteru výše popisovaného GBM, jsou mozkové metastázy, podobně jako nízko stupňové astrocytomy, dobře ohraničeny (Langley & Fidler, 2013).

1.2.1 Mikroprostředí mozkových nádorů

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

Obrázek 1. Buněčné populace přítomné v nádorovém mikroprostředí GBM a jejich interakce ovlivňují biologické chování nádoru, např. lokální invazivitu, metastatický potenciál a rezistenci k terapii. Mikroglie jsou přítomné v peritumorální oblasti, makrofágy a gliomové kmenové buňky jsou lokalizovány perivaskulárně. Cévy a hemoencefalická bariéra jsou porušeny, upraveno dle (Uyar Ramazan, 2022).



V následujícím textu budou popsány buněčné populace přítomné v gliálních mozkových nádorech, ve kterých byla popsána přítomnost DPP-IV a FAP a týkají se této práce.

Gliomové buňky vznikají procesem nádorové transformace gliálních buněk v mozku. Přítomnost DPP-IV byla popsána v gliomových buněčných liniích a v primárních gliomových nekmenových kulturách odvozených z GBM (Busek, Stremenova, & Sedo, 2008; Busek et al., 2012; Sedo et al., 2001; Sedo et al., 1998; Sedo & Revoltella, 1995). DPP-IV zavedená do gliomových buněk s nízkou endogenní expresí DPP-IV negativně ovlivnila jejich proliferační potenciál v myších xenotransplantátech *in vivo* (Busek et al., 2012). Antiproliferační efekt DPP-IV naznačuje její tumor-supresorovou funkci v gliomagenezi. Výsledky naše i dalších autorů potvrzují též přítomnost FAP v transformovaných gliálních buňkách (Busek et al., 2012; Mentlein et al., 2011; Rettig et al., 1986). Přítomnost FAP byla pozorována v zejména gliomových buňkách exprimujících DPP-IV (Busek, Stremenova, & Sedo, 2008). Podle některých autorů FAP přítomný v gliomových buňkách napomáhá jejich migraci remodelací složek ECM, čímž může stimulovat růst nádoru a podporovat angiogenezi (Mentlein et al., 2011).

Nádorově asociované pericyty byly popsány v 19. století jako “adventiciální“ buňky (Rouget, 1893), které se vyskytují ve stěnách mikrocév v blízkosti endotelu. Jsou to štíhlé, podlouhlé, větvené buňky (Sims, 1986), s charakteristickou expresí α aktinu hladkého svalu (α SMA), desminu, CD146, receptoru pro PDGF (PDGFR) a neurogliálního antigenu NG2

(Armulik et al., 2011). V průběhu angiogeneze je proliferace a migrace endotelových buněk stimulována parakrinním působením růstových faktorů exprimovaných pericyty (Durham et al., 2014; Geevarghese & Herman, 2014). Podobné procesy se uplatňují v průběhu nádorové vaskularizace, která ovšem bez náležité fyziologické maturace, vede ke strukturním a funkčním anomáliím nově tvořených cév (Huang et al., 2010; Ozerdem & Stallcup, 2003). V porovnání s ostatními tkáněmi je množství pericytů v mozkové tkáni relativně vyšší a jejich přítomnost ve struktuře mozkových kapilár je nezbytná pro integritu a funkci hematoencefalické bariéry. Vzhledem k tomu, že v mozku byla prokázána schopnost pericytů diferencovat do neuronálních buněk v odpovědi na stresové podmínky, mohou být označovány za alternativní zdroj kmenových/progenitorových buněk (Dore-Duffy et al., 2006; Muramatsu & Yamashita, 2014; Paul et al., 2012). Mezenchymové FAP⁺ buňky s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů byly v GBM lokalizovány v blízkosti dysplastických cév (příloha č.2, Busek et al., 2016) a parakrinně stimulovaly chemotaxi endotelových buněk, angiogenní pučení a zvýšenou migraci a růst transformovaných buněk *in vitro* (Balaziová et al., 2021). Li popsala nádorově asociované pericytům podobné stromální buňky exprimující FAP⁺ PDGFR β^+ v mikroprostředí GBM (M. Li et al., 2020). “GBM-aktivované pericyty“ secernují řadu imunopresivních molekul a molekul stimulačních prurůstové vlastnosti nádoru např. IL 10, TGF- β (Sena et al., 2018).

Nádorově asociované fibroblasty (cancer associated fibroblasts, CAF) hrají důležitou roli v procesech tumorigeneze (Hanahan & Weinberg, 2011). CAF mohou vznikat z tkáňových fibroblastů nebo z mezenchymových kmenových buněk (Quante et al., 2011). Mezi typické markery CAF patří α SMA, tenascin C, protein 1 specifický pro fibroblasty (FSP 1) nebo FAP (Augsten, 2014). Přítomnost CAF v gliomech nebyla dlouhou dobu popsána z důvodu absence rezidentních fibroblastů v centrálním nervovém systému (LeBleu & Neilson, 2020). Naše nepublikované výsledky i práce jiných autorů potvrzují přítomnost mezenchymových buněk s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů (CAF) v GBM (Jain et al., 2021). Role CAF je důležitá i v degradaci ECM. Vzhledem k tomu, že CAF odvozené z kožních fibroblastů stimulovaly proliferaci gliomových buněk *in vitro* (Trylcová et al., 2015), lze v procesech gliomageneze předpokládat jejich protumorigenní funkci.

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

CÍLE PRÁCE:

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

3.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

3.1.1 Gliální mozkové nádory a mozkové metastázy

Tkáňový materiál byl získán v rámci několika grantových projektů ve spolupráci Laboratoře biologie nádorové buňky (LBNB) s klinickými pracovišti – Neurochirurgickým oddělením Nemocnice Na Homolce a s Neurochirurgickou a neuroonkologickou klinikou 1. LF UK a ÚVN na základě souhlasu příslušných etických komisí. Tkáňové vzorky gliálních mozkových nádorů byly získány od 51 pacientů. Dle kritérií WHO byly tkáně gliálních mozkových nádorů rozděleny na nízkostupňové (stupeň 2: n=7) a vysokostupňové (stupeň 3: n=5 a stupeň 4: n=39). Tkáňové vzorky mozkových metastáz byly získány od 24 pacientů. Dle původu extrakraniálního nádoru byly tkáňové vzorky mozkových metastáz rozděleny na mozkové metastázy karcinomu prsu (n=6), plic (n=7), GIT (n=4), melanomu (n=2), karcinomů neznámého primárního původu (carcinoma of unknown primary origin, CUPO, n=5). Nenádorová mozková tkáň byla získána od pacientů operovaných pro farmakorezistentní epilepsii (FRE, n=15). Vzorky byly ihned po odběru použity k odvození primárních buněčných kultur (fibroblastových, pericytárních, nádorových nekmenových a kmenových) nebo uloženy při -80 °C pro následné analýzy.

3.1.2 Permanentní buněčné linie, primární buněčné kultury

Permanentní gliomové buněčné linie U118, U138, U87, T98G, U251 byly odvozeny z GBM, gliomů 4. stupně malignity dle WHO (Cell Line Services, CLS, Německo a American Type Culture Collection, ATCC, LGC Standards, Velká Británie). Gliomová buněčná linie U373 byla odvozena z gliomu 3. stupně malignity dle WHO (ATCC, LGC Standards). Buňky byly kultivovány dle doporučení výrobců, v plastových nádobách o ploše 25 cm², v termostatu (Sanyo, Japonsko) při 37 °C (5% CO₂/95% vzduch) v kultivačním médiu Dulbecco's Eagle Modified Medium (DMEM, Merck, ČR) s přidávkem 10% fetálního telecího séra (fetal calf serum, FCS, Merck, ČR), dále označovaného jako kompletní DMEM.

Komerčně dostupná primární pericytární buněčná kultura (Human Brain Vascular Pericytes, HBVP) byla odvozena ze zdravé fetální mozkové tkáně. HBVP kultura byla kultivována dle doporučení výrobce, v plastových nádobách o ploše 25 cm², potažených poly-

L-lysinem (PolyLys, 0,0015% v/v, 150 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$, Merck, ČR), v termostatu (Sanyo, Japonsko) při 37 °C (5% $\text{CO}_2/95\%$ vzduch) v kultivačním médiu. HBVP kultura byla kultivována v pericytárním médiu (pericyte medium, PM) doplněném 2% fetálním hovězím sérem (fetal bovine serum, FBS), s přidavkem růstových suplementů (pericyte growth supplement, PGS) a antibiotik Penicilin/Streptomycin (P/S) (vše získáno od Science Cell, USA), dále označováno jako kompletní PM.

Z tkání GBM byly odvozeny gliomové nekmenové kultury (nonGSC) (Stremenova et al., 2009), gliomové kmenové kultury (glioma stem cells, GSC) (Sana et al., 2018), mezenchymové FAP⁺ kultury s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů (pFAP) (Balaziova et al., 2021) a mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů (CAF-GBM) (Trylcova et al., 2015). Z mozkových metastáz byly odvozeny mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů (CAF-MM). Z nenádorové mozkové tkáně byly odvozeny mezenchymové kultury s charakteristikami fibroblastů (KoF) (Trylcova et al., 2015). Všechny postupy byly upraveny dle předchozích zkušeností a dle protokolů Freshney R.I. (2005).

Transgenní buňky U373 konstitutivně exprimující zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein, U373-pEGFP) s excitační vlnovou délkou 395 nm a emisní vlnovou délkou 509 nm byly připraveny pomocí vektoru pEGFP-N2 (Clontech-Takara Bio Europe, Francie) v naší laboratoři dle doporučení výrobce.

3.2 BUNĚČNÉ MODELY KOMPLEXITY NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ

3.2.1 Příprava a použití kondiciovaných médií

Buňky U373 a U87, nebo HBVP byly nasazeny do 92mm Petriho misek (Nunc, USA) potažených PolyLys v koncentraci $7,5 \times 10^3$ buněk/ cm^2 a byly kultivovány v kompletní DMEM, resp. v kompletním PM. Po 24 hodinách a oplachu fosfátovým pufrem (PBS, 137 mM NaCl, 4 mM Na_2HPO_4 , 2,68 mM KCl, 1,76 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) byla provedena výměna média za čisté, bezsérové PM. Po 72 hodinách byla kondiciovaná média (KM) odpipetována, centrifugována (4 minuty, 4 °C, 225 g), sterilně filtrována (Millex GV 0,22 μm , Millipore, Irsko) a uložena do -80 °C. Jako kontrola bylo použité PM bez expozice buňkám.

Použití KM: $7,5 \times 10^3$ buněk/ cm^2 buněk U373, U87 nebo HBVP bylo nasazeno do 60mm Petriho misek (Nunc, USA) potažených PolyLys a 24 hodin kultivováno v kompletním

DMEM, resp. PM. Po odsátí média a oplachu PBS bylo k buňkám přidáno KM. Po 72 hodinách byl proveden sběr pomocí PBS/EDTA (0,02% v/v, pH 7,4) a buněčné pelety byly uloženy do -80 °C pro další analýzu. Buňky byly kultivovány v kvadruplikátech.

3.2.2 Přímá kokultivace gliomových buněk U373 a nenádorových pericytů HBVP

3.2.2.1 Značení nenádorových pericytů HBVP

10⁷ buněk HBVP bylo značeno pomocí fluorescenčního barviva Tagit Violet Proliferation and Cell Tracking Dye s excitační vlnovou délkou 395 nm a emisní vlnovou délkou 455 nm (Bio Legend, USA) dle doporučení výrobce. 10⁶ buněk/ml bylo inkubováno v PBS obsahujícím proliferační barvivo v koncentraci 1 µl/ml po dobu 20 minut při 37 °C. Po centrifugaci (6 minut, 4 °C, 130 g) byl pelet resuspendován v kompletním PM. Buňky byly dále označovány HBVP–Tagit.

3.2.2.2 Přímá kokultivace HBVP–Tagit a U373–pEGFP

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

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

Tabulka 1. Schéma nasazení buněk v kokultivačních experimentech pro sběr v různých časových intervalech.

počet buněk $\times 10^5$ v kokultuře nasazených do 92mm Petriho misky		počet buněk $\times 10^5$ kultivovaných samostatně nasazených do 92mm Petriho misky		hodina sběru od nasazení
HBVP-Tagit	U373-pEGFP	HBVP-Tagit	U373-pEGFP	
1,5	1,5	3	3	0
1	1	2	2	24
0,5	0,5	1	1	48
0,2	0,2	0,4	0,4	72

3.2.2.3 *Separace HBVP-Tagit a U373-pEGFP z kokultury*

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

3.2.3 **Stimulace gliomových a stromálních buněk rekombinantním TGF- β 1**

Transformované gliální buňky (permanentní, primární nonGSC), HBVP a mezenchymové FAP⁺ kultury s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů (pFAP) a mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů (CAF-GBM a CAF-MM) byly nasazeny do 92mm Petriho misek (pro HBVP a pFAP potažených PolyLys) v koncentraci $7,5 \times 10^3$ buněk/cm², do příslušných kompletních médií DMEM, resp. PM. Buňkám bylo po 72 hodinách a oplachu PBS vyměněno kompletní médium obsahující rekombinantní TGF- β 1 (Preprotech, ČR) v koncentraci 2 ng/ml (příloha č.3, Krepela et al., 2021). S kontrolními buňkami bylo zacházeno stejným způsobem, bez přídavku TGF- β 1. Po 72 hodinách od stimulace byl proveden sběr pomocí PBS/EDTA (0,02% v/v, pH 7,4) a buněčné pelety byly uloženy do -80 °C pro další analýzu. Buňky byly kultivovány v triplikátech.

3.3 CHARAKTERIZACE MNOHOČETNÝCH FOREM DPP-IV A FAP

3.3.1 Příprava buněčného lyzátu

Tkáňové vzorky byly homogenizovány v ledovém 25mM fosfátovém pufru pH 6 (0,2 mM Na₂HPO₄, 0,6 mM KH₂PO₄, 22,4 mM NaCl) homogenizační sondou Ultra-Turrax S8N-5G (IKA, Staufen, Německo) ve finální koncentraci 15 % w/v. Homogenát byl smíchán v poměru 1:1 s lyzačním puforem pH 7,5 (10 mM Tris – HCl, 1 mM EGTA, 1 mM Na₂EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 10% glycerol) s přidavkem inhibitorů proteáz 200 μM AEBSF a 50 μM E – 64 (oboje Sigma Aldrich, Německo) s 25 μM pepstatinem A (Merck, Německo) a centrifugován (30 minut, 4°C, 27 000 g). Buněčné lyzáty byly připravovány v koncentraci 10⁶ buněk/ml lyzačního pufru s inhibitory proteáz, 20 minut inkubovány na orbitální třepačce při 4°C a centrifugovány za stejných podmínek jako pro tkáňové vzorky. Celkový protein byl stanoven metodou dle Lowryho (Lowry et al., 1951).

3.3.2 Biochemické stanovení hydrolytické aktivity DPP-IV a FAP

Hydrolytická aktivita DPP-IV a FAP byla měřena v 96 jamkových deskách (Thermo Scientific, USA) při 37 °C, kontinuální fluorimetrickou metodou při excitační vlnové délce 380 nm a emisní vlnové délce 460 nm. DPP-IV-podobná aktivita byla stanovena pomocí fluorogenního substrátu glycyl-L-prolyl-7-aminomethylkumarinu (H-Gly-Pro-AMC, Bachem, Německo), ve 200 μl reakční směsi obsahující 193 μl PBS pH 7,4 a 5 μl měřeného vzorku. Reakce byla odstartována přidavkem 2 μl substrátu ve finální koncentraci 50 μM. Aktivita DPP-IV byla měřena v přítomnosti specifického inhibitoru DPP-IV, Sitagliptinu (BioVision, USA). Po proběhnutí 15 cyklů měření DPP-IV-podobné aktivity byl do každé jamky pipetován Sitagliptin ve finální koncentraci 300 nM. Aktivita DPP-IV odpovídá reziduální DPP-IV-podobné aktivitě po inhibici Sitagliptinem vztažené na jeden miligram celkového proteinu.

Exopeptidázová aktivita FAP byla měřena v podobném uspořádání jako DPP-IV s následujícími modifikacemi. 5 μl vzorku bylo pipetováno do jamky, reakce byla zahájena přidavkem 95 μl PBS obsahujícího fluorogenní substrát pro FAP NS604 (získán od RNDr. Pavla Šáchy PhD, z Ústavu organické chemie a biochemie, ČR) ve finální koncentraci 150 μM. Specifita substrátu NS604 byla ověřena pomocí FAP-specifického inhibitoru DFAP (získán od prof. Dr. Ingrid DeMeester z Laboratoře lékařské biochemie na Univerzitě

v Antwerpách, Belgie). Po proběhnutí 15 cyklů stanovení aktivity FAP byl do každé jamky pipetován objem inhibitoru ve finální koncentraci 1 μM . Biochemické stanovení aktivity FAP dále probíhalo za stejných podmínek jako je uvedeno pro DPP-IV.

Biochemická stanovení aktivity DPP-IV a FAP byla prováděna v triplikátech nebo kvadruplikátech a probíhala na Spektrofluorimetru 1420, multilabel counter Victor 3 (Perkin Elmer, USA). Naměřená data byla vyhodnocena v programu Workout 2.0 Wallace 1420 Workstation.

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

Hydrolyticky aktivní formy DPP-IV a FAP byly detekovány v gelech po elektroforetické separaci SDS PAGE (MW formy) a v gelech polymerovaných na plastickém nosiči s imobilizovaným pH gradientem 3-10 (ReadyStrip™ IPG Strips, BioRad, Velká Británie) po izoelektrické fokusaci (pI formy), metodou stanovení aktivity enzymu v gelu. PAGE gely nebo IPG gely byly po ekvilibraci ve fosfátovém pufru (100 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaH_2PO_4 pH 7,5) přemístěny na skleněnou podložku, převrstveny substrátem H-Gly-Pro-AMC (50 μM , DPP-IV-podobná aktivita) nebo NS604 (150 μM , aktivita FAP), překryté acetátcelulózovou (AC) membránou (Beckman Coulter, Německo) a pod krycím sklem uloženy na 30 minut do 37 °C v inkubátoru Heraeus (Kendro, Německo). Fluorescenční signál štěpeného produktu byl zachycen na AC membránu a dokumentován na přístroji ChemiDoc MP Imaging System (ChemiDoc, BioRad) transiluminací v UV spektru s emisním filtrem 590/110 nm.

3.3.4 Imunochemické metody

3.3.4.1 *Enzyme-linked immunoassay (ELISA) pro DPP-IV a FAP*

Koncentrace DPP-IV a FAP byla měřena s využitím komerčních sad DuoSet ELISA: DPP-IV/CD26 DY 1180, a DuoSet FAP, DY 3715 (R&D Systems, Německo) dle doporučení výrobce. Experiment probíhal při pokojové teplotě (RT), inkubace reagensů a vzorků v desce byly prováděny s využitím orbitální třepačky PTR 30 (Grant-Bio, Velká Británie) promývací kroky byly prováděny na promývače Hydroflex (Tecan, Schoeller, ČR). Stručně, 96 jamkové desky DY990 (R&D Systems, Německo) byly přes noc inkubovány s příslušnou primární protilátkou (antiDPP-IV, cat.no. 842127, 2 µg/ml a antiFAP, cat.no. 842997, 1 µg/ml). Po oplachu v TTBS pufru pH 7,5 (0,05% Tween 20 v/v v Tris Buffer Saline: 100 mM Tris base, 154 mM NaCl) byl do jamek pipetován blokační roztok (PBS s 1% albuminem) a po hodinové inkubaci a oplachu testované vzorky. Po dvouhodinové inkubaci vzorků a oplachu byla do jamek na dvě hodiny pipetovaná biotinylovaná, detekční protilátka (cat.no. 842128, 1 µg/ml). Po oplachu byl do jamek pipetován křenovou peroxidázou-konjugovaný Streptavidin (cat.no. 890803) na dobu 20 minut. Po oplachu byl do jamek pipetován substrát (peroxid vodíku a tetramethylbenzidin, 1:1). Reakce probíhala v temnu a po 20 minutách byla zastavena přidávkem 1N kyseliny sírové. Chromogenní produkt byl kvantifikován na přístroji Microplate reader Sunrise (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 450 nm s korekcí absorbance měřené při vlnové délce 570 nm. Standardní vzorky byly měřeny v duplikátech, analyzované vzorky v triplikátech nebo kvadruplikátech. Z naměřených dat standardních vzorků byla sestrojena kalibrační křivka, s jejímž využitím byly odečteny hodnoty koncentrací DPP-IV a FAP v testovaných vzorcích.

3.3.4.2 *Enzyme-linked immunoassay (ELISA) pro TGF-β1*

Koncentrace TGF-β1 byla stanovena pomocí DuoSet ELISA Human TGF-β1 DY 240 (R&D Systems, Německo) dle doporučení výrobce obdobně jako při stanovení koncentrace DPP-IV nebo FAP s následujícími změnami. Primární protilátka (antiTGF-β1, cat.no. 840116, 2 µg/ml) byla blokována blokačním roztokem (5% Tween 20 v/v v PBS pH 7,2-7,4). Testované vzorky byly aktivovány acidifikací 1 N HCl (10 minut, RT), následovanou neutralizací 1,2 N NaOH/0,5M HEPES (10 minut, RT). Další kroky v protokolu byly identické jako při stanovení koncentrace DPP-IV nebo FAP.

3.3.4.3 *Imunodetekce DPP-IV a FAP po western blotu*

3.3.4.3.1 1D Elektroforéza

Přítomnost DPP-IV a FAP byla hodnocena po elektroforetické separaci proteinů s navazující imunodetekcí (MW formy). V průběhu dizertační práce byla zavedena Stain-Free metoda, využívající k normalizaci detekovaných hodnot proteinu zájmu digitální subtrakcí denzitometricky zjištěného pozadí celkového proteinu v nasazeném vzorku (Ladner et al., 2004). K objemu buněčného lyzátu obsahujícího 20 nebo 30 μg celkového proteinu (stanoveného dle Lowryho) byl pipetován vzorkový pufr (Laemmli pufr 4x, 250 mM Tris base, 28 mM SDS, 40% glycerol, pH 6,8). Elektroforéza byla prováděna v 7cm minigelech s tloušťkou 1,5 mm, složených ze 4% jamkového a 8% separačního gelu (30% akrylamid, 0,8% bis akrylamid). Pro provedení Stain-Free metody byl do polymerační směsi přidáván 2,2,2 – Trichlorethanol (TCE, 0,05% v/v, Merck, Německo). Elektroforéza probíhala v elektrodovém pufru (25 mM Tris base, 192 mM glycín, 0,1 % SDS, pH 8,3) při konstantním napětí (60 V po dobu 30 minut, 140 V po dobu 90 minut). Po ukončení elektroforézy byla provedena aktivace TCE ve Stain-Free gelu na přístroji ChemiDoc MP Imaging System (ChemiDoc, BioRad); doba aktivace 45 vteřin, za podmínek optimální automatické expozice. Gely byly ekvilibrovány v transferovém pufru (Bjerrum and Schafer-Nielsen transfer buffer s 20% metanolem v/v) a proteiny byly přeneseny na PVDF membránu s nízkým fluorescenčním signálem (0,45 μm , Merck, ČR) při konstantním napětí 10 V po dobu 60 minut (SemiDry System, BioRad). Po transferu byl metodou Stain-Free detekce pořízen snímek PVDF membrány za podmínek optimální automatické expozice a signál z každé dráhy, reprezentující nanášku celkového proteinu, byl použit pro normalizaci signálu proteinu zájmu na celkový protein. Před imunodetekcí byly membrány promyty v TTBS pufru pH 7,5 (0,05% Tween 20 v/v v Tris Buffer Saline: 100 mM Tris base, 154 mM NaCl) a nespecifické vazby byly blokovány blokačním činidlem EveryBlot Blocking Buffer (EBBB, BioRad) při RT po dobu 5 minut. Primární protilátky proti lidským DPP-IV a FAP antiDPP-IV E19 nebo antiFAP D8 (obě Applied DNA Sciences, USA) byly ředěny v EBBB 1000x, resp. 5000x a inkubovány přes noc při 4°C. Poté byly membrány 30 minut oplachovány v TTBS a inkubovány s HRP-konjugovanou sekundární potkaní protilátkou ředěnou 20000 x v EBBB. Po dalším 30 minutovém oplachu byla aplikována Luminata Forte (Merck, ČR) a chemiluminiscenční signál byl hodnocen na přístroji ChemiDoc v režimu optimální automatické expozice. Detekovaný signál DPP-IV nebo FAP byl hodnocen a normalizován pomocí ImageLab Software (BioRad) podle doporučení výrobce.

3.3.4.3.2 2D Elektroforéza

Přítomnost DPP-IV a FAP byla hodnocena po izoelektrické fokusaci (IEF) a 2D elektroforetické separaci proteinů s navazující imunodetekcí. Vzorky byly lyzovány v rehydratačním pufru (Rehydration Buffer, RB, 8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT) s přidavkem amfolytů Bio-Lyte 3-10 (100x Bio-Lyte 3/10 Ampholyte, BioRad), inkubovány 20 minut na orbitální třepačce při RT a centrifugovány (30 minut, 20°C, 27 000 g). Komerčně dostupné gely polymerované na plastickém nosiči s imobilizovaným gradientem (IPG gely) pH 3-10, pH 4-7 a pH 7-10 (ReadyStrip™ IPG Strips, BioRad) byly pasivně rehydratovány 130 µg celkového proteinu v RB (Bradford, 1976) při RT přes noc. IEF probíhala dle doporučení výrobce ve třech fázích 5-7 hodin při maximálním proudu 50 µA. Ekvilibrace IPG gelů před 2D elektroforézou probíhala 15 minut v ekvilibračním pufru I (6 M urea, 2 % SDS, 50 mM Tris HCl, 20% glycerol, pH 8,8 s přidavkem 2% w/v DTT) a 15 minut v ekvilibračním pufru II (6 M urea, 2 % SDS, 50 mM Tris HCl, 20% glycerol, pH 8,8 2,5% w/v IAA). IPG gely byly přeneseny na 8% separační gel (30% akrylamid, 0,8% bis akrylamid) o tloušťce 1,5 mm a zafixovány 0,5% w/v agarózou v elektrodovém pufru se stopovým množstvím bromfenolové modře. Elektroforéza i následný přenos proteinů na PVDF membránu probíhal, jak bylo uvedeno pro 1D elektroforézu a western blot, bez průběžné Stain-Free dokumentace.

3.3.4.4 *Imunohistochemická a imunocytochemická analýza*

10 µm řezy ze vzorků mozkové tkáně byly připraveny při -20 °C na kryotomu (Bright Instruments, Velká Británie) a fixovány ve 4% paraformaldehydu, 10 minut při RT. Po dvojitém oplachu v PBS byly řezy permeabilizovány 0,1% Tritonem X-100 (Sigma, Německo) a inkubovány v blokačním roztoku TBS (Tris Buffer Saline: 100 mM Tris base, 154 mM NaCl, pH 7,5 s 10% FCS a 0,1% BSA) 60 minut při RT. Dvojitá imunodetekce antigenů byla prováděna sekvenčně protilátkami antiDPP-IV MA261 (mouse, 1:100, Abcam, Velká Británie) při 4°C přes noc a antiFAP D8 (rat, Applied DNA Sciences, USA) 1 hodinu při RT s oplachem v TTBS mezi jednotlivými inkubacemi. Sekundární myši AF 488 (1:500, AlexaFluor 488 donkey antimouse IgG A21202) a potkaní AF 546 (1:500, AlexaFluor 546 goat antirat IgG, A11081, obě od Molecular Probes/Invitrogene, Velká Británie) protilátky byly aplikovány 1 hodinu při RT.

Imunocytochemická analýza byla provedena podobně jako imunohistochemická barvení s následujícími modifikacemi. $4 \times 10^3/\text{cm}^2$ buněk bylo nasazeno na skleněná krycí sklíčka a fixováno ve 4% paraformaldehydu, 5 minut při RT. Blokace probíhala v TBS pufru 1 hodinu před inkubací sklíček s primárními protilátkami antiDPP-IV MA 261, 1:100 a antiFAP D8, 1:100 (4 °C přes noc). Po oplachu byla skla inkubována se sekundární myší (AF 488, A21202) nebo potkaní protilátkou (AF 488, AlexaFluor 488 goat antirat IgG, A11006, Molecular Probes/Invitrogene, Velká Británie) 1 hodinu při RT. Kontrolní barvení jader bylo prováděno pomocí 50 ng/ml Hoechst 33258 (bisbenzimid, Sigma Aldrich, Německo). Vzorky byly montovány v Aqua Polymount (Polysciences, Německo) a signál pozorován a dokumentován na fluorescenčním mikroskopu IX70 (Olympus, ČR).

3.3.5 Deglykosylace

Deglykosylace peptidovou N-glykosidázou F (PNGáza F, E.C. 3.5.1.52, Sigma Aldrich, USA) byla provedena dle doporučení výrobce s následujícími modifikacemi: 20 μg celkového nativního proteinu (stanoveného Lowryho metodou v dříve popsáném buněčném lyzátu) bylo inkubováno s 0,01 U PNGázy F při 37 °C v inkubátoru Heraeus po dobu 24 hodin. Ke kontrolním vzorkům nebyla přidána PNGáza F. Vzorky byly následně smíchány s Laemmli puftrem 4x a analyzovány metodou western blot v nedenaturujících a neredukujících podmínkách.

3.4 STATISTIKA

Pro statistické vyhodnocení byl použit program Statistica 12 (StatSoft ČR s.r.o., ČR).

4 VÝSLEDKY

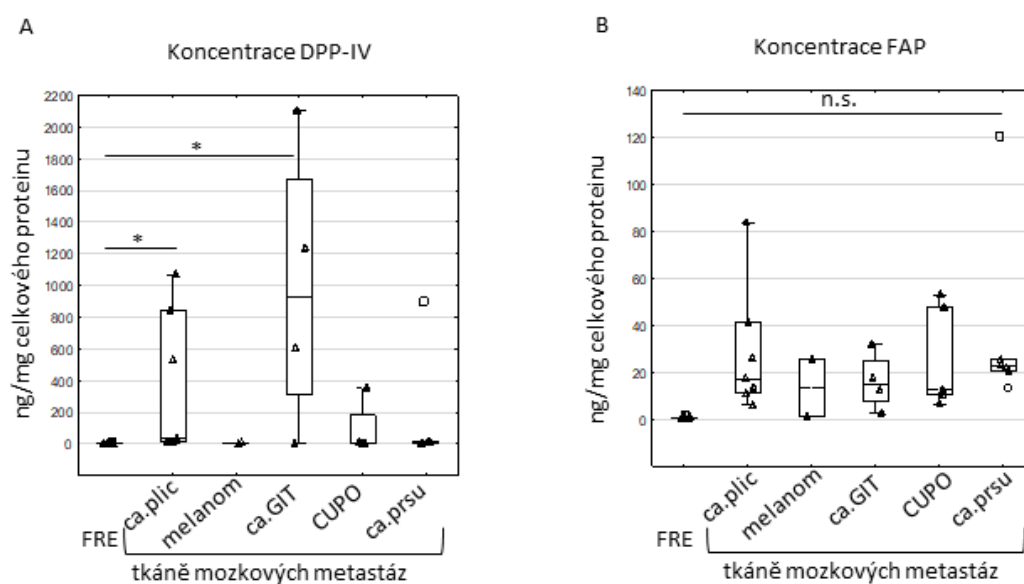
4.1 MNOHOČETNÉ FORMY DPP-IV A FAP V TKÁNÍCH GLIÁLNÍCH MOZKOVÝCH NÁDORŮ A MOZKOVÝCH METASTÁZ

Koncentrace DPP-IV a FAP byla v tkáních GBM statisticky významně vyšší ve srovnání s koncentrací v nízkostupňových gliomech a FRE (příloha č.1, Matrasova et al., 2017).

Koncentrace DPP-IV byla v tkáních mozkových metastáz karcinomu plic a GIT statisticky významně vyšší ve srovnání koncentrací ve FRE (obrázek č. 2A) a statisticky významně korelovala s aktivitou DPP-IV (Spearmanův korelační koeficient $r=0,8042$, $p<0,05$) a s normalizovaným signálem imunopozitivní DPP-IV po WB (Spearmanův korelační koeficient $r=0,8064$, $p<0,05$).

Koncentrace FAP byla v tkáních mozkových metastáz karcinomu plic a GIT vyšší, ovšem bez statistické významnosti, ve srovnání s koncentrací ve FRE (obrázek č.2B) a statisticky významně korelovala s aktivitou FAP (Spearmanův korelační koeficient $r=0,777$, $p<0,05$) a s normalizovaným signálem imunopozitivního FAP po WB (Spearmanův korelační koeficient $r=0,694$, $p<0,05$).

Obrázek 2. Koncentrace DPP-IV a FAP v tkáních mozkových metastáz a v nenádorové mozkové tkáni byly stanoveny metodou ELISA. ca.plic: karcinom plic, ca.GIT: karcinom gastrointestinálního traktu, CUPO: karcinomy neznámého původu, ca.prsu: karcinom prsu, FRE: farmakorezistentní epilepsie. Kruskal-Wallisův test, * $p<0,05$, n.s.: bez statistické významnosti, krabice 25-75 % s označením mediánu, svorky: minimální a maximální hodnoty, trojúhelníky: zdrojové hodnoty, kolečka: odlehlé hodnoty, čtverečky: extrémní hodnoty.



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

DPP-IV byla ve vysokostupňových gliomech přítomna ve dvou až třech imunopozitivních, hydrolyticky aktivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí odpovídající molekulové hmotnosti MW 140-160 kDa. V bioptickém materiálu, kde byla nalezena pouze jedna imunopozitivní MW forma DPP-IV, nebyla pozorována žádná hydrolyticky aktivní MW forma DPP-IV (příloha č.1, Matrasova et al., 2017).

FAP byl ve vysokostupňových gliomech přítomný v jedné imunopozitivní MW formě s elektroforetickou pohyblivostí odpovídající MW 120-140 kDa. Přítomnost hydrolyticky aktivních forem FAP nebyla stanovována (příloha č.1, Matrasova et al., 2017).

DPP-IV a FAP nebyly v gliomech stupně 2 a ve FRE přítomny v detekovatelných množstvích (příloha č.1, Matrasova et al., 2017; příloha č.2, Busek et al., 2016; Stremenova et al., 2007).

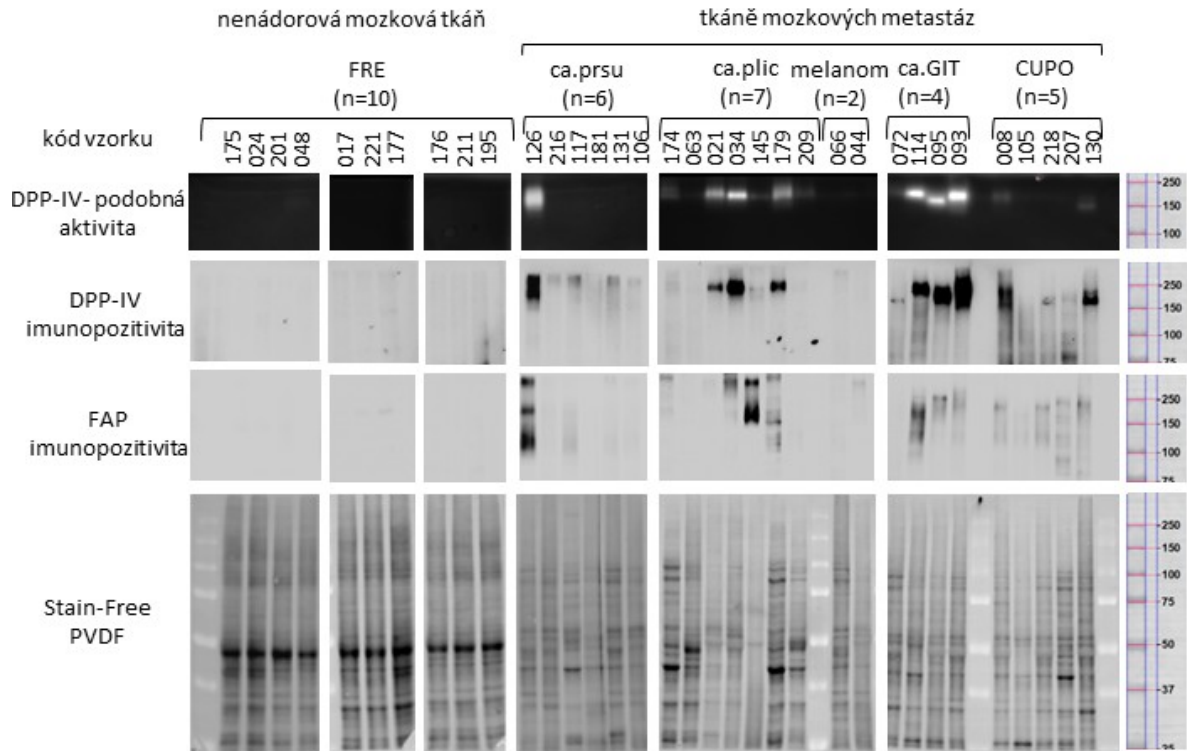
DPP-IV byla v tkáních mozkových metastáz přítomna v jedné až dvou imunopozitivních, hydrolyticky aktivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí odpovídající MW nad 200 kDa (obrázek č. 3).

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

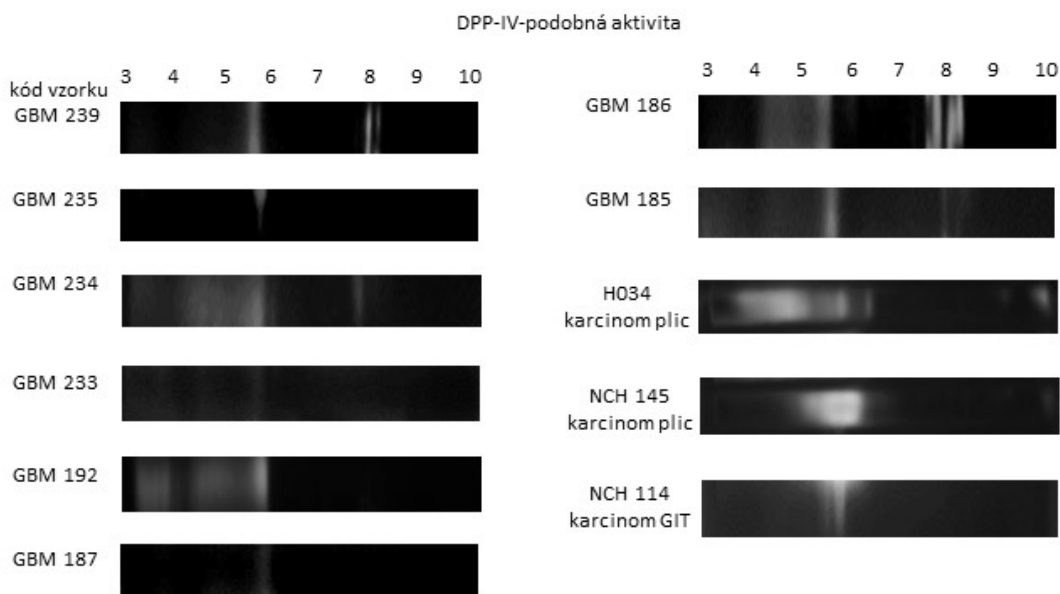
Přítomnost DPP-IV a FAP ve FRE nebyla měřitelná (obrázek č. 3).

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

Obrázek 3. MW formy DPP-IV a FAP v tkáních mozkových metastáz a nenádorové mozkové tkáni. DPP-IV-podobná aktivita byla detekována po elektroforetické separaci substrátem H-Gly-Pro-AMC. Imunopozitivní MW formy byly detekovány po 1D WB protilátkami antiDPP-IV E19 a antiFAP D8. Signál DPP-IV a FAP byl normalizován na celkový protein ze Stain-Free PVDF membrány. ca.prsu: karcinom prsu, ca.plic: karcinom plic, ca.GIT: karcinom gastrointestinálního traktu, CUPO: karcinomy neznámého původu, FRE: farmakorezistentní epilepsie.



Obrázek 4. pI formy s DPP-IV-podobnou aktivitou v tkáních GBM a mozkových metastáz byly detekovány po izoelektrické fokusaci substrátem H-Gly-Pro-AMC. GBM: glioblastoma multiforme.



Tabulka 2. pI formy s DPP-IV-podobnou aktivitou v tkáních GBM a mozkových metastáz byly detekovány po izoelektrické fokusaci substrátem H-Gly-Pro-AMC. GBM: glioblastoma multiforme, MM: mozkové metastázy.

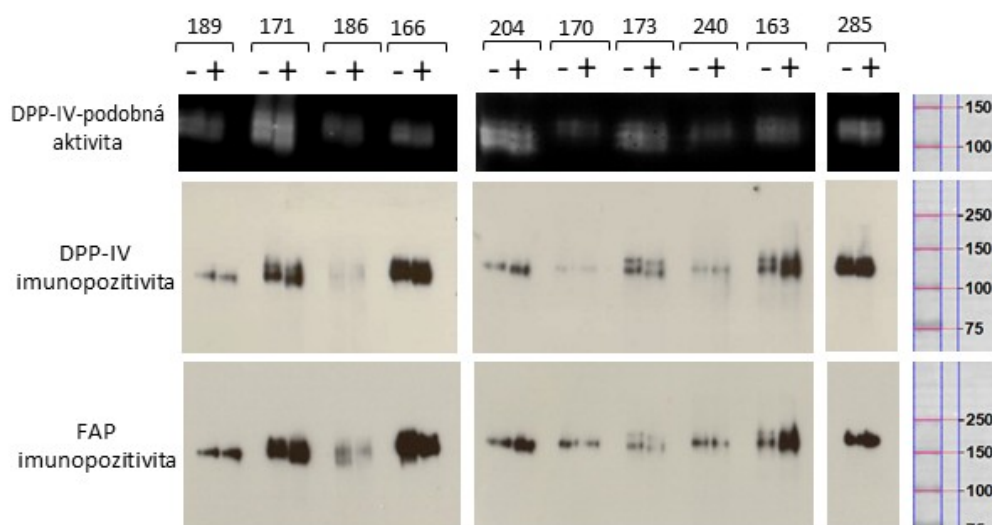
kód vzorku		formy s DPP-IV podobnou aktivitou		
		pI 4,0-5,0	pI 5,8	pI 8,0
GBM	239	-	+	+
	235	-	+	-
	234	+	+	+
	233	-	+	-
	192	+	+	-
	187	-	+	-
	186	+	+	+
	185	-	+	+
MM	H034	-	+	-
	NCH 145	-	+	-
	NCH 114	-	+	-

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

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

Naše výsledky DPP-IV a FAP nepotvrdily vliv glykosylace na vznik mnohočetných forem DPP-IV a FAP v gliomových buněčných liniích (příloha č.1, Matrasova et al., 2017). Expozice DPP-IV a FAP v tkáňových homogenátech GBM PNGáze F nevedla ke změně počtu pozorovaných imunopozitivních MW forem ani k poklesu hydrolytické aktivity DPP-IV (data neuvedena). Účinkem PNGázy F se zvýšila elektroforetická pohyblivost přítomných MW forem DPP-IV a FAP v porovnání s kontrolními, PNGáze F neexponovanými vzorky (obrázek č. 5).

Obrázek 5. Deglykosylace DPP-V a FAP přítomných v tkáních GBM. DPP-IV-podobná aktivita byla detekována po elektroforetické separaci substrátem H-Gly-Pro-AMC. Imunopozitivní MW formy DPP-IV a FAP byly detekovány po 1D WB protilátkami antiDPP-IV E19, antiFAP D8. (+): vzorek exponovaný PNGáze F, (-): vzorek bez expozice PNGáze F. GBM: glioblastoma multiforme, PNGáza F: peptidová N glykosidáza F.



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

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

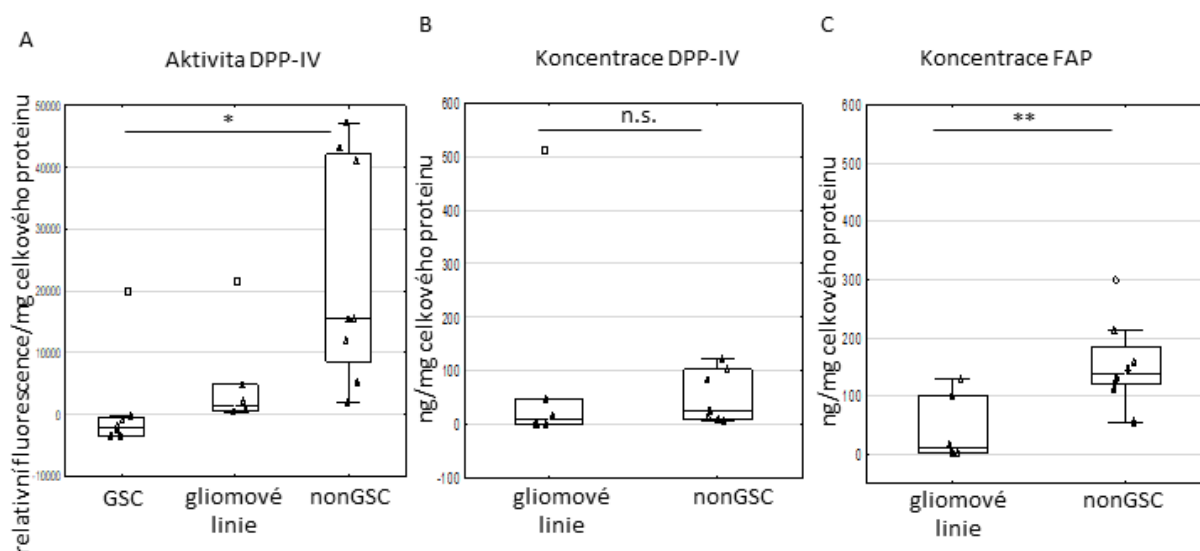
Mnohočetné formy DPP-IV a FAP v transformovaných gliálních buňkách

Přítomnost DPP-IV a FAP byla hodnocena v permanentních gliomových buněčných liniích a primárních gliomových nekmenových (nonGSC) a gliomových kmenových (GSC) kulturách.

Enzymová aktivita DPP-IV byla signifikantně vyšší v nonGSC kulturách v porovnání s enzymovou aktivitou v gliomových buněčných liniích a GSC kulturách (obrázek č. 6A). Koncentrace DPP-IV se v gliomových buněčných liniích statisticky významně nelišila od koncentrace v nonGSC kulturách (obrázek č. 6B) a statisticky korelovala s normalizovaným signálem imunopozitivní DPP-IV po WB (Spearmanův korelační koeficient $r=0,6294$, $p<0,05$).

Koncentrace FAP v nonGSC kulturách byla signifikantně vyšší ve srovnání s koncentrací v gliomových buněčných liniích (obrázek č. 6C) a statisticky korelovala s normalizovaným signálem imunopozitivního FAP po WB (Spearmanův korelační koeficient $r=0,775$, $p<0,05$).

Obrázek 6. Enzymová aktivita a koncentrace DPP-IV a FAP v gliomových buňkách. (A) Enzymová aktivita DPP-IV byla stanovena biochemicky. Koncentrace (B) DPP-IV a (C) FAP byly stanoveny metodou ELISA. nonGSC: gliomové nekmenové kultury, GSC: gliomové kmenové kultury. (A) Kruskal-Wallisův test, $*p<0,05$. (B), (C) Mann-Whitneyův U test, $**p<0,05$, n.s.: bez statistické významnosti. Krabice, 25-75 % s označením mediánu, svorky: minimální a maximální hodnoty, trojúhelníky: zdrojové hodnoty, kolečka: odlehle hodnoty, čtverečky: extrémní hodnoty.

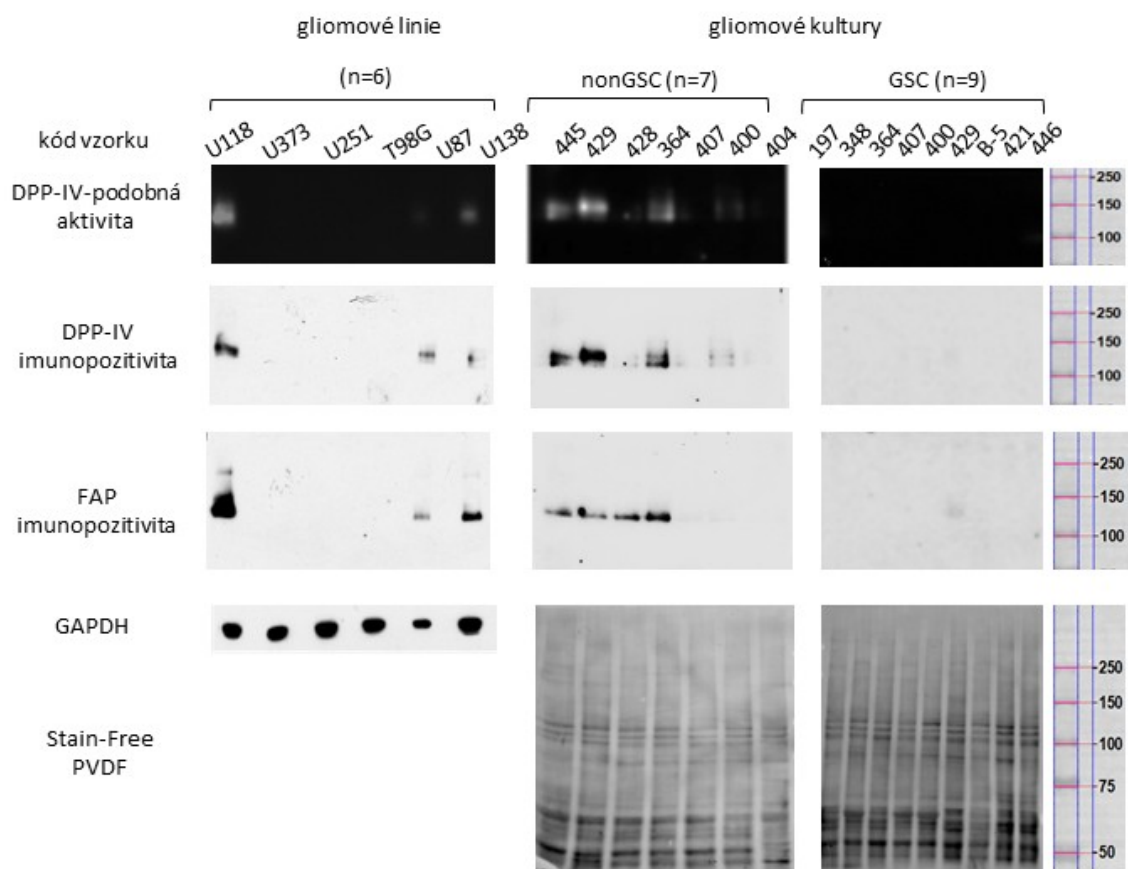


DPP-IV byla v gliomových liniích a nonGSC kulturách přítomna v jedné až dvou imunopozitivních, hydrolyticky aktivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí v oblasti MW 140 kDa (obrázek č. 7). V gliomových buněčných liniích byly přítomny dvě až tři hydrolyticky aktivní, imunopozitivní formy DPP-IV s pI v oblasti 5,8 (příloha č.1, Matrasova et al., 2017).

FAP byl v gliomových liniích a nonGSC kulturách pozorován v jedné až dvou imunopozitivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí v oblasti MW 140 kDa (obrázek č. 7). V gliomových buněčných liniích byly přítomny dvě až tři imunopozitivní formy FAP s pI 5,8-6,2 a imunopozitivita FAP byla pozorována i v oblasti kyselého pH.

Přítomnost DPP-IV a FAP v GSC nebyla měřitelná (obrázek č. 7).

Obrázek 7. MW formy DPP-IV a FAP v gliomových buňkách. DPP-IV-podobná aktivita byla detekována po elektroforetické separaci substrátem H-Gly-Pro-AMC. Imunopozitivní MW formy byly detekovány po 1D WB protilátkami antiDPP-IV E19 a antiFAP D8. Signál DPP-IV a FAP byl normalizován na expresi glyceraldehydfosfátdehydrogenázy nebo na celkový protein ze Stain-Free PVDF membrány. nonGSC: gliomové nekmenové kultury, GSC gliomové kmenové kultury.



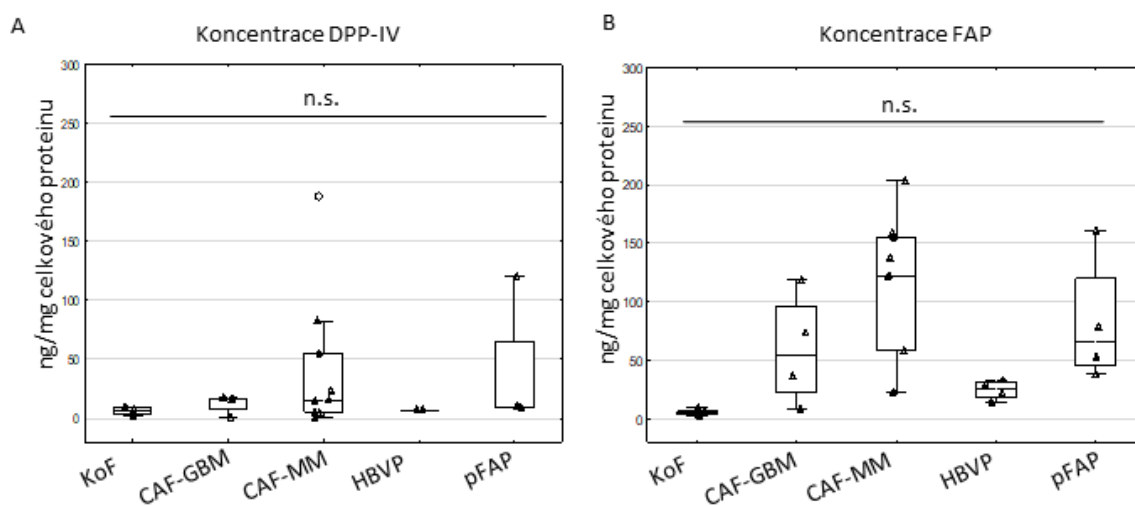
Mnohočetné formy DPP-IV a FAP ve stromálních buňkách přítomných v tkáních GBM a mozkových metastáz

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

Koncentrace DPP-IV se ve stromálních buňkách ze všech studovaných zdrojů statisticky významně nelišila od koncentrace v nenádorových buňkách KoF a v nenádorových pericytech HBVP (obrázek č. 8A).

Koncentrace FAP byla vyšší v CAF-GBM, CAF-MM a pFAP ve srovnání s koncentrací v nenádorových buňkách KoF a nenádorových pericytech HBVP, ovšem bez statistické signifikance (obrázek č. 8B).

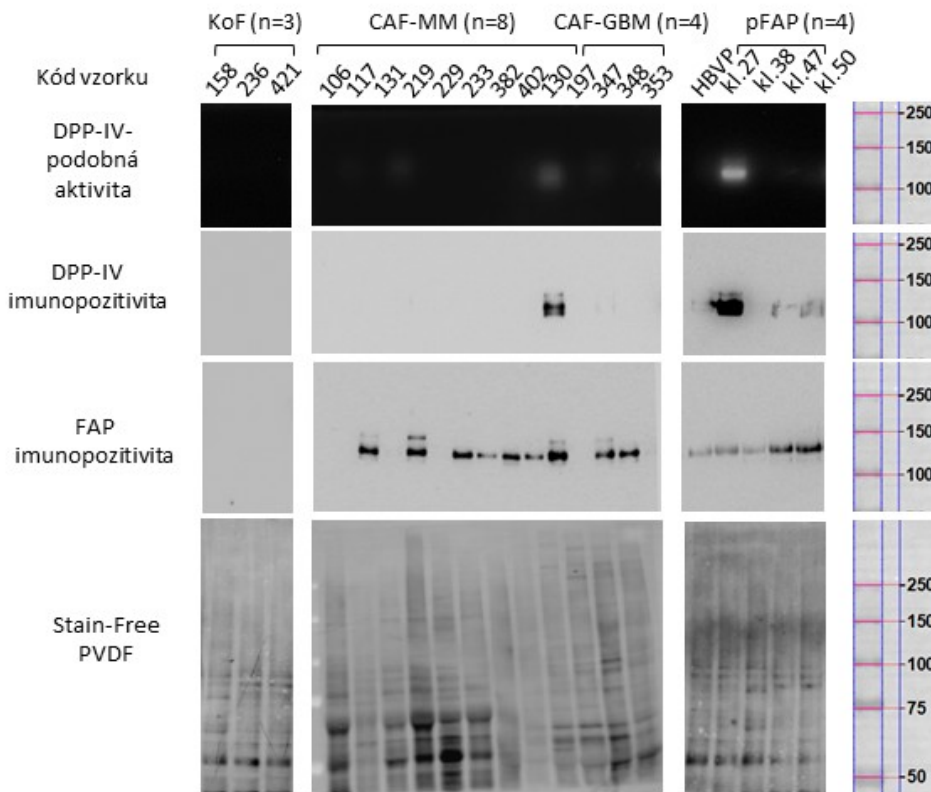
Obrázek 8. Koncentrace DPP-IV a FAP ve stromálních buňkách přítomných v tkáních GBM a mozkových metastáz a v nenádorové mozkové tkáni byly stanoveny metodou ELISA. KoF: mezenchymové kultury s charakteristikami fibroblastů odvozené z nenádorové mozkové tkáně, CAF-GBM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání GBM, CAF-MM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání mozkových metastáz, HBVP: primární pericytární buněčná kultura odvozená z nenádorové mozkové tkáně, pFAP: mezenchymové FAP⁺ kultury s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů odvozené z tkání GBM. Kruskal-Wallisův test, n.s.: bez statistické významnosti. Krabice: 25-75 % s označením mediánu, svorky: minimální a maximální hodnoty, trojúhelníky: zdrojové hodnoty, kolečka: odlehlé hodnoty.



DPP-IV byla v CAF-MM 219 a pFAP kl.27 přítomna ve dvou imunopozitivních, hydrolyticky aktivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí odpovídající MW 140 kDa. V ostatních kulturách stromálních buněk a v nenádorových buňkách KoF a HBVP nebyla DPP-IV detekovatelná (obrázek č. 9).

FAP byl v CAF-MM, CAF-GBM a pFAP přítomný v jedné až dvou imunopozitivních MW formách s elektroforetickou pohyblivostí odpovídající MW 120-140 kDa. V nenádorových buňkách KoF nebyla přítomnost FAP detekovatelná (obrázek č. 9).

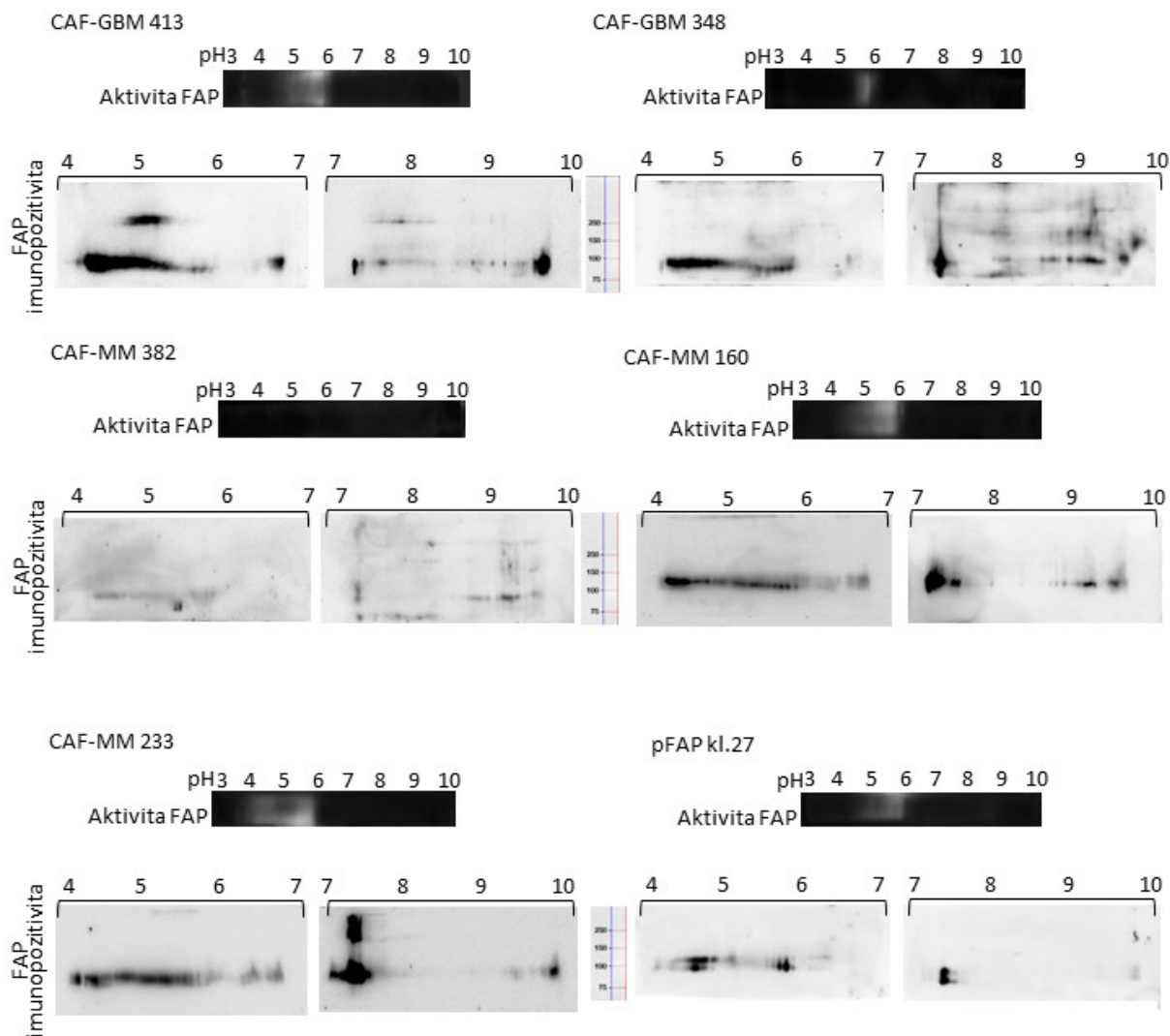
Obrázek 9. MW formy DPP-IV a FAP ve stromálních buňkách přítomných v tkáních GBM a mozkových metastáz a v nenádorových buňkách. DPP-IV-podobná aktivita byla detekována po elektroforetické separaci substrátem H-Gly-Pro-AMC. Imunopozitivní formy DPP-IV a FAP byly detekovány po 1D WB protilátkami antiDPP-IV E19, antiFAP D8. Signál DPP-IV a FAP byl normalizován na celkový protein ze Stain-Free PVDF membrány. KoF: mezenchymové kultury s charakteristikami fibroblastů odvozené z nenádorové mozkové tkáně, CAF-GBM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání GBM, CAF-MM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání mozkových metastáz, HBVP: primární pericytární buněčná kultura odvozená z nenádorové mozkové tkáně, pFAP: mezenchymové FAP⁺ kultury s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů odvozené z tkání GBM.



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

Ve stromálních buňkách CAF-MM, CAF-GBM a pFAP byly pozorovány dvě až tři imunopozitivní, hydrolyticky aktivní formy FAP s pI 5,5-6,0. Imunopozitivita FAP s pI 4,0-5,0 byla detekována v oblasti kyselého pH fokusovaného gelu. Ve stromálních buňkách byly přítomny i formy FAP s pI 7,0-8,0 a pI 9,0-9,5. Elektroforetická mobilita pI forem FAP odpovídala MW monomeru okolo 100 kDa (obrázek č. 10).

Obrázek 10. pI formy FAP ve stromálních buňkách přítomných v tkáních GBM a mozkových metastáz. Hydrolyticky aktivní pI formy byly detekovány po izoelektrické fokusaci FAP-specifickým substrátem NS604. Imunopozitivní pI formy FAP byly detekovány po 2D WB protilátkou antiFAP D8. CAF-GBM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání GBM, CAF-MM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání mozkových metastáz, pFAP: mezenchymové FAP⁺ kultury s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů odvozené z tkání GBM.

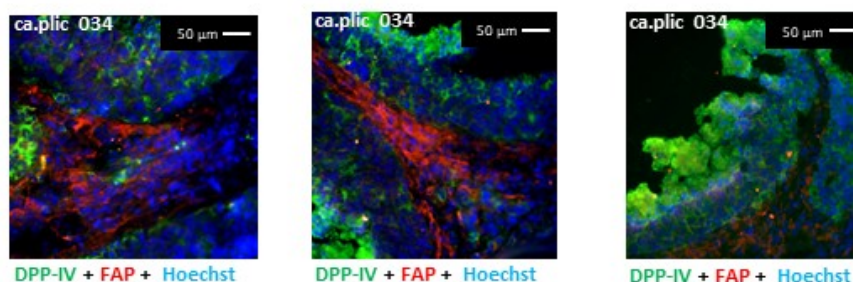


Tabulka 3. pl formy DPP-IV a FAP v gliomových a stromálních buňkách přítomných v tkáních GBM a mozkových metastáz. Imunopozitivní pl formy DPP-IV a FAP byly detekovány po 2D WB protilátkami antiDPP-IV E19 a antiFAP D8. CAF-GBM: mezenchymové buňky s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání GBM, CAF-MM: mezenchymové buňky s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání mozkových metastáz, pFAP: mezenchymové FAP⁺ buňky s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů odvozené z tkání GBM.

kód vzorku			imunopozitivní DPP-IV			imunopozitivní FAP			
			pI 4,0-5,0	pI 5,8	pI 8,0	pI 4,0-5,0	pI 5,8	pI 8,0	pI 9,0
transformované gliální buňky	gliomové linie	U118	-	+	-	+	+	-	-
		U138	-	+	-	+	+	-	-
		U87	-	+	-	+	+	-	-
stromální buňky přítomné v tkáních GBM a mozkových metastáz	CAF-MM	233	nebylo stanoveno			+	+	+	-
		382				-	+	-	+
		160				+	+	+	-
	CAF-GBM	413				+	+	+	+
		348				+	+	+	+
	pFAP	kl.27				+	+	+	-

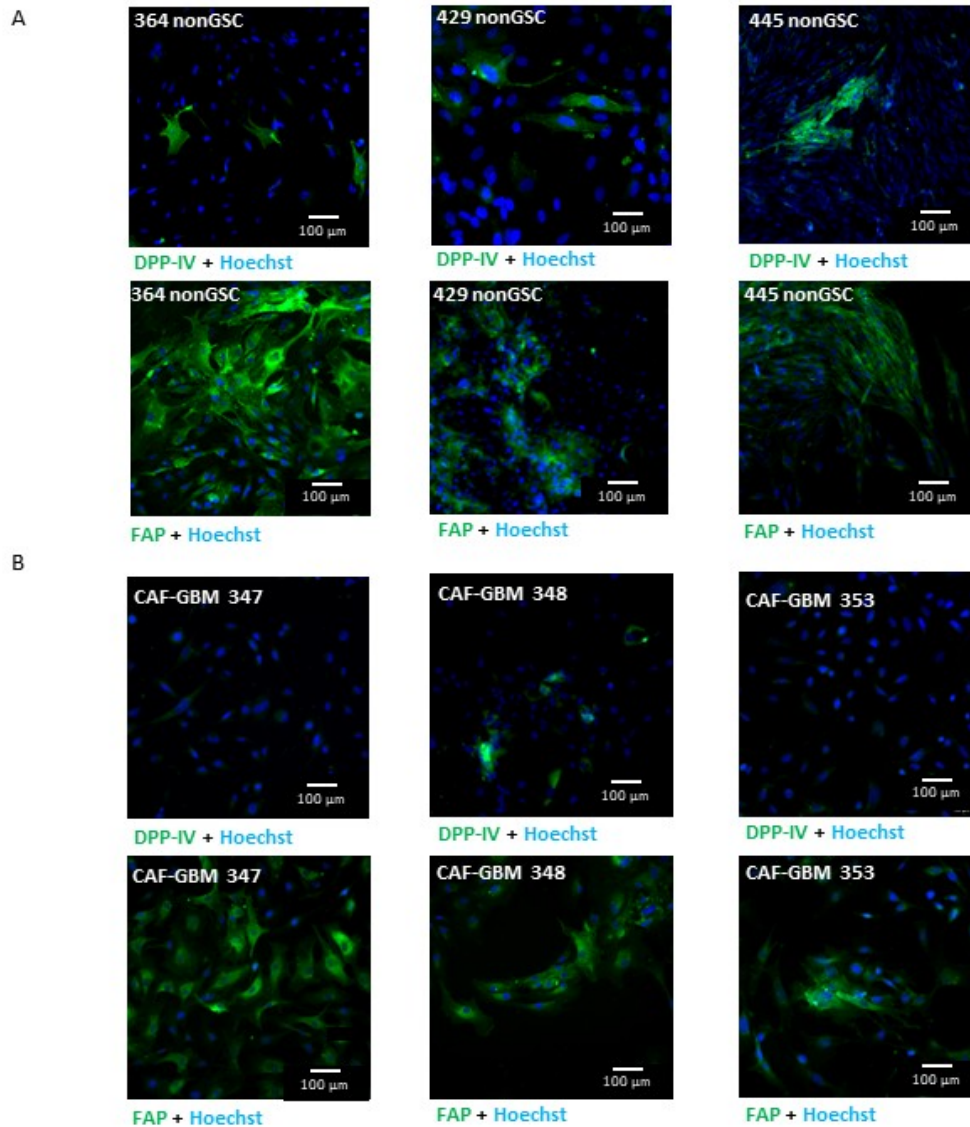
Distribuce DPP-IV a FAP v buněčných populacích přítomných v mikroprostředí mozkových metastáz byla hodnocena dvojitým barvením tkáňových řezů protilátkami antiDPP-IV MA261 a antiFAP D8. Zatímco DPP-IV byla přítomna především v transformovaných elementech, FAP byl přítomen především ve stromálních buňkách mozkových metastáz (obrázek č. 11).

Obrázek 11. Intratumorová heterogenita přítomnosti DPP-IV a FAP v mozkových metastázách byla vizualizována dvojitou sekvenční imunodetekcí protilátkami antiDPP-IV MA261 a antiFAP D8, antinuclei Hoechst. ca.plic: karcinom plic.



Přítomnost DPP-IV a FAP v gliomových nekmenových kulturách a stromálních CAF-GBM byla imunocytochemicky potvrzena protilátkami antiDPP-IV MA261 a antiFAP D8 (obrázek č. 12).

Obrázek 12. Distribuce DPP-IV a FAP v gliomových a stromálních buňkách přítomných v tkáních GBM a mozkových metastáz. Přítomnost DPP-IV a FAP v (A) nonGSC a (B) CAF-GBM byla detekována imunocytochemicky. K imunodetekci byly použity protilátky antiDPP-IV MA261 a antiFAP D8, antinuclei Hoechst. nonGSC: gliomové nekmenové kultury, CAF-GBM: mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání GBM.



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

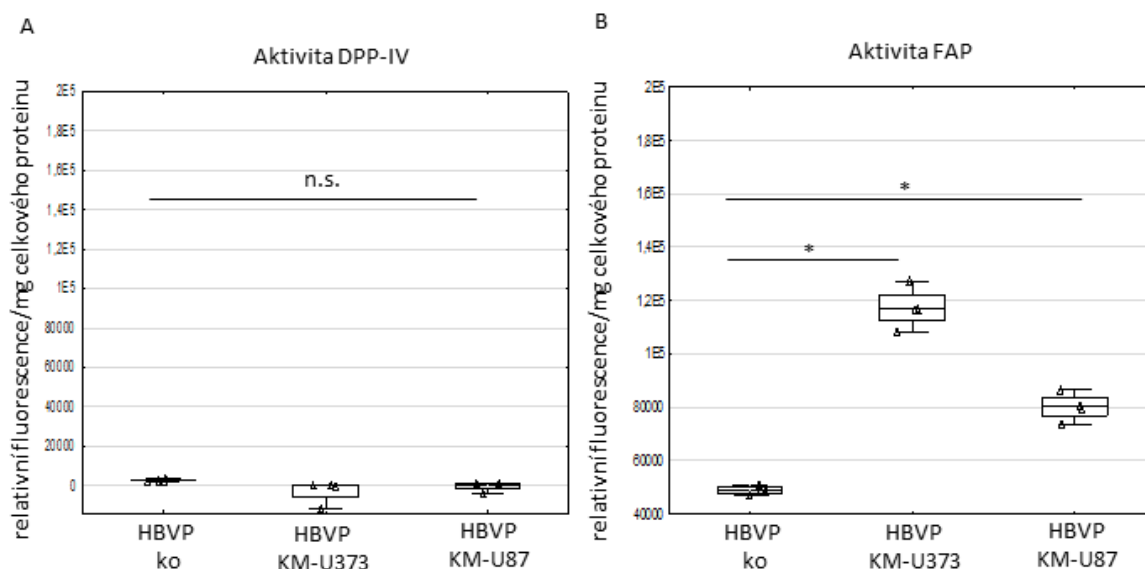
Naše výsledky prokázaly regulaci exprese FAP v různých typech buněk přítomných v mikroprostředí GBM účinkem TGF- β 1 (příloha č.3, Krepela et al., 2021). Pro přiblížení mechanismů regulace exprese DPP-IV a FAP v mikroprostředí GBM byly provedeny experimenty využívající expozici nenádorových pericytů HBVP médiím kondiciovaným

transformovanými gliálními buňkami a vice versa, přímou kokultivaci nenádorových buněk HBVP a gliomových buněk U373 a stimulaci gliomových a stromálních buněk přítomných v tkáních gliálních mozkových nádorů a mozkových metastáz rekombinantním TGF- β 1.

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

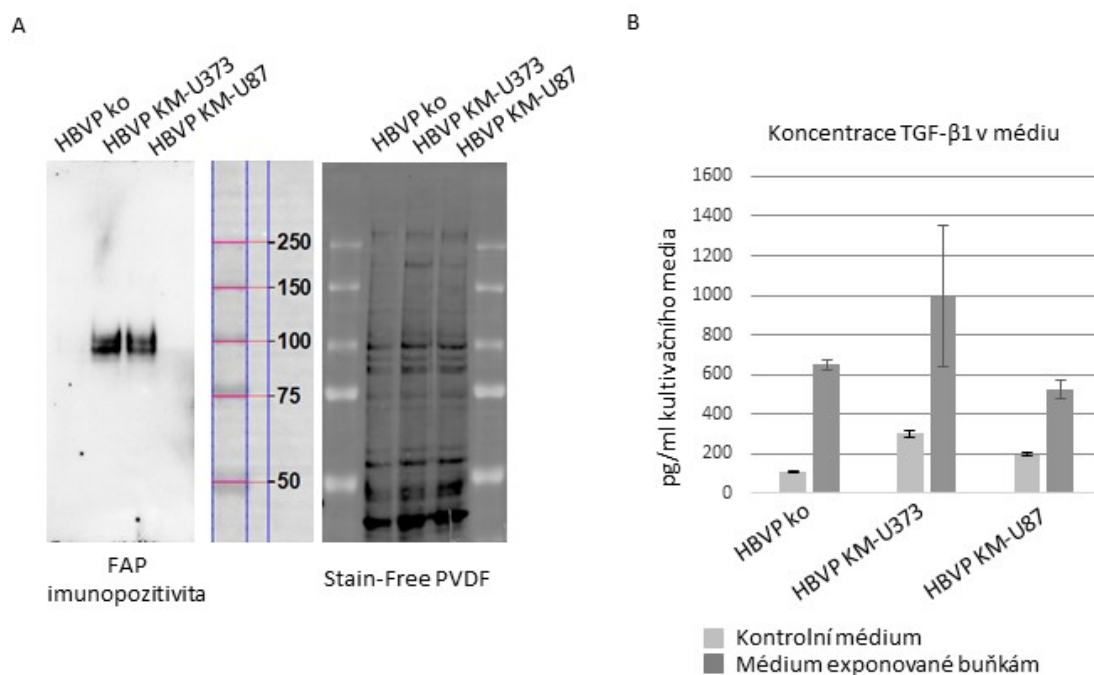
Enzymová aktivita DPP-IV se v HBVP exponovaných KM-U373 a KM-U87 statisticky významně nelišila od HBVP neexponovaných KM (obrázek č. 13A) a nebyla citlivá ke specifickému inhibitoru DPP-IV Sitagliptinu (data neuvedena). Enzymová aktivita FAP v nenádorových pericytech HBVP statisticky významně vzrostla po expozici KM-U373 a po expozici KM-U87 (obrázek č. 13B) a byla citlivá k inhibici FAP-specifickým inhibítorem DFAP (data neuvedena).

Obrázek 13. Vliv médií kondiciovaných gliomovými buňkami U373 a U87 na enzymovou aktivitu DPP-IV a FAP v nenádorových pericytech HBVP. Enzymové aktivity (A) DPP-IV a (B) FAP byly stanoveny biochemicky. KM-U87: média kondiciovaná gliomovými buňkami, KM-U373: média kondiciovaná gliomovými buňkami U373, HBVP: primární pericytární buněčná kultura odvozená z nenádorové mozkové tkáně, HBVP ko: buňky neexponované KM. Kruskal-Wallisův test, * $p < 0,05$, n.s.: bez statistické významnosti. Krabice, 25-75 % s označením mediánu, svorky: minimální a maximální hodnoty, trojúhelníky: zdrojové hodnoty.



V buňkách HBVP exponovaných KM-U373 nebo KM-U87 byly přítomny dvě imunopozitivní MW formy FAP s elektroforetickou pohyblivostí odpovídající MW 100 kDa (obrázek č. 14A). V kultivačních médiích HBVP buněk dochází k dalšímu zvýšení koncentrace TGF- β 1 (obrázek č. 14B).

Obrázek 14. Vliv médií kondiciovaných gliomovými buňkami U373 a U87 na expresi FAP v nenádorových pericytech HBVP. (A) Imunopozitivní MW formy FAP byly detekovány po 1D WB protilátkou antiFAP D8. (B) Koncentrace TGF- β 1 byla stanovena metodou ELISA. Data představují průměr ze tří biologických vzorků měřených v technických triplicátech \pm SEM. KM-U87: média kondiciovaná gliomovými buňkami, KM-U373: média kondiciovaná gliomovými buňkami U373, HBVP: primární pericytární buněčná kultura odvozená z nenádorové mozkové tkáně, HBVP ko: buňky neexponované KM.

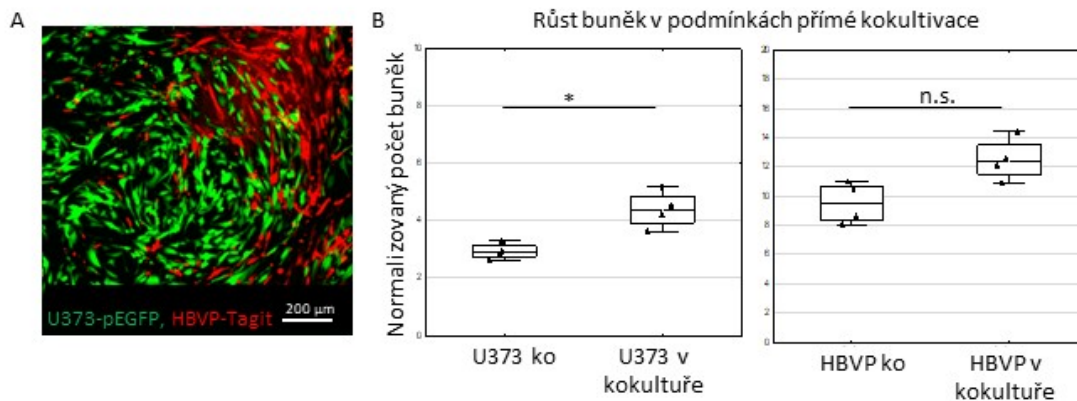


Expres a enzymová aktivita FAP a DPP-IV v gliomových buňkách U87 a U373 se po kultivaci v médiích kondiciovaných nenádorovými pericyty HBVP (KM-HBVP) statisticky významně neměnily (data neuvedena).

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

Pro analýzy byly jednotlivé populace separovány průtokovým cytometrem s třídícím buněk na U373-pEGFP s 79,9% čistotou a HBVP-Tagit s 87,6% čistotou. Oproti buňkám U373-pEGFP kultivovaným samostatně byl pozorován jejich statisticky významně rychlejší růst v kokultuře s HBVP-Tagit (obrázek č. 15B).

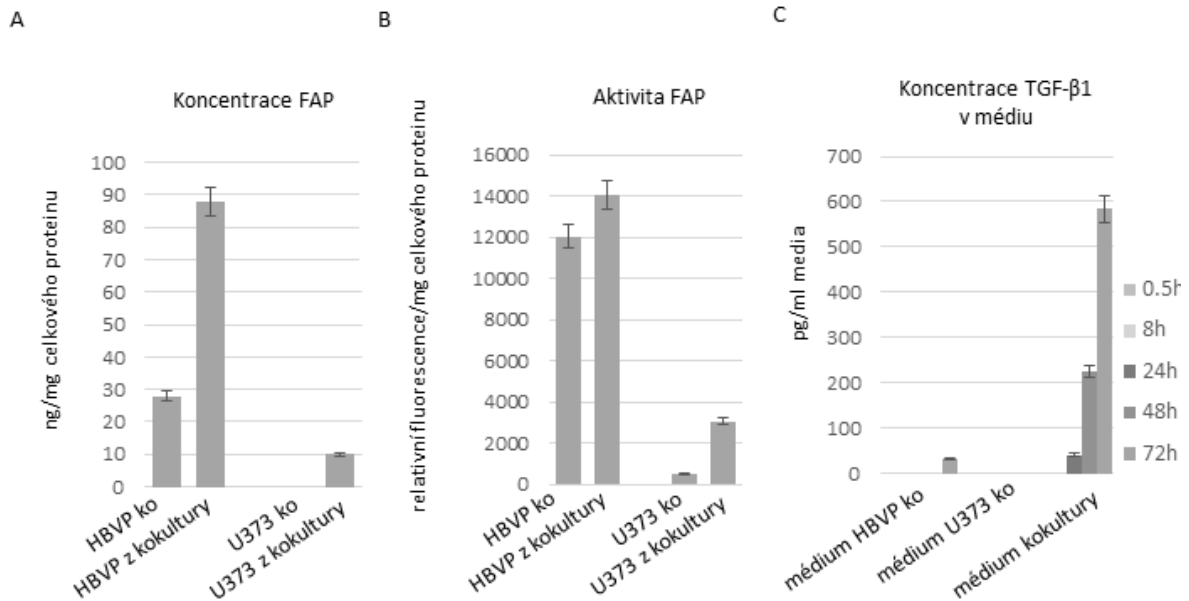
Obrázek 15. Růst gliomových buněk U373-pEGFP a nenádorových pericytů HBVP-Tagit v podmínkách přímé kokultivace. (A) Kokultura buněk U373-pEGFP a HBVP-Tagit. (B) Růst buněk U373-pEGFP a HBVP-Tagit v podmínkách kokultury. Mann-Whitneyův U test, * $p < 0,05$, n.s.: bez statistické významnosti. Krabice: 25-75 % s označením mediánu, svorky: minimální a maximální hodnoty, trojúhelníky: zdrojové hodnoty.



V podmínkách přímé kokultivace byla pozorována zvýšená aktivita a exprese FAP v nenádorových pericytech HBVP-Tagit i v gliomových buňkách. Koncentrace FAP v kokultivovaných HBVP-Tagit vzrostla 3,5x ve srovnání s koncentrací v HBVP-Tagit kultivovanými samostatně (obrázek č. 16A), enzymová aktivita FAP vzrostla 1,3x (obrázek č. 16B). Koncentrace FAP v kokultivovaných U373-pEGFP vzrostla 10x ve srovnání s koncentrací v U373-pEGFP kultivovanými samostatně (obrázek č. 16A), relativní hydrolytická aktivita FAP vzrostla 4,2x (obrázek č. 16B). Přítomnost FAP v médiu kokultury nebyla detekovatelná (data neuvedena).

V médiu kokultury dochází v čase ke zvýšení koncentrace TGF- β 1 (obrázek č. 16C). Inhibiční studie s použitím specifického inhibitoru DPP-IV neprokázaly interferenci enzymových aktivit DPP-IV a FAP (data neuvedena).

Obrázek 16. Vliv přímé kokultivace gliomových buněk U373-pEGFP a nenádorových pericytů HBVP-Tagit na expresi FAP. (A) Koncentrace FAP byla stanovena metodou ELISA. (B) Enzymová aktivita FAP byla stanovena biochemicky. (C) Koncentrace TGF-β1 byla stanovena metodou ELISA. Pokud není uvedeno jinak, data byla získána v 72. hodině od nasazení kokultury. ko: buňky kultivované samostatně. Data představují průměr ze dvou biologických vzorků měřených v technických triplikátech ±SEM.

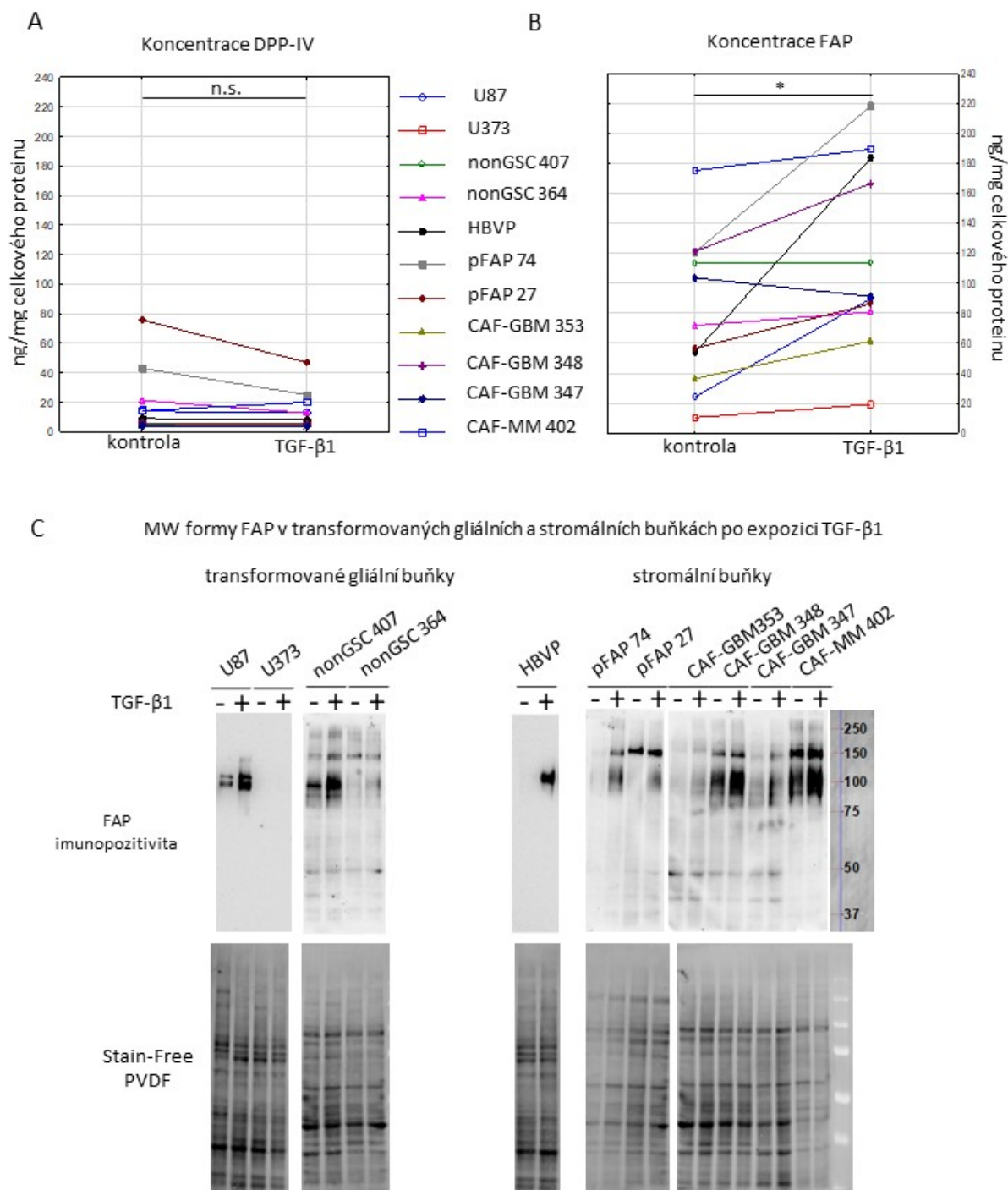


Vliv TGF-β1 na expresi DPP-IV a FAP v transformovaných gliálních a stromálních buňkách přítomných v GBM a mozkových metastázách

Pro expozici rekombinantnímu TGF-β1 byly použity gliomové buněčné linie, nonGSC kultury, nenádorové pericyty HBVP, mezenchymové FAP⁺ kultury s charakteristikami nádorově asociovaných pericytů pFAP a mezenchymové kultury s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů CAF-GBM a CAF-MM. Ve studovaných buňkách byl, na rozdíl od DPP-IV, pozorován statisticky významný nárůst koncentrace proteinu FAP vlivem TGF-β1 (obrázek č. 17A a B).

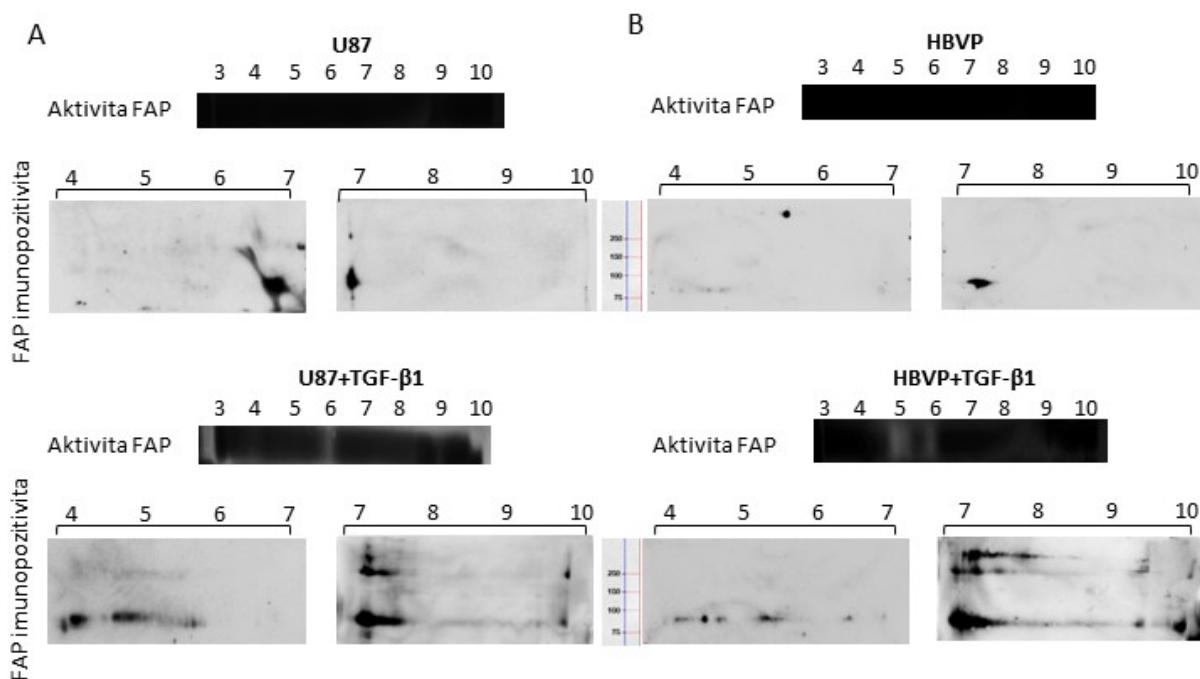
Dvě nebo tři imunopozitivní MW formy FAP byly, s výjimkou U373, přítomny ve všech testovaných buňkách. Elektroforetická pohyblivost dvou MW forem FAP odpovídala MW 100 kDa a jedné formy 150 kDa (obrázek č. 17C).

Obrázek 17. Vliv rekombinantního TGF- β 1 na expresi DPP-IV a FAP v gliomových a stromálních buňkách přítomných v tkáních mozkových nádorů. Koncentrace (A) DPP-IV a (B) FAP byly stanoveny metodou ELISA. (C) Imunopozitivní MW formy FAP byly detekovány protilátkou antiFAP D8. Signál FAP byl normalizován na celkový protein ze Stain-Free PVDF membrány. (+): vzorek exponovaný TGF- β 1, (-): vzorek bez expozice TGF- β 1. U87: gliomová buněčná linie, U373: gliomová buněčná linie, nonGSC: gliomové nekmenové kultury, HBVP: primární pericytární buněčná kultura odvozená z nenádorové mozkové tkáně, pFAP: mezenchymové FAP⁺ buňky odvozené z tkání GBM. CAF-GBM: mezenchymové buňky s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání GBM, CAF-MM: mezenchymové buňky s charakteristikami nádorově asociovaných fibroblastů odvozené z tkání mozkových metastáz. (A), (B) Wilcoxonův párový test, * $p < 0,01$, n.s.: bez statistické významnosti.



V gliomových buňkách U87 i v nenádorových pericytech vedla expozice TGF- β 1 k expresi hydrolyticky aktivní formy FAP s pI 5,0-6,0, nepřítomné v nestimulovaných buňkách. Imunopozitivní formy FAP s pI 5,0-6,0, pI 7,0-8,0 a pI 9,0-9,5 byly pozorovány po indukci TGF- β 1, ve srovnání s neexponovanými buňkami. Elektroforetická mobilita imunopozitivních pI forem FAP odpovídala MW 100 kDa (obrázek č. 18).

Obrázek 18. pI formy FAP v gliomových buňkách U87 a nenádorových pericytech HBVP exponovaných rekombinantnímu TGF- β 1. Hydrolyticky aktivní pI formy FAP byly detekovány substrátem NS604. Imunopozitivní pI formy FAP byly detekovány protilátkou antiFAP D8. (A) U87: bez přídavku TGF- β 1, U87 + TGF- β 1: s přídavkem TGF- β 1. (B) HBVP: bez přídavku TGF- β 1, HBVP + TGF- β 1: s přídavkem TGF- β 1. HBVP primární pericytární kultura odvozená z nenádorové mozkové tkáně, U87: gliomová buněčná linie.



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

Naše předchozí výsledky prokázaly významně vyšší hydrolytickou aktivitu DPP-IV, zejména její membránové frakce, koncentraci proteinu a relativní expresi transkriptu DPP-IV ve vysokostupňových gliomech oproti nenádorové tkáni mozku (příloha č.1, Matrasova et al., 2017; Stremenova et al., 2007). Vyšší koncentrace proteinu a relativní exprese transkriptu FAP byla pozorována v tkáních vysokostupňových gliomů oproti nenádorové tkáni mozku (příloha č.1, Matrasova et al., 2017; příloha č.2, Busek et al., 2016; Mentlein et al., 2011; Stremenova et al., 2007).

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

Naše výsledky prokazují významně vyšší koncentraci proteinu a vyšší enzymovou aktivitu DPP-IV v tkáních mozkových metastáz karcinomu GIT a plic ve srovnání s nenádorovou mozkovou tkání. Zvýšená exprese DPP-IV byla popsána v premaligních adenomech a kolorektálních karcinomech ve srovnání s normální tkání tlustého střeva (Larrinaga et al., 2015). Subpopulace nádorových kmenových buněk exprimujících DPP-IV byla přítomna v primárních kolorektálních karcinomech i v jejich jaterních metastázách. Tyto buňky jsou pravděpodobně důležité pro iniciaci, progresi a chemorezistenci nádoru (Pang et al., 2010). Přítomnost DPP-IV byla popsána v různých typech primárních karcinomů plic a v řadě z nich odvozených buněčných linií. Aktivita DPP-IV byla pozorována v buňkách lidského a myšího adenokarcinomu plic. Vildagliptin, inhibitor hydrolytické aktivity DPP-IV, potlačil růst nádorových buněk v *in vivo* modelech, pravděpodobně prostřednictvím makrofágy stimulované cytotoxicity NK buněk (Jang et al., 2019). Terapeuticky využívaná inhibice hydrolytické aktivity DPP-IV gliptiny u pacientů s diabetem mellitem druhého typu a konkomitantním pokročilým karcinomem plic zvýšila dobu jejich přežití (Bishnoi et al., 2019). Oproti tomu nízká hydrolytická aktivita DPP-IV byla pozorována v buňkách lidského adenokarcinomu a dlaždicobuněčného karcinomu plic ve srovnání s buňkami odvozenými z fetální plicní tkáně (Dimitrova et al., 2012). Snížená koncentrace proteinu a relativní exprese transkriptu DPP-IV byla rovněž přítomna v buňkách lidského nemalobuněčného

karcinomu plic (NSCLC) ve srovnání s epitelovými plicními buňkami (Wesley et al., 2004). Expresi DPP-IV jsme rovněž prokázali v tkáních mozkových metastáz karcinomu prsu, kde se ovšem signifikantně neodlišovala od nenádorové mozkové tkáně. Exprese DPP-IV v nenádorových epitelových buňkách karcinomu prsu pravděpodobně podporuje jejich nádorovou transformaci zprostředkovanou epidermálním růstovým faktorem (Choi et al., 2015). Další práce popisují epitelo-mezenchymovou tranzici (EMT) transformovaných buněk odvozených z karcinomu prsu a zvýšení jejich metastatického potenciálu v důsledku inhibice hydrolytické aktivity DPP-IV (S. Li et al., 2020; Yang et al., 2019). V tkáních mozkových metastáz melanomu jsme pozorovali expresi DPP-IV srovnatelnou s nenádorovou mozkovou tkání. Nízká exprese DPP-IV byla pozorována v transformovaných melanocytech a v tkáních melanomů (Morrison et al., 1993; Wesley et al., 1999).

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

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

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

Dvě až tři imunopozitivní, hydrolyticky aktivní MW formy DPP-IV s MW 140-160 kDa jsme pozorovali v tkáních vysokostupňových gliomů, zatímco DPP-IV s MW nad 200 kDa byla nalezena pouze v tkáních mozkových metastáz. Vznik vysokomolekulární formy DPP-IV s MW nad 200 kDa byl v literatuře popsán jako komplex DPP-IV s molekulou ADA v krevních mononukleárních buňkách (De Meester et al., 1992). Přítomnost komplexu DPP-IV s ADA je typická pro plazmatické membrány T buněk (Shibuya-Saruta et al., 1996), které jsou rovněž součástí nádorového mikroprostředí GBM. V tkáních GBM souvisí přítomnost CD4⁺ T lymfocytů s nepříznivou prognózou pacientů (Han et al., 2014). V bioptickém materiálu z tkání vysokostupňových gliomů, kde byla pozorována pouze jedna imunopozitivní MW forma DPP-IV, nebyla po elektroforetické separaci nalezena korespondující hydrolytická aktivita DPP-IV. V těchto bioptických vzorcích byla zjištěna velmi nízká aktivita DPP-IV i biochemicky, fluorescenční kontinuální metodou. De Meester pozorovala hydrolytickou aktivitu DPP IV pouze u jedné ze tří forem DPP-IV purifikovaných z mononukleárních buněk z periferní krve (De Meester et al., 1992). Hydrolytická aktivita DPP-IV byla pozorována u jedné ze čtyř forem DPP-IV izolovaných z lidské plazmy (Shibuya-Saruta et al., 1996). Absence enzymové aktivity jedné MW formy DPP-IV by mohla být způsobena citlivostí použité metody (Ludwig, 2005). Někteří autoři pozorovali sníženou hydrolytickou aktivitu DPP-IV v souvislosti s její hypersialylací (Mavropoulos et al., 2005; O'Mullan et al., 2017). V tkáních gliomů byla pozorována zvýšená relativní exprese transkriptu α 2,3-sialyltransferázy ve srovnání s nenádorovou mozkovou tkání. Změna sialylačního vzorce a přítomnost α 2,3- vázaných sialových kyselin byla pozorována v plazmatických membránách gliomových buněk a komponentách ECM (Yamamoto et al., 1997).

Imunopozitivita MW forem FAP byla detekována výhradně v DPP-IV pozitivních tkáních vysokostupňových gliomů a mozkových metastáz, což podporuje dříve popsanou koexpresi a hypotetizovanou koregulaci obou molekul v gliomových buňkách a tkáních (Balaziová et al., 2011; Stremenova et al., 2007). V tkáni vysokostupňových gliomů jsme našli pouze jednu molekulovou formu FAP s MW 140 kDa, zatímco v bioptickém materiálu mozkových metastáz byly pozorovány až tři MW formy FAP s MW 100 kDa, 150 kDa a 200 kDa. Podobně jako DPP-IV může i FAP nehydrolyticky interagovat s vazebnými partnery. Mueller pozoroval v transformovaných melanocytech komplex FAP s α 3 β 1 integrinem

(Mueller et al., 1999). V GBM souvisela exprese $\alpha 3\beta 1$ integrinu v endotelových buňkách se zvýšenou vaskularizací (Bae et al., 2022). Predikovaná molekulová hmotnost lidského monomeru FAP je dle aminokyselinové sekvence 87,7 kDa. V literatuře byl popsán monomer s MW v rozmezí 90-97 kDa (Gherzi et al., 2006; Goldstein et al., 1997; K. N. Lee et al., 2005; Mori et al., 2004; O'Brien & O'Connor, 2008).

Sacharidové složky na povrchu enzymů mohou ovlivňovat jejich afinitu k substrátu a kinetiku enzymových reakcí (Mitra et al., 2006). Glykosylace DPP-IV a částečně FAP je v literatuře dobře popsána, přestože její vliv na biologickou aktivitu obou molekul nejsou jednoznačné (Aertgeerts, Ye, Shi, et al., 2004; Kahne et al., 1996; Mavropoulos et al., 2005). Krystal lidské DPP-IV obsahuje devět predikovaných míst pro vazbu sacharidového řetězce a sedm z nich je mezidruhově konzervovaných (Aertgeerts, Ye, Shi, et al., 2004). Lidský FAP má pět predikovaných míst pro vazbu sacharidového řetězce (Aertgeerts et al., 2005). Příspěvek sacharidových složek v DPP-IV a FAP může dosahovat až 30% resp. 50% z celkové MW molekuly (Escribano & Imperial, 1989; Kawasaki et al., 2009). Z výsledků předkládané práce vyplývá, že kompletní deglykosylace DPP-IV a FAP v tkáních GBM ovlivnila elektroforetickou mobilitu pozorovaných forem ve srovnání s PNGázou F neexponovanými kontrolami. Stejně pozorování bylo popsáno pro PNGázou F deglykosylované DPP-IV a FAP z gliomových buněčných linií (příloha č.1, Matrasova et al., 2017). Enzymová aktivita DPP-IV nebyla účinkem PNGázy F ovlivněna. Aertgeerts uvádí, že přítomnost sacharidových složek v DPP-IV a FAP není nezbytná pro jejich enzymovou aktivitu, tvorbu dimeru nebo vazebné vlastnosti (Aertgeerts et al., 2004 a 2005). V řadě nádorů, včetně gliomů, byl pozorován pozměněný obsah glykoproteinů na kvalitativní i kvantitativní úrovni (Hakomori, 1989). Na základě našich výsledků předpokládáme, že spektrum mnohočetných forem DPP-IV a FAP v GBM primárně nevzniká v důsledku přítomnosti sacharidových struktur. Biologická funkce obou molekul by ovšem mohla být v mikroprostředí GBM glykosylací ovlivněna. Buněčná adheze je ovlivněna sacharidovými složkami membránových a secernovaných proteinů (Arnal-Estape & Nguyen, 2015; Ohtsubo & Marth, 2006). Terminálně vázané sialové kyseliny udávají glykoproteinům na povrchu buněčných membrán záporný náboj, čímž mohou snižovat adhezivitu a stimulovat invazivní potenciál transformovaných buněk (Passaniti & Hart, 1988). BEHAB/brevican je proteoglykan ECM specifický pro CNS. Jeho exprese je zvýšená v gliomech a jeho proteolytická degradace může zvyšovat invazivitu gliomu (Gary et al., 1998). Viapiano popsal dvě formy BEHAB/brevicanu s odlišným obsahem sialových kyselin ve vysoko- a nízkostupňových gliomech (Viapiano et al., 2005). Brevican je substrátem FAP, který hraje

roli v remodelaci ECM (Mentlein et al., 2011). Námi popsané formy FAP s pI v alkalické oblasti přítomné v tkáních GBM a mozkových metastáz by svým kladným nábojem mohly stabilizovat interakci se sialylovaným brevicanem a podporovat hydrolytický účinek FAP.

Podobně jako v tkáních vysokostupňových gliomů a mozkových metastáz jsou v gliomových liniích a gliomových nekmenových kulturách (nonGSC) přítomné dvě imunopozitivní, hydrolyticky aktivní MW formy DPP-IV. V gliomových buňkách jsme nenalezli MW formy DPP-IV nad 200 kDa, což může být způsobeno omezenou dostupností molekulárních vazebných partnerů v kultivačních podmínkách *in vitro*. Na rozdíl od spektra MW forem DPP-IV pozorovaného v tkáních GBM je v kultivovaných gliomových buňkách přítomná jedna MW forma DPP-IV s odpovídající hydrolytickou aktivitou. V tkáních GBM a mozkových metastáz jsme po izoelektrické fokusaci pozorovali několik pI forem nesoucích DPP-IV-podobnou aktivitu s pI 4,0-5,0, pI 5,8 a pI 8,0. Tři imunopozitivní formy FAP s pI 7,0-8,5 jsme našli v tkáních GBM (příloha č.1, Matrasova et al., 2017) a v tkáních mozkových metastáz karcinomu plic a GIT (připravováno k publikaci). Zdrojem molekulových forem s pI 5,8, nesoucích DPP-IV-podobnou aktivitu, popsaných v tkáních GBM a mozkových metastáz mohou být gliomové buňky, v jejichž modelových liniích jsme pozorovali dvě až tři imunopozitivní, hydrolyticky aktivní formy DPP-IV s pI 5,8-6,0 (příloha č.1, Matrasova et al., 2017). Tyto pI formy DPP-IV jsou nejbližší predikovanému pI DPP-IV 5,67. V gliomových buňkách jsme imunodetekcí nenalezli molekulové formy DPP-IV s pI 4,0-5,0. Přítomnost molekulových forem DPP-IV s pI 4,4 byla popsána v krevní plazmě pacientů s diabetem mellitem druhého typu a patrně souvisela s vyšší aktivitou DPP-IV a nižším obsahem sialových kyselin ve srovnání s DPP-IV s pI 4,25 z krevní plazmy zdravých jedinců (O'Mullan et al., 2017). Několik k neuraminidáze citlivých pI forem DPP-IV s pI 3,0-4,0 bylo izolováno rovněž z lidské placenty (Puschel et al., 1982). Kahne se spolupracovníky pozorovali jedenáct imunoreaktivních pI forem DPP-IV v mitogeny aktivovaných lymfocytech v rozmezí pI 3,5-5,9, z nichž pět mělo enzymovou aktivitu DPP-IV a pouze dvě pI formy DPP-IV s pI 3,5 a 3,9 obsahovaly sialové kyseliny a byly citlivé k účinkům neuraminidázy. Ostatní formy DPP-IV nebyly citlivé k účinku neuraminidázy ani jiných glykosidáz (Kahne et al., 1996). Z literárních dat je patrné, že profil aktivních pI forem DPP-IV je rozmanitý a hypersialylace snižuje aktivitu DPP-IV. Na rozdíl od tkání GBM, jsme imunopozitivitu DPP-IV s pI 8,0 nedetkovali v žádných studovaných buněčných modelech a nebyla popsána ani v literatuře. Předpokládáme, že její přítomnost v GBM může být důsledkem lokálně specifických regulací posttranslačních úprav.

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

Jako modelový systém pro studium humorálních komunikací v nádorovém mikroprostředí jsou obecně užívány experimenty s využitím kondiciovaných médií (F. X. Chen et al., 2009; Tan et al., 2018; Zhang et al., 2020). Naše experimenty prokázaly zvýšení exprese FAP provázené zvýšením sekrece TGF- β 1 do kultivačního média v transformovaných gliálních buňkách i v nenádorových pericytech po expozici mediím kondiciovaných netransformovanými, resp. transformovanými buněčnými populacemi. Experimenty s využitím přímých kokultivací buněk jsou obecně užívány jako modelový systém pro studium komplexních, včetně kontaktních, interakcí v nádorovém mikroprostředí. Mezi typické důsledky těchto interakcí patří přechod buňky z epitelového do mezenchymového fenotypu (EMT) nebo diferenciaci do mezenchymových kmenových buněk (Bhattacharya et al., 2012). V podmínkách přímé kokultivace transformovaných gliálních buněk s nenádorovými pericyty byla našimi experimenty potvrzena zvýšená koncentrace FAP v obou populacích, za dalšího zvýšení TGF- β 1 v jejich kultivačním médiu. Expozice transformovaných gliálních buněk a

nenádorových pericytů rekombinantnímu TGF- β 1 vedla k expresi molekulových pI forem FAP s pI 7,0-8,0 a pI 9,0-9,5, námi pozorovaných v komplexním bioptickém materiálu z tkání GBM (příloha č.1, Matrasova et al., 2017) a z tkání mozkových metastáz karcinomu plic a GIT (připravováno k publikaci). Tato pozorování nasvědčují významu kontextu nádorového mikroprostředí pro modifikaci expresního vzorce molekulových forem FAP v tkáních GBM a mozkových metastáz.

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

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

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

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

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

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala kolegům z Laboratoře biologie nádorové buňky za vytvoření příjemného pracovního a lidského prostředí, ve kterém jsem mohla pracovat a kterého jsem mohla být součástí.

Velký dík patří mému školiteli Prof. MUDr. Aleksimu Šedovi, DrSc. za vedení mé práce, cenné rady a trpělivost. Díky patří mé milé Květě Vlašicové, která mi pomohla realizovat kokultivační experimenty a Mgr. Nikole Ternerové za provedení průtokové cytometrie. Dál bych chtěla poděkovat MUDr. Evě Balážiové, Ph.D., MSc. Rosanně Matieu-Sanz, Ph.D. a MUDr. Barboře Výmolové za odvození primárních buněčných kultur a jejich imunocytochemickou analýzu.

Tato práce vznikla za podpory Grantové Agentury Univerzity Karlovy (GAUK, č. projektu 671612) a Národního ústavu pro výzkum rakoviny (NÚVR, projekt Exceles LX22NPO5102).

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abbott, C. A., Baker, E., Sutherland, G. R., & McCaughan, G. W. (1994). Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. *Immunogenetics*, *40*(5), 331-338.
- Abbott, C. A., Yu, D. M., Woollatt, E., Sutherland, G. R., McCaughan, G. W., & Gorrell, M. D. (2000). Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *Eur J Biochem*, *267*(20), 6140-6150.
- Aertgeerts, K., Levin, I., Shi, L., Snell, G. P., Jennings, A., Prasad, G. S., Zhang, Y., Kraus, M. L., Salakian, S., Sridhar, V., Wijnands, R., & Tennant, M. G. (2005). Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha. *J Biol Chem*, *280*(20), 19441-19444.
- Aertgeerts, K., Ye, S., Shi, L., Prasad, S. G., Witmer, D., Chi, E., Sang, B. C., Wijnands, R. A., Webb, D. R., & Swanson, R. V. (2004). N-linked glycosylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26): effects on enzyme activity, homodimer formation, and adenosine deaminase binding. *Protein Sci*, *13*(1), 145-154.
- Aertgeerts, K., Ye, S., Tennant, M. G., Kraus, M. L., Rogers, J., Sang, B. C., Skene, R. J., Webb, D. R., & Prasad, G. S. (2004). Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein Sci*, *13*(2), 412-421.
- Ahluwalia, A., De Felipe, C., O'Brien, J., Hunt, S. P., & Perretti, M. (1998). Impaired IL-1beta-induced neutrophil accumulation in tachykinin NK1 receptor knockout mice. *Br J Pharmacol*, *124*(6), 1013-1015.
- Ajami, K., Abbott, C. A., McCaughan, G. W., & Gorrell, M. D. (2004). Dipeptidyl peptidase 9 has two forms, a broad tissue distribution, cytoplasmic localization and DPIV-like peptidase activity. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, *1679*(1), 18-28.
- Ajami, K., Abbott, C. A., Obradovic, M., Gysbers, V., Kahne, T., McCaughan, G. W., & Gorrell, M. D. (2003). Structural requirements for catalysis, expression, and dimerization in the CD26/DPIV gene family. *Biochemistry*, *42*(3), 694-701.
- Angevin, E., Isambert, N., Trillet-Lenoir, V., You, B., Alexandre, J., Zalcmann, G., Vielh, P., Farace, F., Valleix, F., Podoll, T., Kuramochi, Y., Miyashita, I., Hosono, O., Dang, N. H., Ohnuma, K., Yamada, T., Kaneko, Y., & Morimoto, C. (2017). First-in-human phase 1 of YS110, a monoclonal antibody directed against CD26 in advanced CD26-expressing cancers. *British Journal of Cancer*, *116*(9), 1126-1134.
- Araki, H., Li, Y., Yamamoto, Y., Haneda, M., Nishi, K., Kikkawa, R., & Ohkubo, I. (2001). Purification, molecular cloning, and immunohistochemical localization of dipeptidyl peptidase II from the rat kidney and its identity with quiescent cell proline dipeptidase. *Journal of Biochemistry*, *129*(2), 279-288.
- Armulik, A., Genove, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, *21*(2), 193-215.
- Arnal-Estape, A., & Nguyen, D. X. (2015). Sweets for a bitter end: lung cancer cell-surface protein glycosylation mediates metastatic colonization. *Cancer Discov*, *5*(2), 109-111.
- Arscott, W. T., LaBauve, A. E., May, V., & Wesley, U. V. (2009). Suppression of neuroblastoma growth by dipeptidyl peptidase IV: relevance of chemokine regulation and caspase activation. *Oncogene*, *28*(4), 479-491.
- Artym, V. V., Kindzelskii, A. L., Chen, W. T., & Petty, H. R. (2002). Molecular proximity of seprase and the urokinase-type plasminogen activator receptor on malignant melanoma cell membranes: dependence on beta1 integrins and the cytoskeleton. *Carcinogenesis*, *23*(10), 1593-1601.
- Augsten, M. (2014). Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol*, *4*, 62.
- Aytac, U., & Dang, N. H. (2004). CD26/dipeptidyl peptidase IV: a regulator of immune function and a potential molecular target for therapy. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, *4*(1), 11-18.
- Bae, E., Huang, P., Muller-Greven, G., Hambardzumyan, D., Sloan, A. E., Nowacki, A. S., Marko, N., Carlin, C. R., & Gladson, C. L. (2022). Integrin alpha3beta1 promotes vessel formation of glioblastoma-associated endothelial cells through calcium-mediated macropinocytosis and lysosomal exocytosis. *Nat Commun*, *13*(1), 4268.
- Balaziová, E., Busek, P., Stremenová, J., Sromová, L., Krepela, E., Lízová, L., & Sedo, A. (2011). Coupled expression of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein-alpha in transformed astrocytic cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *354*(1-2), 283-289.
- Balaziová, E., Vymola, P., Hrabal, P., Mateu, R., Zubal, M., Tomas, R., Netuka, D., Kramar, F., Zemanová, Z., Svobodová, K., Brabec, M., Sedo, A., & Busek, P. (2021). Fibroblast Activation Protein Expressing Mesenchymal Cells Promote Glioblastoma Angiogenesis. *Cancers*, *13*(13).

- Bauvois, B., Djavaheri-Mergny, M., Rouillard, D., Dumont, J., & Wietzerbin, J. (2000). Regulation of CD26/DPPIV gene expression by interferons and retinoic acid in tumor B cells. *Oncogene*, *19*(2), 265-272.
- Beckenkamp, A., Davies, S., Willig, J. B., & Buffon, A. (2016). DPPIV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy? *Tumour Biol*, *37*(6), 7059-7073.
- Bernard, A. M., Mattei, M. G., Pierres, M., & Marguet, D. (1994). Structure of the mouse dipeptidyl peptidase IV (CD26) gene. *Biochemistry*, *33*(50), 15204-15214.
- Bhattacharya, S. D., Mi, Z., Talbot, L. J., Guo, H., & Kuo, P. C. (2012). Human mesenchymal stem cell and epithelial hepatic carcinoma cell lines in admixture: concurrent stimulation of cancer-associated fibroblasts and epithelial-to-mesenchymal transition markers. *Surgery*, *152*(3), 449-454.
- Bishnoi, R., Hong, Y. R., Shah, C., Ali, A., Skelton, W. P. t., Huo, J., Dang, N. H., & Dang, L. H. (2019). Dipeptidyl peptidase 4 inhibitors as novel agents in improving survival in diabetic patients with colorectal cancer and lung cancer: A Surveillance Epidemiology and Endpoint Research Medicare study. *Cancer Med*, *8*(8), 3918-3927.
- Bjelke, J. R., Christensen, J., Nielsen, P. F., Branner, S., Kanstrup, A. B., Wagtmann, N., & Rasmussen, H. B. (2006). Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. *Biochemical Journal*, *396*, 391-399.
- Blanco-Prieto, S., Vazquez-Iglesias, L., Rodriguez-Girondo, M., Barcia-Castro, L., Fernandez-Villar, A., Botana-Rial, M. I., Rodriguez-Berrocal, F. J., & de la Cadena, M. P. (2015). Serum Calprotectin, CD26 and EGF to Establish a Panel for the Diagnosis of Lung Cancer. *PLoS One*, *10*(5).
- Boccardi, V., Marano, L., Rossetti, R. R., Rizzo, M. R., di Martino, N., & Paolisso, G. (2015). Serum CD26 levels in patients with gastric cancer: a novel potential diagnostic marker. *BMC Cancer*, *15*, 703.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *72*, 248-254.
- Brockway, W. J., & Castellino, F. J. (1972). Measurement of the binding of antifibrinolytic amino acids to various plasminogens. *Arch Biochem Biophys*, *151*(1), 194-199.
- Brundl, E., Proescholdt, M., Schodel, P., Bele, S., Hohne, J., Zeman, F., Stoerr, E. M., Brawanski, A., & Schebesch, K. M. (2018). Excessive release of endogenous neuropeptide Y into cerebrospinal fluid after treatment of spontaneous subarachnoid haemorrhage and its possible impact on self-reported neuropsychological performance - results of a prospective clinical pilot study on good-grade patients. *Neurological Research*, *40*(12), 1001-1013.
- Busek, P., Balaziová, E., Matrasová, I., Hilser, M., Tomas, R., Syruček, M., Zemanová, Z., Krepela, E., Belacek, J., & Sedo, A. (2016). Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. *Tumour Biol*, *37*(10), 13961-13971.
- Busek, P., Duke-Cohan, J. S., & Sedo, A. (2022). Does DPP-IV Inhibition Offer New Avenues for Therapeutic Intervention in Malignant Disease? *Cancers*, *14*(9).
- Busek, P., Mateu, R., Zubal, M., Kotackova, L., & Sedo, A. (2018). Targeting fibroblast activation protein in cancer - Prospects and caveats. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, *23*, 1933-1968.
- Busek, P., & Sedo, A. (2013). Dipeptidyl Peptidase-IV and Related Proteases in Brain Tumors. In *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications*.
- Busek, P., Stremenova, J., Krepela, E., & Sedo, A. (2008). Modulation of substance P signaling by dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity in human glioma cell lines. *Physiological Research*, *57*(3), 443-449.
- Busek, P., Stremenova, J., & Sedo, A. (2008). Dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity bearing molecules in human brain tumors - good or evil? *Frontiers in Bioscience-Landmark*, *13*, 2319-2326.
- Busek, P., Stremenova, J., Sromova, L., Hilser, M., Balaziová, E., Kosek, D., Trylcova, J., Strnad, H., Krepela, E., & Sedo, A. (2012). Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *44*(5), 738-747.
- Cao, Y., Liu, X., Lu, W., Chen, Y., Wu, X., Li, M., Wang, X. A., Zhang, F., Jiang, L., Zhang, Y., Hu, Y., Xiang, S., Shu, Y., Bao, R., Li, H., Wu, W., Weng, H., Yen, Y., & Liu, Y. (2015). Fibronectin promotes cell proliferation and invasion through mTOR signaling pathway activation in gallbladder cancer. *Cancer Lett*, *360*(2), 141-150.
- Cordero, O. J., Salgado, F. J., Vinuela, J. E., & Nogueira, M. (1997). Interleukin-12 enhances CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV function on human activated lymphocytes. *Immunobiology*, *197*(5), 522-533.
- Dang, N. H., & Morimoto, C. (2002). CD26: an expanding role in immune regulation and cancer. *Histol Histopathol*, *17*(4), 1213-1226.
- Danilov, A. V., Danilova, O. V., Brown, J. R., Rabinowitz, A., Klein, A. K., & Huber, B. T. (2010). Dipeptidyl peptidase 2 apoptosis assay determines the B-cell activation stage and predicts prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol*, *38*(12), 1167-1177.

- De Chiara, L., Rodriguez-Pineiro, A. M., Cordero, O. J., Rodriguez-Berrocal, F. J., Ayude, D., Rivas, H., Fj, & de la Cadena, M. P. (2009). Soluble CD26 levels and its association to epidemiologic parameters in a sample population. *Dis Markers*, 27(6), 311-316.
- De Chiara, L., Rodriguez-Pineiro, A. M., Cordero, O. J., Vazquez-Tunas, L., Ayude, D., Rodriguez-Berrocal, F. J., & de la Cadena, M. P. (2014). Postoperative Serum Levels of sCD26 for Surveillance in Colorectal Cancer Patients. *PLoS One*, 9(9).
- De Meester, I., Vanham, G., Kestens, L., Vanhoof, G., Bosmans, E., Gigase, P., & Scharpe, S. (1994). Binding of adenosine deaminase to the lymphocyte surface via CD26. *Eur J Immunol*, 24(3), 566-570.
- De Meester, I., Vanhoof, G., Hendriks, D., Demuth, H. U., Yaron, A., & Scharpe, S. (1992). Characterization of dipeptidyl peptidase IV (CD26) from human lymphocytes. *Clinica Chimica Acta*, 210(1-2), 23-34.
- Dewan, M. Z., Ahmed, S., Iwasaki, Y., Ohba, K., Toi, M., & Yamamoto, N. (2006). Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(6), 273-276.
- Doheny, D., Manore, S. G., Wong, G. L., & Lo, H. W. (2020). Hedgehog Signaling and Truncated GLI1 in Cancer. *Cells*, 9(9).
- Dong, R. P., & Morimoto, C. (1996). Role of CD26 for CD4 memory T cell function and activation. *Hum Cell*, 9(3), 153-162.
- Dore-Duffy, P., Katychev, A., Wang, X., & Van Buren, E. (2006). CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(5), 613-624.
- Dunshee, D. R., Bainbridge, T. W., Kljavin, N. M., Zavala-Solorio, J., Schroeder, A. C., Chan, R., Corpuz, R., Wong, M., Zhou, W., Deshmukh, G., Ly, J., Sutherlin, D. P., Ernst, J. A., & Sonoda, J. (2016). Fibroblast Activation Protein Cleaves and Inactivates Fibroblast Growth Factor 21. *J Biol Chem*, 291(11), 5986-5996.
- Durham, J. T., Surks, H. K., Dulmovits, B. M., & Herman, I. M. (2014). Pericyte contractility controls endothelial cell cycle progression and sprouting: insights into angiogenic switch mechanics. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307(9), C878-892.
- Durinx, C., Lambeir, A. M., Bosmans, E., Falmagne, J. B., Berghmans, R., Haemers, A., Scharpe, S., & De Meester, I. (2000). Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem*, 267(17), 5608-5613.
- Eatemadi, A., Aiyelabegan, H. T., Negahdari, B., Mazlomi, M. A., Daraee, H., Daraee, N., Eatemadi, R., & Sadroddiny, E. (2017). Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment. *Biomed Pharmacother*, 86, 221-231.
- Eichler, A. F., Chung, E., Kodack, D. P., Loeffler, J. S., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2011). The biology of brain metastases-translation to new therapies. *Nat Rev Clin Oncol*, 8(6), 344-356.
- Eisenhauer, D. A., & McDonald, J. K. (1986). A novel dipeptidyl peptidase II from the porcine ovary. Purification and characterization of a lysosomal serine protease showing enhanced specificity for prolyl bonds. *J Biol Chem*, 261(19), 8859-8865.
- Elmansi, A. M., Awad, M. E., Eisa, N. H., Kondrikov, D., Hussein, K. A., Aguilar-Perez, A., Herberg, S., Periyasamy-Thandavan, S., Fulzele, S., Hamrick, M. W., McGee-Lawrence, M. E., Isales, C. M., Volkman, B. F., & Hill, W. D. (2019). What doesn't kill you makes you stranger: Dipeptidyl peptidase-4 (CD26) proteolysis differentially modulates the activity of many peptide hormones and cytokines generating novel cryptic bioactive ligands. *Pharmacol Ther*, 198, 90-108.
- Engel, M., Hoffmann, T., Wagner, L., Wermann, M., Heiser, U., Kiefersauer, R., Huber, R., Bode, W., Demuth, H. U., & Brandstetter, H. (2003). The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5063-5068.
- Escribano, M. J., & Imperial, S. (1989). Purification and Molecular Characterization of FAP, a Feto-acinar Protein Associated with the Differentiation of Human Pancreas. *Journal of Biological Chemistry*, 264(36), 21865-21871.
- Eva, C., Serra, M., Mele, P., Panzica, G., & Oberto, A. (2006). Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. *Front Neuroendocrinol*, 27(3), 308-339.
- Fan, H., Yan, S., Stehling, S., Marguet, D., Schuppaw, D., & Reutter, W. (2003). Dipeptidyl peptidase IV/CD26 in T cell activation, cytokine secretion and immunoglobulin production. *Dipeptidyl Aminopeptidases: Basic Science and Clinical Applications*, 524, 165-174.
- Farias, C. B., Lima, R. C., Lima, L. O., Flores, D. G., Meurer, L., Brunetto, A. L., Schwartzmann, G., & Roesler, R. (2008). Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology*, 75(1-2), 27-31.
- Ferraroni, J. J., & Hayes, J. (1979). Drug-resistant falciparum malaria among the Mayongong Indians in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*, 28(5), 909-911.
- Fitzgerald, A. A., & Weiner, L. M. (2020). The role of fibroblast activation protein in health and malignancy. *Cancer Metastasis Rev*, 39(3), 783-803.

- Franke, F. E., Von Georgi, R., Zygmunt, M., & Munstedt, K. (2003). Association between fibronectin expression and prognosis in ovarian carcinoma. *Anticancer Res*, 23(5b), 4261-4267.
- Frerker, N., Wagner, L., Wolf, R., Heiser, U., Hoffmann, T., Rahfeld, J. U., Schade, J., Karl, T., Naim, H. Y., Alfalah, M., Demuth, H. U., & von Horsten, S. (2007). Neuropeptide Y (NPY) cleaving enzymes: structural and functional homologues of dipeptidyl peptidase 4. *Peptides*, 28(2), 257-268.
- Frohman, L. A., Downs, T. R., Williams, T. C., Heimer, E. P., Pan, Y. C., & Felix, A. M. (1986). Rapid enzymatic degradation of growth hormone-releasing hormone by plasma in vitro and in vivo to a biologically inactive product cleaved at the NH₂ terminus. *J Clin Invest*, 78(4), 906-913.
- Fujimoto, N., Ohnuma, K., Aoe, K., Hosono, O., Yamada, T., Kishimoto, T., & Morimoto, C. (2014). Clinical significance of soluble CD26 in malignant pleural mesothelioma. *PLoS One*, 9(12), e115647.
- Fukasawa, K. M., Fukasawa, K., Sahara, N., Harada, M., Kondo, Y., & Nagatsu, I. (1981). Immunohistochemical localization of dipeptidyl aminopeptidase IV in rat kidney, liver, and salivary glands. *J Histochem Cytochem*, 29(3), 337-343.
- Gallimore, P. H., McDougall, J. K., & Chen, L. B. (1977). In vitro traits of adenovirus-transformed cell lines and their relevance to tumorigenicity in nude mice. *Cell*, 10(4), 669-678.
- Gary, S. C., Kelly, G. M., & Hockfield, S. (1998). BEHAB/brevican: a brain-specific lectican implicated in gliomas and glial cell motility. *Curr Opin Neurobiol*, 8(5), 576-581.
- Geevarghese, A., & Herman, I. M. (2014). Pericyte-endothelial crosstalk: implications and opportunities for advanced cellular therapies. *Transl Res*, 163(4), 296-306.
- Ghadge, S. K., Muhlstedt, S., Ozcelik, C., & Bader, M. (2011). SDF-1 alpha as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacology & Therapeutics*, 129(1), 97-108.
- Ghani, F. I., Yamazaki, H., Iwata, S., Okamoto, T., Aoe, K., Okabe, K., Mimura, Y., Fujimoto, N., Kishimoto, T., Yamada, T., Xu, C. W., & Morimoto, C. (2011). Identification of cancer stem cell markers in human malignant mesothelioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(2), 735-742.
- Gherzi, G., Zhao, Q., Salamone, M., Yeh, Y., Zucker, S., & Chen, W. T. (2006). The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. *Cancer Res*, 66(9), 4652-4661.
- Goldstein, L. A., Gherzi, G., Pineiro-Sanchez, M. L., Salamone, M., Yeh, Y., Flessate, D., & Chen, W. T. (1997). Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma. *Biochim Biophys Acta*, 1361(1), 11-19.
- Gonzalez-Gronow, M., Grenett, H. E., Weber, M. R., Gawdi, G., & Pizzo, S. V. (2001). Interaction of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV initiates a signal transduction mechanism which regulates expression of matrix metalloproteinase-9 by prostate cancer cells. *Biochem J*, 355(Pt 2), 397-407.
- Gorrell, M. D., Gysbers, V., & McCaughan, G. W. (2001). CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol*, 54(3), 249-264.
- Hakomori, S. (1989). Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res*, 52, 257-331.
- Han, S., Zhang, C., Li, Q., Dong, J., Liu, Y., Huang, Y., Jiang, T., & Wu, A. (2014). Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer*, 110(10), 2560-2568.
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harford-Wright, E., Lewis, K. M., & Vink, R. (2013). The potential for substance P antagonists as anti-cancer agents in brain tumours. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 8(1), 13-23.
- Hayes, A. W. (1979). Transport processes as sites of action of toxic chemicals. *Fed Proc*, 38(8), 2218-2219.
- Hedayati-Moghadam, M., Hosseinian, S., Paseban, M., Shabgah, A. G., Gholizadeh, J., Jamialahmadi, T., Sathyapalan, T., & Sahebkar, A. (2021). The Role of Chemokines in Cardiovascular Diseases and the Therapeutic Effect of Curcumin on CXCL8 and CCL2 as Pathological Chemokines in Atherosclerosis. *Dipeptidyl Aminopeptidases: Basic Science and Clinical Applications*, 1328, 155-170.
- Henry, L. R., Lee, H. O., Lee, J. S., Klein-Szanto, A., Watts, P., Ross, E. A., Chen, W. T., & Cheng, J. D. (2007). Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res*, 13(6), 1736-1741.
- Herrmann, H., Sadovnik, I., Cerny-Reiterer, S., Rulicke, T., Stefanzi, G., Willmann, M., Hoermann, G., Bilban, M., Blatt, K., Herndlhofer, S., Mayerhofer, M., Streubel, B., Sperr, W. R., Holyoake, T. L., Mannhalter, C., & Valent, P. (2014). Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 123(25), 3951-3962.
- Hopsu-Havu, V. K., & Glenner, G. G. (1966). A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie*, 7(3), 197-201.

- Huang, F. J., You, W. K., Bonaldo, P., Seyfried, T. N., Pasquale, E. B., & Stallcup, W. B. (2010). Pericyte deficiencies lead to aberrant tumor vascularization in the brain of the NG2 null mouse. *Dev Biol*, *344*(2), 1035-1046.
- Hynes, R. O. (1973). Alteration of Cell-Surface Proteins by Viral Transformation and by Proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *70*(11), 3170-3174.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, *110*(6), 673-687.
- Chen, F. X., Ren, W. W., Yang, Y., Shen, D., Zong, Y., Xu, S., Duan, Y., Qian, Y., & Ji, Y. (2009). Reciprocal effects of conditioned medium on cultured glioma cells and neural stem cells. *J Clin Neurosci*, *16*(12), 1619-1623.
- Chen, H., Yang, W. W., Wen, Q. T., Xu, L., & Chen, M. (2009). TGF-beta induces fibroblast activation protein expression; fibroblast activation protein expression increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM [corrected]. *Exp Mol Pathol*, *87*(3), 189-194.
- Chen, K., Bao, Z., Tang, P., Gong, W., Yoshimura, T., & Wang, J. M. (2018). Chemokines in homeostasis and diseases. *Cell Mol Immunol*, *15*(4), 324-334.
- Chen, T., Ajami, K., McCaughan, G. W., Gai, W. P., Gorrell, M. D., & Abbott, C. A. (2006). Molecular characterization of a novel dipeptidyl peptidase like 2-short form (DPL2-s) that is highly expressed in the brain and lacks dipeptidyl peptidase activity. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, *1764*(1), 33-43.
- Chen, W. T., Kelly, T., & Ghersi, G. (2003). DPPIV, seprase, and related serine peptidases in multiple cellular functions. *Curr Top Dev Biol*, *54*, 207-232.
- Cheng, H. C., Abdel-Ghany, M., Elble, R. C., & Pauli, B. U. (1998). Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J Biol Chem*, *273*(37), 24207-24215.
- Choi, H. J., Kim, J. Y., Lim, S. C., Kim, G., Yun, H. J., & Choi, H. S. (2015). Dipeptidyl peptidase 4 promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via induction of PIN1 gene expression. *Br J Pharmacol*, *172*(21), 5096-5109.
- Christiansen, V. J., Jackson, K. W., Lee, K. N., & McKee, P. A. (2007). Effect of fibroblast activation protein and alpha2-antiplasmin cleaving enzyme on collagen types I, III, and IV. *Arch Biochem Biophys*, *457*(2), 177-186.
- Chung, K. M., Hsu, S. C., Chu, Y. R., Lin, M. Y., Jiaang, W. T., Chen, R. H., & Chen, X. (2014). Fibroblast activation protein (FAP) is essential for the migration of bone marrow mesenchymal stem cells through RhoA activation. *PLoS One*, *9*(2), e88772.
- Ishii, T., Ohnuma, K., Murakami, A., Takasawa, N., Kobayashi, S., Dang, N. H., Schlossman, S. F., & Morimoto, C. (2001). CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(21), 12138-12143.
- Ito, U., Tomita, H., Matsuura, M., Yamazaki, S., Takada, Y., & Inaba, Y. (1985). Computer-analyzed EEG before and after bypass surgery. Quantification by a computerized wave form recognition method. *Clin Neurol Neurosurg*, *87*(4), 267-274.
- Itoh, Y. (2022). Proteolytic modulation of tumor microenvironment signals during cancer progression. *Front Oncol*, *12*, 935231.
- Iwata, S., Yamaguchi, N., Munakata, Y., Ikushima, H., Lee, J. F., Hosono, O., Schlossman, S. F., & Morimoto, C. (1999). CD26/dipeptidyl peptidase IV differentially regulates the chemotaxis of T cells and monocytes toward RANTES: possible mechanism for the switch from innate to acquired immune response. *Int Immunol*, *11*(3), 417-426.
- Jang, J. H., Janker, F., De Meester, I., Arni, S., Borgeaud, N., Yamada, Y., Gil Bazo, I., Weder, W., & Junggraithmayr, W. (2019). The CD26/DPP4-inhibitor vildagliptin suppresses lung cancer growth via macrophage-mediated NK cell activity. *Carcinogenesis*, *40*(2), 324-334.
- Justa-Schuch, D., Moller, U., & Geiss-Friedlander, R. (2014). The amino terminus extension in the long dipeptidyl peptidase 9 isoform contains a nuclear localization signal targeting the active peptidase to the nucleus. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(18), 3611-3626.
- Justa-Schuch, D., Silva-Garcia, M., Pilla, E., Engelke, M., Kilisch, M., Lenz, C., Moller, U., Nakamura, F., Urlaub, H., & Geiss-Friedlander, R. (2016). DPP9 is a novel component of the N-end rule pathway targeting the tyrosine kinase Syk. *Elife*, *5*.
- Kahn, P., & Shin, S. I. (1979). Cellular Tumorigenicity in Nude-Mice - Test of Associations among Loss of Cell-Surface Fibronectin, Anchorage Independence, and Tumor-Forming Ability. *Journal of Cell Biology*, *82*(1), 1-16.
- Kahne, T., Kroning, H., Thiel, U., Ulmer, A. J., Flad, H. D., & Ansorge, S. (1996). Alterations in structure and cellular localization of molecular forms of DP IV/CD26 during T cell activation. *Cell Immunol*, *170*(1), 63-70.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, *119*(6), 1420-1428.

- Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S. F., & Morimoto, C. (1993). Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science*, *261*(5120), 466-469.
- Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Neill, T., & Iozzo, R. V. (2019). Matrix modeling and remodeling: A biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. *Matrix Biol*, *75-76*, 1-11.
- Kawasaki, N., Lin, C. W., Inoue, R., Khoo, K. H., Kawasaki, N., Ma, B. Y., Oka, S., Ishiguro, M., Sawada, T., Ishida, H., Hashimoto, T., & Kawasaki, T. (2009). Highly fucosylated N-glycan ligands for mannan-binding protein expressed specifically on CD26 (DPPVI) isolated from a human colorectal carcinoma cell line, SW1116. *Glycobiology*, *19*(4), 437-450.
- Kiaris, H., & Schally, A. V. (1999). Decrease in telomerase activity in U-87MG human glioblastomas after treatment with an antagonist of growth hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(1), 226-231.
- Kin, Y., Misumi, Y., & Ikehara, Y. (2001). Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. *Journal of Biochemistry*, *129*(2), 289-295.
- Kitlinska, J. (2007). Neuropeptide Y in neural crest-derived tumors: effect on growth and vascularization. *Cancer Lett*, *245*(1-2), 293-302.
- Kitlinska, J., Kuo, L., Abe, K., Pons, J., Yu, M., Li, L., Tilan, J., Toretsky, J., & Zukowska, Z. (2006). Role of neuropeptide Y and dipeptidyl peptidase IV in regulation of Ewing's sarcoma growth. *Adv Exp Med Biol*, *575*, 223-229.
- Kopp, J., Xu, Z. Q., Zhang, X., Pedrazzini, T., Herzog, H., Kresse, A., Wong, H., Walsh, J. H., & Hokfelt, T. (2002). Expression of the neuropeptide Y Y1 receptor in the CNS of rat and of wild-type and Y1 receptor knock-out mice. Focus on immunohistochemical localization. *Neuroscience*, *111*(3), 443-532.
- Koyama, Y., Norose-Toyoda, K., Hirano, S., Kobayashi, M., Ebihara, T., Someki, I., Fujisaki, H., & Irie, S. (2000). Type I collagen is a non-adhesive extracellular matrix for macrophages. *Arch Histol Cytol*, *63*(1), 71-79.
- Kranjc, M. K., Novak, M., Pestell, R. G., & Lah, T. T. (2019). Cytokine CCL5 and receptor CCR5 axis in glioblastoma multiforme. *Radiol Oncol*, *53*(4), 397-406.
- Krepela, E., Vanickova, Z., Hrabal, P., Zubal, M., Chmielova, B., Balaziová, E., Vymola, P., Matrasova, I., Busek, P., & Sedo, A. (2021). Regulation of Fibroblast Activation Protein by Transforming Growth Factor Beta-1 in Glioblastoma Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(3).
- Ladner, C. L., Yang, J., Turner, R. J., & Edwards, R. A. (2004). Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal Biochem*, *326*(1), 13-20.
- Lambeir, A. M., Diaz Pereira, J. F., Chacon, P., Vermeulen, G., Heremans, K., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Meester, I., & Scharpe, S. (1997). A prediction of DPP IV/CD26 domain structure from a physico-chemical investigation of dipeptidyl peptidase IV (CD26) from human seminal plasma. *Biochim Biophys Acta*, *1340*(2), 215-226.
- Lambeir, A. M., Durinx, C., Proost, P., Van Damme, J., Scharpe, S., & De Meester, I. (2001). Kinetic study of the processing by dipeptidyl-peptidase IV/CD26 of neuropeptides involved in pancreatic insulin secretion. *FEBS Lett*, *507*(3), 327-330.
- Lambeir, A. M., Durinx, C., Scharpe, S., & De Meester, I. (2003). Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci*, *40*(3), 209-294.
- Langley, R. R., & Fidler, I. J. (2013). The biology of brain metastasis. *Clin Chem*, *59*(1), 180-189.
- Larrinaga, G., Perez, I., Sanz, B., Beitia, M., Errarte, P., Fernandez, A., Blanco, L., Etxezarraga, M. C., Gil, J., & Lopez, J. I. (2015). Dipeptidyl-Peptidase IV Activity Is Correlated with Colorectal Cancer Prognosis. *PLoS One*, *10*(3).
- LeBleu, V. S., & Neilson, E. G. (2020). Origin and functional heterogeneity of fibroblasts. *FASEB J*, *34*(3), 3519-3536.
- Lee, J., Fassnacht, M., Nair, S., Boczkowski, D., & Gilboa, E. (2005). Tumor immunotherapy targeting fibroblast activation protein, a product expressed in tumor-associated fibroblasts. *Cancer Res*, *65*(23), 11156-11163.
- Lee, J. J., Wang, T. Y., Liu, C. L., Chien, M. N., Chen, M. J., Hsu, Y. C., Leung, C. H., & Cheng, S. P. (2017). Dipeptidyl Peptidase IV as a Prognostic Marker and Therapeutic Target in Papillary Thyroid Carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *102*(8), 2930-2940.
- Lee, K. N., Jackson, K. W., Christiansen, V. J., Lee, C. S., Chun, J. G., & McKee, P. A. (2006). Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood*, *107*(4), 1397-1404.
- Lee, K. N., Jackson, K. W., Christiansen, V. J., & McKee, P. A. (2005). Plasma antiplasmin-cleaving enzyme (APCE) is a soluble form of fibroblast activation protein (FAP). *Faseb Journal*, *19*(4), A304-A305.
- <Go to
- Lee, N. J., & Herzog, H. (2009). NPY regulation of bone remodelling. *Neuropeptides*, *43*(6), 457-463.

- Leiting, B., Pryor, K. D., Wu, J. K., Marsilio, F., Patel, R. A., Craik, C. S., Ellman, J. A., Cummings, R. T., & Thornberry, N. A. (2003). Catalytic properties and inhibition of proline-specific dipeptidyl peptidases II, IV and VII. *Biochemical Journal*, *371*, 525-532.
- Li, L., Najafi, A. H., Kitlinska, J. B., Neville, R., Laredo, J., Epstein, S. E., Burnett, M. S., & Zukowska, Z. (2011). Of mice and men: neuropeptide Y and its receptors are associated with atherosclerotic lesion burden and vulnerability. *J Cardiovasc Transl Res*, *4*(3), 351-362.
- Li, M., Li, G., Kiyokawa, J., Tirmizi, Z., Richardson, L. G., Ning, J., Das, S., Martuza, R. L., Stemmer-Rachamimov, A., Rabkin, S. D., & Wakimoto, H. (2020). Characterization and oncolytic virus targeting of FAP-expressing tumor-associated pericytes in glioblastoma. *Acta Neuropathol Commun*, *8*(1), 221.
- Li, S., Fan, Y., Kumagai, A., Kawakita, E., Kitada, M., Kanasaki, K., & Koya, D. (2020). Deficiency in Dipeptidyl Peptidase-4 Promotes Chemoresistance through the CXCL12/CXCR4/mTOR/TGFbeta Signaling Pathway in Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3).
- Liao, Y. X., Zhang, Z. P., Zhao, J., & Liu, J. P. (2018). Effects of Fibronectin 1 on Cell Proliferation, Senescence and Apoptosis of Human Glioma Cells Through the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*, *48*(3), 1382-1396.
- Liu, R., Li, H., Liu, L., Yu, J., & Ren, X. (2012). Fibroblast activation protein: A potential therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther*, *13*(3), 123-129.
- Lorey, S., Faust, J., Buhling, F., Ansoerge, S., & Neubert, K. (2000). A new type of fluorogenic substrates for determination of cellular dipeptidyl peptidase IV (DP IV/CD26) activity. *Dipeptidyl Aminopeptidases: Basic Science and Clinical Applications*, *477*, 111-115.
- Lorey, S., Stockel-Maschek, A., Faust, J., Brandt, W., Stiebitz, B., Gorrell, M. D., Kahne, T., Mrestani-Klaus, C., Wrenger, S., Reinhold, D., Ansoerge, S., & Neubert, K. (2003). Different modes of dipeptidyl peptidase IV (CD26) inhibition by oligopeptides derived from the N-terminus of HIV-1 Tat indicate at least two inhibitor binding sites. *Eur J Biochem*, *270*(10), 2147-2156.
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffiatti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*, *23*(8), 1231-1251.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, *193*(1), 265-275.
- Ludwig, T. (2005). Local proteolytic activity in tumor cell invasion and metastasis. *Bioessays*, *27*(11), 1181-1191.
- Luker, K. E., & Luker, G. D. (2006). Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett*, *238*(1), 30-41.
- Mahmood, N., & Rabbani, S. A. (2021). Fibrinolytic System and Cancer: Diagnostic and Therapeutic Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9).
- Matic, I. Z., Dordic, M., Grozdanic, N., Damjanovic, A., Kolundzija, B., Eric-Nikolic, A., Dzodic, R., Sasic, M., Nikolic, S., Dobrosavljevic, D., Raskovic, S., Andrejevic, S., Gavrilovic, D., Cordero, O. J., & Juranic, Z. D. (2012). Serum activity of DPPIV and its expression on lymphocytes in patients with melanoma and in people with vitiligo. *Bmc Immunology*, *13*.
- Matrasova, I., Busek, P., Balaziova, E., & Sedo, A. (2017). Heterogeneity of molecular forms of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein in human glioblastomas. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, *161*(3), 252-260.
- Mavropoulos, J. C., Cuchacovich, M., Llanos, C., Aguilon, J. C., Gatica, H., Pizzo, S. V., & Gonzalez-Gronow, M. (2005). Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy augments dipeptidyl peptidase IV activity and decreases autoantibodies to GRP78/BIP and phosphoglucose isomerase in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, *32*(11), 2116-2124.
- Mazur, A., Holthoff, E., Vadali, S., Kelly, T., & Post, S. R. (2016). Cleavage of Type I Collagen by Fibroblast Activation Protein-alpha Enhances Class A Scavenger Receptor Mediated Macrophage Adhesion. *PLoS One*, *11*(3), e0150287.
- McCaughan, G. W., Wickson, J. E., Creswick, P. F., & Gorrell, M. D. (1990). Identification of the bile canalicular cell surface molecule GP110 as the ectopeptidase dipeptidyl peptidase IV: an analysis by tissue distribution, purification and N-terminal amino acid sequence. *Hepatology*, *11*(4), 534-544.
- McDonald, J. K., Reilly, T. J., Zeitman, B. B., & Ellis, S. (1968). Dipeptidyl arylamidase II of the pituitary. Properties of lysylalanyl-beta-naphthylamide hydrolysis: inhibition by cations, distribution in tissues, and subcellular localization. *J Biol Chem*, *243*(8), 2028-2037.
- McDonald, J. K., & Schwabe, C. (1980). Dipeptidyl peptidase II of bovine dental pulp. Initial demonstration and characterization as a fibroblastic, lysosomal peptidase of the serine class active on collagen-related peptides. *Biochim Biophys Acta*, *616*(1), 68-81.

- Medeiros Mdos, S., Balmforth, A. J., Vaughan, P. F., & Turner, A. J. (1991). Hydrolysis of atrial and brain natriuretic peptides by the human astrocytoma clone D384 and the neuroblastoma line SH-SY5Y. *Neuroendocrinology*, *54*(3), 295-302.
- Mentlein, R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept*, *85*(1), 9-24.
- Mentlein, R., Hattermann, K., Hemion, C., Jungbluth, A. A., & Held-Feindt, J. (2011). Expression and role of the cell surface protease seprase/fibroblast activation protein-alpha (FAP-alpha) in astroglial tumors. *Biol Chem*, *392*(3), 199-207.
- Mentlein, R., & Struckhoff, G. (1989). Purification of two dipeptidyl aminopeptidases II from rat brain and their action on proline-containing neuropeptides. *J Neurochem*, *52*(4), 1284-1293.
- Meurer, R., Vanriper, G., Feeney, W., Cunningham, P., Hora, D., Springer, M. S., Macintyre, D. E., & Rosen, H. (1993). Formation of Eosinophilic and Monocytic Intra-dermal Inflammatory Sites in the Dog by Injection of Human Rantes but Not Human Monocyte Chemoattractant Protein-1, Human Macrophage Inflammatory Protein 1-Alpha, or Human Interleukin-8. *Journal of Experimental Medicine*, *178*(6), 1913-1921.
- Mezey, G., Treszl, A., Schally, A. V., Block, N. L., Vizkeleti, L., Juhasz, A., Klekner, A., Nagy, J., Balazs, M., Halmos, G., & Bognar, L. (2014). Prognosis in human glioblastoma based on expression of ligand growth hormone-releasing hormone, pituitary-type growth hormone-releasing hormone receptor, its splicing variant receptors, EGF receptor and PTEN genes. *J Cancer Res Clin Oncol*, *140*(10), 1641-1649.
- Misumi, Y., Hayashi, Y., Arakawa, F., & Ikehara, Y. (1992). Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim Biophys Acta*, *1131*(3), 333-336.
- Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T. N., & Surolia, A. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem Sci*, *31*(3), 156-163.
- Mitschke, J., Burk, U. C., & Reinheckel, T. (2019). The role of proteases in epithelial-to-mesenchymal cell transitions in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, *38*(3), 431-444.
- Mohan, V., Das, A., & Sagi, I. (2020). Emerging roles of ECM remodeling processes in cancer. *Semin Cancer Biol*, *62*, 192-200.
- Monsky, W. L., Lin, C. Y., Aoyama, A., Kelly, T., Akiyama, S. K., Mueller, S. C., & Chen, W. T. (1994). A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res*, *54*(21), 5702-5710.
- Mori, Y., Kono, K., Matsumoto, Y., Fujii, H., Yamane, T., Mitsumata, M., & Chen, W. T. (2004). The expression of a type II transmembrane serine protease (Seprase) in human gastric carcinoma. *Oncology*, *67*(5-6), 411-419.
- Morrison, M. E., Vijayaradhi, S., Engelstein, D., Albino, A. P., & Houghton, A. N. (1993). A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J Exp Med*, *177*(4), 1135-1143.
- Mueller, S. C., Gherzi, G., Akiyama, S. K., Sang, Q. X., Howard, L., Pineiro-Sanchez, M., Nakahara, H., Yeh, Y., & Chen, W. T. (1999). A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem*, *274*(35), 24947-24952.
- Muenst, S., Laubli, H., Soysal, S. D., Zippelius, A., Tzankov, A., & Hoeller, S. (2016). The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J Intern Med*, *279*(6), 541-562.
- Muliaditan, T., Caron, J., Okesola, M., Opzoomer, J. W., Kosti, P., Georgouli, M., Gordon, P., Lall, S., Kuzeva, D. M., Pedro, L., Shields, J. D., Gillett, C. E., Diebold, S. S., Sanz-Moreno, V., Ng, T., Hoste, E., & Arnold, J. N. (2018). Macrophages are exploited from an innate wound healing response to facilitate cancer metastasis. *Nat Commun*, *9*(1), 2951.
- Muramatsu, R., & Yamashita, T. (2014). Pericyte function in the physiological central nervous system. *Neurosci Res*, *81-82*, 38-41.
- Nazarian, A., Lawlor, K., Yi, S. S., Philip, J., Ghosh, M., Yaneva, M., Villanueva, J., Saghatelian, A., Assel, M., Vickers, A. J., Eastham, J. A., Scher, H. I., Carver, B. S., Lilja, H., & Tempst, P. (2014). Inhibition of Circulating Dipeptidyl Peptidase 4 Activity in Patients with Metastatic Prostate Cancer. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*(11), 3082-3096.
- Niedermeyer, J., Enenkel, B., Park, J. E., Lenter, M., Rettig, W. J., Damm, K., & Schnapp, A. (1998). Mouse fibroblast-activation protein--conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease. *Eur J Biochem*, *254*(3), 650-654.
- Nyberg, F., Le Greves, P., Sundqvist, C., & Terenius, L. (1984). Characterization of substance P(1-7) and (1-8) generating enzyme in human cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Commun*, *125*(1), 244-250.
- O'Brien, P., & O'Connor, B. F. (2008). Seprase: an overview of an important matrix serine protease. *Biochim Biophys Acta*, *1784*(9), 1130-1145.

- O'Rourke, D. A., Donohue, M. F., & Hayes, J. A. (1979). Beta-blockers and peripheral gangrene. *Med J Aust*, 2(2), 88.
- Obenauf, A. C., & Massague, J. (2015). Surviving at a Distance: Organ-Specific Metastasis. *Trends in Cancer*, 1(1), 76-91.
- Ogata, S., Misumi, Y., Tsuji, E., Takami, N., Oda, K., & Ikehara, Y. (1992). Identification of the active site residues in dipeptidyl peptidase IV by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 31(9), 2582-2587.
- Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126(5), 855-867.
- Ostrom, Q. T., Egan, K. M., Nabors, L. B., Gerke, T., Thompson, R. C., Olson, J. J., LaRocca, R., Chowdhary, S., Eckel-Passow, J. E., Armstrong, G., Wiencke, J. K., Bernstein, J. L., Claus, E. B., Il'yasova, D., Johansen, C., Lachance, D. H., Lai, R. K., Merrell, R. T., Olson, S. H., . . . Bondy, M. L. (2020). Glioma risk associated with extent of estimated European genetic ancestry in African Americans and Hispanics. *Int J Cancer*, 146(3), 739-748.
- Ou, Y. C., Li, J. R., Wang, J. D., Chang, C. Y., Wu, C. C., Chen, W. Y., Kuan, Y. H., Liao, S. L., Lu, H. C., & Chen, C. J. (2019). Fibronectin Promotes Cell Growth and Migration in Human Renal Cell Carcinoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11).
- Ozerdem, U., & Stallcup, W. B. (2003). Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis*, 6(3), 241-249.
- Palma, C., Nardelli, F., Manzini, S., & Maggi, C. A. (1999). Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cell lines bearing tachykinin NK1 receptors. *Br J Cancer*, 79(2), 236-243.
- Pandya, P., Orgaz, J. L., & Sanz-Moreno, V. (2017). Modes of invasion during tumour dissemination. *Mol Oncol*, 11(1), 5-27.
- Pang, R., Law, W. L., Chu, A. C., Poon, J. T., Lam, C. S., Chow, A. K., Ng, L., Cheung, L. W., Lan, X. R., Lan, H. Y., Tan, V. P., Yau, T. C., Poon, R. T., & Wong, B. C. (2010). A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell*, 6(6), 603-615.
- Park, J. E., Lenter, M. C., Zimmermann, R. N., Garin-Chesa, P., Old, L. J., & Rettig, W. J. (1999). Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem*, 274(51), 36505-36512.
- Passaniti, A., & Hart, G. W. (1988). Cell surface sialylation and tumor metastasis. Metastatic potential of B16 melanoma variants correlates with their relative numbers of specific penultimate oligosaccharide structures. *J Biol Chem*, 263(16), 7591-7603.
- Patrick O'Mullan, P. D. C., PhD Jizu Yi, PhD Chae Kim, BS Craig A. Gelfand, PhD. (2017). High-Resolution Isoelectric Separation of Dipeptidyl Peptidase IV Facilitates Molecular Understanding of Posttranslational Modifications, Enzyme Activity, and a Link to Type II Diabetes, 30: 90-97.
- Paul, G., Ozen, I., Christophersen, N. S., Reinbothe, T., Bengzon, J., Visse, E., Jansson, K., Dannaeus, K., Henriques-Oliveira, C., Roybon, L., Anisimov, S. V., Renstrom, E., Svensson, M., Haegerstrand, A., & Brundin, P. (2012). The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 7(4), e35577.
- Paulus, W., Roggendorf, W., & Schuppan, D. (1988). Immunohistochemical investigation of collagen subtypes in human glioblastomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 413(4), 325-332.
- Pinski, J., Schally, A. V., Halmos, G., Szepeshazi, K., & Groot, K. (1994). Somatostatin analogues and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of human glioblastomas in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 54(22), 5895-5901.
- Pirie-Shepherd, S. R., Jett, E. A., Andon, N. L., & Pizzo, S. V. (1995). Sialic acid content of plasminogen 2 glycoforms as a regulator of fibrinolytic activity. Isolation, carbohydrate analysis, and kinetic characterization of six glycoforms of plasminogen. *J Biol Chem*, 270(11), 5877-5881.
- Puschel, G., Mentlein, R., & Heymann, E. (1982). Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur J Biochem*, 126(2), 359-365.
- Qi, S. Y., Riviere, P. J., Trojnar, J., Junien, J. L., & Akinsanya, K. O. (2003). Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochem J*, 373(Pt 1), 179-189.
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 19(11), 1423-1437.
- Quante, M., Tu, S. P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S. S., Takashi, S., Baik, G. H., Shibata, W., Diprete, B., Betz, K. S., Friedman, R., Varro, A., Tycko, B., & Wang, T. C. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*, 19(2), 257-272.

- Ramirez-Montagut, T., Blachere, N. E., Sviderskaya, E. V., Bennett, D. C., Rettig, W. J., Garin-Chesa, P., & Houghton, A. N. (2004). FAP alpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor. *Oncogene*, *23*(32), 5435-5446.
- Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Reza, R., Wojakowski, W., & Ratajczak, J. (2006). The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*, *20*(11), 1915-1924.
- Raum, D., Marcus, D., Alper, C. A., Levey, R., Taylor, P. D., & Starzl, T. E. (1980). Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science*, *208*(4447), 1036-1037.
- Rawlings, N. D., & Bateman, A. (2021). How to use the MEROPS database and website to help understand peptidase specificity. *Protein Sci*, *30*(1), 83-92.
- Reeve, J. R., Jr., Walsh, J. H., Chew, P., Clark, B., Hawke, D., & Shively, J. E. (1983). Amino acid sequences of three bombesin-like peptides from canine intestine extracts. *J Biol Chem*, *258*(9), 5582-5588.
- Ren, X. M., Hayashi, Y., Yoshimura, N., & Takimoto, K. (2005). Transmembrane interaction mediates complex formation between peptidase homologues and Kv4 channels. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *29*(2), 320-332.
- Rettig, W. J., Chesa, P. G., Beresford, H. R., Feickert, H. J., Jennings, M. T., Cohen, J., Oettgen, H. F., & Old, L. J. (1986). Differential Expression of Cell-Surface Antigens and Glial Fibrillary Acidic Protein in Human Astrocytoma Subsets. *Cancer Research*, *46*(12), 6406-6412. <Go to ISI>://WOS:A1986E976600072
- Rettig, W. J., Su, S. L., Fortunato, S. R., Scanlan, M. J., Raj, B. K., Garin-Chesa, P., Healey, J. H., & Old, L. J. (1994). Fibroblast activation protein: purification, epitope mapping and induction by growth factors. *Int J Cancer*, *58*(3), 385-392.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, *414*(6859), 105-111.
- Richardson, P. J. (2016). CXCR4 and Glioblastoma. *Anticancer Agents Med Chem*, *16*(1), 59-74.
- Rohrich, M., Loktev, A., Wefers, A. K., Altmann, A., Paech, D., Adeberg, S., Windisch, P., Hielscher, T., Flechsig, P., Floca, R., Leitz, D., Schuster, J. P., Huber, P. E., Debus, J., von Deimling, A., Lindner, T., & Haberkorn, U. (2019). IDH-wildtype glioblastomas and grade III/IV IDH-mutant gliomas show elevated tracer uptake in fibroblast activation protein-specific PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, *46*(12), 2569-2580.
- Rouget, C. (1893). Mémoire sur le développement, la structure et les propriétés physiologique des capillaires sanguins et lymphatiques. *Archives de physiologie normale et pathologique*, *5*, 603-663.
- Sana, J., Busek, P., Fadrus, P., Besse, A., Radova, L., Vecera, M., Reguli, S., Stollinova Sromova, L., Hilser, M., Lipina, R., Lakomy, R., Kren, L., Smrcka, M., Sedo, A., & Slaby, O. (2018). Identification of microRNAs differentially expressed in glioblastoma stem-like cells and their association with patient survival. *Sci Rep*, *8*(1), 2836.
- Sato, H., Noma, K., Ohara, T., Kawasaki, K., Akai, M., Kobayashi, T., Nishiwaki, N., Narusaka, T., Komoto, S., Kashima, H., Katsura, Y., Kato, T., Kikuchi, S., Tazawa, H., Kagawa, S., Shirakawa, Y., Kobayashi, H., & Fujiwara, T. (2022). Dual-targeted near-infrared photoimmunotherapy for esophageal cancer and cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Sci Rep*, *12*(1), 20152.
- Sauer, A. V., Brigida, I., Carriglio, N., & Aiuti, A. (2012). Autoimmune dysregulation and purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. *Frontiers in Immunology*, *3*, 26510.3389/fimmu.2012.00265
- Scanlan, M. J., Raj, B. K., Calvo, B., Garin-Chesa, P., Sanz-Moncasi, M. P., Healey, J. H., Old, L. J., & Rettig, W. J. (1994). Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(12), 5657-5661.
- Sedo, A., Krepela, E., Kasafirek, E., Kraml, J., & Kadlecova, L. (1991). Dipeptidyl peptidase IV in the human lung and spinocellular lung cancer. *Physiological Research*, *40*(3), 359-362.
- Sedo, A., & Malik, R. (2001). Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? *Biochim Biophys Acta*, *1550*(2), 107-116.
- Sedo, A., Malik, R., Drbal, K., Lisa, V., Vlasicova, K., & Mares, V. (2001). Dipeptidyl peptidase IV in two human glioma cell lines. *Eur J Histochem*, *45*(1), 57-63.
- Sedo, A., Malik, R., & Krepela, E. (1998). Dipeptidyl peptidase IV in C6 rat glioma cell line differentiation. *Biol Chem*, *379*(1), 39-44.
- Sedo, A., & Revoltella, R. P. (1995). Detection of dipeptidyl peptidase IV in glioma C6 and neuroblastoma SK-N-SH cell lines. *Biochem Cell Biol*, *73*(1-2), 113-115.
- Sell, H., Rohrborn, D., Indrakusuma, I., Jelenik, T., Castaneda, T. R., Al-Hasani, H., Romacho, T., Roden, M., & Eckel, J. (2015). Adipose-specific Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) Knockout Mice Display Improved Fasting Insulin and Cholesterol Levels Despite Increased Weight Gain on HFD. *Diabetes*, *64*, A548-A548.

- Sena, I. F. G., Paiva, A. E., Prazeres, P., Azevedo, P. O., Lousado, L., Bhutia, S. K., Salmina, A. B., Mintz, A., & Birbrair, A. (2018). Glioblastoma-activated pericytes support tumor growth via immunosuppression. *Cancer Med*, 7(4), 1232-1239.
- Sevenich, L., & Joyce, J. A. (2014). Pericellular proteolysis in cancer. *Genes Dev*, 28(21), 2331-2347.
- Shi, K., Wang, S. L., Shen, B., Yu, F. Q., Weng, D. F., & Lin, J. H. (2019). Clinicopathological and prognostic values of fibronectin and integrin alphavbeta3 expression in primary osteosarcoma. *World J Surg Oncol*, 17(1), 23.
- Shi, M., Yu, D. H., Chen, Y., Zhao, C. Y., Zhang, J., Liu, Q. H., Ni, C. R., & Zhu, M. H. (2012). Expression of fibroblast activation protein in human pancreatic adenocarcinoma and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol*, 18(8), 840-846.
- Shibuya-Saruta, H., Kasahara, Y., & Hashimoto, Y. (1996). Human serum dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) and its unique properties. *J Clin Lab Anal*, 10(6), 435-440. <35::AID-JCLA21>3.0.CO;2-X
- Schally, A. V., Varga, J. L., & Engel, J. B. (2008). Antagonists of growth-hormone-releasing hormone: an emerging new therapy for cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 4(1), 33-43.
- Sims, D. E. (1986). The Pericyte - a Review. *Tissue & Cell*, 18(2), 153-174. [https://doi.org/Doi 10.1016/0040-8166\(86\)90026-1](https://doi.org/Doi 10.1016/0040-8166(86)90026-1)
- Sizarov, A., Ya, J., de Boer, B. A., Lamers, W. H., Christoffels, V. M., & Moorman, A. F. (2011). Formation of the building plan of the human heart: morphogenesis, growth, and differentiation. *Circulation*, 123(10), 1125-1135.
- Spindel, E. R., Giladi, E., Segerson, T. P., & Nagalla, S. (1993). Bombesin-like peptides: of ligands and receptors. *Recent Prog Horm Res*, 48, 365-391.
- Spindel, E. R., Chin, W. W., Price, J., Rees, L. H., Besser, G. M., & Habener, J. F. (1984). Cloning and characterization of cDNAs encoding human gastrin-releasing peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(18), 5699-5703.
- Stenman, S., & Vaheri, A. (1981). Fibronectin in Human Solid Tumors. *International Journal of Cancer*, 27(4), 427-435. 10.1002/ijc.2910270403
- Stremenova, J., Busek, P., Krepela, E., Sromova, L., & Sedo, A. (2009). Expression of dipeptidyl peptidase-IV and related molecules in primary cell cultures derived from human astrocytic tumors. *Febs Journal*, 276, 391-392. <Go to ISI>://WOS:000267069901197
- Stremenova, J., Krepela, E., Mares, V., Trim, J., Dbaly, V., Marek, J., Vanickova, Z., Lisa, V., Yea, C., & Sedo, A. (2007). Expression and enzymatic activity of dipeptidyl peptidase-IV in human astrocytic tumours are associated with tumour grade. *Int J Oncol*, 31(4), 785-792.
- Struyf, S., Proost, P., Schols, D., De Clercq, E., Opendakker, G., Lenaerts, J. P., Dethoux, M., Parmentier, M., De Meester, I., Scharpe, S., & Van Damme, J. (1999). CD26/dipeptidyl-peptidase IV down-regulates the eosinophil chemotactic potency, but not the anti-HIV activity of human eotaxin by affecting its interaction with CC chemokine receptor 3. *J Immunol*, 162(8), 4903-4909.
- Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J. J., Stragiotto, G., Tran, D., Brem, S., Hottinger, A., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., . . . Ram, Z. (2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 318(23), 2306-2316.
- Sundstrom, G., Larsson, T. A., Xu, B., Heldin, J., & Larhammar, D. (2013). Interactions of zebrafish peptide YYb with the neuropeptide Y-family receptors Y4, Y7, Y8a, and Y8b. *Front Neurosci*, 7, 29.
- Szabo, R., Wu, Q., Dickson, R. B., Netzel-Arnett, S., Antalis, T. M., & Bugge, T. H. (2003). Type II transmembrane serine proteases. *Thromb Haemost*, 90(2), 185-193.
- Tan, B., Shen, L., Yang, K., Huang, D., Li, X., Li, Y., Zhao, L., Chen, J., Yi, Q., Xu, H., Tian, J., & Zhu, J. (2018). C6 glioma-conditioned medium induces malignant transformation of mesenchymal stem cells: Possible role of S100B/RAGE pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 495(1), 78-85.
- Tang, W., Wang, X., Chen, Y., Zhang, J., Chen, Y., & Lin, Z. (2015). CXCL12 and CXCR4 as predictive biomarkers of glioma recurrence pattern after total resection. *Pathol Biol (Paris)*, 63(4-5), 190-198.
- Tian, M., Chen, L., Ma, L., Wang, D., Shao, B., Wu, J., Wu, H., & Jin, Y. (2016). Expression and prognostic significance of CCL11/CCR3 in glioblastoma. *Oncotarget*, 7(22), 32617-32627.
- Tonks, N. K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(11), 833-846.
- Torimoto, Y., Dang, N. H., Vivier, E., Tanaka, T., Schlossman, S. F., & Morimoto, C. (1991). Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes. *J Immunol*, 147(8), 2514-2517.
- Trylcova, J., Busek, P., Smetana, K., Jr., Balaziová, E., Dvorankova, B., Mifkova, A., & Sedo, A. (2015). Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells in vitro. *Tumour Biol*, 36(8), 5873-5879.
- Turk, B., Turk, D., & Turk, V. (2012). Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J*, 31(7), 1630-1643.

- Ulmer, A. J., Mattern, T., Feller, A. C., Heymann, E., & Flad, H. D. (1990). CD26 antigen is a surface dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) as characterized by monoclonal antibodies clone TII-19-4-7 and 4EL1C7. *Scand J Immunol*, 31(4), 429-435.
- Van Damme, J., Struyf, S., Wuyts, A., Van Coillie, E., Menten, P., Schols, D., Sozzani, S., De Meester, I., & Proost, P. (1999). The role of CD26/DPP IV in chemokine processing. *Chem Immunol*, 72, 42-56.
- Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., & Scharpe, S. (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J*, 9(9), 736-744.
- Viapiano, M. S., Bi, W. L., Piepmeier, J., Hockfield, S., & Matthews, R. T. (2005). Novel tumor-specific isoforms of BEHAB/brevican identified in human malignant gliomas. *Cancer Res*, 65(15), 6726-6733.
- Vivier, I., Marguet, D., Naquet, P., Bonicel, J., Black, D., Li, C. X., Bernard, A. M., Gorvel, J. P., & Pierres, M. (1991). Evidence that thymocyte-activating molecule is mouse CD26 (dipeptidyl peptidase IV). *J Immunol*, 147(2), 447-454.
- Vizovisek, M., Ristanovic, D., Menghini, S., Christiansen, M. G., & Schuerle, S. (2021). The Tumor Proteolytic Landscape: A Challenging Frontier in Cancer Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5).
- Wagner, L., Klemann, C., Stephan, M., & von Horsten, S. (2016). Unravelling the immunological roles of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) activity and/or structure homologue (DASH) proteins. *Clin Exp Immunol*, 184(3), 265-283.
- Wang, L., Cao, L., Wang, H., Liu, B., Zhang, Q., Meng, Z., Wu, X., Zhou, Q., & Xu, K. (2017). Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*, 8(44), 76116-76128.
- Waster, P., Rosdahl, I., Gilmore, B. F., & Seifert, O. (2011). Ultraviolet exposure of melanoma cells induces fibroblast activation protein-alpha in fibroblasts: Implications for melanoma invasion. *Int J Oncol*, 39(1), 193-202.
- Waumans, Y., Baerts, L., Kehoe, K., Lambeir, A. M., & De Meester, I. (2015). The Dipeptidyl Peptidase Family, Prolyl Oligopeptidase, and Prolyl Carboxypeptidase in the Immune System and Inflammatory Disease, Including Atherosclerosis. *Front Immunol*, 6, 387.
- Wen, P. Y., & Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 359(5), 492-507.
- Wesley, U. V., Albino, A. P., Tiwari, S., & Houghton, A. N. (1999). A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. *J Exp Med*, 190(3), 311-322.
- Wesley, U. V., Tiwari, S., & Houghton, A. N. (2004). Role for dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non small cell lung carcinoma cells. *Int J Cancer*, 109(6), 855-866.
- Wilson, T. A., Karajannis, M. A., & Harter, D. H. (2014). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int*, 5, 64.
- Wong, P. F., Gall, M. G., Bachovchin, W. W., McCaughan, G. W., Keane, F. M., & Gorrell, M. D. (2016). Neuropeptide Y is a physiological substrate of fibroblast activation protein: Enzyme kinetics in blood plasma and expression of Y2R and Y5R in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Peptides*, 75, 80-95.
- Yamamoto, H., Saito, T., Kaneko, Y., Kersey, D., Yong, V. W., Bremer, E. G., Mkrdichian, E., Cerullo, L., Leestma, J., & Moskal, J. R. (1997). alpha2,3-sialyltransferase mRNA and alpha2,3-linked glycoprotein sialylation are increased in malignant gliomas. *Brain Res*, 755(1), 175-179.
- Yang, F., Takagaki, Y., Yoshitomi, Y., Ikeda, T., Li, J., Kitada, M., Kumagai, A., Kawakita, E., Shi, S., Kanasaki, K., & Koya, D. (2019). Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 Accelerates Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer Metastasis via the CXCL12/CXCR4/mTOR Axis. *Cancer Res*, 79(4), 735-746.
- Yi, T., & Lindner, D. (2008). The role and target potential of protein tyrosine phosphatases in cancer. *Curr Oncol Rep*, 10(2), 114-121.
- Yi, W., Xiao, E., Ding, R., Luo, P., & Yang, Y. (2016). High expression of fibronectin is associated with poor prognosis, cell proliferation and malignancy via the NF-kappaB/p53-apoptosis signaling pathway in colorectal cancer. *Oncol Rep*, 36(6), 3145-3153.
- Young, R. M., Jamshidi, A., Davis, G., & Sherman, J. H. (2015). Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann Transl Med*, 3(9), 121.
- Yu, D. M. T., Wang, X. M., McCaughan, G. W., & Gorrell, M. D. (2006). Extraenzymatic functions of the dipeptidyl peptidase IV-related proteins DP8 and DP9 in cell adhesion, migration and apoptosis. *Febs Journal*, 273(11), 2447-2460.
- Yu, H., Yang, J., Li, Y., & Jiao, S. (2015). [The expression of fibroblast activation protein-alpha in primary breast cancer is associated with poor prognosis]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 31(3), 370-374.
- Zaruba, M. M., & Franz, W. M. (2010). Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(3), 321-335.

- Zhang, G. L., Qian, C., Zhang, S. Z., Tuo, Y. H., Zeng, B. Y., Ji, Y. X., & Wang, Y. Z. (2020). Effect of conditioned medium from neural stem cells on glioma progression and its protein expression profile analysis. *World J Stem Cells*, *12*(11), 1396-1409.
- Zhang, H. E., Hamson, E. J., Koczorowska, M. M., Tholen, S., Chowdhury, S., Bailey, C. G., Lay, A. J., Twigg, S. M., Lee, Q., Roediger, B., Biniossek, M. L., O'Rourke, M. B., McCaughan, G. W., Keane, F. M., Schilling, O., & Gorrell, M. D. (2019). Identification of Novel Natural Substrates of Fibroblast Activation Protein-alpha by Differential Degradomics and Proteomics. *Mol Cell Proteomics*, *18*(1), 65-85.
- Zhang, M., Xu, L., Wang, X., Sun, B., & Ding, J. (2015). Expression levels of seprase/FAPalpha and DPPiV/CD26 in epithelial ovarian carcinoma. *Oncol Lett*, *10*(1), 34-42.
- Zhang, M. Z., Qiao, Y. H., Nesland, J. M., Trope, C., Kennedy, A., Chen, W. T., & Suo, Z. H. (2007). Expression of seprase in effusions from patients with epithelial ovarian carcinoma. *Chin Med J (Engl)*, *120*(8), 663-668.
- Zhao, H. F., Wang, J., Shao, W., Wu, C. P., Chen, Z. P., To, S. T., & Li, W. P. (2017). Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: current preclinical and clinical development. *Mol Cancer*, *16*(1), 100.
- Zhen, E. Y., Jin, Z., Ackermann, B. L., Thomas, M. K., & Gutierrez, J. A. (2016). Circulating FGF21 proteolytic processing mediated by fibroblast activation protein. *Biochem J*, *473*(5), 605-614.
- Zlotnik, A., & Yoshie, O. (2000). Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity*, *12*(2), 121-127.
- Zukowska-Grojec, Z., Karwatowska-Prokopczuk, E., Rose, W., Rone, J., Movafagh, S., Ji, H., Yeh, Y. Y., Chen, W. T., Kleinman, H. K., Grouzmann, E., & Grant, D. S. (1998). Neuropeptide Y - A novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circulation Research*, *83*(2), 187-195.
-

8.1 PŘÍLOHA Č. 1

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

Heterogeneity of molecular forms of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein in human glioblastomas

Ivana Matrasova, Petr Busek, Eva Balaziová, Aleksí Sedo

Background and Aims. Proteolytic enzymes contribute to the progression of various cancers. We previously reported increased expression of the proline specific peptidases dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) and its closest paralogue fibroblast activation protein (FAP) in human glioblastomas. Here we analyze the molecular heterogeneity of DPP-IV and FAP in glioblastomas.

Methods. ELISA, isoelectric focusing, 1D and 2D electrophoresis followed by WB or enzyme overlay assay were utilized to analyze DPP-IV and FAP isoforms. Cell fractionation using a Percoll gradient and deglycosylation with PNGase F were performed to analyze the possible basis of DPP-IV and FAP microheterogeneity.

Results. Molecular forms of DPP-IV with an estimated molecular weight of 140-160 kDa and a pI predominantly 5.8 were detected in human glioblastoma; in some tumors additional isoforms with a more acidic (3.5-5.5) as well as alkaline (8.1) pI were revealed. Using 2D electrophoresis, two to three molecular forms of FAP with an alkaline (7.0-8.5) pI and an estimated MW of 120-140 kDa were identified in glioblastoma tissues. In glioma cell lines *in vitro*, several isoforms of both enzymes were expressed, however the alkaline forms present in glioblastoma tissues were not detected. Removal of N-linked oligosaccharides decreased the estimated molecular weight of both enzymes; the overall pattern of molecular forms nevertheless remained unchanged.

Conclusion. Several isoforms of DPP-IV and FAP are present in glioblastoma tissue. The absence of alkaline isoforms of both enzymes in glioma cell lines however suggests that isoforms from other, most likely stromal, cell types contribute to the overall pattern seen in glioblastoma tissues.

Key words: brain tumor, CD26, DPP-4, FAP, isoenzyme, seprase

Received: January 10, 2017; Accepted with revision: March 17, 2017; Available online: April 26, 2017
<https://doi.org/10.5507/bp.2017.010>

Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, U Nemocnice 5, 12853 Prague 2, Czech Republic

Corresponding author: Aleksí Sedo, e-mail: aleksi@cesnet.cz

INTRODUCTION

Malignant gliomas are the most frequent primary tumors of the central nervous system¹. Of these, glioblastomas (grade IV gliomas) represent the most malignant form with almost 100% mortality, aggressive and diffuse infiltrative growth and limited response to therapy². As reviewed previously, several proteases were found to be deregulated in gliomas and critically contribute to the disease progression³.

The almost ubiquitously expressed dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) and its closest paralogue fibroblast activation protein (FAP, EC 3.4.21.B28), characteristically expressed in the cancer and remodeling tissues, were implicated in the pathogenesis of various cancers. The functional consequence of their dysregulation may be cancer specific^{4,6}, possibly depending both on the available substrates of particular protease and on the cell population expressing the enzymes within the given tumor. The post-proline hydrolytic activity of DPP-IV and FAP is important for the processing of biologically active peptides and in the case of FAP also for the remodeling of the extracellular matrix^{7,8}. Both proteases are involved in the regulation of cell differentiation, adhesion and migra-

tion by their proteolytic activity and also non-hydrolytic interactions^{9,10}. Our previous reports demonstrated that the expression DPP-IV and FAP is increased in glioblastomas^{11,12}. The data on their pathogenetic role in brain tumors is limited- DPP-IV inhibits glioma cell growth, in large part independently of its enzymatic activity¹³, and FAP likely influences the interaction of glioma cells with the surrounding extracellular matrix (our unpublished results and ref.⁶).

DPP-IV and FAP are type II- transmembrane proteins that are enzymatically active as homodimers with a molecular weight (MW) typically of 220-240 kDa and 170 kDa, respectively^{14,15}. Enzymatically active soluble forms of both enzymes lacking the transmembrane region are found in blood plasma, and in the case of DPP-IV also in other bodily fluids, but their origin is largely speculative^{16,17}. In addition to these forms which are probably the result of shedding from the plasma membrane by an unknown protease, substantial molecular heterogeneity has been reported for both DPP-IV and FAP from various sources, and these molecular forms are thought to have unique pathophysiological functions. A spectrum of pI forms of DPP-IV was described in human plasma^{18,19} and placenta²⁰. Multiple molecular forms of DPP-IV were

also identified in normal and cancer lung tissues²¹ and in glioma cells *in vitro*^{22,23}. Interestingly, chemically induced differentiation of C6 glioma cells was accompanied by changes in the proportion of the DPP-IV isoforms²³. In T lymphocytes, Kahne et al. identified 11 immunoreactive molecular forms of DPP-IV with pI range between 3.5 and 5.9. In addition, the expression pattern and subcellular localization of these isoforms was affected by the mitogenic stimulation of the cells²⁴. The data on recombinantly produced DPP-IV suggest that the heterogeneity of molecular forms of DPP-IV may in part be a consequence of the differential glycosylation of the enzyme²⁵.

In contrast to DPP-IV for which only one mRNA has been reported²⁶, two alternative splicing forms of FAP were found in melanoma cells: one encoding a 97 kDa full-length transmembrane monomeric form and a shortened form encoding the 50–70 kDa C terminal part of the protein containing the catalytic region, but lacking a large part of the N terminal including the whole transmembrane and intracellular domain²⁷. Furthermore, transgenic FAP lacking the cytoplasmic and transmembrane domains was converted into 50–70 kDa forms by putative EDTA-sensitive activators and the resulting shortened forms of FAP exhibited up to a 7 fold increase in the gelatinolytic activity²⁸. In addition, the FAP amino acid sequence contains 5 potential glycosylation sites¹⁵, which may give rise to the existence of molecular forms similarly to DPP-IV. Their presence has nevertheless not been explored so far. Our study for the first time analyzes the molecular forms of DPP-IV and FAP in human glioma tissues and their possible origin.

MATERIAL AND METHODS

Brain tissue samples

Brain tissue samples were collected from 51 patients undergoing astrocytic tumor resection, non-tumorous brain specimens were obtained from 15 patients in whom brain surgery was performed for drug-resistant temporal lobe epilepsy¹². Written informed consent was obtained from the patients before their entry into the study according to the guidelines of institutional Ethics Committee conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The tumors were graded in compliance with the 2007 WHO Classification Criteria. Tissue samples, clear of macroscopic vessels and necrosis, were frozen on solid CO₂ and then stored at -80 °C.

Human glioma cell lines

U138MG, U87MG and U118MG (WHO grade IV, acquired from Cell Line Services, Germany) were cultured on the Nunc tissue plastic (Thermo scientific, Langensfeld, Germany) in the Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, Prague, Czech Republic) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS; Sigma) under a humidified (90%) atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37 °C.

Non-denaturing, non-reducing SDS polyacrylamide electrophoresis (SDS PAGE)

Tissue samples were homogenized in ice-cold phosphate buffered saline (PBS) pH 6.0 with an Ultra-Turrax homogenizer fitted with an S8N-5G probe (IKA, Staufen, Germany) to a final 15% w/v concentration. Homogenates were mixed 1:1 with a lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, containing 1 mM EGTA, 1 mM Na₂EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and 10% glycerol) supplemented with protease inhibitors (final concentration pepstatin A 25 µM, AEBSF 200 µM, E-64 50 µM) and centrifuged at 27 000 g, 4 °C for 30 min. Total cell lysates (10 x 10⁶ cells/mL) were prepared on ice in a lysis buffer supplemented with protease inhibitors. To preserve the native enzyme structure and enzymatic activity, all samples were analyzed under non-reducing and non-denaturing conditions in discontinuous (4% stacking, 7% resolving) 1.5mm gels. Samples were mixed with 4x Laemmli sample buffer, 40 µg of total protein assayed according to Lowry²⁹ were loaded on the gels. The separation was carried out in an electrode buffer containing 25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% SDS, pH 8.3 at constant voltage (60 V for 30 min followed by 140 V for 90 min).

ELISA

The DPP-IV and FAP proteins were assayed in tissue lysates by DuoSet DPP-IV and DuoSet FAP ELISA kits (DY1180 and DY3715, R&D Systems, Abingdon, UK) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the 96-well transparent plate was coated by capture antibodies diluted in PBS (anti DPP-IV, cat.no. 842127, 2 µg/mL and anti FAP, cat.no. 842997, 1 µg/mL; overnight incubation at room temperature (RT)). After washing and blocking the plate in 1% bovine serum albumin in PBS, the samples were applied for two hours. After washing, biotinylated detection antibodies (1 µg/mL) and streptavidin-horseradish peroxidase were applied. Substrate Reagent Pack (DY999, R&D Systems) was used for the visualization. The reaction was terminated by 2M sulphuric acid. The absorbance of samples was measured at 450 nm using the microplate reader Sunrise (Tecan, Malmendorf, Switzerland). The measured absorbance values were corrected by subtracting the absorbance values obtained at a reference wavelength of 570 nm. The resulting differential absorbance values were used for the constructing the calibration curves and data evaluation.

Western blot analysis (immunoblotting)

Gels were equilibrated in Bjerrum and Schafer-Nielsen transfer buffer containing 20% methanol. Proteins were transferred onto the PVDF membrane using a semidry blotting system (Bio-Rad, USA). PVDF membranes were thoroughly rinsed in 0.05% Tween 20 in Tris Buffer Saline pH 7.5 (0.05% TTBS) and blocked in 5% non-fat dry milk (NFDM) prior to incubation with the primary antibodies at 4 °C, overnight. Membrane washing in TTBS was followed by incubation with a horse-reddish peroxidase conjugated secondary antibody at RT for 60 min. The used antibodies are listed in Table I. The blots were de-

Table 1. Antibodies used for immunoblotting.

Blocking Agent	Primary Antibody	Species/ clone/ Company	Dilution	Secondary Antibody	Species/ clone Company	Dilution
5% NFDm	Anti-Human DPP-IV	Rat, E19, Vitatex USA	1:1000	PreAdsorbed Anti-Rat, ab6257	Goat, Abcam UK	1:20000
5% NFDm	Anti-Human FAP	Rat, D8, Vitatex USA	1:5000	PreAdsorbed Anti-Rat, ab6257	Goat, Abcam UK	1:20000
5% NFDm	Anti-GAPDH	Rabbit, Merck-Millipore USA	1:1000	Anti-Rabbit	Sheep, Amersham UK	1:20000
5% NFDm	Membrane Fraction WB Cocktail	Ab140365 Abcam, UK	1:500	Secondary Antibody Cocktail	Ab140365 Abcam, UK	1:500

NFDm= non-fat dry milk

veloped using Luminata Forte (Merck-Millipore, USA) and exposed to a photographic film (Hyperfilm™ ECL, Amersham).

DPP-IV enzyme overlay assay

The exopeptidase activity of DPP-IV was visualized by an enzyme overlay assay using the fluorogenic substrate 7-(Glycyl-L-Prolylamido)-4-methylcoumarin (H-GP-AMC, final concentration 100 μM). Gels were equilibrated in phosphate buffer pH 7.5, a cellulose acetate membrane impregnated with the substrate was placed on the top of the gel and covered by a glass plate to prevent evaporation. The signal was visualized after 30 min incubation at 37 °C on a transilluminator (VilberLourmat, France) with an excitation wavelength of 360 nm.

Isoelectric focusing and 2D electrophoresis

Tissue samples or cells (10 million/mL) were mechanically homogenized in the sample/rehydration buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% w/v BioLyte 3/10 ampholytes, protease inhibitors) and incubated on an orbital shaker for 30 min at RT. Samples were cleared by centrifugation (27 000 g, 20 °C for 30 min). Protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad, USA) according to the manufacturer's instructions. 150 μg of total protein was loaded onto 7 cm long Immobilized pH gradient (IPG) strips (pH 3-10 or pH 4-7, Bio-Rad, USA), passive rehydration was performed at RT, for 12-16 h. Isoelectric focusing (IEF) was performed under the following conditions: 250 V for 20 min (linear ramp); 4 000 V for 120 min (linear ramp); 10 000 VH at 4 000 V (rapid ramp). After isoelectric focusing, the IPG strips were incubated in the equilibration buffer I (6 M urea, 30% glycerol, 2% CHAPS, 50 mM Tris pH 6.8 and 1% DTT) for 15 min followed by incubation in the equilibration buffer II (6 M urea, 30% glycerol, 2% CHAPS, 50 mM Tris pH 6.8 and 2.5% IAA) for additional 15 min. IPG strips were then either used for the visualization of the exopeptidase activity of DPP-IV by an enzyme overlay assay, or the separation on 8% polyacrylamide gels in the second dimension was performed at 140V.

Deglycosylation by peptide-N-glycosidase F

Deglycosylation by peptide-N-glycosidase F (PNGase F, E.C. 3.5.1.52, Sigma Aldrich, USA) was performed according to the manufacturer's instructions with the following modifications: cell lysates were prepared as described above and 20 μg of total native protein was subjected to deglycosylation by 0.01 unit of PNGase F at 37 °C for 24 h. Control samples were incubated without PNGase F under the same conditions. The samples were subsequently mixed with the 4x Laemmli sample buffer and separated using non-denaturing, non-reducing SDS PAGE.

Cell fractionation using continuous Percoll gradient

Cells were mildly homogenized in ice-cold isotonic medium (40 million/mL, 250 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂) pH 7.6 supplemented with protease inhibitors in a 2 mL Dounce-tissue grinder (SigmaAldrich, Mexico) for 5 min. Nuclei were removed by centrifugation at 250 g, 4 °C for 10min, the supernatant was applied on top of a 4 mL of 27.4% Percoll (Pharmacia, Sweden). Ultracentrifugation was performed at 65 000 g, 4 °C for 60 min (MTX 150 Sorvall, rotor S560-ST, ThermoScientific). 50 μL fractions were collected and individual subcellular compartments were identified using the Membrane Fraction WB Cocktail (Abcam, UK). For IEF, the samples were diluted 1:4 using the sample/rehydration buffer.

Immunocytochemistry

Cells were cultured on glass coverslips, fixed by 1:1 acetone:methanol for 2 min at RT. Nonspecific binding was blocked by 10% fetal calf serum plus 1% bovine serum albumin in Tris-buffered saline for 1 hour. The samples were incubated with the monoclonal primary antibodies anti-DPP-IV (clone MA 261, 1:100) or anti-FAP (clone F19, 56 μg/mL) overnight at 4°C, followed by AF 488 donkey anti-mouse IgG (A2120, ThermoFisher Scientific, 1:500, 1 h at RT). 400 μM ToPro (ThermoFisher Scientific) or 50 ng/mL Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) added to the solution of the secondary antibodies were used for nuclear counterstaining. The primary antibodies were omitted in the staining controls. Slides were mounted in Aqua Polymount (Polysciences, Eppelheim,

Germany) and viewed on the Olympus IX 81 confocal microscope equipped with the 488, 543 and 633 nm lasers (FluoView 300, Olympus, Prague, Czech Republic).

RESULTS

Expression of DPP-IV and FAP increases with increasing glioma grade

The expression of DPP-IV and FAP was analyzed in high-grade gliomas (grade IV; n=39, grade III; n=5), low-grade gliomas (grade II; n=7) and non-tumorous brain tissue (pharmacoresistant epilepsy; n=15). The concentration of both DPP-IV and FAP as determined by ELISA was significantly higher in glioblastomas (Fig. 1); for DPP-IV, the quantity determined by ELISA correlated with the DPP-IV enzymatic activity in tissue homogenates ($r=0.79$, $P<0.05$, data not shown). These data confirmed our previously reported results¹¹ in an independent patient cohort.

Molecular forms of DPP-IV and FAP in gliomas

All 66 patient samples were simultaneously analyzed using western blotting and an enzyme overlay assay after electrophoretic separation under non-denaturing, non-reducing conditions. The levels of DPP-IV and FAP were below the detection limit in all samples of the normal brain tissue (data not shown), but both molecules were detectable in grade III and IV gliomas (Fig. 2A). Substantial molecular heterogeneity of DPP-IV was present with up to three DPP-IV immunoreactive bands with an estimated molecular weight in the range of 140-160 kDa. The corresponding DPP-IV hydrolytic activity sensitive to a DPP-IV inhibitor was detected in the majority of these cases, suggesting the presence of enzymatically active molecu-

lar forms of canonical DPP-IV. Interestingly, in several samples containing only a single DPP-IV immunopositive band on WB, little or no enzymatic activity could be detected using the enzyme overlay assay (Fig. 2A). In contrast to several isoforms of DPP-IV, western blot analysis of the high-grade glioma tissue samples revealed only one molecular form of FAP with an electrophoretic mobility corresponding to 120-140 kDa (Fig. 2A).

Representative glioblastoma samples containing enzymatically active DPP-IV were further analyzed using isoelectric focusing. This confirmed the presence of several molecular forms of DPP-IV with the predominant isoform having pI 5.8. In some of the tumors additional isoforms with a more acidic (3.5-5.5) as well as alkaline (8.1) pI were detected (Fig. 2B). FAP immunodetection after 2D electrophoresis revealed the presence of two to three forms of FAP with an alkaline (7.0-8.5) pI and an estimated MW of 120-140 kDa (Fig. 2C).

Similarly to glioblastoma tissues, enzymatically active isoforms of DPP-IV with an electrophoretic mobility between 140-160 kDa were revealed in three permanent glioma cell lines (Fig. 2A). Using isoelectric focusing, the DPP-IV hydrolytic activity with a corresponding immunopositivity was detected predominantly at pI 5.8 with a MW of 140 kDa (Fig. 2D). In U118MG cells, which have the highest DPP-IV expression (data not shown), additional forms were detectable in the acidic region. FAP immunopositivity was only identified at an acidic pI between 4.2-4.8 (MW 140 kDa) and 5.8-6.2 (MW 140-200 kDa) in the three glioma cell lines.

Possible basis of the heterogeneity of DPP-IV and FAP molecular forms in glioma cells

Our previous results and literature data show that the majority of DPP-IV and FAP is present in the membrane

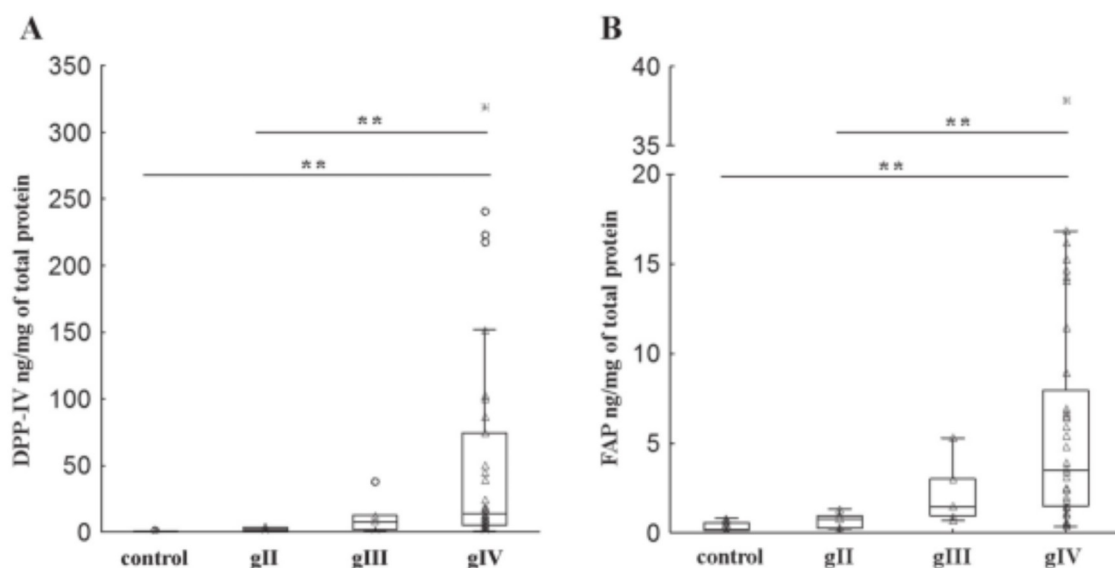


Fig. 1. DPP-IV and FAP expression in grade II-IV gliomas and non-tumorous brain tissue (pharmacoresistant epilepsy). Protein concentration of A) DPP-IV and B) FAP was assayed using ELISA. ** $P < 0.01$, Kruskal-Wallis test. Horizontal line- median, boxes- 25-75%, whiskers- range of non-remote values, white triangles- source data, white circles- remote values, asterisks- extremes.

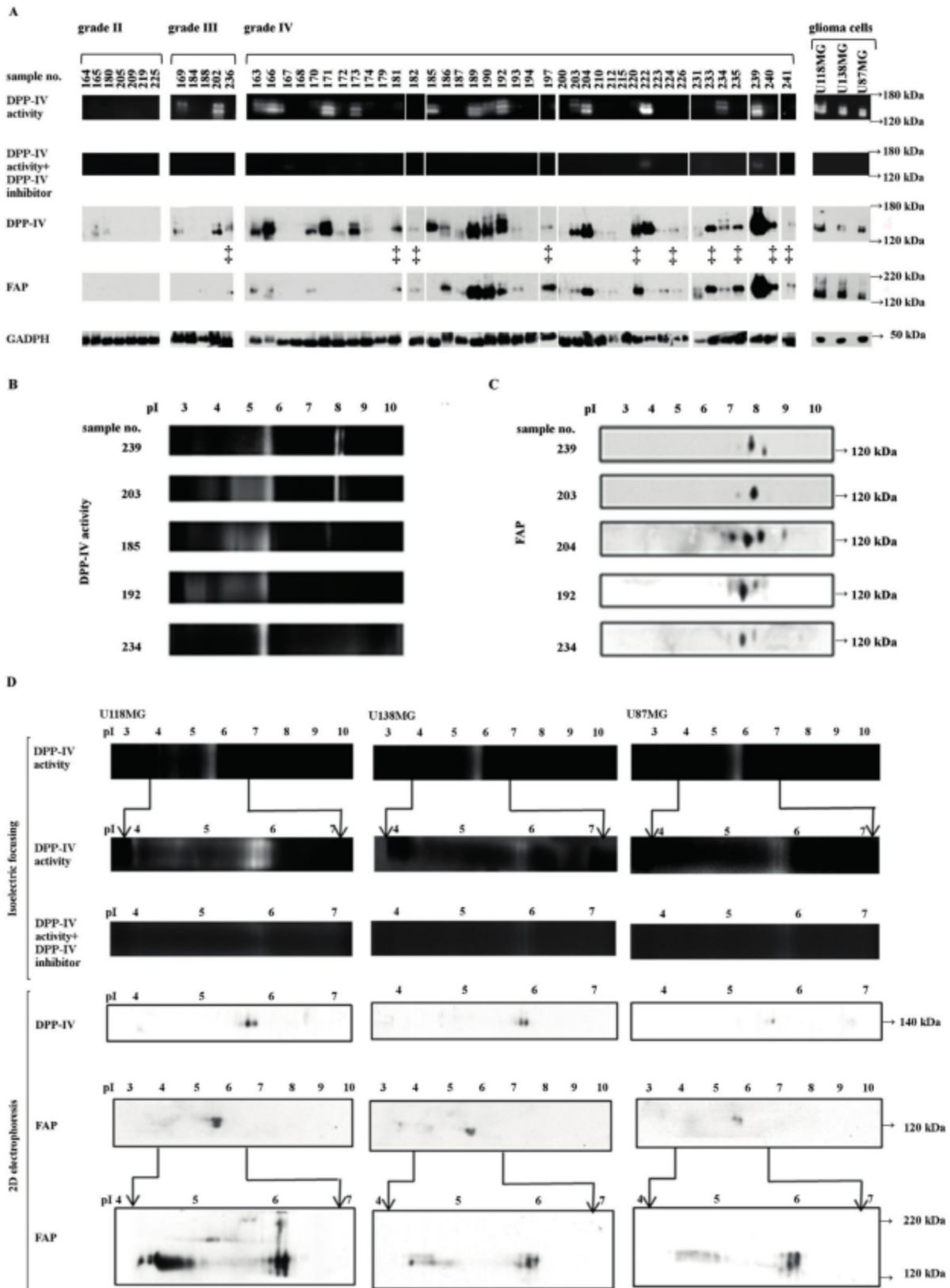


Fig. 2. Molecular forms of DPP-IV and FAP in human gliomas and glioma cell lines. A) Separation of DPP-IV and FAP molecular forms using SDS PAGE under non-denaturing and non-reducing conditions. DPP-IV enzymatic activity was detected using membrane overlay assay with and without a specific DPP-IV inhibitor. Immunodetection of DPP-IV, FAP and GAPDH was performed after transfer of the proteins to a PVDF membrane. Double dagger-tissues with a single DPP-IV band on WB without corresponding detectable DPP-IV enzymatic activity. GAPDH- glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. B) Detection of the DPP-IV enzymatic activity in glioblastomas after separation of the molecular forms by isoelectric focusing. C) Immunodetection of FAP in glioblastomas after separation of the molecular forms by 2D electrophoresis. D) Analysis of DPP-IV and FAP molecular forms in human glioma cell lines using isoelectric focusing and 2D electrophoresis.

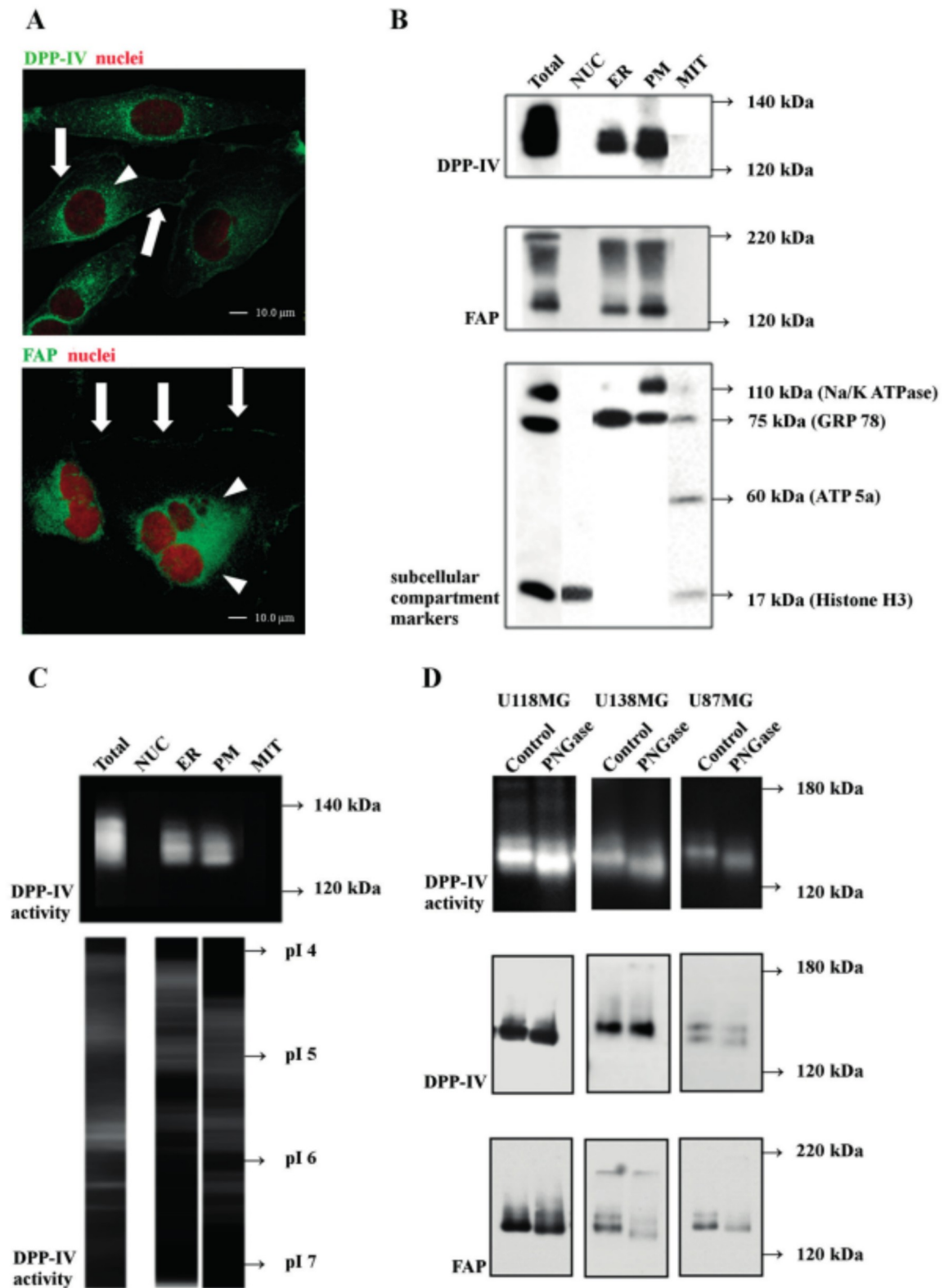


Fig. 3. Possible basis of the heterogeneity of DPP-IV and FAP molecular forms in glioma cells. **A)** Immunocytochemical visualization of DPP-IV and FAP in the plasma membrane (arrows) and intracellularly (arrow heads) in U118MG glioma cells. **B)** Immunodetection of DPP-IV, FAP and compartment markers in subcellular fractions in U118MG glioma cells. NUC= nuclear fraction, ER= endoplasmic reticulum fraction, PM= plasma membrane fraction, MIT= mitochondrial fraction. **C)** Detection of DPP-IV hydrolytic activity in subcellular fractions after SDS PAGE, and isoelectric focusing in U118MG glioma cells. **D)** Effect of deglycosylation on the electrophoretic mobility of DPP-IV and FAP molecular forms expressed in human glioma cell lines. PNGase F= peptide N-glycosidase F

fraction, possibly in the form of high molecular weight oligomeric complexes^{30,31}. However, in addition to the plasma membrane, both DPP-IV and FAP are also localized in various intracellular compartments^{32,33} (Fig. 3A). To assess whether the heterogeneity of molecular forms of DPP-IV and FAP reflects the presence of specific isoforms in subcellular compartments, cell fractionation using a continuous Percoll gradient was performed. Western blotting (Fig. 3B) and isoelectric focusing (Fig. 3C) confirmed that DPP-IV and FAP were dominantly present in the plasma membrane and the endoplasmic reticulum fractions. The estimated MW corresponded to the 140-160 kDa (DPP-IV) and 120-200 kDa (FAP) observed in glioma tissues. DPP-IV in the endoplasmic reticulum had dominantly an acidic pI between 4.4 and 5.1, while the pI of DPP-IV in the plasma membrane was more alkaline (4.8-5.8).

We further evaluated whether differential glycosylation might contribute to the heterogeneity of molecular forms of both molecules. Upon deglycosylation with PNGase F the estimated molecular weight decreased by approximately 10 kDa in comparison to non-treated samples. The overall pattern of molecular forms of both DPP-IV and FAP nevertheless remained unchanged (Fig. 3D). The removal of N-linked saccharides by PNGase F did not influence the hydrolytic activity of DPP-IV (data not shown).

DISCUSSION

Since the discovery of the multifunctional dipeptidyl peptidase-IV, several other proteases possessing similar enzymatic activity or sequence homology have been described and classified as "Dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologues" (DASH) (ref.³⁴). Of these, DPP-IV and its closest paralogue FAP are dominantly plasma membrane localized and were implicated in cancerogenesis, most probably by interacting with local regulatory as well as structural molecules present in the cancer microenvironment^{35,36}.

The presence of heterogeneous molecular forms of DPP-IV observed in various biological sources, including transformed astrocytic cells^{21,22}, led us to presume the existence of specific isoforms of both enzymes in glioblastoma.

In the current study, we observed a significantly higher expression of DPP-IV and FAP proteins in high-grade gliomas compared to the grade II astrocytoma and the normal brain tissue, which confirmed our previous results¹¹. There was a wide intertumoral variability in the expression of both molecules, possibly reflecting their differential expression in individual molecular subtypes of glioblastoma (ref.¹² and our unpublished data) and our unpublished data. FAP immunopositivity was detectable by WB in most of the high-grade glioma samples, but was absent in the DPP-IV negative gliomas. This is consistent with ours as well as other authors' reports suggesting the co-expression and possible coregulation of DPP-IV and FAP in glioma cells and tissues^{11,31}, human pancreatic alpha

cells³⁷ and in some cancer cell lines³⁸. The coexpression of DPP-IV and FAP was also described in endothelial cells, where both molecules are part of proteolytically active heteromeric aggregates with a molecular weight of 820 kDa, promoting cell migration and invasion³⁰.

We further demonstrate the presence of several enzymatically active forms of canonical DPP-IV in most of the high-grade gliomas. Using non-denaturing SDS PAGE, we show that the migration pattern of DPP-IV present in glioblastomas corresponds well with the one observed in glioblastoma cell lines. Interestingly, the pattern consisting of three molecular forms of the enzyme activity was restricted to the samples which in parallel exhibited more than one band of DPP-IV immunopositivity. This may be explained by the fact that the samples without detectable activity in the enzyme overlay assay had lower quantity of DPP-IV (measured by ELISA) and thus their enzymatic activity may be below the detection limit of the method. However, since we could not assess the specific enzymatic activity of individual DPP-IV isoforms, we cannot definitely exclude the existence of hydrolytically inactive isoform of DPP-IV in glioblastomas.

Isoelectric focusing revealed several isoforms of DPP-IV in glioblastomas and glioma cell lines, typically having an acidic pI in similar ranges as described for DPP-IV in human lymphocytes²⁴. Interestingly, alkalic isoforms were detected in several tissue samples but were not observed in any of the analyzed glioma cell lines. Thus, it is possible to presume that these alkalic isoforms might originate from other cellular source of DPP-IV within the glioblastoma tissue. Indeed, we previously described the expression of DPP-IV enzymatic activity in the microvasculature and mononuclear-like cells in glioblastomas³⁹. Alternatively, transformed glial cells could express different isoforms of DPP-IV when being in direct contact with other elements of the tumor microenvironment.

Immunodetection of FAP after native electrophoresis demonstrated only a single form, while the 2D electrophoretic separation revealed several isoforms of FAP in glioma tissue as well as in glioma cell lines. Previous studies reported a pI of 5 for FAP isolated from the human melanoma cell line LOX¹⁴, which corresponds with our results in glioma cells. Nevertheless to the best of our knowledge, the substantial molecular heterogeneity of FAP isoforms has not been observed so far. Interestingly, the isoforms detected in glioblastoma tissues exhibited more alkaline pI compared to the glioma cell lines. Similarly to DPP-IV, these isoforms may originate from the stromal cells expressing FAP in glioblastomas¹² or reflect the differences in FAP isoforms expressed by glioma cells *in vitro* and *in situ*.

Our previous results and literature data show that the majority of DPP-IV and FAP is present in the membrane fraction, possibly in the form of high molecular weight oligomeric complexes^{30,31}. However, in addition to the plasma membrane, both DPP-IV and FAP are also localized in various intracellular compartments^{32,33}. The expression pattern of individual MW isoforms of the enzymes was not substantially different between plasma membrane and endoplasmic reticulum, although acidic pI isoforms

of DPP-IV were more prevalent in the endoplasmic reticulum than in the plasma membrane fraction.

The molecular mechanisms responsible for the heterogeneity of DPP-IV and FAP remain to be identified. Removal of N-linked polysaccharides from both DPP-IV and FAP using PNGase did not influence the proportion of their isoforms, but only slightly shifted the whole pattern toward to the lower molecular weights. Similarly, literature data show that deglycosylation has no effect on the molecular heterogeneity of DPP-IV isolated from human leukocytes or placenta^{20,24}. The DPP-IV hydrolytic activity measured in the samples treated with PNGase F remained comparable to the control samples (data not shown), supporting the conclusion of Aertgeerts et al that deglycosylation of DPP-IV does not to affect its hydrolytic activity^{15,40}. Overall these data suggest that differential glycosylation does not play a major role in generating the variability of DPP-IV and FAP.

CONCLUSION

Using enzymatic and immunochemical methods, we describe for the first time that DPP-IV and FAP are present in various isoforms in high grade gliomas with a varying pattern in individual tumors. Part of this variability corresponds with the patterns observed in glioma cell lines; nevertheless the absence of alkaline isoforms of both enzymes in the glioma cell lines suggests possible contribution of the stromal cells to the pattern observed in glioblastoma tissues. The microheterogeneity of both enzymes is most probably not due to differential glycosylation.

Acknowledgement: This work was supported by Charles University projects GA UK No 67612 and UNCE 204013, Ministry of Health of the Czech Republic, grant No 15-31379A and EATRIS-CZLM2015064.

Author contributions: IM: manuscript writing, figures, data collection, analysis and interpretation;

PB: manuscript writing, data collection, analysis and interpretation; EB: data collection and analysis;

AS: manuscript writing, data interpretation.

Conflict of interest statement: The authors state that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

REFERENCES

- Taylor LP. Diagnosis, treatment, and prognosis of glioma: five new things. *Neurology* 2010; 75(18 Suppl 1):S28-32.
- Hou LC, Veeravagu A, Hsu AR, Tse VC. Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurg Focus* 2006;20(4):E5.
- Busek P, Prevorsek M, Krepela E, Sedo A. Glioma-Associated Proteases, in *Glioma Cell Biology*. 2014, Springer. p. 317-395.
- Wesley UV, Tiwari S, Houghton AN. Role for dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non small cell lung carcinoma cells. *Int J Cancer* 2004;109(6):855-66.
- Busek P, Stremenova J, Sedo A. Dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity bearing molecules in human brain tumors-good or evil? *Front Biosci* 2008;13:2319-26.
- Mentlein R, Hattermann K, Hemion C, Jungbluth AA, Held-Feindt J.

- Expression and role of the cell surface protease seprase/fibroblast activation protein-alpha (FAP-alpha) in astroglial tumors. *Biol Chem* 2011;392(3):199-207.
- Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)—role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* 1999;85(1):9-24.
- Park JE, Lenter MC, Zimmermann RN, Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem* 1999;274(51):36505-12.
- Chen WT, Kelly T, Ghersi G. DPP-IV, seprase, and related serine peptidases in multiple cellular functions. *Curr Top Dev Biol* 2003;54:207-32.
- Gorrell MD, Wang XM, Park J, Ajami K, Yu DM, Knott H, Seth D, McCaughan GW. Structure and function in dipeptidyl peptidase IV and related proteins. *Adv Exp Med Biol* 2006;575:45-54.
- Stremenova J, Krepela E, Mares V, Trim J, Dbaly V, Marek J, Vanickova Z, Lisa V, Yea C, Sedo A. Expression and enzymatic activity of dipeptidyl peptidase-IV in human astrocytic tumours are associated with tumour grade. *Int J Oncol* 2007;31(4):785-92.
- Busek P, Balaziová E, Matrasová I, Hilser M, Tomas R, Syruček M, Zemanová Z, Krepela E, Belacek J, Sedo A. Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. *Tumour Biol* 2016;37(10):13961-71.
- Busek P, Stremenova J, Sromova L, Hilser M, Balaziová E, Kosek D, Trylčová J, Strnad H, Krepela E, Sedo A. Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44(5): 38-47.
- Pineiro-Sanchez ML, Goldstein LA, Dodt J, Howard L, Yeh Y, Tran H, Argraves WS, Chen WT. Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease. *J Biol Chem* 1997;272(12):7595-601.
- Aertgeerts K, Levin I, Shi L, Snell GP, Jennings A, Prasad GS, Zhang Y, Kraus ML, Salakian S, Sridhar V, Wijanands R, Tennant MG. Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha. *J Biol Chem* 2005;280(20):19441-4.
- Cordero OJ, Imbernon M, Chiara LD, Martinez-Zorzano VS, Ayude D, de la Cadena MP, Rodriguez-Berrocal FJ. Potential of soluble CD26 as a serum marker for colorectal cancer detection. *World J Clin Oncol* 2011;2(6):245-61.
- Keane FM, Yao TW, Seelk S, Gall MG, Chowdhury S, Poplawski SE, Lai JH, Li Y, Wu W, Farrell P, Vieira de Ribeiro AJ, Osborne B, Yu DM, Seth D, Rahman K, Haber P, Topaloglu AK, Wang C, Thomson S, Hennessy A, Prins J, Twigg SM, McLennan SV, McCaughan GW, Bachovchin WW, Gorrell MD. Quantitation of fibroblast activation protein (FAP)-specific protease activity in mouse, baboon and human fluids and organs. *FEBS Open Bio* 2013;4:43-54.
- Krepela E, Kraml J, Vicar J, Kadlecová L, Kasafirek E. Demonstration of two molecular forms of dipeptidyl peptidase IV in normal human serum. *Physiol Bohemoslov* 1983;32(6):486-96.
- O'Mullan P, Craft D, Yi J, Kim C, Gelfand CA. High-Resolution Isoelectric Separation of Dipeptidyl Peptidase IV Facilitates Molecular Understanding of Posttranslational Modifications, Enzyme Activity, and a Link to Type II Diabetes. *Journal of Clinical Ligand Assay* 2007;30(3):90.
- Puschel G, Mentlein R, Heymann E. Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur J Biochem* 1982;126(2):359-65.
- Sedo A, Krepela E, Kasafirek E, Kraml J, Kadlecová L. Dipeptidyl peptidase IV in the human lung and spinocellular lung cancer. *Physiol Res* 1991;40(3):359-62.
- Medeiros Mdos S, Balmforth AJ, Vaughan PF, Turner AJ. Hydrolysis of atrial and brain natriuretic peptides by the human astrocytoma clone D384 and the neuroblastoma line SH-SY5Y. *Neuroendocrinology* 1991;54(3):295-302.
- Sedo A, Malik R, Krepela E. Dipeptidyl peptidase IV in C6 rat glioma cell line differentiation. *Biol Chem* 1998;379(1):39-44.
- Kahne T, Kroning H, Thiel U, Ulmer AJ, Flad HD, Ansoerge S. Alterations in structure and cellular localization of molecular forms of DP IV/CD26 during T cell activation. *Cell Immunol* 1996;170(1):63-70.
- Baer JW, Gerhartz B, Hoffmann T, Rosche F, Demuth HU. Characterisation of human DP IV produced by a *Pichia pastoris* expression system. *Adv Exp Med Biol* 2003;524:103-8.
- Bauvois B, Djavaheri-Mergny M, Rouillard D, Dumont J, Wietzerbin J. Regulation of CD26/DPP-IV gene expression by interferons and retinoic acid in tumor B cells. *Oncogene* 2000;19(2):265-72.

27. Goldstein LA, Chen WT. Identification of an alternatively spliced seprase mRNA that encodes a novel intracellular isoform. *J Biol Chem* 2000;275(4):2554-9.
28. Chen D, Kennedy A, Wang JY, Zeng W, Zhao Q, Pearl M, Zhang M, Suo Z, Nesland JM, Qiao Y, Ng AK, Hirashima N, Yamane T, Mori Y, Mitsumata M, Ghersi G, Chen WT. Activation of EDTA-resistant gelatinases in malignant human tumors. *Cancer Res* 2006;66(20):9977-85.
29. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
30. Ghersi G, Zhao Q, Salamone M, Yeh Y, Zucker S, Chen WT. The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. *Cancer Res* 2006;66(9):4652-61.
31. Balaziová E, Busek P, Stremenová J, Sromová L, Krepela E, Lizcova L, Sedo A. Coupled expression of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein-alpha in transformed astrocytic cells. *Mol Cell Biochem* 2011;354(1-2):283-9.
32. Mori Y, Kono K, Matsumoto Y, Fujii H, Yamane T, Mitsumata M, Chen WT. The expression of a type II transmembrane serine protease (Seprase) in human gastric carcinoma. *Oncology* 2004;67(5-6):411-9.
33. Zhang M, Xu L, Wang X, Sun B, Ding J. Expression levels of seprase/FAPalpha and DPPIV/CD26 in epithelial ovarian carcinoma. *Oncol Lett* 2015;10(1):34-42.
34. Sedo A, Malik R. Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? *Biochim Biophys Acta* 2001;1550(2):107-16.
35. Iwata S, Morimoto C. CD26/dipeptidyl peptidase IV in context. The different roles of a multifunctional ectoenzyme in malignant transformation. *J Exp Med* 1999;190(3):301-6.
36. Ge Y, Zhan F, Barlogie B, Epstein J, Shaughnessy J, Jr., Yaccoby S. Fibroblast activation protein (FAP) is upregulated in myelomatous bone and supports myeloma cell survival. *Br J Haematol* 2006;133(1):83-92.
37. Busek P, Vanickova Z, Hrabal P, Brabec M, Fric P, Zavoral M, Skrha J, Kmochova K, Laclav M, Bunganic B, Augustyns K, Van Der Veken P, Sedo A. Increased tissue and circulating levels of dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology* 2016;16(5):829-38.
38. Wesley UV, Albino AP, Tiwari S, Houghton AN. A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. *J Exp Med* 1999;190(3):311-22.
39. Mareš V, Stremenová J, Lisá V, Kozáková H, Marek J, Syrůček M, Šoula O, Sedo A. Compartment- and malignance-dependent up-regulation of γ -glutamyltranspeptidase and dipetidylpeptidase-IV activity in human brain gliomas. *Histology and histopathology* 2012;27(7):931.
40. Aertgeerts K, Ye S, Shi L, Prasad SG, Witmer D, Chi E, Sang BC, Wijnands RA, Webb DR, Swanson RV. N-linked glycosylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26): effects on enzyme activity, homodimer formation, and adenosine deaminase binding. *Protein Sci* 2004;13(1):145-54.

8.2 PŘÍLOHA Č. 2

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

Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma

Petr Busek¹ · Eva Balaziová¹ · Ivana Matrasová¹ · Marek Hilser¹ · Robert Tomas² · Martin Syrucek³ · Zuzana Zemanová⁴ · Evzen Krepela¹ · Jaromir Belacek⁵ · Aleksi Sedo¹

Received: 23 March 2016 / Accepted: 15 July 2016 / Published online: 4 August 2016
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2016

Abstract Glioblastomas are deadly neoplasms resistant to current treatment modalities. Fibroblast activation protein (FAP) is a protease which is not expressed in most of the normal adult tissues but is characteristically present in the stroma of extracranial malignancies. FAP is considered a potential therapeutic target and is associated with a worse patient outcome in some cancers. The FAP localization in the glioma microenvironment and its relation to patient survival are unknown. By analyzing 56 gliomas and 15 non-tumorous brain samples, we demonstrate increased FAP expression in a subgroup of high-grade gliomas, in particular on the protein level. FAP expression was most elevated in the mesenchymal

subtype of glioblastoma. It was neither associated with glioblastoma patient survival in our patient cohort nor in publicly available datasets. FAP was expressed in both transformed and stromal cells; the latter were frequently localized around dysplastic blood vessels and commonly expressed mesenchymal markers. In a mouse xenotransplantation model, FAP was expressed in glioma cells in a subgroup of tumors that typically did not express the astrocytic marker GFAP. Endogenous FAP was frequently upregulated and part of the FAP⁺ host cells coexpressed the CXCR4 chemokine receptor. In summary, FAP is expressed by several constituents of the glioblastoma microenvironment, including stromal non-malignant mesenchymal cells recruited to and/or activated in response to glioma growth. The limited expression of FAP in healthy tissues together with its presence in both transformed and stromal cells suggests that FAP may be a candidate target for specific delivery of therapeutic agents in glioblastoma.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13277-016-5274-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Petr Busek
busekpetr@seznam.cz

✉ Aleksi Sedo
aleksi@cesnet.cz

¹ Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, U Nemocnice 5, 128 53 Prague 2, Czech Republic

² Department of Neurosurgery, Na Homolce Hospital, Roentgenova 2, 150 30 Prague 5, Czech Republic

³ Department of Pathology, Na Homolce Hospital, Roentgenova 2, 150 30 Prague 5, Czech Republic

⁴ Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, U Nemocnice 2, 128 01 Prague 2, Czech Republic

⁵ Institute of Biophysics and Bioinformatics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Salmovská 1, 120 00 Prague 2, Czech Republic

Keywords Fibroblast activation protein α · Serpinase · Glioma · Serine protease · Stromal cells

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM, WHO grade IV glioma) is the most common type of astrocytic tumors. The patient prognosis is dismal due to a highly infiltrative growth and the resistance of glioma cells to conventional chemotherapy and radiotherapy. Novel therapeutic targets are therefore needed. Similarly to other human malignancies, glioblastomas contain genotypically and phenotypically heterogeneous malignant cells and also various types of non-transformed cells. These comprise microglia/macrophages and other immune cells, endothelial cells, pericytes/smooth muscles cells, reactive

astrocytes, and various progenitor cells recruited from the bone marrow [1].

Fibroblast activation protein alpha (FAP, seprase, EC3.4.21. B28) is a dipeptidyl peptidase and endopeptidase that was originally identified by the F19 antibody in *in vitro* cultured fibroblasts and several cancer cell lines [2]. Its expression in adult healthy tissues is sparse; FAP is predominantly expressed at sites of tissue remodeling such as healing wounds and cancers [2–6]. In tumors, FAP is mainly expressed in the tumor stroma in cancer-associated fibroblasts (CAF) (reviewed in [5, 6]). CAF contribute to tumor progression among others by releasing growth and angiogenesis-promoting mediators, by driving the epithelial-mesenchymal transition and by suppressing the immune response to the developing tumor. Although data are limited, FAP seems to participate in the tumor promoting properties of CAF. Koczorowska et al. showed the stimulatory effect of FAP on the secretion of TGF- β , proangiogenic factors, and proteins involved in the remodeling of the extracellular matrix (ECM) [7]. Another report suggested that FAP enzymatic activity contributed to the ECM remodeling by modulating the protein levels as well as the architecture of the ECM, which promoted pancreatic cancer cell motility [8]. In animal models of lung and pancreatic cancer, Lo et al. [9] further showed that the ablation of the FAP⁺ stromal cells reversed the tumor-induced desmoplasia, decreased tumor vascular density, and thus reduced tumor growth. Besides CAF, other stromal cells were reported to express FAP, including endothelial cells [10, 11] and a subpopulation of the CD45⁺ cells in breast cancer, the latter most probably representing tumor-associated macrophages [12, 13]. In pancreatic adenocarcinoma, ovarian carcinoma, and squamous cell carcinomas of the esophagus and oral cavity, FAP is expressed in the cancer cells as well [14]. In a cancer type-dependent manner, FAP is thought to contribute to the malignant potential of these transformed cells by both enzyme activity-dependent and independent mechanisms [15–18]. A meta-analysis of 15 immunohistochemical studies examining FAP expression in various extracranial solid cancers also demonstrated that a FAP overexpression is associated with a worse disease prognosis [19], further suggesting its important role in cancer progression.

Due to its unique expression profile and its presumed role in cancer progression, FAP is considered a potential therapeutic target. Indeed, several strategies of therapeutic FAP targeting were recently shown to be effective in pre-clinical models of extracranial malignancies [14].

Compared to the extracranial malignancies, the brain tumor microenvironment exhibits several unique characteristics. The fibrillary extracellular matrix proteins are less abundant [20], and the data on the presence of cells with properties similar to cancer-associated fibroblasts are limited [21, 22]. Based on the mRNA quantification, FAP upregulation in the brain tumor tissue was previously suggested by us and others [23–25]. On the basis of these studies and the reports showing FAP

expression in glioma cells *in vitro* [24, 26], the transformed glial cells are presumed to be the major cell population expressing FAP in the brain tumors. The quantity of FAP protein, its distribution among the constituents of the glioma microenvironment and its relation to glioma patient survival are unknown. Using human biopsy material and relevant preclinical *in vivo* glioma models, we demonstrate an increase of the FAP protein in the majority of high-grade gliomas, identify the contribution of non-malignant stromal cells to its upregulation in glioblastomas, and analyze its relation to patient survival.

Materials and methods (see supplementary information for details)

Patients and sample collection Tissue samples were obtained from 56 glioma and 15 pharmacoresistant epilepsy (controls) patients; tumors were graded according to the current WHO classification (Table 1). The study was approved by the institutional ethics committee and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all individual participants in the study.

qRT-PCR FAP mRNA was quantified by a coupled real-time RT-PCR assay as described previously [23]. Mouse transcripts in the xenotransplanted tumors were quantified using mouse-specific primers and TaqMan probes (Krepela et al., in preparation). The expression of the investigated mRNAs was normalized to the expression of β -actin or mouse DPP9 mRNA using the ΔC_T method.

ELISA and western blot analysis DuoSet FAP ELISA kit (R&D Systems) was used according to the manufacturer's recommendations. FAP detection by western blot analysis was performed using the D8 (Vitatex, USA) antibody under non-reducing and non-denaturing conditions.

Immunohistochemistry and confocal microscopy, FISH Immunohistochemistry was performed on frozen sections as described [4, 22]. D8 and D28 (Vitatex) and F19 monoclonal antibodies were used to detect human FAP; the three antibodies gave comparable results, and the best visualization of FAP positivity in GFAP⁺ cells was achieved using the D28 antibody. A rabbit polyclonal anti-FAP antibody (Abcam) was used to detect mouse FAP in the xenotransplants. Dual-color interphase FISH with the Vysis LSI EGFR SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen Probe (Abbott, USA) was performed according to the standard manufacturer's protocol. Slides were viewed on the Olympus IX 81 confocal microscope (FluoView 300).

Glioma cell lines and primary cell cultures and orthotopic xenograft glioma model Human glioma cell lines were obtained from ATCC (U373, U138) and CLS Cell Lines Service

Table 1 Characteristics of the patient cohort

Diagnosis	Age at operation (years)	Sex (M/F)	Entry Karnofsky index	Tumor volume (cm ³)
Control (<i>n</i> = 15)	43 (22–62)	4/11	100	–
Grade II (<i>n</i> = 7) (one OA, five FA, one OD)	36 (24–56)	6/1	100 (90–100)	22.66 (14.63–111.8)
Grade III (<i>n</i> = 5) (three AOD, two AOA)	62 (47–65)	4/1	100 (70–100)	51.22 (8.42–103.97)
Grade IV (<i>n</i> = 43) (38 GBM, 1 giant cell GBM, 5 GBM-O)	59 (39–79)	27/16	90 (30–100)	46.9 (7.97–126.45)

Median and range of the values are shown; control—pharmacoresistant epilepsy

AOD anaplastic oligodendroglioma, AOA anaplastic oligoastrocytoma, OA oligoastrocytoma, FA fibrillary astrocytoma, OD oligodendroglioma, GBM glioblastoma, GBM-O GBM with oligodendroglioma component

GmbH (U87, U251); primary cell cultures were derived from glioblastomas as described [26]. FAP expression and xenotransplant characteristics were highly similar for the U373 and U251 glioma cell lines used in this study supporting their presumed identity [27]. Glioma stem-like cell cultures were grown under serum-free conditions as gliomaspheres or on laminin [28]. The cell cultures derived under these conditions typically expressed the stem cell markers CD133 and Sox-2 and differentiated into GFAP and/or beta III tubulin-expressing cells in vitro (Supplementary Fig. 1). Xenotransplants were generated by implanting 10^5 – 10^6 cells into 6–10-week-old male NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J mice as described [26]. The use of animals was approved by the institutional commission and the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic.

Statistical and bioinformatics analyses To compare FAP expression among the individual glioblastoma molecular subtypes and to identify genes whose expression significantly, positively, or negatively correlated with the expression of FAP in glioblastomas, the expression data and assignment to individual glioblastoma molecular subtypes reported by Verhaak et al. [29] were used. The expression of transcripts in these 173 glioblastomas was normalized to the expression levels in healthy controls, and the log₂ value of this ratio was used for the analyses. Functional annotation and gene set enrichment analysis were performed using the DAVID database [30].

The Cox ordinal regression model and backward and forward algorithms were used to identify significant sets of variables predicting survival and the pseudo-likelihood R^2 for the Cox model, $LR(R^2) = 1 - \ln[L(\text{fitted})]/\ln[L(\text{null})]$ [31], a relative measure of the explained entropy, was calculated to compare the importance of the individual variables. The REMBRANDT database and the survival and FAP expression data from the Gravendeel [32] and The Cancer Genome Atlas (TCGA) datasets were used to evaluate the association of FAP expression with glioma survival in independent patient cohorts. For the construction of Kaplan-Meier plots, patients were

divided into groups based on FAP protein or mRNA expression: low expression = first quartile, medium expression = second + third quartile, high expression = fourth quartile. The multiple-sample test and two-sample tests were used to determine differences in survival between individual groups.

Results

FAP protein expression is increased in the majority of human high-grade gliomas

We analyzed the FAP expression in 56 patients with histologically verified newly diagnosed glioma and compared it to the expression in non-tumorous brain tissue (pharmacoresistant epilepsy, *n* = 15). On the mRNA level, there was a trend for increased FAP expression in glioblastomas compared to controls ($p = 0.074$, Mann-Whitney *U* test, Fig. 1a). Larger differences were observed when the quantity of FAP protein was determined using ELISA. FAP protein expression in gliomas grade dependently increased with statistically significant differences between glioblastomas and non-tumorous brain as well as grade II tumors. There was however considerable heterogeneity of FAP expression among individual high-grade gliomas (Fig. 1b). The upregulation of the FAP protein in a subgroup of glioblastomas was also corroborated by the western blot analysis (Fig. 1c). A band corresponding to a FAP dimer (estimated MW of 120–140 kDa under non-reducing, non-denaturing conditions) was detectable in a large proportion of glioblastomas, in only a minority of grade III tumors (data not shown) and in none of the analyzed control tissues and grade II tumors (data not shown).

In summary, our results show that FAP expression is substantially heterogeneous among glioblastomas but is increased in a large proportion of newly diagnosed tumors as compared to the non-tumorous brain tissue, particularly on the protein level. The correlation between mRNA and FAP protein expression as determined by ELISA was rather modest ($r = 0.32$, $p < 0.01$, Spearman correlation coefficient), suggesting that

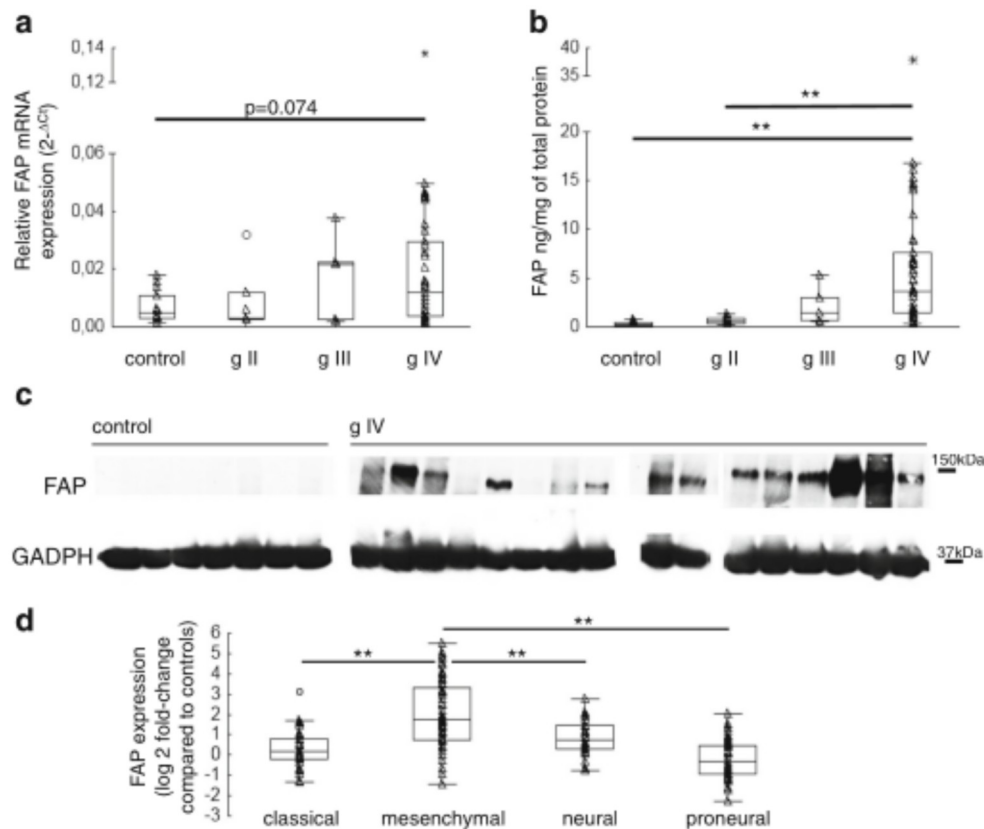


Fig. 1 Expression of FAP in gliomas. **a** FAP mRNA in control non-tumorous brain tissue (pharmacoresistant epilepsy) and grade II–IV gliomas. Mann-Whitney *U* test was used for the comparison of control and grade IV. **b** Quantification of FAP protein in control and glioma grade II–IV tissue lysates by ELISA. $**p < 0.01$, Kruskal-Wallis test. **c** Detection of FAP by western blotting in control and glioma tissues (D8 antibody).

GAPDH glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. **d** FAP mRNA expression in the molecular subtypes of glioblastomas based on the TCGA data. $**p < 0.01$, ANOVA, Tukey post hoc test. *horizontal line*—median, *boxes*—25–75 %, *whiskers*—range of non-remote values, *white triangles*—source data, *white circles*—remote values, *asterisks*—extremes

regulation of FAP expression on the posttranscriptional level may be important in gliomas.

Association of the FAP expression with the glioblastoma mesenchymal subtype

To determine whether part of the observed variability of the FAP expression in glioblastomas may be related to its differential expression in the various molecular subtypes of glioblastomas, we used the TCGA expression data and the assignment of individual tumors to a particular molecular subtype reported by Verhaak et al. [29]. Compared to other subtypes, FAP expression was significantly more upregulated in the mesenchymal subtype with over 70 % of the mesenchymal tumors exhibiting at least a twofold upregulation compared to the controls. In contrast, the classical and proneural subtypes only exhibited a minimal FAP upregulation (Fig. 1d).

We further performed a gene set enrichment analysis of the transcripts significantly positively correlating with FAP in the Verhaak dataset, which revealed an overrepresentation of genes encoding various extracellular matrix proteins (e.g., fibronectin, various types of collagens,

laminin, lumican) and factors involved in inflammation and wound healing (e.g., chemokines CCL2, CCL26, and CXCL12; chemokine receptors CCR2 and CXCR4; interleukin (IL)-15, interleukin receptor IL2RA; and TGF receptor TGFBR2). FAP expression also positively correlated with the transcripts for the proteases ADAM metallopeptidase domain 12; caspases 4, 5, and 7; cathepsins K and S; dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV); and the plasminogen activator urokinase receptor (UPAR). In contrast, the most negatively correlated transcripts encoded proteins involved in neurogenesis and neuronal signaling (Supplementary Table 1).

In our patient cohort, we validated the positive correlation of FAP with the homologous protease DPP-IV on both the mRNA (Spearman $r = 0.47$, $p = 0.003$) and protein (Spearman $r = 0.49$, $p = 0.002$) level.

Patterns of FAP expression in human gliomas

Using freshly frozen bioptic material from glioma patients and a panel of monoclonal antibodies, FAP expression was evaluated by immunohistochemistry in 46 gliomas. Three patterns

of FAP immunopositivity were found: fibrillary intraparenchymal positivity, predominantly perivascular positivity, and the presence of both intraparenchymal and perivascular positivity (Fig. 2a).

The fibrillary intraparenchymal FAP positivity was present in 65 % of the tested glioblastomas and colocalized with the astrocytic marker GFAP. Part of these intraparenchymal FAP⁺ cells also expressed SOX-2, a marker of multipotent neural and glioma stem cells, further supporting their malignant origin (Fig. 2b).

In addition to the FAP positivity of intraparenchymal cells, we observed the presence of FAP⁺GFAP⁻ cells in 65 % of human glioblastomas ($n = 34$), 29 % of grade II ($n = 7$) and 40 % of grade III ($n = 5$) tumors. These cells were absent in the non-malignant brain tissue ($n = 10$). We analyzed, whether the EGFR amplification, a molecular aberration typical for glioma cells [33], is present in these FAP⁺GFAP⁻ cells. In three different glioblastomas exhibiting EGFR amplification, FAP expression was almost exclusively localized in the cells with unamplified EGFR (Fig. 2c), suggesting that they may represent a distinct subpopulation of glioma cells or, more likely, stromal cells. Interestingly, we did not detect EGFR amplification in any of the four tested tumors with intraparenchymal FAP⁺GFAP⁺ cells.

Using double-immunofluorescence staining, the elongated FAP⁺GFAP⁻ cells were often detected around dysplastic tumor vessels (Fig. 2d) and were negative for the markers of microglia (Iba1) and endothelial cells (von Willebrand factor). FAP expression in these cells colocalized with typical mesenchymal markers (smooth muscle actin (SMA) and TE-7 [22]). The regions with FAP⁺GFAP⁻ cells also contained substantial amounts of the mesenchymal extracellular matrix protein fibronectin (Fig. 2e–g).

We further investigated whether hematopoietic cells originating in the bone marrow may contribute to the FAP⁺ stromal subpopulation in human glioblastomas by determining the coexpression of CD45 in FAP⁺ cells. Although the CD45 and FAP staining patterns were largely non-overlapping, sporadic CD45⁺FAP⁺ cells could be detected in several glioblastomas (Fig. 2h).

This data suggest that in addition to glioma cells, FAP is expressed by several other cellular types within the microenvironment of human glioblastomas.

FAP expression and its relation to glioma patient survival

FAP expression was reported as a possible negative prognostic factor in several extracranial malignancies [19]. Our analysis of the data from publicly available datasets comprising both low-grade and high-grade tumors (REMBRANDT and [32]) revealed that FAP expression was associated with glioma patient survival. However, as we demonstrate, FAP expression is typical for glioblastomas as compared to low-

grade tumors. Thus, the observed effect on survival is most likely due to the larger proportion of glioblastomas in the subgroups with higher FAP expression (Supplementary Fig. 2).

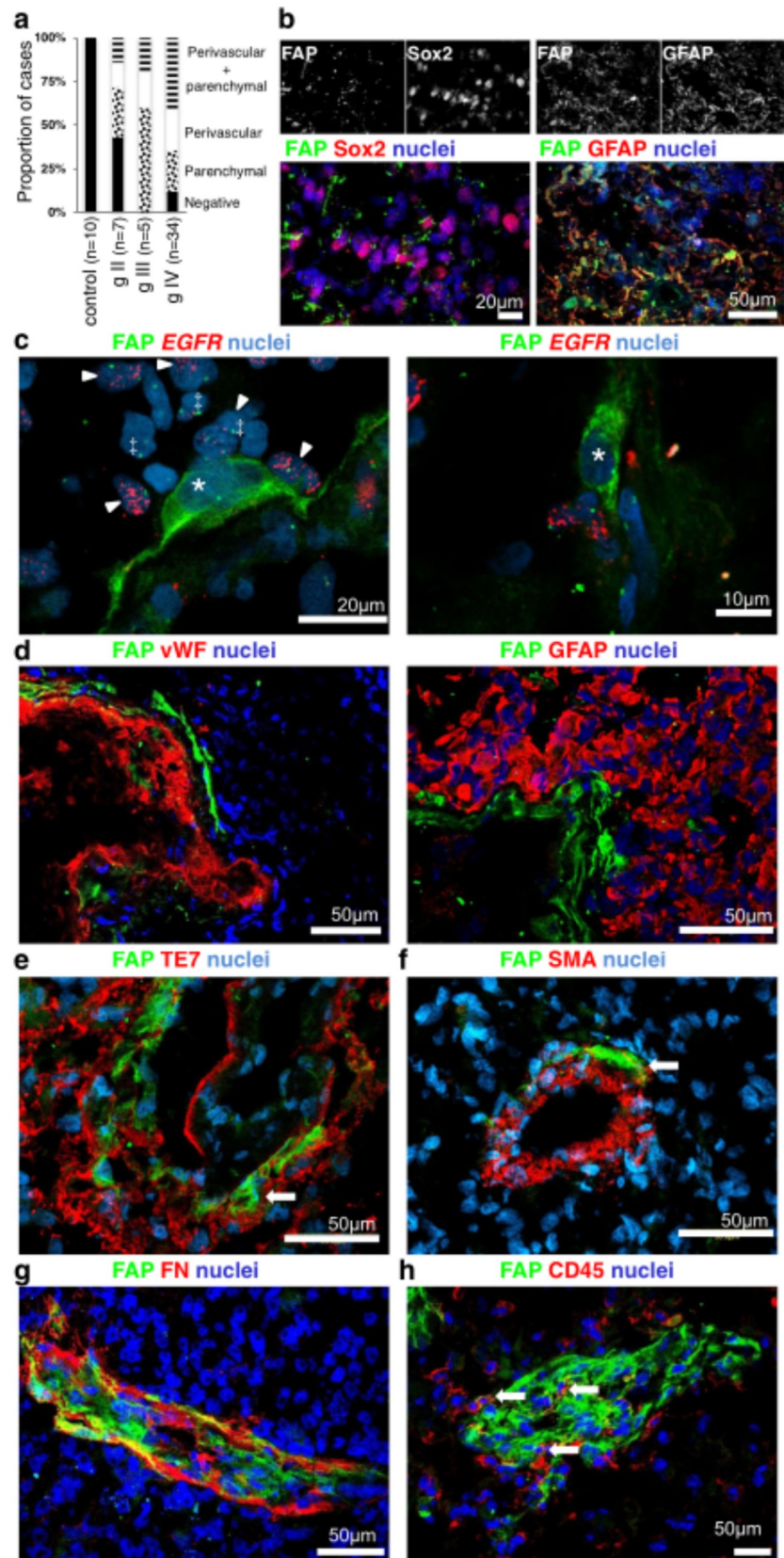
In our patient cohort, the median survival was 48 weeks for glioblastoma ($n = 42$) and at the time of last follow-up, 60 % of grade III ($n = 5$) and 100 % of grade II ($n = 7$) patients were alive. We used the Cox regression analysis to identify variables associated with the survival of glioma patients. A triad of tumor grade, age at operation, and tumor volume most strongly predicted patient survival in the whole experimental cohort (LR[R^2] = 16 %) and was independently identified by the backward and forward stepwise regression fit in the Cox model. In glioblastoma, the combination of patient age and the presence of residual tumor had the highest predictive power (LR[R^2] = 6.9 %). FAP expression as determined by qRT-PCR, ELISA, or western blotting neither alone nor in combination with the clinical variables was associated with patient survival in the whole patient cohort or in glioblastoma (Fig. 3a, b and data not shown). Similarly, our analysis of two different publicly available microarray datasets revealed no association between FAP expression and survival in grade IV tumors (glioblastomas, Fig. 3c, d).

FAP expression in a preclinical glioma model

FAP has recently received substantial attention as a possible therapeutic target in several malignancies (reviewed in [14]). In order to evaluate the expression of FAP in a clinically relevant animal model, various human glioma cell lines were orthotopically implanted in immunodeficient mice and the expression of FAP was evaluated. FAP protein was detected in the malignant glioma cells in xenotransplants generated from U87 and U138, but not from U373 (Fig. 4a) or U251 (not shown) cell lines corresponding with the *in vitro* FAP expression in these cells [34]. We further established xenotransplanted tumors using paired glioblastoma primary cell cultures that were expanded in serum containing media or cultured under serum-free conditions favoring the isolation of glioma stem-like cells [28]. FAP expression was frequently detected in the xenotransplanted malignant cells derived using the serum containing media, whereas it was in general absent in tumors derived from the glioma-stem like cells. Interestingly, the FAP positivity of glioma cells in the xenotransplants was almost exclusively associated with the absence of GFAP expression in these cells (Fig. 4b).

Using the orthotopic mouse glioma model, we evaluated the expression of FAP in host (mouse) stromal cells. In 19 paired samples comprising xenografts from human U373 ($n = 6$), U138 ($n = 8$), and U87 ($n = 5$) cell lines and corresponding contralateral hemispheres, there was a significant upregulation (median 3.4; range 0.61–51.0) of the endogenous mouse FAP transcript as demonstrated using mouse-

Fig. 2 Patterns of FAP expression in gliomas. **a** Localization of the FAP expression as determined by immunohistochemistry in human control non-tumorous brain tissue (pharmacoresistant epilepsy) and grade II–IV gliomas. **b** Parenchymal FAP immunopositivity and its colocalization with GFAP and SOX-2 expression. **c** Detection of a perivascular FAP immunopositivity and EGFR amplification using fluorescence in situ hybridization. FAP expression was observed in cells without EGFR amplification (*asterisk*); some of these cells were in close contact with the malignant cells exhibiting EGFR amplification (*arrowheads*). *double daggers*—centromeric probes for chromosome 7. **d** FAP in the perivascular areas did not colocalize with the marker of endothelial (von Willebrand factor, *vWF*) or glial (glial fibrillary acidic protein, *GFAP*) cells. Colocalization of FAP in the perivascular regions in glioblastomas with **e** the mesenchymal markers TE-7, **f** smooth muscle actin (*SMA*), **g** fibronectin (*FN*), and **h** the hematopoietic cell marker CD45. *Arrows*—doublepositive cells



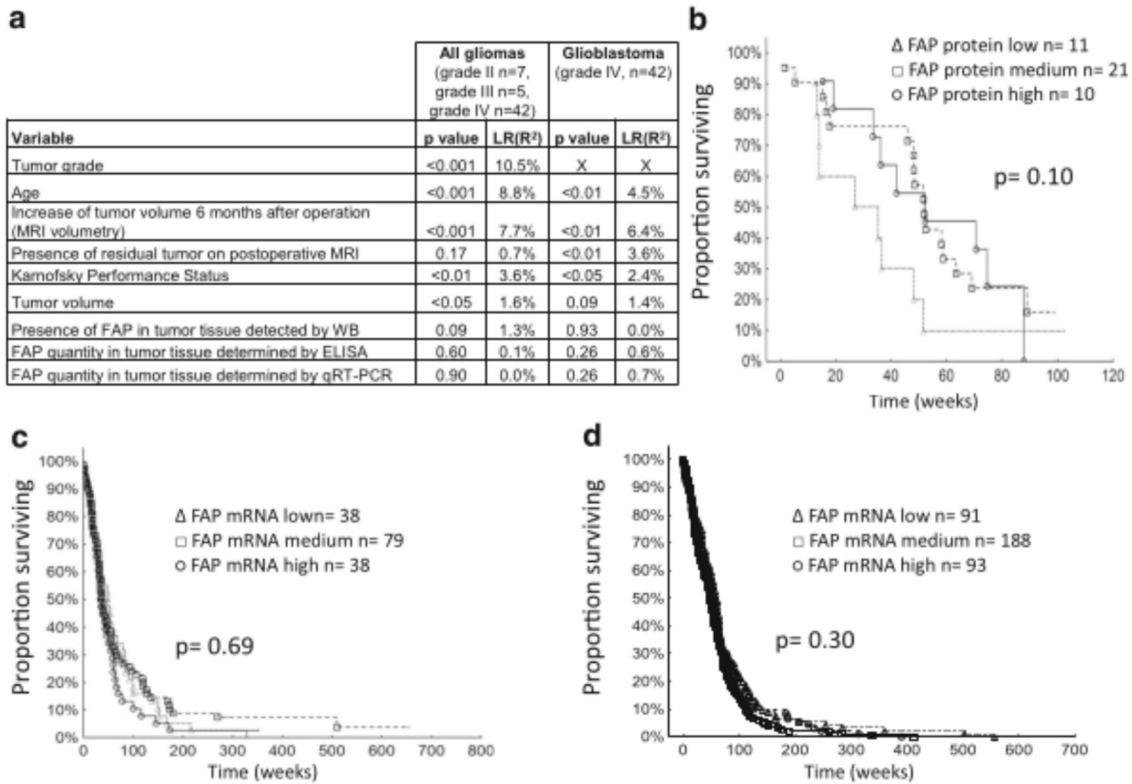


Fig. 3 FAP and glioblastoma patient survival. **a** Identification of factors associated with survival by Cox regression analysis in the studied cohort. The pseudo-likelihood R^2 for the Cox model LR(R^2) was used to compare the relative importance of individual variables. **b** The Kaplan-Meier survival plot of glioblastoma patients according to FAP protein concentration in the tissue determined by ELISA. **c**, **d** The Kaplan-

Meier survival plots of glioblastoma patients with differential FAP mRNA expression in **c** the Greavendeel [32] and **d** TCGA datasets. *White triangles*—low expression = first quartile, *white squares*—medium expression = second + third quartile, *white circles*—high expression = fourth quartile based on FAP protein or mRNA expression. *Plus signs* = censored data

specific qRT-PCR (Fig. 4c). We further detected FAP protein expression in mouse cells surrounding and infiltrating the experimental tumors by immunohistochemistry. There was a positive correlation ($r = 0.69$, $p < 0.001$, Spearman correlation coefficient) between mouse FAP and mouse CXCR4 transcripts in the xenotransplants, and part of the FAP⁺ cells coexpressed the CXCR4 chemokine receptor (Fig. 4d, e).

Collectively, this data suggest that in preclinical glioma models, FAP is expressed by transformed glial cells especially in GFAP-negative tumors. Similarly to epithelial cancers, FAP may be upregulated in resident or recruited stromal cells.

Discussion

Glioblastomas are highly malignant brain tumors resistant to treatment. FAP contributes to the progression in extracranial malignancies, is often associated with worse patient prognosis, and represents a potential therapeutic target. However, the data on FAP protein expression and localization in gliomas is so far limited. In this study, we demonstrate an increased expression of FAP in several cellular subpopulations present in the glioblastoma microenvironment and its association with

their mesenchymal features. In addition, we characterize mouse glioma models for the future evaluation of FAP-targeted therapies. Increased FAP expression was previously observed in various non-malignant states accompanied by the remodeling of extracellular matrix [5, 6]. To avoid the possible changes of FAP expression consequent to the reparatory processes induced by glioma radiotherapy, chemotherapy, or surgery, only patients without previous treatment were included in the study. Our results, obtained in a uniform and well-characterized patient cohort comprising 56 newly diagnosed gliomas, confirm and extend the previous observations by us and others that suggested higher FAP mRNA expression in glioblastomas [23–25]. Importantly, our current study reveals that especially the expression of FAP protein is grade-dependently increased in human gliomas. Results of earlier studies detecting FAP protein by immunohistochemistry were ambiguous. In the seminal works that characterized FAP as a cancer-associated antigen, Rettig et al. reported that none of the astrocytomas ($n = 12$) and high-grade astrocytomas ($n = 4$) exhibited FAP positivity as determined using the F19 antibody, although immunopositivity was detected in the majority of astrocytoma cell lines in vitro [2]. In contrast, based on the colocalization of FAP with GFAP and the proliferation marker

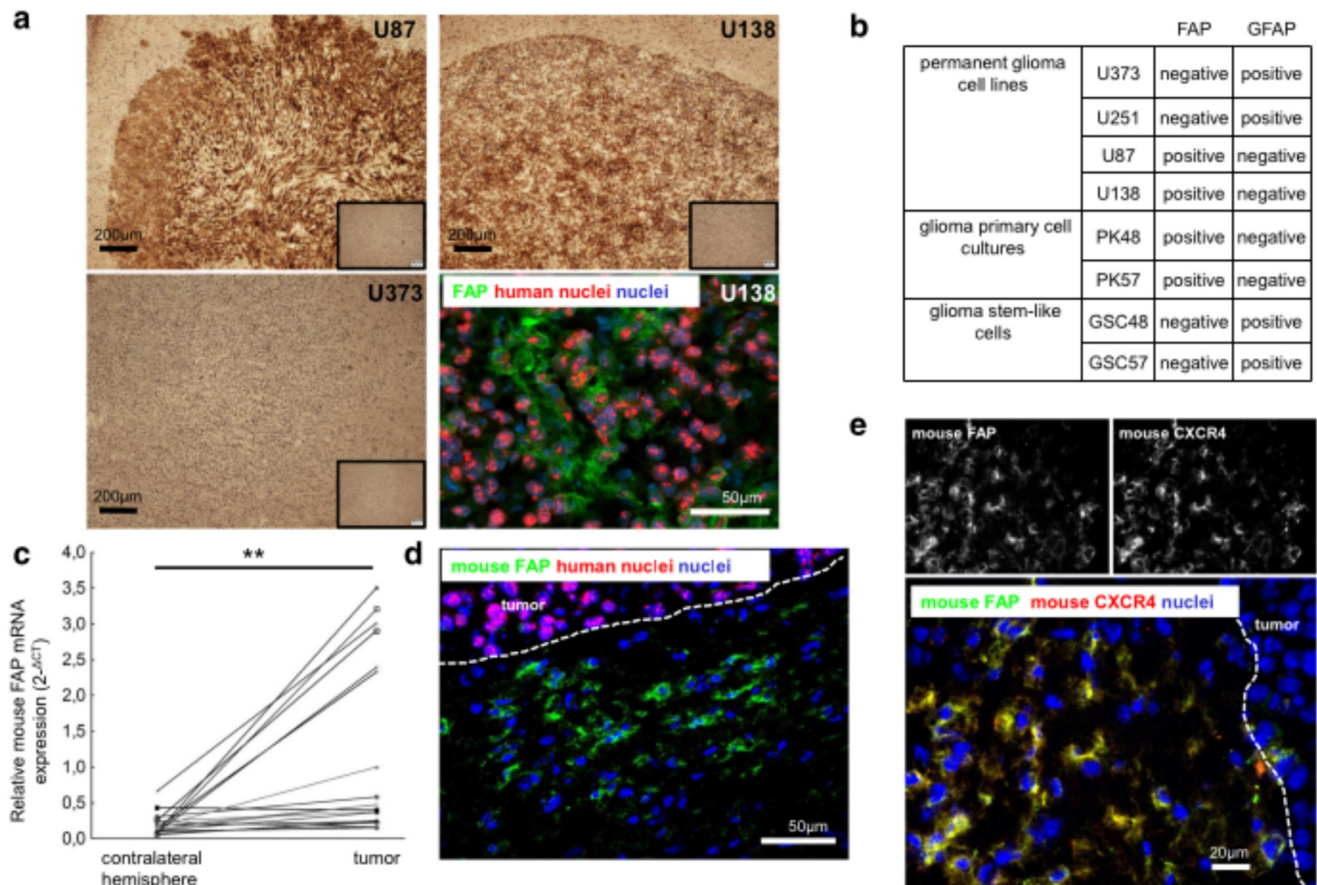


Fig. 4 FAP expression in experimental orthotopic glioma xenotransplants in immunodeficient mice. **a** FAP expression in xenotransplants derived from glioma cell lines U87, U138, and U373 (FAP immunopositivity in *brown*, nuclei counterstained with hematoxylin, insets—staining controls) and double-immunofluorescence labeling of a representative U138 xenotransplant using antibodies against FAP and human nuclei. **b** Summary of FAP and GFAP expression in orthotopically implanted malignant glioma cells

in immunodeficient mice. **c** Expression of mouse FAP mRNA in paired tissue samples in xenotransplanted tumors and contralateral brain hemispheres. Expression was normalized to the expression of mouse DPP9. $**p < 0.01$, $n = 19$, Wilcoxon signed-rank test. **d**, **e** Double-immunofluorescence labeling of a primary cell culture P57 xenotransplant using antibodies against mouse FAP and **e** human nuclei and **f** mouse CXCR4. Several FAP⁺ mouse cells outside of the tumor are seen; tumor margin is indicated by a *dashed line*

Ki67 in human glioblastomas, Mentlein et al. [24] concluded that FAP is expressed in glioma cells and/or activated astrocytes. Our data revealed intraparenchymal FAP positivity in 65 % of glioblastomas. In several cases, these cells coexpressed SOX-2, which was reported to be most abundantly expressed in hypercellular and proliferative areas in glioblastomas [35]. Our results thus strongly support the conclusion that malignant glioma cells *in situ* do express FAP.

Although not emphasized by the authors in previous studies [23, 24], FAP mRNA expression is considerably heterogeneous in glioblastomas. Our current data show that this also translates into greatly heterogeneous FAP protein expression. Based on the expression profiling and the presence of typical genetic aberrations, several molecular subtypes of glioblastomas were recently described [36]. Our analysis of FAP expression in individual glioblastoma molecular subtypes reported by Verhaak et al. [29] suggests that FAP is predominantly overexpressed in tumors of the mesenchymal subtype, and

its expression positively correlates with the expression of genes implicated in the remodeling of the extracellular matrix and inflammation. This is concordant with the presumed involvement of FAP in the processes of tissue remodeling [6] and the higher overall necrosis and associated inflammatory infiltrates in the mesenchymal glioblastoma subtype [29]. The increased expression of FAP in the mesenchymal glioblastoma subtype may also be linked to the proposed regulation of FAP expression by the mesenchymal transcription factor Twist in glioma cells [25]. Part of the intertumoral variability of FAP expression seen in glioblastomas may thus be explained by the uneven presence of FAP in the individual molecular subtypes of glioblastoma. We did not detect FAP expression in glioma cells in the tumors exhibiting EGFR amplification, the molecular aberration characteristic for the classical subtype, and EGFR amplification was detected in none of the tested samples exhibiting parenchymal FAP positivity. This suggests that FAP expression and EGFR amplification do

not typically occur together in glioma cells and further supports that individual molecular subtypes differ in FAP expression. Larger cohorts and a combination of genomic markers are needed to confirm this conclusion.

FAP is a negative prognostic factor in various malignancies [19], and in addition, the mesenchymal gene signature in glioblastoma is associated with worse patient survival [37]. We therefore aimed at determining whether FAP may be a prognostic marker in gliomas. Our analyses of the publicly available datasets ([32] and REMBRANDT database) suggested that higher FAP mRNA expression may be negatively associated with the survival of patients with gliomas, but this was most likely due to the fact that high FAP expression was typically associated with glioblastomas. When glioblastomas were analyzed separately, we observed no effect of FAP on patient survival. Similarly, FAP quantity as determined by qRT-PCR, ELISA, or WB was not associated with survival in our glioblastoma patient cohort. Together, the expression of FAP is characteristic for glioblastomas but contrary to several other malignancies, we could not confirm it as an independent predictor of patient survival.

Our study shows that stromal cells in human glioblastomas express FAP. The upregulation of FAP in the stroma of extracranial malignancies is well established [5], but to the best of our knowledge, we are the first to report similar phenomenon in primary brain tumors. The perivascularly localized FAP⁺ cells were GFAP negative. In addition, in tumors with EGFR amplification, this molecular alteration was not observed in the FAP⁺ cells, further supporting that these cells represent non-malignant stromal elements. These FAP⁺GFAP⁻ cells frequently expressed the mesenchymal marker TE-7, and in some cases, also SMA alpha, and were present in areas with abundant presence of the typical mesenchymal extracellular matrix protein fibronectin. There are various potential origins of these cells. The local source of cells with mesenchymal properties in glioblastomas may be pericytes, multipotent mesenchymal stromal cells [38], and fibroblasts. The presence of fibroblasts in the brain tumors is nevertheless not that well established as in other malignancies, although we [22] and others [21] have shown that cells with properties similar to cancer-associated fibroblasts are present in glioblastomas. Fibrocytes [6] are another possible source of FAP⁺ mesenchymal cells in glioblastomas. These cells are derived from CD14⁺ monocyte precursors, express the hematopoietic markers such as CD45, and migrate to sites of extracellular matrix remodeling [39]. Indeed, we detected CD45 expression in part of the FAP⁺ cells in glioblastomas suggesting their origin in the bone marrow. FAP expression in a subset of CD45⁺CD11b⁺CD14⁺MHCII⁺ cells was reported in human breast cancer. These cells were likely tumor-associated macrophages [12], but their antigenic profile is characteristic for fibrocytes as well [39]. It remains to be determined whether the FAP⁺ stromal cells contribute to glioma pathogenesis. The

FAP⁺ stromal mesenchymal cells were recently shown to have an important role in tumor-induced immunosuppression [13, 40], ECM production, and remodeling [8, 9] and may also contribute to angiogenesis [7–9]. Potentially, the FAP-mediated cleavage of antiplasmin leading to lowered fibrinolytic capacity [41] may also participate on the hypercoagulability and vaso-occlusive mechanisms that promote glioblastoma progression [42].

The expression of FAP in glioma cells and stromal elements was recapitulated in orthotopic xenotransplants in immunodeficient mice. Similarly to human glioblastomas, FAP was expressed only in a part of the model glioma cell lines and the FAP positivity in the xenotransplants was strongly associated with the absence of GFAP expression. The FAP⁺GFAP⁻ cell lines U87 and U138 exhibit higher expression of MMP2 and the mesenchymal marker fibronectin ([43] and our unpublished data). The mesenchymal transition [44] may contribute to the higher expression of FAP in tumors originating from primary cell cultures derived using serum containing media as compared to the glioma stem-like cell cultures. Our xenotransplantation model further allowed assessing the changes in the expression of FAP in stromal cells using mouse-specific qRT-PCR. Although variably, endogenous FAP was upregulated in the xenotransplantation model upon implantation of any of the three different glioma cell lines used. The presence of the CXCR4 chemokine receptor in part of the FAP expressing mouse cells suggests that in addition to the upregulation of FAP in resident stromal cells, cells attracted by the tumors may contribute to the observed upregulation of endogenous FAP.

FAP represents a potential target in cancer therapy. In some preclinical tumor models, low molecular FAP inhibitors or FAP downmodulation by shRNA inhibited cancer progression [45, 46]. Nevertheless, a FAP inhibitor Val-boroPro (Talabostat) and an unconjugated humanized anti-FAP antibody sibrotuzumab had minimal clinical activity in phase II clinical trials in patients with metastatic colorectal cancer [47, 48]. Other so far preclinical studies therefore exploited the selective expression of FAP in the tumor microenvironment to deliver cytotoxic compounds by FAP-targeted immunotoxins [49], immunoradioisotopes [50], or FAP-activated prodrugs [51] or to ablate FAP-positive cells by FAP-specific chimeric antigen receptor T cells [52] or vaccination against FAP [53]. These approaches do not rely on the direct pathogenetic role of FAP and have the potential to influence also FAP-negative malignant cells by a bystander effect and/or by the ablation of cancer-promoting stromal cells. Such therapies may potentially be applicable to a subgroup of glioblastoma patients with high FAP protein expression.

In conclusion, FAP protein expression is increased in the majority of human glioblastomas due to its upregulation in glioma cells as well as in various stromal populations that

are activated or possibly recruited in response to the glioma growth. FAP⁺ stromal cells characteristically expressing mesenchymal markers were present in the majority of glioblastomas. Although the functional role of FAP and FAP-bearing stromal cells for the progression of brain tumors is currently unclear, the expression of FAP in the glioblastoma microenvironment together with the restricted expression in healthy adult tissues makes it a possible target for the specific delivery of therapeutic agents. Our work thus also provides information on the preclinical models for the testing of new therapeutic modalities in glioblastoma.

Acknowledgments The work was supported by the grant from the Ministry of Health of the Czech Republic, Internal grant agency IGA 12237-5/2011. The authors thank Igor Romanko for assistance with CXCR4 immunohistochemistry and Zdislava Vanickova for the help with RNA isolation. The excellent technical assistance of Kvetoslava Vlasicova and Karin Roubickova is acknowledged. Special thanks go to Martin Prevorovsky for the help with the TCGA expression data.

Compliance with ethical standards

Funding This study was funded by the Ministry of Health of the Czech Republic, Internal grant agency IGA 12237-5/2011.

Conflicts of interest None.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

References

- Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia*. 2012;59(8):1169–80.
- Rettig WJ, Garin-Chesa P, Beresford HR, Oettgen HF, Melamed MR, Old LJ. Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(9):3110–4.
- Bae S, Park CW, Son HK, Ju HK, Paik D, Jeon CJ, et al. Fibroblast activation protein alpha identifies mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Br J Haematol*. 2008;142(5):827–30. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07241.x.
- Busek P, Hrabal P, Fric P, Sedo A. Co-expression of the homologous proteases fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase-IV in the adult human Langerhans islets. *Histochem Cell Biol*. 2015;143(5):497–504. doi:10.1007/s00418-014-1292-0.
- Kelly T, Huang Y, Simms AE, Mazur A. Fibroblast activation protein-alpha: a key modulator of the microenvironment in multiple pathologies. *International review of cell and molecular biology*. 2012;297:83–116.
- Jacob M, Chang L, Pure E. Fibroblast activation protein in remodeling tissues. *Current molecular medicine*. 2012;12(10):1220–43.
- Koczorowska MM, Tholen S, Bucher F, Lutz L, Kizhakkedathu JN, De Wever O, et al. Fibroblast activation protein-alpha, a stromal cell surface protease, shapes key features of cancer associated fibroblasts through proteome and degradome alterations. *Mol Oncol*. 2016;10(1):40–58. doi:10.1016/j.molonc.2015.08.001.
- Lee HO, Mullins SR, Franco-Barraza J, Valianou M, Cukierman E, Cheng JD. FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer*. 2011;11:245.
- Lo A, Wang LC, Scholler J, Monslow J, Avery D, Newick K, et al. Tumor-promoting desmoplasia is disrupted by depleting FAP-expressing stromal cells. *Cancer Res*. 2015;75(14):2800–10. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3041.
- Bhati R, Patterson C, Livasy CA, Fan C, Ketelsen D, Hu Z, et al. Molecular characterization of human breast tumor vascular cells. *Am J Pathol*. 2008;172(5):1381–90. doi:10.2353/ajpath.2008.070988.
- Aimes RT, Zijlstra A, Hooper JD, Ogbourne SM, Sit ML, Fuchs S, et al. Endothelial cell serine proteases expressed during vascular morphogenesis and angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2003;89(3):561–72.
- Tchou J, Zhang PJ, Bi Y, Satija C, Marjundar R, Stephen TL, et al. Fibroblast activation protein expression by stromal cells and tumor-associated macrophages in human breast cancer. *Hum Pathol*. 2013;44(11):2549–57. doi:10.1016/j.humpath.2013.06.016.
- Arnold JN, Magiera L, Kraman M, Fearon DT. Tumoral immune suppression by macrophages expressing fibroblast activation protein-alpha and heme oxygenase-1. *Cancer immunology research*. 2014;2(2):121–6. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0150.
- Hamson EJ, Keane FM, Tholen S, Schilling O, Gorrell MD. Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. *PROTEOMICS-Clinical Applications*. 2014;8(5–6):454–63. doi:10.1002/prca.201300095.
- Huang Y, Simms AE, Mazur A, Wang S, Leon NR, Jones B, et al. Fibroblast activation protein-alpha promotes tumor growth and invasion of breast cancer cells through non-enzymatic functions. *Clin Exp Metastasis*. 2011;28(6):567–79.
- Huang Y, Wang S, Kelly T. Sepsase promotes rapid tumor growth and increased microvessel density in a mouse model of human breast cancer. *Cancer Res*. 2004;64(8):2712–6.
- Yang W, Han W, Ye S, Liu D, Wu J, Liu H, et al. Fibroblast activation protein-alpha promotes ovarian cancer cell proliferation and invasion via extracellular and intracellular signaling mechanisms. *Exp Mol Pathol*. 2013;95(1):105–10. doi:10.1016/j.yexmp.2013.06.007.
- Wang H, Wu Q, Liu Z, Luo X, Fan Y, Liu Y, et al. Downregulation of FAP suppresses cell proliferation and metastasis through PTEN/PI3K/AKT and Ras-ERK signaling in oral squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1155. doi:10.1038/cddis.2014.122.
- Liu F, Qi L, Liu B, Liu J, Zhang H, Che D, et al. Fibroblast activation protein overexpression and clinical implications in solid tumors: a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(3):e0116683. doi:10.1371/journal.pone.0116683.
- Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(6):1046–69.
- Clavreul A, Guette C, Faguer R, Tetaud C, Boissard A, Lemaire L, et al. Glioblastoma-associated stromal cells (GASCs) from histologically normal surgical margins have a myofibroblast phenotype and angiogenic properties. *J Pathol*. 2014;233(1):74–88. doi:10.1002/path.4332.
- Trylcova J, Busek P, Smetana Jr K, Balaziová E, Dvorankova B, Mifkova A, et al. Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells in vitro. *Tumour Biol*. 2015;36(8):5873–9. doi:10.1007/s13277-015-3259-8.

23. Stremenova J, Krepela E, Mares V, Trim J, Dbaly V, Marek J, et al. Expression and enzymatic activity of dipeptidyl peptidase-IV in human astrocytic tumours are associated with tumour grade. *Int J Oncol*. 2007;31(4):785–92.
24. Mentlein R, Hattermann K, Hemion C, Jungbluth AA, Held-Feindt J. Expression and role of the cell surface protease seprase/fibroblast activation protein-alpha (FAP-alpha) in astroglial tumors. *Biol Chem*. 2011;392(3):199–207. doi:10.1515/BC.2010.119.
25. Mikheeva SA, Mikheev AM, Petit A, Beyer R, RG O, Khorasani L, et al. TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol Cancer*. 2010;9:194.
26. Busek P, Stremenova J, Sromova L, Hilser M, Balaziová E, Kosek D, et al. Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(5):738–47. doi:10.1016/j.biocel.2012.01.011.
27. Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol*. 1999;9(3):469–79.
28. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, et al. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell*. 2009;4(6):568–80.
29. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98–110.
30. da Huang W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44–57.
31. McFadden D. Conditional logit analysis of qualitative choice behavior. In: Zarembka P, editor. *Frontiers in econometrics*. New York: Academic Press; 1973. p. 105–42.
32. Gravendeel LA, Kouwenhoven MC, Gevaert O, de Rooij JJ, Stubbs AP, Duijijm JE, et al. Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res*. 2009;69(23):9065–72. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2307.
33. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007;170(5):1445–53.
34. Busek P, Stremenova J, Sedo A. Dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity bearing molecules in human brain tumors—good or evil? *Front Biosci*. 2008;13:2319–26.
35. Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Schiffer D. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer genomics & proteomics*. 2011;8(3):139–47.
36. Karsy M, Gelbman M, Shah P, Balumbu O, Moy F, Arslan E. Established and emerging variants of glioblastoma multiforme: review of morphological and molecular features. *Folia Neuropathol*. 2012;50(4):301–21.
37. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):157–73.
38. Appaix F, Nissou MF, van der Sanden B, Dreyfus M, Berger F, Issartel JP, et al. Brain mesenchymal stem cells: the other stem cells of the brain? *World journal of stem cells*. 2014;6(2):134–43. doi:10.4252/wjsc.v6.i2.134.
39. Reilkoff RA, Bucala R, Herzog EL. Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(6):427–35. doi:10.1038/nri2990.
40. Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, Jones JO, et al. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science*. 2010;330(6005):827–30.
41. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Dolence EK, McKee PA. Enhancement of fibrinolysis by inhibiting enzymatic cleavage of precursor alpha2-antiplasmin. *J Thromb Haemost*. 2011;9(5):987–96.
42. Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest*. 2004;84(4):397–405. doi:10.1038/labinvest.3700070.
43. Tremblay P, Beaudet MJ, Tremblay E, Rueda N, Thomas T, Vallieres L. Matrix metalloproteinase 2 attenuates brain tumour growth, while promoting macrophage recruitment and vascular repair. *J Pathol*. 2011;224(2):222–33. doi:10.1002/path.2854.
44. Paulus W, Huettner C, Tonn JC. Collagens, integrins and the mesenchymal drift in glioblastomas: a comparison of biopsy specimens, spheroid and early monolayer cultures. *Int J Cancer*. 1994;58(6):841–6.
45. Santos AM, Jung J, Aziz N, Kissil JL, Pure E. Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(12):3613–25.
46. Cai F, Li Z, Wang C, Xian S, Xu G, Peng F, et al. Short hairpin RNA targeting of fibroblast activation protein inhibits tumor growth and improves the tumor microenvironment in a mouse model. *BMB Rep*. 2013;46(5):252–7.
47. Narra K, Mullins SR, Lee HO, Strzemkowski-Brun B, Magalong K, Christiansen VJ, et al. Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting fibroblast activation protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2007;6(11):1691–9.
48. Hofheinz RD, al-Batran SE, Hartmann F, Hartung G, Jager D, Renner C, et al. Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibroutuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Onkologie*. 2003;26(1):44–8.
49. Fang J, Xiao L, Joo KI, Liu Y, Zhang C, Liu S, et al. A potent immunotoxin targeting fibroblast activation protein for treatment of breast cancer in mice. *Int J Cancer*. 2015. doi:10.1002/ijc.29831.
50. Fischer E, Chaitanya K, Wuest T, Wadle A, Scott, AM, van den Broek M et al. Radioimmunotherapy of fibroblast activation protein positive tumors by rapidly internalizing antibodies. *Clin Cancer Res*. 2012.
51. Akinboye ES, Brennen WN, Rosen DM, Bakare O, Denmeade SR. Iterative design of emetine-based prodrug targeting fibroblast activation protein (FAP) and dipeptidyl peptidase IV DPP-IV using a tandem enzymatic activation strategy. *Prostate*. 2016. doi:10.1002/pros.23162.
52. Wang LC, Lo A, Scholler J, Sun J, Majumdar RS, Kapoor V, et al. Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer immunology research*. 2014;2(2):154–66. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0027.
53. Lee J, Fassnacht M, Nair S, Boczkowski D, Gilboa E. Tumor immunotherapy targeting fibroblast activation protein, a product expressed in tumor-associated fibroblasts. *Cancer Res*. 2005;65(23):11156–63.

Příloha č. 3

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



Article

Regulation of Fibroblast Activation Protein by Transforming Growth Factor Beta-1 in Glioblastoma Microenvironment

Evzen Krepela¹, Zdislava Vanickova¹, Petr Hrabal², Michal Zubal¹, Barbora Chmielova¹, Eva Balaziova¹, Petr Vymola¹, Ivana Matrasova¹, Petr Busek^{1,*} and Aleksí Sedo^{1,*}

- ¹ Laboratory of Cancer Cell Biology, Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University, 128 53 Prague 2, Czech Republic; evzen.krepela@lf1.cuni.cz (E.K.); zvani@lf1.cuni.cz (Z.V.); michal.zubal@lf1.cuni.cz (M.Z.); barbora.chmielova@lf1.cuni.cz (B.C.); eva.balaziova@lf1.cuni.cz (E.B.); petr.vymola@lf1.cuni.cz (P.V.); ivana.matrasova@lf1.cuni.cz (I.M.)
- ² Department of Pathology, Military University Hospital Prague, 169 02 Prague 6, Czech Republic; petr.hrabal@uvn.cz
- * Correspondence: petr.busek2@lf1.cuni.cz (P.B.); aleksi.sedo@lf1.cuni.cz (A.S.); Tel.: +420-22496-5825 (P.B.); +420-22496-5735 (A.S.)

Abstract: The proline-specific serine protease fibroblast activation protein (FAP) can participate in the progression of malignant tumors and represents a potential diagnostic and therapeutic target. Recently, we demonstrated an increased expression of FAP in glioblastomas, particularly those of the mesenchymal subtype. Factors controlling FAP expression in glioblastomas are unknown, but evidence suggests that transforming growth factor beta (TGFbeta) can trigger mesenchymal changes in these tumors. Here, we investigated whether TGFbeta promotes FAP expression in transformed and stromal cells constituting the glioblastoma microenvironment. We found that both FAP and TGFbeta-1 are upregulated in glioblastomas and display a significant positive correlation. We detected TGFbeta-1 immunopositivity broadly in glioblastoma tissues, including tumor parenchyma regions in the immediate vicinity of FAP-immunopositive perivascular stromal cells. We demonstrate for the first time that TGFbeta-1 induces expression of FAP in non-stem glioma cells, pericytes, and glioblastoma-derived endothelial and FAP⁺ mesenchymal cells, but not in glioma stem-like cells. In glioma cells, this effect is mediated by the TGFbeta type I receptor and canonical Smad signaling and involves activation of FAP gene transcription. We further present evidence of FAP regulation by TGFbeta-1 secreted by glioma cells. Our results provide insight into the previously unrecognized regulation of FAP expression by autocrine and paracrine TGFbeta-1 signaling in a broad spectrum of cell types present in the glioblastoma microenvironment.

Keywords: glioblastoma; tumor microenvironment; transforming growth factor beta; fibroblast activation protein; seprase; regulation of expression; Smad2; signaling



Citation: Krepela, E.; Vanickova, Z.; Hrabal, P.; Zubal, M.; Chmielova, B.; Balaziova, E.; Vymola, P.; Matrasova, I.; Busek, P.; Sedo, A. Regulation of Fibroblast Activation Protein by Transforming Growth Factor Beta-1 in Glioblastoma Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1046. <https://doi.org/10.3390/ijms22031046>

Academic Editor: Michal Masarik
Received: 1 December 2020
Accepted: 18 January 2021
Published: 21 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Glioblastomas are genetically, epigenetically, and phenotypically highly heterogeneous and invariably lethal brain tumors which devastate brain tissues via their infiltrative and invasive growth [1]. They consist of different, phenotypically varied cancer and stromal cell types, such as mesenchymal, endothelial, and immune cells, all of which participate in creating a dynamic tumor microenvironment [2]. Proteolytic networks acting in the glioblastoma microenvironment are of critical importance in the process of gliomagenesis [3]. In a previous study, we demonstrated increased expression of fibroblast activation protein (FAP) in a large proportion of human glioblastomas and its localization in both transformed and stromal cells [4]. FAP, also known as seprase, is a dimeric type II transmembrane glycoprotein which exhibits catalytic activity of a serine protease (EC 3.4.21.B28) that can act as a dipeptidyl peptidase or endopeptidase on oligo- and polypeptide substrates and

preferentially cleaves post-proline peptide bonds [5–7]. FAP expression is very low in most healthy human tissues and cells, with the exception of multipotent bone marrow stromal cells [8], alpha cells of Langerhans islets [9], some dermal fibroblasts surrounding hair follicles [10], and skin melanocytes after ultraviolet irradiation [11]. Prominent FAP expression is, however, found in stromal cells including fibroblasts, fibroblast-like cells, and myofibroblasts at sites of active tissue remodeling, such as fibrosis, chronic inflammation, and healing wounds [5,12,13]. Moreover, FAP is frequently overexpressed in solid malignant tumors, where it is found in stromal cells, e.g., in cancer-associated fibroblasts and endothelial cells, and it is also present in premalignant and cancer cells [5,14–18]. Due to its frequent overexpression in the tumor microenvironment and its plasma membrane localization, FAP is considered a promising molecular target for the imaging and treatment of malignant tumors [19–21].

Current studies provide evidence that FAP can participate in complex processes that drive and maintain the progression of malignant tumors. These include cell proliferation, differentiation, signaling, adhesion, migration, extracellular matrix remodeling, epithelial–mesenchymal transition, angiogenesis, invasion, metastasis, and immunosuppression, although it seems that the role of FAP is highly context dependent and cell type specific [14,19,22,23]. Despite the expanding list of validated and candidate natural peptide and protein substrates of FAP [5–7], the biochemical functions of FAP in the abovementioned biological processes are not yet precisely understood. Alongside their proteolysis-dependent effects, membrane-bound FAP molecules can engage in binding interactions with other proteins, including those anchored in the plasma membrane and recruited in lipid rafts and invadopodia [24] or those present in the cell cytoplasm [25]. During its biogenetic trafficking, FAP may thus exhibit both proteolytic and non-proteolytic protein-recruiting and scaffolding functions.

Which factors control FAP expression in glioblastomas is currently unknown. Among the various molecular subtypes of glioblastomas, we observed the highest FAP expression in the mesenchymal subtype [4]. This glioblastoma subtype is associated with a more aggressive phenotype and with signaling pathways involved in wound healing and inflammation [26]. An important mediator of mesenchymal changes in glioblastomas is the transforming growth factor beta (TGFbeta) [27,28], a pleiotropic cytokine which exists in three isoforms (TGFbeta-1, -2, and -3), and by binding to TGFbeta receptors, triggers both Smad and non-Smad TGFbeta-activated intracellular signaling pathways [29,30]. Depending on the type and differentiation status of the cell as well as activities of other signaling pathways, TGFbeta induces epithelial–mesenchymal transition, activates angiogenesis, dampens immune responses, and promotes tumor invasiveness [31,32]. Since it has been shown that in some, but not all cell types, the *FAP* gene is a transcriptional target for TGFbeta signaling [23], we studied several cell types isolated from or serving as model systems for the complex glioblastoma microenvironment to assess whether TGFbeta participates in the upregulation of *FAP* gene expression in particular subpopulations of transformed and stromal cells typically present in glioblastomas.

2. Results

2.1. Expression of FAP and TGFbeta Isoforms in Human Glioblastomas

The levels of FAP protein (Figure 1A, left panel) and FAP enzymatic activity (Figure 1A, right panel) were substantially higher in glioblastomas than in non-tumorous pharmacoresistant epilepsy (PRE) brain tissues. In glioblastomas, the enzymatic activity of FAP displayed statistically significant positive correlation with FAP protein concentration (Figure 1D). The strength of this correlation was moderate, which may be due to differences in the relative concentrations of active FAP molecules [33]. ELISAs specific to the individual TGFbeta protein isoforms revealed that in glioblastomas, TGFbeta-1 was the most abundantly expressed TGFbeta isoform (Figure 1B). Further analysis revealed that the concentration of TGFbeta-1 protein was substantially higher in glioblastomas than in the

PRE brain tissues (Figure 1C). In glioblastomas, FAP and TGFbeta-1 protein concentrations showed a weak but statistically significant positive correlation (Figure 1E).

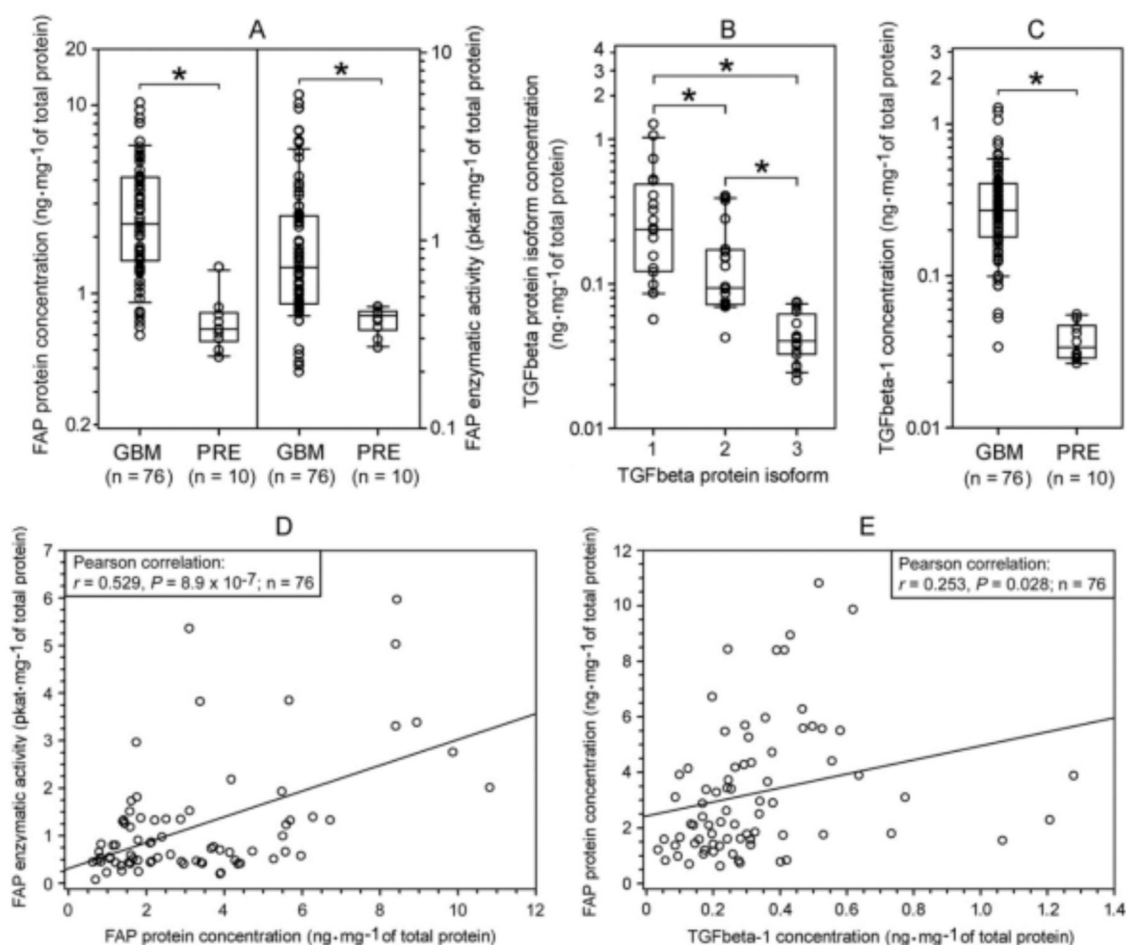


Figure 1. Expression of fibroblast activation protein (FAP) and transforming growth factor beta (TGFbeta) in human glioblastomas (GBMs). (A) Upregulation of FAP protein (left panel) and FAP enzymatic activity (right panel) levels in GBMs as compared to pharmacoresistant epilepsy (PRE) brain tissues. (B) Differential expression of TGFbeta protein isoforms in GBMs (n = 20). (C) Upregulation of TGFbeta-1 protein level in GBMs as compared to PRE brain tissues. (D) Relationship between the levels of FAP enzymatic activity and FAP protein in GBMs. (E) Relationship between FAP protein and TGFbeta-1 protein levels in GBMs. In (A–C), the sets of individual data points (each representing the mean of measurements in triplicate) are presented as a median with the box showing the 25th–75th percentile and whiskers indicating the 10th and 90th percentile. Note the logarithmic y-axis. In (A,C), * $p < 0.01$, Mann–Whitney rank sum test. In (B), * $p < 0.05$, Kruskal–Wallis one way ANOVA on ranks.

We previously reported that FAP was most prominently upregulated in the mesenchymal subtype of glioblastoma based on the data from 173 glioblastomas in The Cancer Genome Atlas (TCGA) database [4]. We now extended the analysis of the TCGA data to 505 primary glioblastomas and analyzed the expression of FAP and individual TGFbeta isoforms. Concordantly with the FAP protein data reported in the present study, FAP mRNA was upregulated in glioblastomas compared to control brain tissues (Figure 2). Similarly, transcripts encoding TGFbeta isoforms (TGFB 1, 2, 3) were upregulated in glioblastomas compared to control brain tissues (Figure 2) as was also reported in previous studies [34]. Expression of FAP and all TGFbeta isoforms was highest in the mesenchymal subtype glioblastomas (Figure 2). FAP expression correlated with TGFB1 and TGFB3, but not TGFB2 in all glioblastomas and in the mesenchymal subtype (Figure 2). Collectively, these data suggest that TGFbeta-1 may contribute to the regulation of FAP expression in the

glioblastoma microenvironment. The TCGA data further suggest that this may be most pronounced in the mesenchymal subtype of glioblastoma.

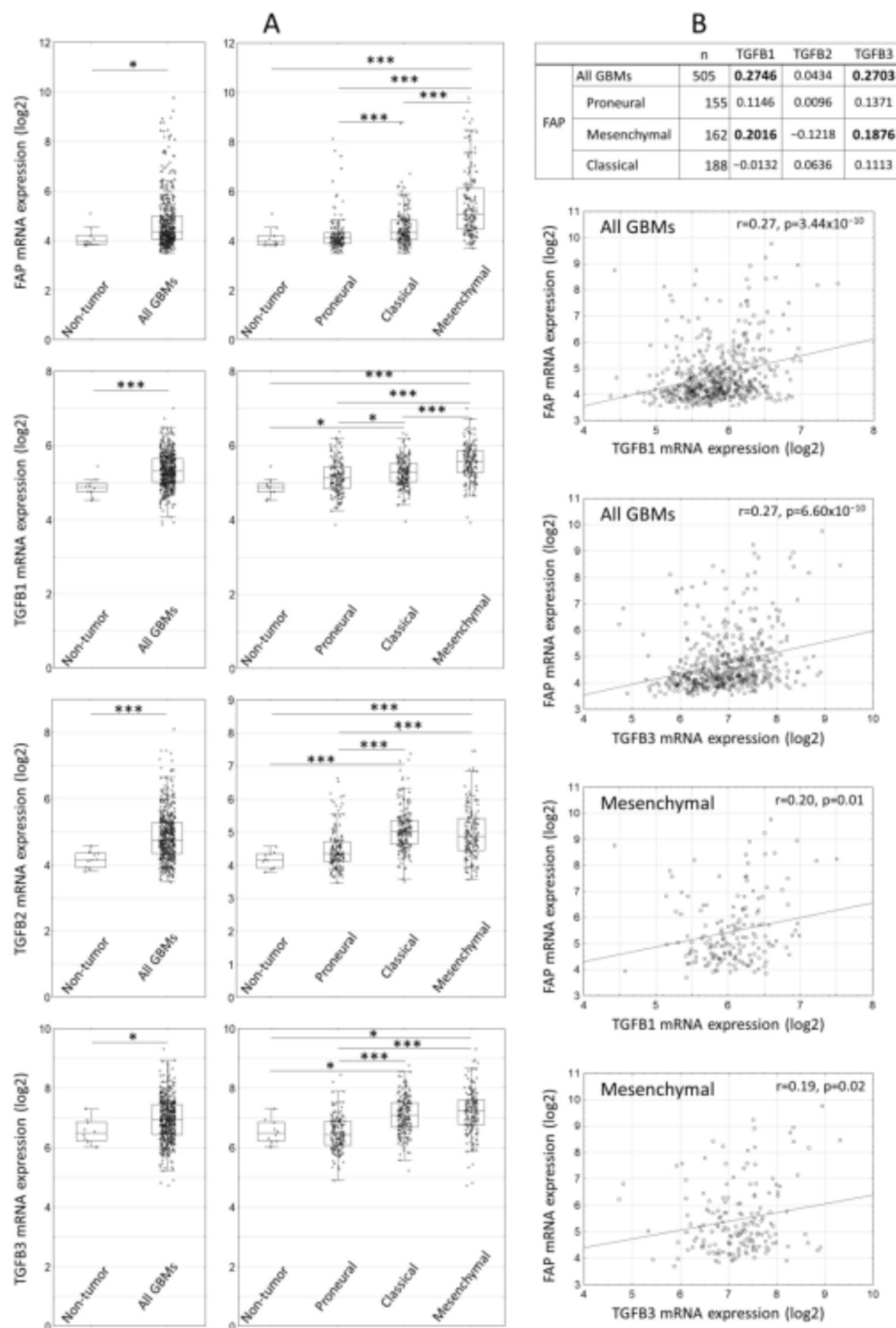


Figure 2. FAP and TGFbeta expression in molecular subtypes of primary glioblastomas (GBMs) according to The Cancer Genome Atlas (TCGA) data. **(A)** Expression of FAP and individual isoforms of TGFbeta mRNA in GBMs and individual molecular subtypes compared to control brain tissues. Line—median, box—25th–75th percentile, whiskers—non-outlier range, triangles—raw data, circles—outliers, asterisk—extremes; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Mann–Whitney U test and Kruskal–Wallis one way ANOVA on ranks. **(B)** Correlation between FAP and individual TGFbeta isoforms in all GBMs and in individual molecular subtypes of GBM (Pearson correlation coefficient, correlations with $p < 0.05$ are in bold). Scatter plots are shown only for statistically significant correlations.

2.2. Immunohistochemical Localization of FAP and TGFbeta-1 in Human Glioblastomas

Using chromogenic and fluorescence immunohistochemistry, we detected FAP immunopositivity in glioblastomas in several cell subpopulations including perivascular stromal cells, some intraparenchymal cancer cells in approximately 25% of glioblastomas and, albeit infrequently, endothelial cells of some blood vessels (Figure 3A–D,F). In contrast to glioblastomas, PRE brain tissues did not exhibit FAP immunopositivity (Figure 3E). By means of fluorescence immunohistochemistry and confocal microscopy, we detected TGFbeta-1 immunopositivity broadly in glioblastoma tissues including regions in the immediate vicinity of FAP-immunopositive perivascular stromal cells (Figure 3F).

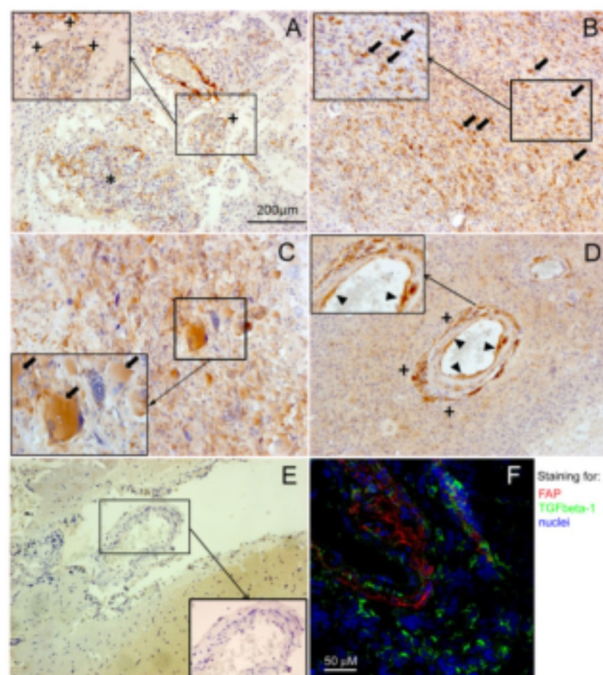


Figure 3. Immunohistochemical detection of FAP and TGFbeta-1 in the tumor microenvironment of human glioblastomas (GBMs). (A–D) Representative images of FAP immunopositivity (brown) in GBMs as compared to (E) non-tumorous brain tissue (pharmacoresistant epilepsy), where no FAP immunostaining was detected. In GBMs, FAP is expressed in perivascular stromal cells (+), including microvascular proliferations (*), and in some tumors also in some cancer cells (arrows). Infrequently, FAP was also detected in the endothelial cells of blood vessels (arrowheads showing endothelial FAP in an arteriole). (F) Representative confocal fluorescence microscopy image of a GBM tissue section showing TGFbeta-1 immunopositivity (green) in the tumor parenchyma and stromal regions in the vicinity of FAP expressing perivascular stromal cells (red). Nuclei (blue) were counterstained with the Hoechst 33258 dye.

2.3. Upregulation of FAP Enzymatic Activity and FAP Protein Induced by Recombinant TGFbeta-1 in Different Cell Types Present in the Glioblastoma Microenvironment

To determine whether TGFbeta-1 may contribute to FAP upregulation in glioblastomas, we cultured several different cell types representing cellular components of glioblastoma microenvironment, with and without human recombinant TGFbeta-1 for 72 h, and measured FAP enzymatic activity. Permanent human glioma cell lines U87, U251 and U118 displayed detectable baseline FAP enzymatic activity and FAP protein which dose-dependently increased when the cells were cultured in the presence of TGFbeta-1 at concentrations ranging from $0.2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ to $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figures 4A and 5). A considerable TGFbeta-1-mediated upregulation of FAP enzymatic activity was also observed in four out of five tested non-stem glioma cell cultures (Figure 4B, left part), while TGFbeta-1-treated glioma stem-like cell cultures showed either no change or negligible increase in their extremely low baseline FAP enzymatic activity (Figure 4B, right part). Human brain vascular pericytes (HBVP)

and glioblastoma-derived FAP⁺ mesenchymal (pFAP) cell cultures displayed a marked upregulation of their FAP enzymatic activity after treatment with TGFbeta-1 (Figure 4C). Glioblastoma-derived endothelial cell (pEC) cultures showed a highly variable level of baseline FAP enzymatic activity but all exhibited a significantly upregulated FAP enzymatic activity after treatment with TGFbeta-1 (Figure 4D). In contrast to the pEC cultures, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) showed no TGFbeta-1-mediated increase in their extremely low baseline FAP enzymatic activity (Figure 4D). Using ELISA, we confirmed FAP upregulation on the protein level in permanent glioma cell lines and endothelial cells (Figure 5). In all investigated cell types that responded to TGFbeta-1 by FAP activity and FAP protein upregulation, the maximum response was reached at 2 ng·mL⁻¹ of TGFbeta-1 with no further increase for 10 ng·mL⁻¹ (Figures 4 and 5). To the best of our knowledge, there is no evidence that the catalytic activity of FAP is regulated by an endogenous biological inhibitor or activator. In cells expressing FAP, the levels of FAP enzymatic activity and FAP protein concentration are upregulated in parallel after treatment with different concentrations of recombinant TGFbeta-1 (Figures 4 and 5). This results in a strong positive Pearson correlation between FAP protein and FAP activity levels, as shown for human glioma cell lines U87 and U251 and for endothelial cells pEC 54A (Figure 5). Therefore, the quantification of FAP enzymatic activity is a reliable measure of FAP gene expression level in various cell types.

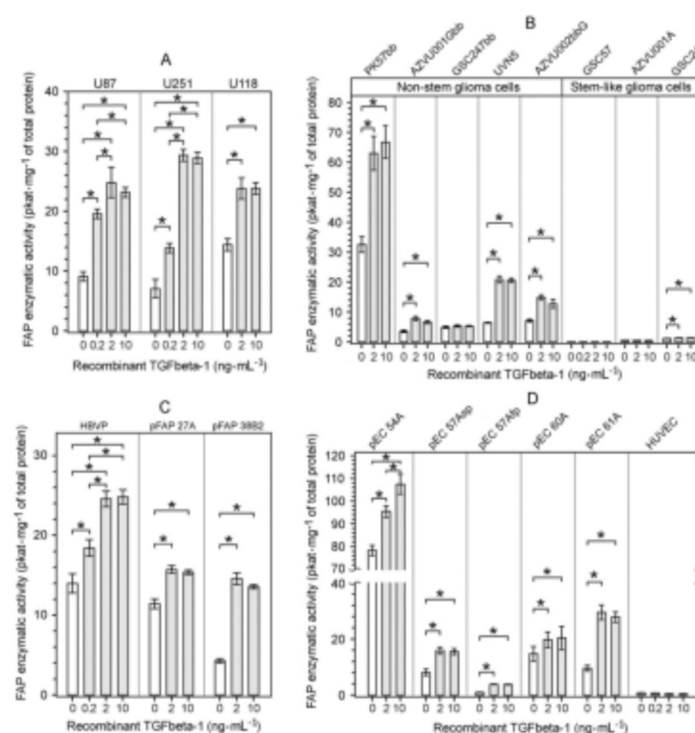


Figure 4. Upregulation of FAP enzymatic activity by human recombinant TGFbeta-1 protein in different cell types originating from human glioblastomas (GBMs). The cells were cultured in the absence or presence of recombinant TGFbeta-1 for 72 h and their lysates were assayed for FAP enzymatic activity and total protein concentration. (A) Upregulation of FAP enzymatic activity in TGFbeta-1-treated permanent glioma cell lines. (B) Upregulation of FAP enzymatic activity in TGFbeta-1-treated non-stem glioma cell cultures, but absence of or negligible increase in FAP enzymatic activity in TGFbeta-1-treated glioma stem-like cell cultures. (C) Upregulation of FAP enzymatic activity in TGFbeta-1-treated human brain vascular pericytes (HBVP) and glioblastoma-derived FAP⁺ mesenchymal (pFAP) cell cultures. (D) Upregulation of FAP enzymatic activity in TGFbeta-1-treated endothelial cell (pEC) cultures isolated from human GBMs, but not in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Results are presented as mean \pm SD from six parallel cell cultures measured in triplicate. In (A–D), * $p < 0.05$, one way ANOVA, Tukey’s post hoc test.

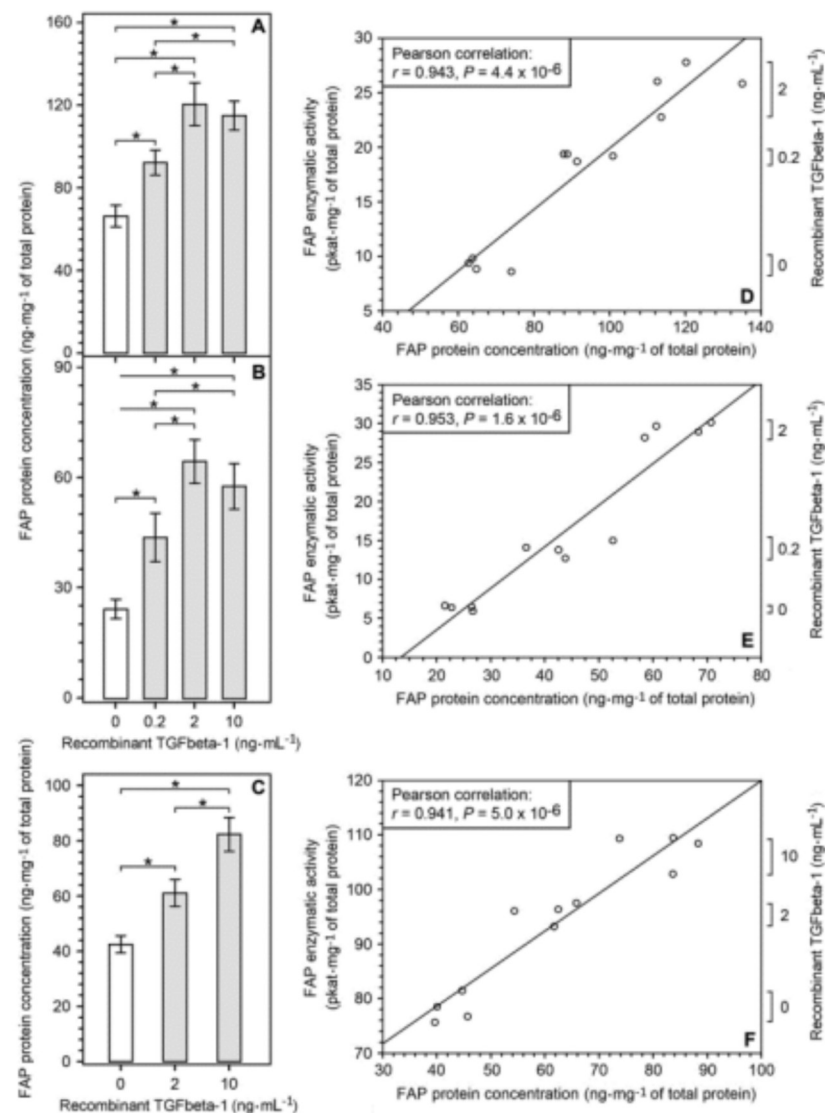


Figure 5. Upregulation of FAP protein concentration by human recombinant TGFbeta-1 protein in permanent glioma cell lines and endothelial cells (pEC) isolated from human glioblastoma. The cells were cultured without TGFbeta-1 and with several concentrations of recombinant TGFbeta-1 for 72 h and their lysates were assayed for FAP protein concentration, FAP enzymatic activity and total protein concentration. (A,B) Upregulation of FAP protein concentration in TGFbeta-1-treated glioma cell lines U87 (A) and U251 (B). (C) Upregulation of FAP protein concentration in TGFbeta-1-treated pEC 54A cells. (D,E) Relationship between FAP protein concentration and FAP enzymatic activity in U87 (D) and U251 (E) cells cultured without and with TGFbeta-1. (F) Relationship between FAP protein concentration and FAP enzymatic activity in pEC 54A cells cultured without and with TGFbeta-1. In A–C, results are presented as mean \pm SD from four parallel cell cultures measured in triplicate. * $p < 0.05$, one way ANOVA, Tukey’s post hoc test. In (D–F), Pearson correlation between FAP protein concentration and FAP enzymatic activity in U87 (D), U251 (E) and pEC 54A (F) cells is shown.

2.4. Characterization of the TGFbeta-1-Mediated Upregulation of FAP Enzymatic Activity and FAP Protein in Human Glioma Cells

Besides being dose-dependent (Figures 4 and 5), TGFbeta-1-mediated upregulation of FAP protein concentration and FAP enzymatic activity in human glioma cells was also time-dependent (Figure 6B,C). Moreover, the TGFbeta-1-treated U87 glioma cells also displayed a time-dependent upregulation of FAP mRNA (Figure 6A). The TGFbeta-1-induced increase in FAP mRNA expression preceded that of FAP protein by at least 12 h (Figure 6A,B), which

indicates that TGFbeta-1 regulates FAP expression on the transcriptional level. Interestingly, we also observed an upregulation of FAP mRNA, FAP protein, and FAP enzymatic activity over time in our control cell cultures (Figure 6A–C,F).

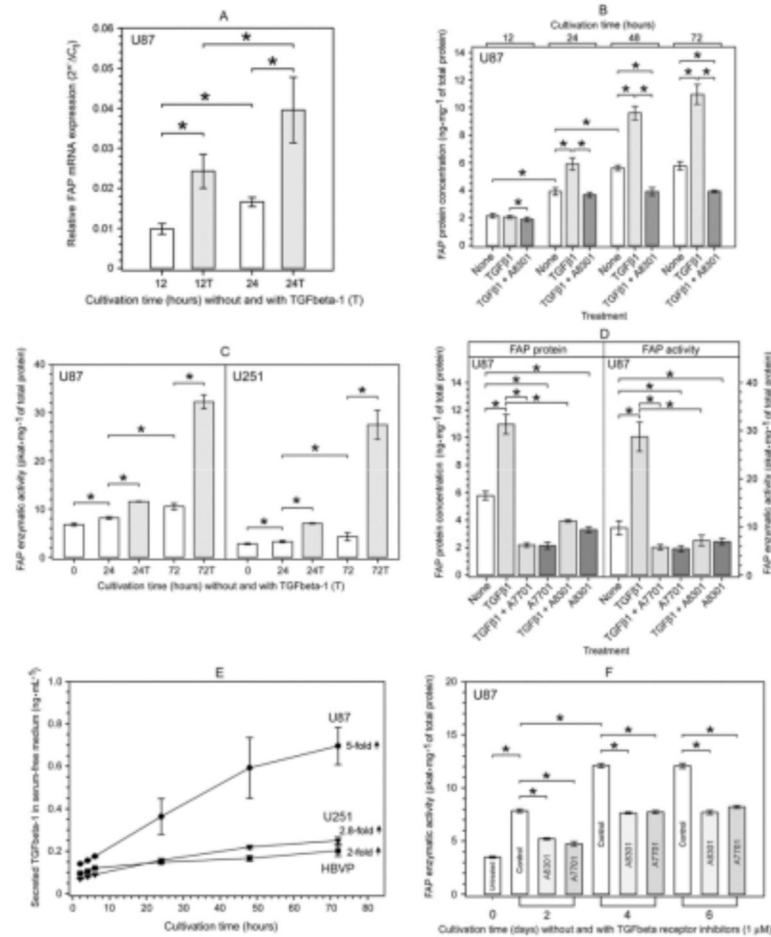


Figure 6. Characterization of TGFbeta-1-mediated upregulation of FAP mRNA, FAP protein, and FAP enzymatic activity in human glioma cells. **(A)** Time-dependent upregulation of FAP mRNA expression in U87 glioma cells during cultivation without and with $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of human recombinant TGFbeta-1. **(B)** Time-dependent upregulation of FAP protein in U87 glioma cells during cultivation without and with $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of human recombinant TGFbeta-1. A complete blocking of exogenous and partial blocking of endogenous FAP protein upregulation by co-treatment with the TGFbeta type I receptor inhibitor A8301 ($1 \mu\text{M}$). **(C)** Time-dependent upregulation of FAP enzymatic activity in U87 and U251 glioma cells during cultivation without and with $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of human recombinant TGFbeta-1. **(D)** Upregulation of both FAP protein and FAP enzymatic activity in U87 glioma cells after cultivation with $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of human recombinant TGFbeta-1 for 72 h and its complete blocking by co-treatment with the TGFbeta type I receptor inhibitors A7701 and A8301 (both at $1 \mu\text{M}$), which also reduced the baseline FAP protein and FAP enzymatic activity levels. **(E)** Time course of secretion of endogenous TGFbeta-1 into serum-free media by cultured glioma cells U87 and U251 and human brain vascular pericytes (HBVP). The mean increase in secreted TGFbeta-1 level between the 2nd and 72nd hour of cultivation is indicated for each examined cell line. **(F)** Time course of increase in the baseline level of FAP enzymatic activity in cultured U87 glioma cells and its marked decrease by treatment with A8301 and A7701 (both at $1 \mu\text{M}$). The results in **(A)** are presented as the mean \pm SD from three parallel cell cultures measured in triplicate. Results in **(B–F)** are presented as the mean \pm SD from five or six parallel cell cultures measured in triplicate. In **(A)**, $* p < 0.05$, one way repeated measures ANOVA. In **(B,C,F)**, $* p < 0.05$, Friedman repeated measures ANOVA on ranks. In **(D)**, $* p < 0.05$, one way ANOVA, Tukey's post hoc test.

The synthetic small-molecule inhibitors of TGFbeta type I receptor (ALK-5 kinase) A8301 and A7701 [35] not only completely blocked the exogenous recombinant TGFbeta-1-mediated upregulation of FAP protein and FAP enzymatic activity in U87 glioma cells (Figure 6B,D), but also led to a significant decrease in the baseline level of FAP protein and FAP enzymatic activity in the cultured cells (Figure 6D). Since this A8301- and A7701-sensitive fraction of baseline FAP protein and FAP enzymatic activity could be due to upregulation via autocrine TGFbeta-1 signaling, we investigated the secretion of endogenous TGFbeta-1 in U87 and U251 glioma cells and in human brain vascular pericytes (HBVP). By means of ELISA, we demonstrated that all three studied cell lines secreted TGFbeta-1 into serum-free media, albeit in different quantities (Figure 6E). The baseline level of FAP enzymatic activity in cultured U87 cells significantly increased over time and reached a plateau after several cultivation days (Figure 6F). However, it was markedly reduced (by 32–42%) when U87 cells were cultured in the presence of A8301 and A7701 (Figure 6F). The inhibitor A7701 is a direct synthetic precursor of A8301, which exerts about twice as much a potent inhibitory effect (in terms of ID_{50}) against the TGFbeta type I receptor as compared to A7701 [35]. Nevertheless, at a treatment concentration of 1 μ M, both inhibitors completely prevented the TGFbeta-1-induced upregulation of FAP protein and FAP enzymatic activity in U87 glioma cells (Figure 6B,D).

To assess whether TGFbeta-1 signaling leads selectively to FAP upregulation, we evaluated the effect of TGFbeta-1 on the expression of dipeptidyl peptidase-4 (DPP4). This proline-specific protease is the closest FAP homologue [36] and is co-expressed with FAP in some cell types including glioma cells [9,37]. Nevertheless, in U87 glioma cells cultured with or without recombinant TGFbeta-1 for 72 h, the level of DPP4 protein and DPP4 enzymatic activity remained unchanged (Figure 7).

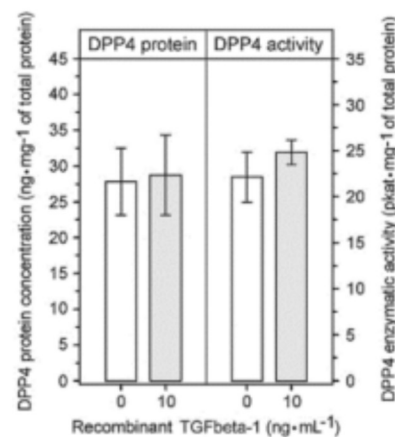


Figure 7. Effect of TGFbeta-1 on the expression of dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) in human U87 glioma cells. The levels of DPP4 protein and DPP4 enzymatic activity were determined in U87 cell lysates after cultivating the cells with and without 10 $ng \cdot mL^{-1}$ of human recombinant TGFbeta-1 for 72 h. The results are presented as the mean \pm SD from six parallel cell culture experiments for each condition measured in triplicate. The levels of DPP4 protein and DPP4 enzymatic activity in the TGFbeta-1-treated and TGFbeta-1-untreated cells did not significantly differ ($p = 0.792$ and $p = 0.126$, respectively; Mann–Whitney rank sum test).

2.5. TGFbeta-1-Induced Phosphorylation of Smad2 in FAP-Upregulating and FAP-Non-Upregulating Human Glioma Cells

Since the U87 glioma cells and the AZVU001A glioma stem-like cells were sensitive and fully resistant, respectively, to TGFbeta-1-mediated upregulation of FAP enzymatic activity (Figure 4A,B), we wondered whether this difference may be due to the absence of activation of the canonical TGFbeta receptor/Smad signaling pathway in the glioma stem-like cells. Using Western blot analysis with specific anti-pSmad2 antibodies, we demonstrated that both the FAP-upregulating U87 glioma cells and FAP-non-upregulating

AZVU001A glioma stem-like cells were capable of rapidly phosphorylating the Smad2 protein when exposed to TGFbeta-1 (Figure 8A,B). TGFbeta-1-induced phosphorylation of Smad2 was completely inhibited when the cells were co-treated with TGFbeta-1 and the inhibitor A7701 (Figure 8A,B; for the full length immunoblots see the Supplemental Figure S1).

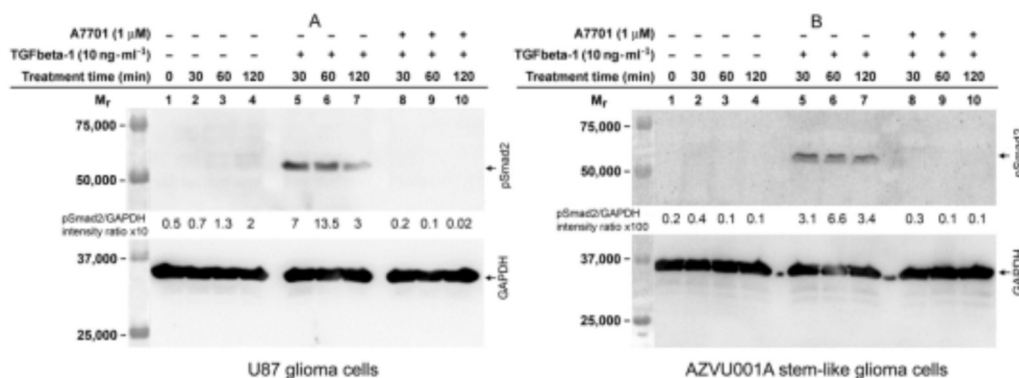


Figure 8. Western blot analysis of TGFbeta-1-induced phosphorylation of Smad2 protein in glioma cells. (A) U87 glioma cells and (B) AZVU001A glioma stem-like cells treated with recombinant TGFbeta-1 for the indicated times showed the presence of phosphorylated Smad2 (pSmad2) protein (lanes 5, 6, and 7, upper immunoblots). pSmad2 was undetectable in U87 glioma cells and in AZVU001A glioma stem-like cells cultured in the absence of TGFbeta-1 (lanes 2, 3, and 4, upper immunoblots) or in the presence of both TGFbeta-1 and TGFbeta type I receptor inhibitor A7701 (lanes 8, 9, and 10, upper immunoblots). The lower immunoblots show immunodetection of GAPDH which served as a protein loading control.

3. Discussion

Proteases contribute to cancer pathogenesis and represent potential diagnostic and therapeutic targets. In glioblastoma, TGFbeta is produced by glioma cells, microglia, and astrocytes [38–40]. TGFbeta signaling through phosphorylated Smad2 regulates expression of various TGFbeta-response genes [27,41–43] and leads—in addition to various other effects—to dysregulation of proteolytic networks [3]. Our previous work suggested increased expression of FAP, a potential TGFbeta target gene, in glioblastomas [4]. In this work we investigated the effect of TGFbeta signaling on FAP expression in multiple cell types present in glioblastoma microenvironment.

We show that all three TGFbeta protein isoforms (-1, -2, and -3) are expressed in glioblastomas, with the TGFbeta-1 isoform being the most abundantly produced. This is in line with recent findings in glioblastomas obtained by methods other than ELISA [34,41]. We used biochemical and immunohistochemical methods to show that the expression of both FAP and TGFbeta-1 was upregulated in glioblastomas as compared to non-tumorous brain tissues. Interestingly, the FAP-immunopositive cells within the glioblastoma microenvironment were localized in the immediate vicinity of the TGFbeta-1 immunopositive stromal and cancer cells. These observations in conjunction with the positive correlation between FAP and TGFbeta-1 protein levels in glioblastomas suggested that TGFbeta-1 signaling may be involved in the regulation of FAP expression by targeting multiple cell types within the glioblastoma microenvironment. To test this hypothesis, we carried out in vitro experiments, in which, several cell types representing the cellular components of the glioblastoma microenvironment were exposed to human recombinant TGFbeta-1. These experiments revealed that TGFbeta-1 upregulates the expression of FAP in human permanent and non-stem glioma cell cultures, brain vascular pericytes, and glioblastoma-derived endothelial cells and FAP⁺ mesenchymal cells.

It was previously reported that human glioma cell lines secrete both TGFbeta-1 and TGFbeta-2 proteins [40]. Both secreted TGFbeta isoforms occur as a mixture of a latent precursor and a biologically active form, and the proteolytic conversion of the former to the latter is catalyzed by a furin-like protease [40]. In cultured U87 and U251 glioma cell

lines, we observed an accumulation of the secreted endogenous TGFbeta-1 in the culture medium and a parallel increase in the baseline FAP protein and FAP activity levels in the cells. These observations together with the ability of recombinant TGFbeta-1 to upregulate FAP in the cells pointed to the possible regulation of FAP level through the endogenous TGFbeta-1/TGFbeta receptor signaling axis. To test this, we exposed the cultured glioma cells to specific TGFbeta type I receptor inhibitors A8301 and A7701 [35]. This resulted in a significant decrease in FAP protein and FAP activity levels in the inhibitor-treated glioma cells providing evidence that autocrine/paracrine TGFbeta-1 signaling can contribute to the regulation of baseline FAP levels. These results, together with the ability of human brain vascular pericytes to secrete TGFbeta-1, further indicate that the autocrine/paracrine TGFbeta-1 signaling can contribute to the regulation of FAP level in multiple cell types within the glioblastoma microenvironment.

Several recent studies demonstrated that the specific chemical inhibitors of the TGFbeta type I receptor, including A8301 and A7701 used in our experiments, effectively suppress the canonical Smad-dependent TGFbeta signaling pathway, but they do not interfere with the TGFbeta-triggered non-Smad signaling pathways including those involving MAP kinases [35,44–47]. Thus, the complete suppression of the TGFbeta-1-induced upregulation of FAP and the partial suppression of the baseline level of FAP we observed after treatment with A8301 and A7701, are caused by the specific blocking of the canonical Smad-dependent TGFbeta signaling pathway. This is further supported by the concurrent lack of Smad2 phosphorylation in U87 cells which were co-treated with TGFbeta-1 and A7701. These data together provide evidence that the canonical Smad-dependent TGFbeta signaling axis accounts for the TGFbeta-1-mediated regulation of FAP expression in glioblastoma cells.

It has previously been demonstrated that TGFbeta-1 can trigger the upregulation of *FAP* gene expression in certain human melanoma cell lines via a signaling pathway that involves the activation of TGFbeta receptors and formation of phosphorylated Smad (pSmad) complexes which directly bind to the *FAP* promoter and activate *FAP* gene transcription [23]. Besides this mechanism, other transcription factors, including EGR-1 [48], Twist [49] and Snail [50], can likewise directly bind to the *FAP* promoter and trigger the transcription of the *FAP* gene. Interestingly, in some cell types, the genes that encode EGR-1, Twist, and Snail can be transcriptionally activated by the TGFbeta-induced pSmad complexes [51–53]. Nevertheless, there is evidence that pSmad-mediated TGFbeta-1 signaling does not upregulate the levels of Snail and Twist proteins in human glioma cells [54]. This supports the conclusion that TGFbeta signaling induces direct activation of *FAP* gene expression by pSmad complexes in glioma cells. Thus, mesenchymal transcription factors such as Twist [49] and the autocrine and paracrine TGFbeta-1 signaling described in the current work contribute to the regulation of FAP expression in glioma cells.

The biochemical basis of the very low baseline FAP levels and absent or negligible upregulation of FAP after treatment with recombinant TGFbeta-1 in glioma stem-like cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is, at present, unknown. We assume that the protein-binding partners of pSmad complexes, which can function as switching contextual determinants [32,55], modify the functionality of the TGFbeta-1 signaling pathway controlling *FAP* gene expression in these cells. Further studies are warranted to identify the molecular mechanism by which cells avoid the TGFbeta-1-mediated upregulation of FAP expression, as they could contribute to the identification of factors maintaining the extremely low FAP expression in the majority of healthy tissues.

The functions of FAP in cancer are incompletely understood and seem very probably different in different cell types. Its role in individual cell subpopulations in the glioblastoma microenvironment remains to be established. Nevertheless, approaches utilizing FAP expression for tumor imaging, including imaging of glioblastomas, and targeted delivery of anticancer therapeutics have been recently described [19–21]. Considering the important role of TGFbeta-1 signaling in glioblastoma progression, the TGFbeta-induced expression of

FAP opens an interesting possibility of evaluating these approaches for parallel therapeutic targeting of several cell subpopulations in glioblastoma.

4. Materials and Methods

4.1. Patients and Tissue Samples

Tissue samples were obtained from surgically treated patients (Table 1) with glioblastoma multiforme (GBM, WHO grade IV glioma, $n = 76$) and pharmacoresistant epilepsy (PRE; $n = 10$; controls) and were stored at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ until preparation of lysates. The tumors were graded according to the current WHO classification [56]. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and was approved by the Ethics Committees of the Na Homolce Hospital, the Military University Hospital, both Prague, Czech Republic, and the Masaryk Hospital, Usti nad Labem, Czech Republic (study approval numbers 108-39/4-2014-UVN and 7/8/2014-25, approved on 28 July 2014 and 21 July 2014, respectively). Signed informed consent was obtained from all patients entering the study.

Table 1. Characteristics of patient cohorts.

Diagnosis	n	Age at Surgery ^a (Years)	Sex (Male/Female)	IDH ^b Status (Wild/Mutated)
Glioblastoma multiforme	76	62 (41–80)	49/27	76/0
Pharmacoresistant epilepsy	10	32 (22–62)	3/7	N.D. ^c

^a Data are presented as the median with the range in parentheses; ^b IDH = isocitrate dehydrogenase; ^c N.D. = not determined.

4.2. The Cancer Genome Atlas (TCGA) Database Data

Expression data and information on the molecular subtype of primary glioblastomas ($n = 505$) and non-tumorous brain tissues ($n = 10$) from the TCGA GBM (HG-UG133A platform) were downloaded from GlioVis data portal [57] on 29 February 2020.

4.3. Immunohistochemistry and Confocal Microscopy

For FAP immunostaining in $4\text{ }\mu\text{m}$ paraffin sections, we used a primary rabbit monoclonal antibody (Ab207178 (clone EPR20021), Abcam, Cambridge, UK; 1:250, at room temperature for 20 min) and an automated Bond Stainer (Leica, Buffalo Grove, IL, USA). Antigen retrieval was performed with an EDTA-based pH 9.0 epitope retrieval solution (BOND Epitope Retrieval Solution 2) for 20 min and Bond Polymer Refine Detection (Leica) was used to visualize the primary antibody and haematoxylin counterstaining. Images were captured by an experienced pathologist (P.H.) on an Axioskop 2 mot plus microscope using the AxioCam ICc1 camera (Zeiss, Oberkochen, Germany). Sequential double immunofluorescence labelling of TGFbeta-1 and FAP was performed in $10\text{ }\mu\text{m}$ frozen sections with minor modifications of a previously described protocol [4,9]. The sections were fixed with chilled acetone:methanol 1:1 at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, blocked with 10% fetal calf serum plus 1% bovine serum albumin in TBS, and incubated with primary anti-TGFbeta-1 antibody (ab92486, Abcam; 1:400, overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). After washing away non-bound antibodies, the slides were incubated with the primary anti-FAP antibody (D8; Vitatex, Stony Brook, NY, USA; 1:200, 1 h at room temperature). After washing, slides were incubated with the corresponding Alexa Fluor 488- and 546-conjugated secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1:500, 1 h at room temperature). $400\text{ }\mu\text{M}$ ToPro (Thermo Fisher Scientific) or $50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ Hoechst 33,258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used for counterstaining of cell nuclei. Immunostained sections were viewed and photographed using Olympus IX 81 confocal microscope (FluoView 300, Olympus, Shinjuku, Japan).

4.4. Cell Culture and Experimental Treatment of Cells

Permanent human glioma cell lines U87, U251 and U118 were purchased from CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Germany. The cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Cat. No. D5796), supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS), at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

Cultures of non-stem and stem-like cells from glioblastomas were derived, cultured and characterized as we described previously [58]. Briefly, after mechanical and enzymatic (Papain Dissociation System, Worthington, Lakewood, NJ, USA) dissociation according to manufacturer's recommendations, cells were grown in 10% FCS-containing media (non-stem cell cultures), or after forming gliomaspheres in serum-free media (stem-like cell cultures, DMEM/F12 with bFGF 20 ng·mL⁻¹ and EGF 20 ng·mL⁻¹, both PeproTech, London, UK), B27-supplement 1:50 (Thermo Fisher Scientific), 1% Glutamax (Thermo Fisher Scientific), 100 U·mL⁻¹ penicillin and 100 µg·mL⁻¹ streptomycin) propagated on Geltrex-coated (Thermo Fisher Scientific) plastic. The cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% of CO₂ in air. The three studied glioma stem-like cell cultures were all tumorigenic in immunodeficient mice forming highly infiltrative tumors. These cells cultures expressed in variable extent the stem cell markers CD133 (anti-AC133-APC, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and Sox2 (anti-Sox2-PerCP, IC2018C, R&D Systems, Abingdon, UK) as determined by flow cytometry [58]. They also differentiated to glial fibrillary acidic protein (GFAP) and beta-III tubulin positive cells when exposed to 10% FCS containing medium [58], except for GSC247 cells. Of the five studied non-stem glioma cell cultures, four were tumorigenic in immunodeficient mice.

Human brain vascular pericytes (HBVP, ScienCell Research Laboratories Carlsbad, CA, USA) were cultured according to the manufacturer's recommendations on polylysine-coated (0.01%, Sigma-Aldrich) plastic in the recommended Pericyte Medium (ScienCell, Cat. No 1201) supplemented with pericyte growth supplement (PGS), 2% FCS and 100 U·mL⁻¹ penicillin and 100 µg·mL⁻¹ streptomycin. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from Thermo Fisher Scientific and cultured according to the manufacturer's recommendations in M200 (Cascade Biologics Thermo Fisher Scientific) supplemented with 2% Large Vessel Endothelial Supplement (LVES, Thermo Fisher Scientific).

Endothelial cell cultures (pEC) were derived from fresh glioblastoma tissue. Tumor tissue was cut in small pieces and digested with TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific) at 37 °C for 20 min. The resulting cell suspension was used for direct magnetic-activated cell sorting (MACS) using a CD105 antibody (M3527, Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA 0.15 µg of the antibody per 100 µL of 10⁷ cells per mL at 4 °C for 8 min) and Sheep-Anti Mouse IgG Dynabeads (Cat. No. 11031, Thermo Fisher Scientific, 0.15 µL per 100 µL of 10⁷ cells per mL) according to the manufacturer's recommendations. The positive fraction was cultured as described by Miebach et al. [59] and Charalambous et al. [60] on fibronectin-coated (3 µg·cm⁻², Sigma-Aldrich) plastic in an initiation medium containing RPMI, 10% FCS, 10% Nu serum (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), 1 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 300 UI Heparin (Zentiva), 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich), and 3 µg·mL⁻¹ endothelial cell growth supplement (ECGS, BD Bioscience). After two weeks, 10% Nu Serum was omitted from culture media and the ECGS concentration was increased to 30 µg·mL⁻¹. Alternatively, the mechanically and enzymatically dissociated tissue fragments were placed on fibronectin-coated plastic in the initiation medium and MACS was performed after harvesting the emigrated cells, usually after 7 days. Thereafter, the cells were cultured as described above. A similar procedure was used to isolate FAP⁺ mesenchymal cells (pFAP), except that an anti-FAP F11-24 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA; 0.1 µg of the antibody per 100 µL of 10⁷ cells per mL at 4 °C for 8 min) was used for MACS and cells were grown in pericyte growth medium (Pericyte medium, ScienCell, Cat. No. 1201, supplemented with 2% FCS, PGS, 100 U·mL⁻¹ penicillin and 100 µg·mL⁻¹ streptomycin). The isolated endothelial cells expressed the endothelial cell marker von Willebrand factor (vWF, in 100% of cells) and did not express astrocytic (GFAP) or mesenchymal (clone TE7, platelet derived growth factor receptor—PDGFR) markers. The pFAP cell cultures

expressed mesenchymal markers (FAP in approximately 70% of cells, TE7 in approximately 90% of cells, PDGFRbeta in approximately 90% of cells) and were GFAP and vWF negative as determined by immunocytochemistry using specific primary antibodies (Table 2)

Table 2. Antibodies used for the characterization of cell cultures derived from human glioblastomas.

Antibody, Source	Dilution	Temperature, Incubation Time	Secondary Antibody (1:500, Room Temperature, 1 h)
Anti-FAP mouse IgG1 kappa isolated from F19 mouse hybridoma (ATCC CRL-2733)	56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	4 °C, overnight	Anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A21202)
Anti-TE-7 (CBL271, Millipore)	1:100	room temperature, 1 h	Anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A21202)
Anti-PDGFRbeta (LS-C11443, LSBio)	1:50	4 °C, overnight	Anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A21202)
Anti-vWF (A0083, Dako)	1:200	room temperature, 1 h	Anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11010)
Anti-GFAP (11-255-M001, Exbio)	1:200	4 °C, overnight	Anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A21202)
Anti-beta III Tubulin (TU-20, ab7751, Abcam)	1:250	4 °C, overnight	Anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A21202)

During experiments, permanent glioblastoma cell lines, glioma non-stem and stem-like cell cultures, human brain vascular pericytes (HBVP), glioblastoma-derived FAP⁺ mesenchymal cells (pFAP), glioblastoma-derived endothelial cells (pEC), and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured in the appropriate media (see above) in 6-well culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% of CO₂ in air. After 72 h, the culture media were exchanged for fresh media with or without the tested substances. Human recombinant transforming growth factor beta-1 (TGFbeta-1; Cat. No. 100-21C, PeproTech, Cranbury, NJ, USA), 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS, pH 7.2, containing 0.1% of bovine serum albumin (BSA), was added to the culture medium to achieve the treatment concentration of 0.2, 2 and 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. In some experiments, potent inhibitors of the TGFbeta type I receptor (activin-like kinase 5/ALK-5 kinase) A8301 [35] and A7701 [35] (both from Axon Medchem, Groningen, The Netherlands) were used. The inhibitors were dissolved at a concentration of 10 mM in dimethyl sulfoxide and were further diluted to a treatment concentration of 1 μM in the culture medium either alone or with recombinant TGFbeta-1. Cells were then grown under the described conditions for the required period of time and were harvested and processed as described below.

4.5. Preparation of Tissue and Cell Lysates and Cell Conditioned Media

Tissue samples were homogenized with Ultra-Turrax homogenizer (T10; IKA, Königswinter, Germany) on ice in a homogenization buffer containing 2 mM Na₂HPO₄, 0.6 mM KH₂PO₄ and 22.4 mM NaCl, pH 6.0. The 15% homogenates were mixed in 1:1 volume parts with a lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% glycerol) and a mix of protease and phosphatase inhibitors including 25 μM pepstatin A, 200 μM AEBSE, 50 μM E-64, 5 mM NaF, and 1 mM Na₃VO₄. The suspensions were rotation-mixed at 4 °C for 30 min and then cleared by centrifugation at 22,000 × g and 4 °C for 30 min. The cleared supernatants, i.e., the tissue lysates, were collected and stored in aliquots at −75 °C until analysis. Cell lysates were prepared as follows: cells adherently growing in 6-well culture plates (Nunc) were washed twice with ice-cold PBS buffer pH 7.4 and scraped off in 200 μL of the lysis buffer on ice. Cell lysates were cleared by centrifugation at 22,000 × g and 4 °C for 30 min and the supernatants were stored in aliquots as described above.

To obtain serum-free conditioned media from U87 and U251 cells, the cells were seeded in 6-well Nunc culture plates and grown in DMEM supplemented with 10% FCS, at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air to reach confluence. The medium

was then removed, cells were washed twice with PBS buffer pH 7.4, and cultivated in 2 mL of fresh serum-free DMEM per well for additional 72 h. The sampling was done at 2, 4, 6, 12, 24, 48, and 72 h of cultivation and involved the withdrawal of 200 μ L of the conditioned culture medium and immediate volume replenishment with 200 μ L of fresh, serum-free DMEM. To obtain the conditioned medium from HBVP cells, the cells were seeded in 6-well Nunc culture plates and grown in a complete Pericyte Medium (see above) to reach confluence. The medium was then removed, the cells washed with PBS buffer pH 7.4, and cultivated in 2 mL of fresh, serum-free Pericyte Medium. Sampling of the conditioned medium was done as described above except that fresh serum-free Pericyte Medium was used for volume replenishment. The collected conditioned media were centrifuged at $22,000\times g$ and $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min to remove detached cells and cell debris, and the supernatants were stored in aliquots at $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

4.6. Determination of Total Protein

Total protein concentration in tissue and cell lysates was determined by the Lowry method [61] using BSA as a standard.

4.7. Determination of Enzyme Activity

Enzymatic activity of FAP was measured in black, flat bottom 96-well plates (Corning Costar, Tewksbury, MA, USA) using a kinetic assay with 150 μ M of *N*-(quinoline-4-carbonyl)-*D*-Ala-*L*-Pro-7-amido-4-methyl-coumarin as a fluorogenic FAP-specific substrate [62] prepared by standard Boc peptide chemistry [63]. FAP assays were carried out at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a total reaction volume of 100 μ L in a PBS buffer containing 8 mM NaH_2PO_4 , 42 mM Na_2HPO_4 and 150 mM NaCl, pH 7.4. Fluorescence of the enzymatically released 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) was measured on a microplate fluorimeter Infinite M1000 (Tecan, Grödig, Austria) using excitation and emission wavelengths/slits of 380/5 nm and 460/5 nm, respectively. During the assays, less than 3% of the initial FAP substrate concentration was cleaved. The FAP substrate on its own was stable in the PBS buffer pH 7.4. Measurements were done in triplicate and were calibrated with several concentrations of AMC in the assay buffer.

The enzymatic activity of DPP4 was measured in white, flat bottom 96-well plates (Nunc) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ using a kinetic assay with 50 μ M of Gly-*L*-Pro-AMC (Bachem, Bubendorf, Switzerland) as a fluorogenic substrate in PBS buffer pH 7.4. In parallel assays, a highly selective DPP4 inhibitor sitagliptin (Biovision, Milpitas, CA, USA) was used at 300 nM to exclude the activity of other DPP4-related proteases cleaving the substrate, as described previously [64].

4.8. ELISA Assays

TGFbeta protein isoforms TGFbeta-1, TGFbeta-2 and TGFbeta-3, and proline-specific protease proteins FAP and DPP4 were assayed in tissue and cell lysates and serum-free conditioned media by DuoSet ELISA kits (R&D Systems) including DuoSet TGF beta-1 (Cat. No. DY240), DuoSet TGF beta-2 (Cat. No. DY302), DuoSet TGF beta-3 (Cat. No. DY243), DuoSet FAP (Cat. No. DY3715) and DuoSet DPP-IV (Cat. No. DY1180), respectively, in accordance with the manufacturer's recommendations.

4.9. Western Blot Analysis

The Western blot procedure was performed in a similar way to that described previously [65] with some modifications specified below. The lysate samples, 35 μ g of total protein per one gel lane, were electrophoresed under denaturing and reducing conditions in discontinuous (5% stacking, 10% resolving) 1.5 mm polyacrylamide gels. The samples were mixed with a $5\times$ sample buffer containing 10 *w/v*% SDS, 50 *w/v*% glycerol, 250 mM Tris/HCl, 0.05% Serva Blue G and 500 mM dithiothreitol, pH 7.40. Electrophoretic separation was carried out in an electrode buffer containing 25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% SDS, pH 8.3, at constant voltage (60 V for 30 min followed by 140 V for 90 min). After

separation, the gels were equilibrated in a transfer buffer containing 48 mM Tris, 39 mM glycine, pH 9.2, and 20% methanol. Proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a semidry blotting system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). PVDF membranes with the transferred proteins were thoroughly rinsed in a buffer (TTSB) containing 0.05% Tween 20, 100 mM Tris/HCl and 154 mM NaCl, pH 7.5, and blocked in a 5% BSA in TTSB prior to incubation with a 1000× diluted primary antibody Rabbit Anti-Phospho Smad2 (Ser465/467) (Sigma-Aldrich; Cat. No. AB3849-I) at 4 °C overnight. After extensive washing in TTSB, the membranes were incubated with a 25,000× diluted Donkey Anti-Rabbit IgG-Horseradish Peroxidase-Conjugated secondary antibody (GE Healthcare, Little Chalfont, UK; Cat. No. NA934) at room temperature for 60 min. Immunoblots were washed with TTSB and developed using Luminata Forte (Sigma-Aldrich). Chemiluminescence signal was detected and captured on an imaging ChemiDoc System (BioRad). Subsequently, the membranes were washed with TTSB and probed overnight at 4 °C for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which served as a protein-loading control, using a 1000× diluted Rabbit Anti-GAPDH (Sigma-Aldrich; Cat. No. 2459656). After extensive washing with TTSB, the membranes were incubated with 20,000× diluted secondary Donkey Anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase-conjugated antibody. The immunoblots were washed and developed with Luminata Forte. The signal was detected and captured on the ChemiDoc System.

4.10. Isolation of Total RNA and Real Time RT-PCR

The isolation and fluorometric quantification of total RNA from cultured human glioma cells and real time RT-PCR were carried out according to the previously reported procedures [66] using several important modifications in the real time RT-PCR method as described below. The forward and reverse primers and TaqMan probes for the quantification of expression of human FAP and β -actin (ACTB) mRNAs (Table 3) were designed using the Primer Express software (Thermo Fisher Scientific) and custom-synthesized at Thermo Fisher Scientific.

Table 3. Primers and TaqMan probes for real-time RT-PCR quantification of expression of human FAP and ACTB mRNAs.

Human Transcript	GenBank Accession No.	Primer Names	Sequences of Primers and TaqMan Probes
Fibroblast activation protein (FAP)	NM_004460.4	Forward primer:	5'-TCTGCTGTGCTTGCCCTTATTG-3'
		Reverse primer:	5'-ATGAAGATATTCTTGCTCGAAATCC-3'
		TaqMan probe:	5'-(6-FAM)TGCAATGTCTTACGCCCTTCAAGAGTTCA(TAMRA)-3'
β -actin (ACTB)	NM_001101.2	Forward primer:	5'-ATGGCCACGGCTGCTT-3'
		Reverse primer:	5'-CCATGCCAGGAAGGAA-3'
		TaqMan probe:	5'-(6-FAM)CCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCT(TAMRA)-3'

The expression of human FAP and ACTB mRNAs was quantitated by a two-step, real-time RT-PCR assay as follows. In the first reverse transcription (RT) step, 3 μ g of total RNA was reverse-transcribed in a total volume of 30 μ L of 50 mM Tris/acetate buffer, pH 8.3, containing 75 mM of potassium acetate, 3 mM of MgCl₂, 2.5 μ M of Oligo (dT)₂₀ Primer (Thermo Fisher Scientific), 500 μ M of each dGTP, dCTP, dATP, and dTTP, 5 mM dithiothreitol, 60 units of RNase inhibitor RNaseOUT (Thermo Fisher Scientific) and 300 units of SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). RT reactions were carried out at 55 °C for 30 min and were terminated by heating at 70 °C for 15 min. The resulting RT mixes were stored at −25 °C until PCR analysis. The subsequent PCR step was carried out in a total volume of 25 μ L of 20 mM Tris/HCl buffer, pH 8.4, containing 50 mM of KCl, 4 mM of MgCl₂, 0.43 mM of each dGTP, dCTP, dATP, and dTTP, 200 nM of each forward and reverse gene-specific primer and TaqMan probe (Table 3), 2.5 unit of Platinum Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), and an aliquot of the RT mix, representing a PCR input equivalent of 200 ng of total RNA. PCR amplification included a hot start at 95 °C for 3 min and 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 sec and annealing/extension at 58 °C for 1 min. The real-time PCR assays were run in triplicate on the QuantStudio

12K Flex instrument (Thermo Fisher Scientific) operated from within the QuantStudio 12K Flex Software (Thermo Fisher Scientific). Threshold cycle (C_T) values of amplification reactions, represented by the plots of the background subtracted fluorescence intensity (ΔFI) of the reporter dye (6-FAM) against the PCR cycle number, were determined using the QuantStudio 12K Flex Software.

4.11. Statistical Analysis

Statistical calculations were performed with SigmaStat (Systat Software, San Jose, CA, USA) and Stat200 (Biosoft, Cambridge, UK). A two-sided $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical difference of PCR results was calculated from linearized ΔC_T data (i.e., $2^{-\Delta C_T}$) after normalizing the expression of FAP mRNA (target transcript) on the expression of ACTB mRNA (reference transcript) [66].

5. Conclusions

Our present work demonstrates for the first time that FAP expression positively correlates with TGFbeta expression in glioblastomas and can be differentially regulated via autocrine and paracrine TGFbeta-1 signaling in non-stem glioma cells, pericytes, glioblastoma-derived endothelial and FAP⁺ mesenchymal cells, but not in glioma stem-like cells. In glioma cells, this regulation is mediated by TGFbeta type I receptor and canonical SMAD and involves the activation of FAP gene transcription.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/3/1046/s1>. Figure S1: Western blot analysis of TGFbeta-1-induced phosphorylation of Smad2 protein in glioma cells.

Author Contributions: Conceptualization, E.K., P.B. and, A.S.; formal analysis, E.K.; funding acquisition, A.S.; investigation, E.K., Z.V., P.H., M.Z., B.C., I.M. and P.B.; methodology, E.K., Z.V., P.H., M.Z., B.C., E.B., P.V., I.M. and P.B.; resources, E.B., P.V. and P.B.; supervision, E.K., P.B. and A.S.; writing—original draft, E.K.; writing—review and editing, E.K., P.B. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministry of Health of the Czech Republic, grant 15-31379A, by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant LM2015064 of the EATRIS-CZ, and by the project “Center of Tumor Ecology” (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000785) supported by the Operational Program Research, Development and Education of the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the institutional Ethics Committee of Na Homolce Hospital, the Military University Hospital, both Prague, Czech Republic, and the Masaryk Hospital, Usti nad Labem, Czech Republic (study approval numbers 108-39/4-2014-UVN and 7/8/2014-25, approved on 28 July 2014 and 21 July 2014, respectively).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request. Publicly available datasets from the TCGA were downloaded from <http://gliovis.bioinfo.cnio.es>.

Acknowledgments: We would like to thank David Netuka from the Department of Neurosurgery, Military University Hospital (Prague, Czech Republic), Robert Tomas and Martin Syrucek from the Departments of Neurosurgery and Pathology, respectively, of the Na Homolce Hospital (Prague, Czech Republic), and Robert Bartos, Department of Neurosurgery, J.E. Purkynje University and Masaryk Hospital (Usti nad Labem, Czech Republic) for their cooperation in obtaining GBM and PRE samples and histopathological data. We gratefully acknowledge the technical assistance of Kvetoslava Vlasicova and Karin Roubickova, and the language editing by Anna Pilatova. The authors also wish to express their gratitude to the Laboratory of Jan Konvalinka, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague, for the synthesis of the FAP substrate. The results shown in Figure 2 are based upon data generated by the TCGA Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

GBM	Glioblastoma
PRE	Pharmacoresistant epilepsy
TGFbeta	Transforming growth factor beta
FAP	Fibroblast activation protein
DPP4	Dipeptidyl peptidase-4
Smad	Small mothers against decapentaplegic
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
ACTB	β -Actin

References

- Perrin, S.L.; Samuel, M.S.; Koszyca, B.; Brown, M.P.; Ebert, L.M.; Oksdath, M.; Gomez, G.A. Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: Implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochem. Soc. Trans.* **2019**, *47*, 625–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Broekman, M.L.; Maas, S.L.N.; Abels, E.R.; Mempel, T.R.; Krichevsky, A.M.; Breakefield, X.O. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat. Rev. Neurol.* **2018**, *14*, 482–495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Busek, P.; Prevorovsky, M.; Krepela, E.; Sedo, A. Glioma associated proteases. In *Glioma Cell Biology*; Sedo, A., Mentlein, R., Eds.; Springer: Vienna, Austria, 2014; pp. 317–395.
- Bušek, P.; Balaziová, E.; Matrasová, I.; Hilser, M.; Tomas, R.; Syruček, M.; Zemanová, Z.; Krepela, E.; Belacek, J.; Šedo, A. Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 13961–13971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kelly, T.; Huang, Y.; Simms, A.E.; Mazur, A. Fibroblast activation protein-alpha: A key modulator of the microenvironment in multiple pathologies. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* **2012**, *297*, 83–116. [[PubMed](#)]
- Koczorowska, M.M.; Tholen, S.; Bucher, F.; Lutz, L.; Kizhakkedathu, J.N.; De Wever, O.; Wellner, U.F.; Biniowski, M.L.; Stahl, A.; Lassmann, S.; et al. Fibroblast activation protein-alpha, a stromal cell alterations. *Mol. Oncol.* **2016**, *10*, 40–58. [[CrossRef](#)]
- Zhang, H.E.; Hamson, E.J.; Koczorowska, M.M.; Tholen, S.; Chowdhury, S.; Bailey, C.G.; Lay, A.J.; Twigg, S.M.; Lee, Q.; Roediger, B.; et al. Identification of Novel Natural Substrates of Fibroblast Activation Protein-alpha by Differential Degradomics and Proteomics. *Mol. Cell. Proteom.* **2019**, *18*, 65–85. [[CrossRef](#)]
- Bae, S.; Park, C.W.; Son, H.K.; Ju, H.K.; Paik, D.; Koh, G.Y.; Kim, J.; Kim, H.; Jeon, C.J. Fibroblast activation protein α identifies mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Br. J. Haematol.* **2008**, *142*, 827–830. [[CrossRef](#)]
- Bušek, P.; Hrabal, P.; Fric, P.; Šedo, A. Co-expression of the homologous proteases fibroblast activation and dipeptidyl peptidase-IV in the adult human Langerhans islets. *Histochem. Cell Biol.* **2015**, *143*, 497–504. [[CrossRef](#)]
- Huber, M.A.; Kraut, N.; Schweifer, N.; Dolznig, H.; Peter, R.U.; Schubert, R.D.; Scharffetter-Kochanek, K.; Pehamberger, H.; Garin-Chesa, P. Expression of stromal cell markers in distinct compartments of human skin cancers. *J. Cutan. Pathol.* **2006**, *33*, 145–155. [[CrossRef](#)]
- Wäster, P.; Orfanidis, K.; Eriksson, I.; Rosdahl, I.; Seifert, O.; Ollinger, K. UV radiation promotes melanoma dissemination mediated by the sequential reaction axis of cathepsins-TGF-beta1-FAP-alpha. *Br. J. Cancer* **2017**, *117*, 535–544. [[CrossRef](#)]
- Jacob, M.; Chang, L.; Pure, E. Fibroblast Activation Protein in Remodeling Tissues. *Curr. Mol. Med.* **2012**, *12*, 1220–1243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Juillerat-Jeanneret, L.; Tafelmeyer, P.; Golshayan, D. Fibroblast activation protein-alpha in fibrogenic disorders and cancer: More than a prolyl-specific peptidase? *Expert Opin. Ther. Targets* **2017**, *21*, 977–991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Puré, E.; Blomberg, R. Pro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: Back to the basics. *Oncogene* **2018**, *37*, 4343–4357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Liu, F.; Qi, L.; Liu, B.; Liu, J.; Zhang, H.; Che, D.; Cao, J.; Shen, J.; Geng, J.; Bi, Y.; et al. Fibroblast Activation Protein Overexpression and Clinical Implications in Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0116683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Goscinski, M.A.; Suo, Z.H.; Nesland, J.M.; Chen, W.-T.; Zakrzewska, M.; Wang, J.; Zhang, S.; Flørenes, V.A.; Giercksky, K.E. Seprase, dipeptidyl peptidase IV and urokinase-type plasminogen activator expression in dysplasia and invasive squamous cell carcinoma of the esophagus. A study of 229 cases from Anyang Tumor Hospital, Henan Province, China. *Oncology* **2008**, *75*, 49–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Goscinski, M.A.; Suo, Z.; Flørenes, V.A.; Vlatkovic, L.; Nesland, J.M.; Giercksky, K.E. FAP- α and uPA Show Different Expression Patterns in Premalignant and Malignant Esophageal Lesions. *Ultrastruct. Pathol.* **2008**, *32*, 89–96. [[CrossRef](#)]
- Mori, Y.; Kono, K.; Matsumoto, Y.; Fujii, H.; Yamane, T.; Mitsumata, M.; Chen, W.-T. The Expression of a Type II Transmembrane Serine Protease (Seprase) in Human Gastric Carcinoma. *Oncology* **2004**, *67*, 411–419. [[CrossRef](#)]

19. Busek, P.; Mateu, R.; Zubal, M.; Kotackova, L.; Šedo, A. Targeting fibroblast activation protein in cancer—Prospects and caveats. *Front. Biosci.* **2018**, *23*, 1933–1968.
20. Röhrich, M.; Loktev, A.; Wefers, A.K.; Altmann, A.; Paech, D.; Adeberg, S.; Windisch, P.; Hielscher, T.; Flechsig, P.; Floca, R.; et al. IDH-wildtype glioblastomas and grade III/IV IDH-mutant gliomas show elevated tracer uptake in fibroblast activation protein-specific PET/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *46*, 2569–2580. [[CrossRef](#)]
21. Šimková, A.; Bušek, P.; Šedo, A.; Konvalinka, J. Molecular recognition of fibroblast activation protein for diagnostic and therapeutic applications. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2020**, *1868*, 140409. [[CrossRef](#)]
22. Fitzgerald, A.A.; Weiner, L.M. The role of fibroblast activation protein in health and malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* **2020**, *39*, 783–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tulley, S.; Chen, W.T. Transcriptional regulation of seprase in invasive melanoma cells by transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 15280–15296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Knopf, J.D.; Tholen, S.; Koczorowska, M.M.; De Wever, O.; Biniiossek, M.L.; Schilling, O. The stromal cell-surface protease fibroblast activation protein- α localizes to lipid rafts and is recruited to invadopodia. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1853*, 2515–2525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wu, Q.Q.; Zhao, M.; Huang, G.Z.; Zheng, Z.N.; Chen, Y.; Zeng, W.S.; Lv, X.Z. Fibroblast Activation Protein (FAP) Overexpression Induces Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Oral Squamous Cell Carcinoma by Down-Regulating Dipeptidyl Peptidase 9 (DPP9). *Onco Targets Ther.* **2020**, *13*, 2599–2611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Behnan, J.; Finocchiaro, G.; Hanna, G. The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours. *Brain* **2019**, *142*, 847–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Joseph, J.V.; Balasubramanian, V.; Walenkamp, A.; Kruyt, F.A. TGF-beta as a therapeutic target in high grade gliomas —Promises and challenges. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 478–485. [[CrossRef](#)]
28. Wang, Q.; Hu, B.; Hu, X.; Kim, H.; Squatrito, M.; Scarpaccia, L.; deCarvalho, A.C.; Lyu, S.; Li, P.; Li, Y.; et al. Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 42–56. [[CrossRef](#)]
29. Heldin, C.H.; Moustakas, A. Signaling receptors for TGF-beta family members. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*, a022053. [[CrossRef](#)]
30. Zhang, Y.E. Non-Smad signaling pathways of the TGF-beta family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, a022129. [[CrossRef](#)]
31. Budi, E.H.; Duan, D.; Derynck, R. Transforming growth factor-beta receptors and smads: Regulatory complexity and functional versatility. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27*, 658–672. [[CrossRef](#)]
32. Yeh, H.W.; Lee, S.S.; Chang, C.Y.; Lang, Y.D.; Jou, Y.S. A new switch for TGFbeta in cancer. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 3797–3805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bainbridge, T.W.; Dunshee, D.R.; Kljavin, N.M.; Skelton, N.J.; Sonoda, J.; Ernst, J.A. Selective Homogeneous Assay for Circulating Endopeptidase Fibroblast Activation Protein (FAP). *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Roy, L.O.; Poirier, M.B.; Fortin, D. Differential Expression and Clinical Significance of Transforming Growth Factor-Beta Isoforms in GBM Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1113. [[CrossRef](#)]
35. Tojo, M.; Hamashima, Y.; Hanyu, A.; Kajimoto, T.; Saitoh, M.; Miyazono, K.; Node, M.; Imamura, T. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. *Cancer Sci.* **2005**, *96*, 791–800. [[CrossRef](#)]
36. Goldstein, L.A.; Ghersi, G.; Piñero-Sánchez, M.L.; Salamone, M.; Yeh, Y.; Flessate, D.; Chen, W.-T. Molecular cloning of seprase: A serine integral membrane protease from human melanoma. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1361*, 11–19. [[CrossRef](#)]
37. Balaziová, E.; Bušek, P.; Stremenová, J.; Sromová, L.; Křepela, E.; Lizcova, L.; Šedo, A. Coupled expression of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein- α in transformed astrocytic cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2011**, *354*, 283–289. [[CrossRef](#)]
38. Constam, D.B.; Philipp, J.; Malipiero, U.V.; Ten Dijke, P.; Schachner, M.; Fontana, A. Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J. Immunol.* **1992**, *148*, 1404–1410.
39. Sasaki, A.; Naganuma, H.; Satoh, E.; Nagasaka, M.; Isoe, S.; Nakano, S.; Nukui, H. Secretion of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 by malignant glioma cells. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **1995**, *35*, 423–430. [[CrossRef](#)]
40. Leitlein, J.; Aulwurm, S.; Waltereit, R.; Naumann, U.; Wagenknecht, B.; Garten, W.; Weller, M.; Platten, M. Processing of immunosuppressive pro-TGF-beta 1,2 by human glioblastoma cells involves cytoplasmic and secreted furin-like proteases. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 7238–7243. [[CrossRef](#)]
41. Frei, K.; Gramatzki, D.; Tritschler, I.; Schroeder, J.J.; Espinoza, L.; Rushing, E.J.; Weller, M. Transforming growth factor-beta pathway activity in glioblastoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 5963–5977. [[CrossRef](#)]
42. Herbertz, S.; Sawyer, J.S.; Stauber, A.J.; Gueorguieva, I.; Driscoll, K.E.; Estrem, S.T.; Cleverly, A.L.; Desai, D.; Guba, S.C.; Benhadji, K.A.; et al. Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug Des. Dev. Ther.* **2015**, *9*, 4479–4499. [[CrossRef](#)]
43. Akhurst, R.J. Targeting TGF-beta signaling for therapeutic gain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, a022301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Imamichi, Y.; Waidmann, O.; Hein, R.; Eleftheriou, P.; Giehl, K.; Menke, A. TGF beta-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4. *Biol. Chem.* **2005**, *386*, 225–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Ikushima, H.; Todo, T.; Ino, Y.; Takahashi, M.; Miyazawa, K.; Miyazono, K. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* **2009**, *5*, 504–514. [[CrossRef](#)]
46. Bandyopadhyay, B.; Han, A.; Dai, J.; Fan, J.; Li, Y.; Chen, M.; Woodley, D.T.; Li, W. TbetaRI/ Alk5-independent TbetaRII signaling to ERK1/2 in human skin cells according to distinct levels of TbetaRII expression. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 19–24. [[CrossRef](#)]
47. Hamidi, A.; Song, J.; Thakur, N.; Itoh, S.; Marcusson, A.; Bergh, A.; Heldin, C.H.; Landstrom, M. TGF-beta promotes PI3K-AKT signaling and prostate cancer cell migration through the TRAF6-mediated ubiquitylation of p85alpha. *Sci. Signal.* **2017**, *10*, 486. [[CrossRef](#)]
48. Zhang, J.; Valianou, M.; Cheng, J.D. Identification and characterization of the promoter of fibroblast activation protein. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* **2010**, *2*, 1154–1163. [[CrossRef](#)]
49. Mikheeva, S.A.; Mikheev, A.M.; Petit, A.; Beyer, R.; Oxford, R.G.; Khorasani, L.; Maxwell, J.-P.; Glackin, C.A.; Wakimoto, H.; González-Herrero, I.; et al. TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 194. [[CrossRef](#)]
50. Yi, Y.; Wang, Z.; Sun, Y.; Chen, J.; Zhang, B.; Wu, M.; Li, T.; Hu, L.; Zeng, J. The EMT-related transcription factor snail up-regulates FAPalpha in malignant melanoma cells. *Exp. Cell Res.* **2018**, *364*, 160–167. [[CrossRef](#)]
51. Chen, S.J.; Ning, H.; Ishida, W.; Sodin-Semrl, S.; Takagawa, S.; Mori, Y.; Varga, J. The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 21183–21197. [[CrossRef](#)]
52. Cho, H.J.; Baek, K.E.; Saika, S.; Jeong, M.J.; Yoo, J. Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *353*, 337–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Tan, E.J.; Thuault, S.; Caja, L.; Carletti, T.; Heldin, C.H.; Moustakas, A. Regulation of Transcription Factor Twist Expression by the DNA Architectural Protein High Mobility Group A2 during Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 7134–7145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Joseph, J.V.; Conroy, S.; Tomar, T.; Eggens-Meijer, E.; Bhat, K.; Copray, S.; Walenkamp, A.M.; Boddeke, E.; Balasubramanyan, V.; Wagemakers, M.; et al. TGF-beta is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Fuxe, J.; Vincent, T.; Garcia de Hereos, A. Transcriptional crosstalk between TGF- beta and stem cell pathways in tumor cell invasion: Role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 2363–2374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; Von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)]
57. Bowman, R.L.; Wang, Q.; Carro, A.; Verhaak, R.G.; Squatrito, M. Gliovis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. *Neuro. Oncol.* **2017**, *19*, 139–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Sana, J.; Bušek, P.; Fadrus, P.; Besse, A.; Radova, L.; Vecera, M.; Reguli, S.; Stollinova-Sromova, L.; Hilser, M.; Lipina, R.; et al. Identification of microRNAs differentially expressed in glioblastoma stem-like cells and their association with patient survival. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2836. [[CrossRef](#)]
59. Miebach, S.; Grau, S.; Hummel, V.; Rieckmann, P.; Tonn, J.-C.; Goldbrunner, R.H. Isolation and Culture of Microvascular Endothelial Cells from Gliomas of Different WHO Grades. *J. Neuro-Oncol.* **2006**, *76*, 39–48. [[CrossRef](#)]
60. Charalambous, C.; Hofman, F.M.; Chen, T.C. Functional and phenotypic differences between glioblastoma multiforme—derived and normal human brain endothelial cells. *J. Neurosurg.* **2005**, *102*, 699–705. [[CrossRef](#)]
61. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [[CrossRef](#)]
62. Keane, F.M.; Yao, T.-W.; Seelk, S.; Gall, M.G.; Chowdhury, S.; Poplawski, S.E.; Lai, J.H.; Li, Y.; Wu, W.; Farrell, P.; et al. Quantitation of fibroblast activation protein (FAP)-specific protease activity in mouse, baboon and human fluids and organs. *FEBS Open Bio* **2013**, *4*, 43–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Dvořáková, P.; Bušek, P.; Knedlík, T.; Schimer, J.; Etrych, T.; Kostka, L.; Stollinova-Sromova, L.; Šubrt, V.; Šácha, P.; Šedo, A.; et al. Inhibitor-Decorated Polymer Conjugates Targeting Fibroblast Activation Protein. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 8385–8393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Bušek, P.; Vanickova, Z.; Hrabal, P.; Brabec, M.; Frič, P.; Zavoral, M.; Skrha, J.; Kmočová, K.; Laclav, M.; Bunganič, B.; et al. Increased tissue and circulating levels of dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology* **2016**, *16*, 829–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Matrasova, I.; Bušek, P.; Balaziová, E.; Šedo, A. Heterogeneity of molecular forms of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein in human glioblastomas. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **2017**, *161*, 252–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Krepela, E.; Bušek, P.; Hilser, M.; Vanickova, Z.; Šedo, A. Species-specific real-time RT-PCR analysis of expression of stromal cell genes in a tumor xenotransplantation model in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *491*, 126–133. [[CrossRef](#)]

8.3 PŘÍLOHA Č. 4

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

Heterogeneity of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein in glioma primary cell cultures and cell lines



Vomelová I., Fejfarová E., Bušek P., Šedo A.
Aleksi@cesnet.cz; http://lbnf1.cuni.cz



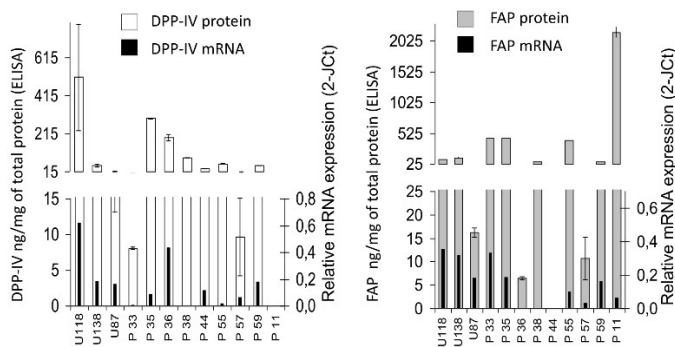
Laboratory of Cancer Cell Biology, Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

Introduction:

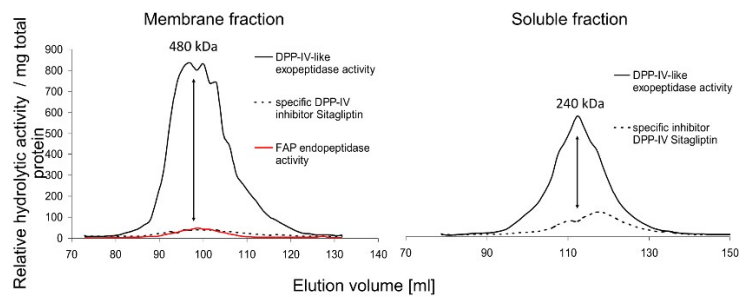
Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) and fibroblast activation protein (FAP) are transmembrane proteases possessing a DPP-IV-like exopeptidase activity. In addition, FAP is an endopeptidase and cleaves denatured collagen. Both enzymes are involved in the processes of cell differentiation, adhesion and migration by hydrolytic as well as non-hydrolytic mechanisms. The effect of DPP-IV and FAP can be either tumor promoting, or tumor suppressing, depending on the tumor type. Differing expression within the particular cell population (stromal, transformed) as well as the molecular heterogeneity of DPP-IV and FAP can be the cause of the conflicting effects of both molecules in different tumors. Molecular heterogeneity of both molecules may affect their biological function(s) due to the shift of the proteolytic processing of their biologically active substrates present in the tumor microenvironment. Our previous data showed the presence of DPP-IV-like enzymatic activity and the expression of DPP-IV and FAP in various glioma primary cell cultures and cell lines. Thus, here we analyze patterns of multiple molecular forms of DPP-IV and FAP in cultured human glioma cells.

Results:

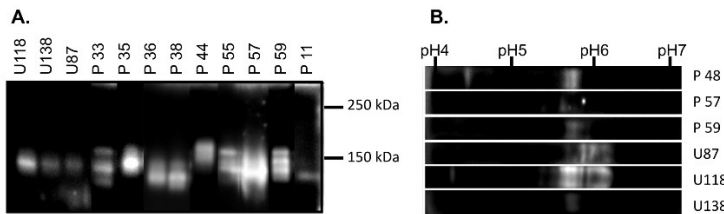
1. DPP-IV (A) and FAP (B) are variably expressed in glioma primary cell cultures and cell lines.



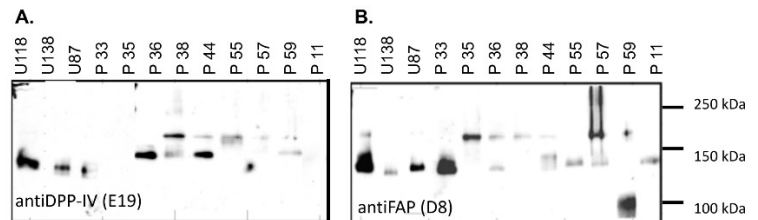
2. The majority of DPP-IV and FAP is present in the membrane fraction of glioma cell line U118 and elute as a high oligomeric complexes



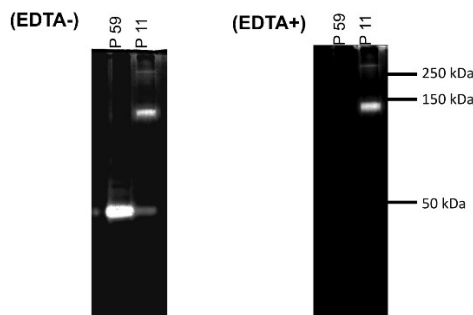
3. DPP-IV-like enzymatic activity in the primary cell cultures and glioma cell lines is represented by multiple molecular forms of DPP-IV and/or FAP with differing MW (A) and pI (B).



4. Presence of multiple molecular forms of DPP-IV (A) and FAP (B) in primary cell cultures and glioma cell lines was confirmed by immunodetection.



5. Gelatinolytic activity of FAP detected by gelatin zymography in the presence (EDTA+) or absence (EDTA-) of the metalloproteinase inhibitor



Conclusions:

Our results demonstrate the presence of multiple molecular forms of DPP-IV and FAP in glioma primary cell cultures and cell lines.

- o The majority of DPP-IV and FAP was present in the membrane fraction and eluted in the form of oligomeric complexes using gel chromatography
- o 1-4 molecular species possessing DPP-IV enzymatic activity were identified using gel chromatography, isoelectric focussing and immunodetection in glioma cell cultures and lines
- o Immunoanalysis demonstrated 1-3 molecular forms associated with the endopeptidase activity characteristic for FAP

Materials and methods:

Glioma cell lines U138, U118 and U87 were acquired from CLS. Glioma primary cell cultures (P 33, 35, 36, 38, 44, 55, 57, 59 and 11) were derived from high grade gliomas (Bušek et al., 2012) and cultured in 10% FCS. Gel chromatography was carried on Sephadex column S 300. Elution profiles were determined using specific substrates H-GlyPro AMC for DPP-IV-like exopeptidase activity (Bachem) and Z-GlyPro for FAP endopeptidase activity (Bachem). Presence of FAP was differentiated using Sitagliptin, specific inhibitor of DPP-IV (Biovision research products). DuoSet ELISA (RnD Systems) was used to quantify DPP-IV and FAP in cell lysates, real-time RT-PCR data were normalized to the beta actin. DPP-IV and FAP were separated according to their MW (SDS PAGE; non reducing, non denaturing conditions) and pI (IPG strips pH 4-7, 7cm, BioRad). The exopeptidase activity was detected using overlay assay with H-GlyProAMC (f.c. 100uM). The endopeptidase (gelatinolytic) activity was assayed using 0.1% gelatin in 7% polyacrylamide gels. Gels were incubated in the presence or absence of EDTA at 37°C and stained with Coomassie blue. Immunodetection of DPP-IV and FAP was performed using the rat monoclonal antiDPP-IV (E19) and antiFAP (D8) antibody (Vitatex) and a HRP conjugated secondary antibody (Abcam 6257)

Grant support: GAUK 671612, IGA 12237-5/2011, PRVOUK-P27/LF1/1 and UNCE 204013, SVV 266516