

KÜLÖNBÖZŐ EREDETŰ MALIGNUS AGYDAGANATOK INVAZIVITÁSÁNAK PANELSZERŰ VIZSGÁLATA

Petrás Miklós¹, Hutóczki Gábor¹, Varga Imre², Vereb György³, Szöllősi János³,
Bognár László¹, Ruzsithi Péter¹, Kenyeres Annamária⁴, Tóth Judit⁵,
Hanzély Zoltán⁶, Scholtz Beáta⁷, Klekner Álmos¹

¹Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Idegsebészeti Klinika; ²Kenézy Kórház Rendelőintézet Egészségügyi Szolgáltató KFT, Tüdőgyógyászati Osztály, Debrecen; ³DE OEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet; ⁴DE OEC, Anatómiai Szövet- és Fejlődéstani Intézet; ⁵DE OEC Onkológiai Intézet; ⁶Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet, Budapest; ⁷DE OEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debrecen

Az agydaganatok kezelésének hatékonyságát környezeti infiltrációs képességük jelentősen befolyásolja. A várható túlélés az intrakraniális tumorok eltávolíthatóságától nagymértékben függ. A glioblasztómák kifejezetten magas kiújulási arányában döntő szerepe van a környezeti infiltrációnak. Ezzel szemben a hasonlóan anaplasztikus bronchogén adenokarcinóma agyi áttétei sokkal kevésbé szűrik be az agyállományt, így radikális eltávolításuk általában rutinszerűen kivitelezhető. A glioblasztómák kiugróan magas infiltrációs képessége molekuláris hátterének pontosabb megismeréséhez az invázióban résztvevő molekulák mRNS-expressziójának meghatározásával kerülhetünk közelebb. E molekulák együttes, panel-szerű vizsgálatát végeztük el két eltérő inváziós képességgel rendelkező tumorban. Idegsebészeti műtéttel eltávolított öt glioblasztóma és öt adenokarcinóma áttéti tumormintán 29 molekuláris mRNS-expresszióját határoztuk meg kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (QRT-PCR), majd 9 célmolekulára vonatkozóan immunhisztokémiai vizsgálatok történtek. Célmolekuláink az epidermális növekedési faktor receptorok (EGFR), az integrin-receptorcsalád és legfontosabb ligandjai: a kollagének, fibronectin és lamininek köréből kerültek ki. Hat molekulában észleltünk szignifikáns mRNS-expresszióbeli különbséget a glioblasztóma és az áttéti daganat között. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal négy esetben találtunk proteinszinten verifikálható eltéréseket. A glioblasztómák agyi áttéti daganatot jelentősen meghaladó inváziós tulajdonságáért felelős molekulák panel-szerű vizsgálatával egyszerűen és gyorsan meghatározhatók a két daganattípusra jellemző fő különbségek: eredményeink a gliómák invazivitásában már ismert ErbB1 mellett az alfa7 integrin szerepére is felhívják a figyelmet. Magyar Onkológia 53: 253–258, 2009

Kulcsszavak: glioblasztóma, áttéti daganat, invázió, EGFR, integrin

Tumor cell invasion into the surrounding brain tissue is mainly responsible for the failure of radical surgical resection and successful treatment, with tumor recurrence as microdisseminated disease. Epidermal growth factor receptors (EGFRs), integrins and their ligands in the extracellular matrix (ECM) predominantly participate in the invasion process, including the cell adhesion to the surrounding microenvironment and cell migration. The extent of infiltration of the surrounding brain tissue by malignant tumors strongly depends on the tumor cell type. Malignant gliomas show much more intensive peritumoral invasion than do metastatic tumors. In this study, the mRNA expression of 29 invasion-related molecules (18 cell membrane receptors or receptor subunits (EGFRs and integrins) and 11 ECM components: collagens, laminins and fibronectin) was investigated by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Fresh frozen human tissue samples from glioblastoma (GBM) and intracerebral bronchial adenocarcinoma metastases (five pieces from each) were evaluated. Significant differences were established in six of the 29 molecules (ErbB1, 2, 3, integrins alpha3, 7 and beta1). To confirm our results at the protein level, immunohistochemical analysis of nine molecules was performed. The staining intensity differed definitely in the case of ErbB1, 2 and integrins alpha3 and beta1. Determining the differences in invasion-related molecules in tumors of different origin can help identify the exact molecular mechanisms that facilitate peritumoral infiltration by glioblastoma cells. These results should allow the selection of target molecules for potential chemotherapeutic agents directed against highly invasive malignant gliomas. Petrás M, Hutóczki G, Varga I, Vereb Gy, Szöllősi J, Bognár L, Ruzsithi P, Kenyeres A, Tóth J, Hanzély Z, Scholtz B, Klekner Á. Expression pattern of invasion-related molecules in cerebral tumors of different origin. Hungarian Oncology 53: 253–258, 2009

Keywords: glioblastoma, metastasis, invasion, EGFR, integrins

Közlésre érkezett:
2009. május 8.

Elfogadva:
2009. augusztus 4.

Levelezési cím:
Dr. Klekner Álmos
Debreceni Egyetem
Orvos-
és Egészségtudományi
Centrum
Idegsebészeti Klinika
4032 Debrecen
Nagyerdei Krt. 98.
Telefon/Fax:
(06-52) 419-418
E-mail:
aklekner@yahoo.com

A tanulmányt az OTKA
F049050 és K62648
pályázatok támogatták.

BEVEZETÉS

Az agyi gliómák a leggyakoribb primer agydaganatok, és közöttük is a legnagyobb arányt a glioblasztómák képviselik. Ez utóbbiak esetében a kombinált kezelési stratégia ellenére szerény túlélési eredmények születnek (43). A kezelés hatékonyságát nagymértékben meghatározza a korai daganatkiújulás, mely a műtéti reszekció határán szinte minden esetben bekövetkezik, hiszen a tumor teljes eltávolítása az igen kiterjedt környezeti tumoros beszűrődés miatt általában kivitelezhetetlen.

Az intrakraniális daganatok második leggyakoribb csoportját az agyi áttéti daganatok alkotják – ezek közül is első helyen a tüdődaganatok állnak. A tüdőeredetű adenokarcinómák azok közé a dedifferenciált, anaplasztikus tumorok közé tartoznak, melyek nagyon gyakran adnak távoli áttétet. Az ilyen intenzív áttétképződéshez a daganatsejteknek igen erőteljes környezethez való kitapadási funkciókra van szüksége, mely a kolonizációnak is alapfeltétele.

A daganatnövekedés és -terjedés során a tumorsejtek szoros kapcsolatba lépnek a környező extracelluláris mátrixot (ECM) alkotó molekulákkal, és a peritumorális invázió is jórészt a tumorsejt felszíni receptorai és az ECM-komponensek közötti együttműködés révén valósul meg (39). Az agyállományban az erek környezetében az ECM fő alkotói a kollagének, a fibronectin és a lamininek (12, 30). A migráló gliómasejtek hatására az agyállomány képes ezeket az ECM-alkotókat előállítani, de a tumorinvázió során lezajló molekuláris mechanizmusok teljes megismerése még várat magára (19, 35).

A transzmembrán receptorok egy része, mint például az EGF-receptorcsalád tagjai, proliferációs jelátvitelben vesznek részt, ami a tumornövekedéshez és invázióhoz egyaránt szükséges (9, 24, 25, 36). Nem véletlen tehát, hogy glioblasztómában EGFR-amplifikációt és mutáns EGFR jelenlétét lehet kimutatni. Egy másik transzmembrán receptorcsaládot az integrinek képviselnek, melyeknek nélkülözhetetlen szerepük van a sejtkitapadásban és a sejtek vándorlásában, így a gliómák inváziójában is aktív funkcióval bírnak (15, 21). Mivel az EGF-receptorok és az integrinek a tumornövekedés során együttműködnek egymással, illetve az ECM molekulák közül a kollagének, a fibronectin és a lamininek ligandjaik közé tartoznak, a peritumorális invázióban betöltött szerepük ma már nyilvánvaló.

A jelen tanulmányban a glioblasztómák kiemelkedően magas infiltrációs képességéért felelős molekulák egy részének azonosítása volt a cél. Ehhez glioblasztóma és tüdőeredetű adenokarcinóma mintákban a peritumorális invázióban jelentős szereppel bíró molekulák csoportos, panelszerű vizsgálatával meghatároztuk a célmolekulák mRNS-szintű expresszióját. Az így kapott eltéréseket fehérjeszinten immunhisztokémiai vizsgálatokkal ellenőriztük.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Szövetminták

Szövetmintáink a Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikán működő Idegsebészeti Szövet- és Agydaganatbankból származnak: műtét során eltávolított és folyékony nitrogén felszínén azonnal lefagyasztott majd -80°C -on tárolt mintákon végeztünk méréseket. Mintáink öt glioblasztóma és öt tüdőeredetű adenokarcinóma szoliter agyi áttétekből származtak. Az RNS-analízisre szánt mintákból előbb metszetekeket készítettünk szövettani diagnózishoz és immunhisztokémiai vizsgálatokra, majd a maradék szövetdarabot RNS-izolálásra továbbítottuk. A szövettani diagnózist a klinikumtól független sorsú kódolt mintákon gyakorlott neuropatológus állapította meg. A Debreceni Idegsebészeti Szövet- és Agydaganatbank a Tudományos és Kutatásügyi Bizottság (TUKEB) engedélyével rendelkezik, és a kutatási célú vizsgálatok minden esetben az érintett betegek írásos beleegyezésével történtek.

mRNS-analízis

A kiválasztott molekulacsoport mRNS-expresszióját egyedi rendelés alapján előállított ún. „DNS-kártya” segítségével végeztük el („Micro Fluidic Card” – Applied Biosystems, USA). Összesen 29 molekulát: sejt felszíni receptorokat és ligandjaikat vizsgáltuk. A tumor eredetét igazoló markereket (glial fibrillary acidic protein – GFAP és citokeratin 18, 19), a Ki-67 proliferációs markert és belső standardként a béta-aktin és glicerin aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) expresszióját szintén meghatároztuk (összesen 35 gén).

A mérések pontosítása és a statisztikai analízis érdekében minden mérést kétszer végeztünk el. Mintáink statisztikai elemzése során az egyes gének expresszió szintjei közötti különbség meghatározásához a Mann-Whitney féle U-próbát alkalmaztuk. Az eredményeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Immunhisztokémia

Kilenc molekula esetében – EGFR (ErbB1), ErbB2, 3, 4, alfa3, 5, béta1, 2, 3 integrin – végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatot. Az immunhisztokémiai reakciók intenzitásának értékelését három különböző, szövettani vizsgálatokban jártas szakember egymástól függetlenül végezte el. Minden metszeten három különböző területen 0-tól 4-ig osztályoztuk a festődési intenzitást, majd eredményeinket átlagolva jutottunk a végleges értékekhez.

EREDMÉNYEK

A fenti betegekből származó műtéti szövetszövetmintákban 29, peritumorális infiltrációban szerepet játszó ECM-komponens mRNS-expressziós szintjét határoztuk meg, majd közülük kilenc molekula esetében immunhisztokémiai vizsgálatokat is végeztünk. A 29 molekulából 18 tartozott a sejtfelszíni receptorok közé, 11 pedig a legfontosabb ligandokat képviselte. A fentiek kivül meghatároztuk tumorspecifikus markerként a GFAP és a citokeratin-18,19 valamint proliferációs markerként a Ki-67 mRNS-expresszióját is (1. táblázat, 1–2. ábra).

A tumormarkerek a megfelelő daganattípusra jellemzően minden minta esetében jelentős eltérést illetve specifikus mRNS-expressziónövekedést mutattak, ami a minták eltérő szövettani típusát egyértelműen megerősítette. A Ki-67 minden esetben egymáshoz hasonló magas értéket eredményezett, bizonyítva ezzel a minták magas proliferációs aktivitását és a szövetszövetminta megfelelően sejtdús – és nem nekrotikus – jellegét.

A két különböző eredetű daganatban mért mRNS-expressziós értékek összehasonlítása során a glioblastóma mintákban az adenokarcinóma-áttekhez képest szignifikánsan magasabb szintet mértünk az EGFR (ErbB1) és alfa7 integrin esetében, míg az ErbB2, 3, alfa3 és béta1 integrin mRNS-expressziós szintje az

áttek daganatokban bizonyult statisztikailag igazolhatóan magasabbnak (1. táblázat).

A kollagének, fibronectin és lamininek mRNS-szintjeinek esetében nem volt szignifikáns különbség a glioblastómák és az áttek daganatok között.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során az ErbB1 esetében a glioblastómákban az áttek daganatokhoz képest egyértelműen magasabb értékeket állapítottunk meg. Az ErbB2, valamint az alfa3 és béta1 integrin esetében az adenokarcinómában észleltünk magasabb immunreakciókat, míg az ErbB3, 4, az alfa5, béta2 és 3 integrin esetében jelentős festődési reakcióbeli különbség nem volt megállapítható (3. ábra).

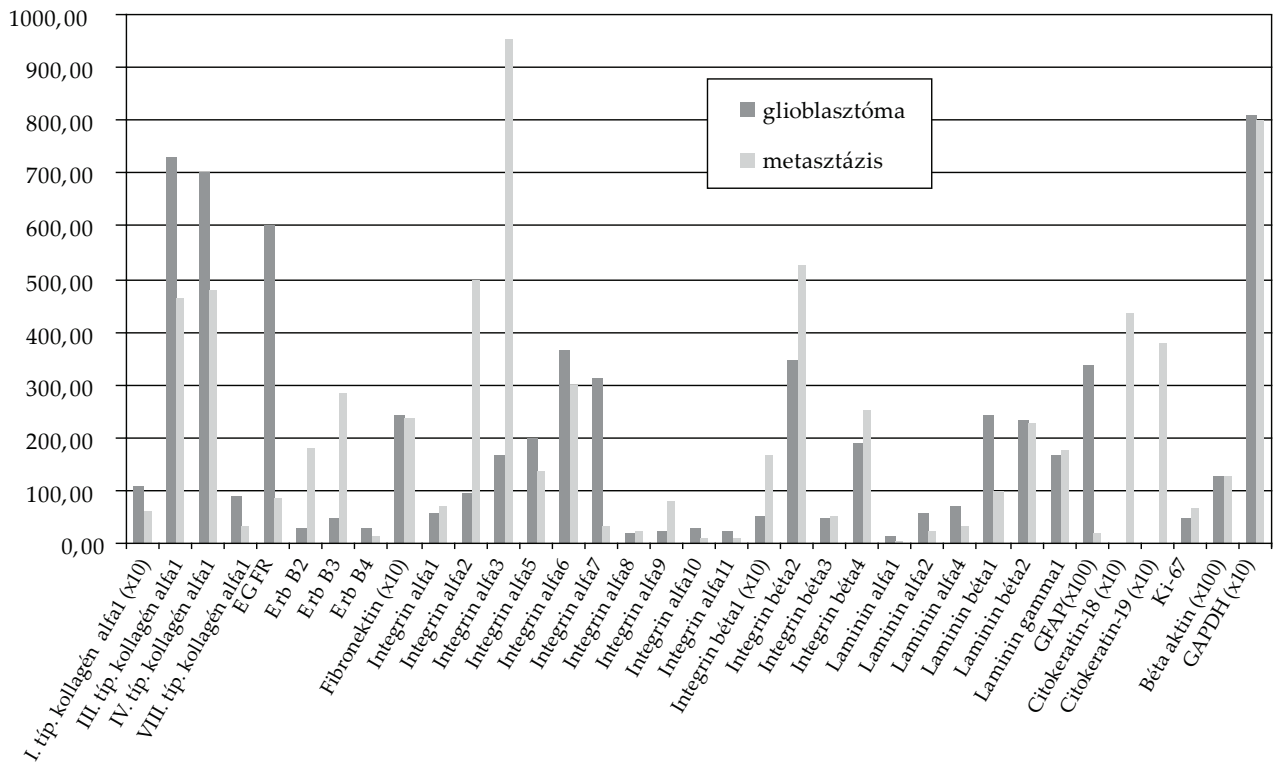
MEGBESZÉLÉS

A magas grádusú gliómák sikeres kezelését nagymértékben hátráltatja, hogy a teljes tumoreltávolítás az invazív jelleg miatt az esetek döntő többségében nem kivitelezhető. Igen aktív kutatás folyik ma is világszerte olyan célmolekulák azonosítására, melyek gyógyszeres befolyásolásával tumorinváziót csökkentő hatás érhető el. E molekulák egyik lehetséges csoportja a tumoros környezeti infiltrációban döntő szerepet játszó tumorsejt-ECM kapcsolatot megvalósító sejtfelszíni receptorok és ligandjaik köre, melyek kölcsönhatásának

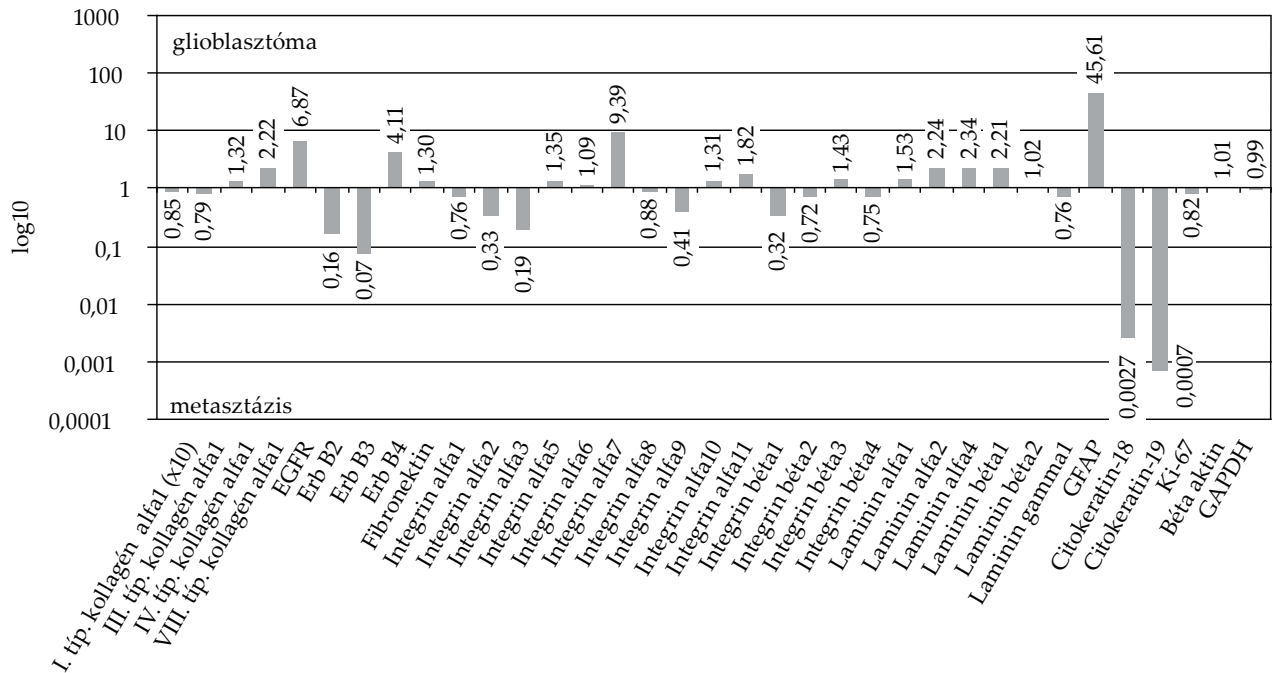
1. táblázat. Huszonkilenc, tumoros környezeti infiltrációban szerepet játszó molekula, tumormarkerek, Ki-67 proliferációs marker és belső standard gének mRNS-expressziós értékeinek összehasonlítása 5 glioblastóma és 5 tüdő-adenokarcinóma agyi áttek tumor mintában

Gén	GBM – Met egymáshoz viszonyított expressziós aránya („fold change”)	p-érték	Gén	GBM – Met egymáshoz viszonyított expressziós aránya („fold change”)	p-érték
I. típusú kollagén alfa1	0,85	>0,05	Integrin alfa11	1,82	>0,05
III. típusú kollagén alfa1	0,79	>0,05	Integrin béta1	0,32	0,032
IV. típusú kollagén alfa1	1,32	>0,05	Integrin béta2	0,72	>0,05
VIII. típusú kollagén alfa1	2,22	>0,05	Integrin béta3	1,43	>0,05
EGFR (ErbB1)	6,87	0,032	Integrin béta4	0,75	>0,05
ErbB2	0,16	0,008	Laminin alfa1	1,53	>0,05
ErbB3	0,07	0,032	Laminin alfa2	2,24	>0,05
ErbB4	4,11	>0,05	Laminin alfa4	2,34	>0,05
Fibronectin	1,30	>0,05	Laminin béta1	2,21	>0,05
Integrin alfa1	0,76	>0,05	Laminin béta2	1,02	>0,05
Integrin alfa2	0,33	>0,05	Laminin gamma1	0,76	>0,05
Integrin alfa3	0,19	0,032	GFAP	45,61	0,008
Integrin alfa5	1,35	>0,05	Citokeratin-18	0,003	0,008
Integrin alfa6	1,09	>0,05	Citokeratin-19	0,001	0,008
Integrin alfa7	9,39	0,008	Ki-67	0,82	>0,05
Integrin alfa8	0,88	>0,05	Béta-aktin	1,01	>0,05
Integrin alfa9	0,41	>0,05	GAPDH	0,99	>0,05
Integrin alfa10	1,31	>0,05			

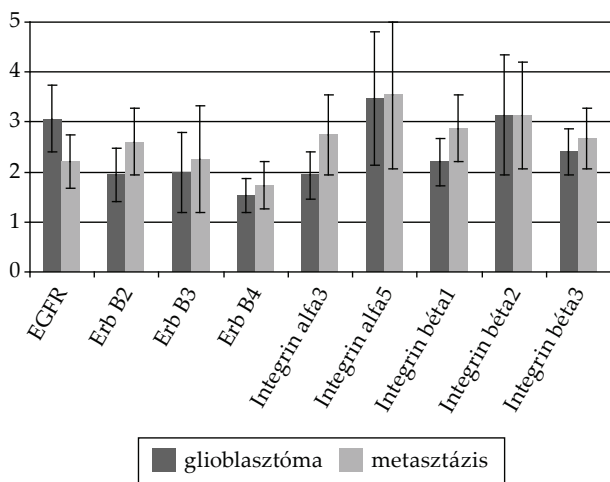
GBM = glioblastóma, Met = metasztázis; a szignifikáns eltérést mutató molekulák (p<0,05) p-értékei félkövér szedéssel kiemelve



1. ábra. Huszonkilenc, tumoros környezeti infiltrációban szerepet játszó molekula, tumormarkerek, Ki-67 proliferációs marker és belső standard gének mRNS-expressziós értékei 5 glioblasztóma és 5 tüdő-adenokarcinóma agyi áttéti tumor mintában



2. ábra. Huszonkilenc, tumoros környezeti infiltrációban szerepet játszó molekula, tumormarkerek, Ki-67 proliferációs marker és belső standard gének mRNS-expressziós értékeinek egymáshoz viszonyított aránya glioblasztómában és tüdő-adenokarcinóma agyi áttéti tumorában. A grafikonon csoportonként 5 független mintában elvégzett duplikát mérések átlagának hányadosai szerepelnek



3. ábra. Kilenc, tumoros környezeti infiltrációban szerepet játszó molekula immunhisztokémiai vizsgálatának szemikvantitatív eredménye glioblasztómában és tüdő-adenokarcinóma agyi áttéti tumorában. Az 5–5 minta 3–3 eltérő területének 3 független vizsgáló által becsült intenzitását (0–4) átlagoltuk

gátlásától a kezelés hatékonyságának javulása várható (5, 8, 16, 17, 22, 41). Az EGFR tumornövekedéssel és invázióval kapcsolatos pozitív szerepéről már számos közlemény született (9, 24, 25, 36). A gliómasejtek migrációjának *in vitro* vizsgálata során az EGFR-expresszió és a laminin stimuláció valamint az alfa3–béta1 integrin között összefüggés igazolódott (39). Az EGFR-hez hasonlóan az integrinek is transzmembrán receptorcsaládot alkotnak, melyek egymással együttműködni képesek. Az integrinek elsősorban az ECM-alkotókkal való kapcsolatuk révén vesznek részt a sejtek környezethez való kitapadásában és a migrációban (4, 15, 21). Mivel az integrinek az intracelluláris oldalon aktinszálak révén a citoskeletonhoz kapcsolódnak, a sejtfurma és sejthelyzet változtatásában (migráció) egyértelmű szereppel bírnak (37, 42). A lamininek az ECM részét képezik és az integrinek ligandjaiként vesznek részt a sejtvándorlásban (2, 29, 34), és a gliómák invazívitasában egyértelműen pozitív szerepet töltenek be (7, 11, 23, 26, 28). A fibronectin az ECM-ban bőségesen jelenlévő nagy molekulású adhezív glikoprotein, mely igen fontos szerepet játszik a sejtek kitapadásában, migrációjában, differenciálódásában és proliferációjában (14). A fibronectin számos integrinhez képes kötődni, így együttműködve vesznek részt a környezeti infiltrációban (18, 22, 33). Az agyállomány ECM-ában számos különböző típusú kollagénmolekula található, melyek a gliómasejtek inváziójában is bizonyított szereppel bírnak (1, 3, 6, 10, 13, 19, 20, 27, 31, 32).

A tumorsejtek és az ECM kapcsolatával összefüggést mutató tumoros környezeti invázió igen intenzív és kiterjedt kutatásokat indukált, melyek során nagyszámú sejtfelszíni receptort és extracelluláris molekulát azonosítottak. Mivel az egyes molekulák expressziója a különböző daganattípusok esetén jelentős szórást mutathat, az invazív jelleg meghatározásához a fontosabb molekulák csoportjának panelszerű vizsgálatával állapítottuk meg

a jellemző különbségeket. Ennek során pedig a különböző invazívitasú intracerebrális daganatok összehasonlító elemzésével a glioblasztómák igen kifejezett infiltrációs képességéért felelős molekulákat kívántuk azonosítani.

Az irodalmi adatok alapján 4 EGFR-családbeli receptor-tirozinkináz, 14 különböző integrin alegységet, 6 laminin alegységet, 4 kollagéntípust és a fibronectint vizsgáltuk. A két különböző tumortípus között az extracelluláris mátrixban található komponensek vonatkozásában számottevő eltérést nem detektáltunk, ellenben a sejtfelszíni receptorok (EGFR-család), illetve receptoralegységek (integrinek) közül hat esetben észleltünk szignifikáns mRNS-expresszióbeli különbséget. A hat molekula közül kettő esetében mértünk a glioblasztómában magasabb értékeket, míg négy esetben az áttéti daganat értékei bizonyultak magasabbnak. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a glioblasztómák kifejezettebb invazívitasában az eltérést mutató molekulák közül valószínűleg az EGFR (ErbB1) és az alfa7 integrin molekuláknak van leginkább szerepe.

Az mRNS-szintű vizsgálatainkat kilenc esetben proteinszintű analízissel kiegészítve, négy esetben azzal egyirányú különbséget detektáltunk, mely a szóban forgó receptorok és ECM-komponensek jelentőségét tovább emeli.

Méréseink során a vizsgált molekulák csoportjára nézve jellemző expressziós eltéréseket tudtunk megállapítani, melyhez a „DNS-kártya” igen egyszerű és gyors eszköznél bizonyult. Az ily módon azonosított molekulák pedig a jövőben az antiinvazív terápiát célzó kutatásokhoz célmolekulaként is szolgálhatnak, de ennek pontosításához további vizsgálatok szükségesek.

IRODALOM

- Adams SL, Sobel ME, Howard BH, et al. Levels of translatable mRNAs for cell surface protein, collagen precursors, and two membrane proteins are altered in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 74:3339–3403, 1977
- Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, et al. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24:326–332, 2005
- Berens ME, Rief MD, Loo MA, et al. The role of extracellular matrix in human astrocytoma migration and proliferation studied in a microliter scale assay. *Clin Exp Metastasis* 12:405–415, 1994
- D'Abaco GM, Kaye AH. Integrins: Molecular determinants of glioma invasion. *J Clin Neurosci* 14:1041–1048, 2007
- Danen EHJ, Yamada KM. Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol* 189:1–13, 2001
- Deryugina EI, Bourdon MA. Tenascin mediates human glioma cell migration and modulates cell migration on fibronectin. *J Cell Sci* 109:643–652, 1996
- Enblad P, Hesselager E, Bongcam-Rudloff I, et al. Modulation of phenotype and induction of irregular vessels accompany high tumorigenic potential of clonal human glioma cells xenografted to nude-rat brain. *Int J Cancer* 85:819–828, 2000
- Engbring JA, Kleinman HK. The basement membrane matrix in malignancy. *J Pathol* 200:465–470, 2003
- Engvevaaten O, Bjerkgvig R, Pedersen P-H, et al. Effects of EGF, bFGF, NGF and PDGF (bb) on cell proliferative, migratory and invasive capacities on human brain-tumour biopsies *in vitro*. *Int J Cancer* 53:209–214, 1993

10. Fan X, Munoz J, Sanko SG, et al. PTEN, DMBT1, and p16 alterations in diffusely infiltrating astrocytomas. *Int J Oncol* 3:667–674, 2002
11. Fujiwara H, Kikkawa Y, Sanzen N, et al. Purification and characterization of human laminin-8. Laminin-8 stimulates cell adhesion and migration through alpha3beta1 and alpha6beta1 integrins. *J Biol Chem* 276:17550–17558, 2001
12. Giese A, Laube B, Zapf S, et al. Glioma cell adhesion and migration on human brain section. *Anticancer Res* 18:2435–2447, 1998
13. Giese A, Rief MD, Loo MA, et al. Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Res* 54:3897–3904, 1994
14. Hynes RO. *Fibronectins*. Springer Verlag, New York 1990
15. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* 69:11–25, 1992
16. Kaspar M, Zardi L, Neri D. Fibronectin as target for tumor therapy. *Int J Cancer* 118:1331–1339, 2006
17. Kawataki T, Yamane T, Naganuma H, et al. Laminin isoforms and their integrin receptors in glioma cell migration and invasiveness: Evidence for a role of alpha5-laminin(s) and alpha3beta1 integrin. *Exp Cell Res* 313: 3819–3831, 2007
18. Kim S, Bell K, Mousa SA, et al. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 156:1345–1362, 2000
19. Knott JCA, Mahesparan R, Garcia-Gabrera I, et al. Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. *Int J Cancer* 75:864–872, 1998
20. Koochekpour S, Merzak A, Pilkington GJ. Extracellular matrix proteins inhibit proliferation, upregulate migration and induce morphological changes in human glioma cell lines. *Eur J Cancer* 31A:375–380, 1995
21. Kumar CC. Signaling by integrin receptors. *Oncogene* 17:1365–1373, 1998
22. Labat-Robert J. Fibronectin in malignancy. Effect of aging. *Semin Cancer Biol* 12:187–195, 2002
23. LeMosy EK, Lightner VA, Erickson HP. Structural analysis of a human glial variant laminin. *Exp Cell Res* 227:80–88, 1996
24. Lund-Johansen M, Bjerkvig R, Pedersen P-H, et al. Effects of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer Res* 50:6039–6044, 1990
25. Lund-Johansen M, Forsberg K, Bjerkvig R, et al. Effects of growth factors on a human glioma cell line during invasion into rat brain aggregates in culture. *Acta Neuropathol* 84:190–197, 1992
26. Mahesparan R, Read TA, Lund Johansen M, et al. Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol (Berl)* 105:49–57, 2003
27. Mahesparan R, Tysnes BB, Read TA, et al. Extracellular matrix-induced cell migration from glioblastoma biopsy specimens in vitro. *Acta Neuropathol (Berl)* 97:231–239, 1999
28. McComb RD, Bigner DD. Immunolocalization of laminin in neoplasms of the central and peripheral nervous systems. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:242–253, 1985
29. Miner H, Yurchenco PD. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 20:255–284, 2004
30. Novak U, Kaye AH. Extracellular matrix and the brain: components and function. *J Clin Neurosci* 7:280–290, 2000
31. Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, et al. Fibronectin-mediated cell migration promotes glioma cell invasion through chemokinetic activity. *Clin Exp Metastasis* 15:538–546, 1997
32. Ohnishi T, Hiraga S, Izumoto S, et al. Role of fibronectin-stimulated tumor cell migration in glioma invasion in vivo: clinical significance of fibronectin and fibronectin receptor expressed in human glioma tissues. *Clin Exp Metastasis* 16:729–741, 1998
33. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115:3861–3863, 2002
34. Patarroyo M, Tryggvason I, Virtanen I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol* 12:197–207, 2002
35. Pedersen P-H, Marienhagen K, Mork S, et al. Migratory pattern of fetal rat brain cells and human glioma cells in the adult rat brain. *Cancer Res* 53:5158–5165, 1993
36. Pedersen P-H, Ness GO, Engebraaten O, et al. Heterogeneous response to the growth factors (EGF, PDGF (bb), TGF- α , bFGF, IL-2) on glioma spheroid growth, migration and invasion. *Int J Cancer* 56:255–261, 1994
37. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704–1709, 2003
38. Rowe DW, Moen RC, Davidson JM, et al. Correlation of procollagen mRNA levels in normal and transformed chick embryo fibroblasts with different rates of procollagen synthesis. *Biochemistry* 17:1581–1590, 1978
39. Tysnes BB, Haugland HK, Bjerkvig R. Epidermal growth factor and laminin receptors contribute to migratory and invasive properties of gliomas. *Invasion Metastasis* 17:270–280, 1997
40. Tysnes BB, Mahesparan R. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *J Neurooncol* 53:129–147, 2001
41. Yuan L, Siegel M, Choi K, et al. Transglutaminase 2 inhibitor, KCC009, disrupts fibronectin assembly in the extracellular matrix and sensitizes orthotopic glioblastomas to chemotherapy. *Oncogene* 26:2563–2573, 2007
42. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305:285–298, 2001
43. Wong ML, Kaye AH, Hovens CM. Targeting malignant glioma survival signaling to improve clinical outcomes. *J Clin Neurosci* 14:301–308, 2007