

Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína  
Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



**MUDr. Bc. Marek Hilšer**

**Dipeptidylpeptidáza IV v ortotopických modelech gliomu**  
**Dipeptidyl peptidase IV in orthotopic models of glioma**

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

**Praha 2016**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval 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, 1. 6. 2016

Marek Hilšer

Podpis

### **Poděkování:**

Děkuji **prof. MUDr. Aleksimu Šedovi, DrSc.** za přínosné a kritické připomínky ke struktuře a obsahu této dizertační práce. Děkuji také za jeho vedení v průběhu celého postgraduálního studia.

Děkuji **RNDr. Janě Trylčové** za vytvoření a poskytnutí transfekovaných buněčných linií, které jsem využil pro tuto práci.

Děkuji všem spolupracovníkům z Laboratoře biologie nádorové buňky za ochotnou pomoc a podporu, které se mi od nich během postgraduálního studia dostalo.

# Obsah

<b>Souhrn .....</b>	<b>6</b>
<b>Summary .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Úvod.....</b>	<b>10</b>
1.1. DPP-IV a její biologický význam .....	11
1.1.1. Molekulární charakterizace DPP-IV .....	11
1.1.2. Příklady biologických účinků katalytického a nekatalytického působení DPP-IV .....	13
1.1.3. DPP-IV a její fyziologický výskyt v organismech .....	15
1.1.4. DPP-IV a její výskyt v nádorových tkáních .....	16
1.1.5. Biologické působení DPP-IV v onkogenezi .....	17
1.1.6. DPP-IV v gliomogenezi .....	20
1.2. In vivo modely experimentálních gliomů .....	21
1.2.1. Modelování gliomogeneze in vivo pomocí RCAS/tv-a technologie .....	24
1.3. Validace neinvazivní fluorescenční zobrazovací metody pro analýzu dynamiky růstu xentransplantačního ortotopického modelu gliomu .....	27
<b>2. Hypotézy.....</b>	<b>29</b>
<b>3. Cíle .....</b>	<b>30</b>
<b>4. Metody .....</b>	<b>31</b>
3.1. Buněčné linie odvozené z astrocytárních tumorů a jejich transfektanty .....	31
3.2. In vivo implantace gliomových buněk do mozku myši .....	32
3.3. Transgenní indukce gliomu in vivo .....	32
3.4. Kvantifikace objemu tumorů .....	33
3.5. In vivo fluorescenční zobrazování růstu tumoru .....	33
3.6. Analýza relativního zeslabení fluorescenčního signálu v mozkové tkáni.....	34
3.7. Imunofluorescenční detekce antigenů .....	34
3.8. Katalytická histochemie .....	36
3.9. Kombinované stanovení enzymové aktivity DPP-IV a exprese CD31 .....	36
3.10. Biochemické stanovení DPP-IV- podobné enzymové aktivity.....	37
3.11. Stanovení celkového proteinu .....	38
3.12. Statistická analýza .....	38

<b>4. Výsledky .....</b>	<b>39</b>
4.1. Zavedení ortotopického xenotransplantačního modelu gliomu .....	39
4.2. Vliv experimentálně zvýšené exprese katalyticky aktivní DPP-IV na růst ortotopického xenograftu.....	40
4.3. Vliv zvýšené exprese katalyticky neaktivní DPP-IV na růst ortotopického xenograftu.....	42
4.4. Analýza indexu proliferace Ki-67 .....	43
4.5. Indukce tumorů pomocí retrovirového vektoru RCAS PDGFB-HA .....	44
4.6. Přítomnost DPP-IV enzymové aktivity v tumorech transgenně indukovaných retrovirovým vektorem.....	46
4.7. Kvantifikace enzymové aktivity kanonické DPP-IV v tumorech transgenně indukovaných retrovirovým vektorem RCAS PDGFB-HA.....	49
4.8. In vivo zobrazování .....	50
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>53</b>
5.1. DPP-IV a její vliv na gliomogenezi in vivo .....	53
5.2. Validace neinvazivní fluorescenční zobrazovací metody .....	58
<b>6. Závěry.....</b>	<b>60</b>
<b>Zkratky.....</b>	<b>61</b>
<b>Literatura.....</b>	<b>62</b>
<b>Přílohy .....</b>	<b>74</b>

## Souhrn

Maligní gliomy se řadí mezi vysoce agresivní nádorová onemocnění. Průměrná doba přežití pacientů nepřesahuje 15 měsíců. Přes intenzivní výzkum se dosud nedaří nalézat terapeutické strategie, které by významným způsobem prodloužily život postižených tímto onemocněním.

Jednu z oblastí výzkumu možného terapeutického zacílení v onkologické léčbě představují proteázy buněčného povrchu. Do této skupiny proteinů patří i dipeptidylpeptidáza IV (DPP-IV). Změna exprese DPP-IV byla prokázána v různých typech nádorových onemocnění a také v maligních gliomech. Poznání role DPP-IV v biologických procesech tohoto maligního onemocnění může přispět k rozvoji nových terapeutických modalit.

Cílem této dizertační práce bylo zavést xenograftový ortotopický model gliomu a geneticky modifikovaný model gliomu (genetically engineered model, GEM). Dále jsme zkoumali vliv DPP-IV na růst experimentálního gliomu a zaměřili se na rozlišení podílu jejího katalytického a nekatalytického mechanismu v tomto procesu. V GEM modelu jsme sledovali enzymovou aktivitu a distribuci DPP-IV. Pro intraexperimentální sledování dynamiky růstu experimentálních gliomů jsme testovali vhodnost neinvazivní fluorescenční zobrazovací metody.

Výsledky práce ukázaly, že DPP-IV negativně ovlivňovala růst gliomu v xenograftovém ortotopickém modelu. Tento vliv se uplatňoval bez ohledu na její katalytickou funkci. V transgenním modelu gliomu jsme pozorovali zvýšenou DPP-IV-podobnou aktivitu oproti kontrolní tkáni, ale nárůst kanonické DPP-IV nebyl statisticky významný. V tumorech transgenního modelu jsme ukázali, že oproti zdravé mozkové tkáni došlo v nádorové tkáni ke změně distribuce DPP-IV. Zatímco ve zdravé tkáni byla DPP-IV exprimována na cévách a kapilárách, novotvořené dysplastické nádorové kapiláry ji neexprimovaly. V nádorové tkáni byla DPP-IV exprimována individuálními buňkami nacházejícími se především v okolí cév. Při validaci neinvazivní fluorescenční zobrazovací metody jsme zjistili, že není vhodná pro přesný odhad objemů experimentálních tumorů, ale může být využívána pro semikvantitativní detekci růstu tumorů.

Přestože je DPP-IV ve zvýšené míře exprimována ve vysoce maligních gliálních nádorech, naše práce v souladu s výsledky jiných autorů ukázala, že DPP-IV má pravděpodobně kompenzatorní antitumorigenní účinky. Experimenty s využitím xenograftového modelu ukázaly, že menší růst tumorů spojený se zvýšenou transgenní expresí DPP-IV transformovaných gliálních buněk nezávisí na enzymové aktivitě DPP-IV.

V GEM modelu byla DPP-IV spontánně exprimována převážně stromálními buňkami. Tato pozorování nasvědčují, že biologická role DPP-IV v jednotlivých kompartmentech nádoru může být různá.

Naše výsledky rozšiřují znalosti o roli DPP-IV v onkogenezi, jejíž pochopení je předpokladem jak dalšího využití, tak i případných rizik terapeutického cílení této molekuly.

## Summary

Malignant gliomas belong to a highly aggressive class of tumours. Average patient survival time generally does not exceed 15 months. Despite intensive research, no therapeutic strategies capable of significantly extending the lives of those affected by the disease have been established to date.

One potentially viable area of research into possible therapeutic targets in cancer therapy focuses on cell surface proteases. This group of proteins includes dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV). Changes to DPP-IV expression have been established in the case of various cancer types including malignant gliomas. Understanding the role of DPP-IV in the biological processes of this malignant disease may thus contribute to the development of new therapeutic modalities.

This thesis is therefore dedicated to establishing an orthotopic xenograft model as well as a genetically engineered model (GEM) of the glioma. The effects of DPP-IV on the growth of an experimental glioma were subsequently examined, as was the ratio of catalytic and non-catalytic mechanisms in this process. The GEM model was used for monitoring enzymatic activity and DPP-IV distribution. Non-invasive fluorescence imaging was employed in order to monitor the intraexperimental dynamics of experimental gliomas.

The results indicated that DPP-IV negatively influences glioma growth in the orthotopic xenograft model. This influence was found to be independent of its catalytic function. While the transgenic glioma model produced evidence of increased DPP-IV-like activity in comparison with control tissue, the growth of canonical DPP-IV was not statistically significant. The transgenic model indicated that while no changes took place in healthy brain tissue, changes in DPP-IV distribution occurred in model tumours. While DPP-IV was expressed in blood vessels and capillaries in healthy tissue, it was not expressed in newly formed dysplastic tumour capillaries. DPP-IV was expressed in individual tumour tissue cells located especially in the vicinity of blood vessels. When validating non-invasive fluorescence imaging, we found that this technique was not suitable for providing accurate estimates of experimental tumour volumes, but that it may be used for the semi-quantitative detection of tumour growth.

Although DPP-IV was increasingly expressed in highly malignant glial tumours, our work has shown that – in accordance with previous studies – DPP-IV likely exerts compensatory antitumour effects. Experiments employing the xenograft model indicate that less extensive tumour growth associated with the high transgenic expression of DPP-IV in



transformed glial cells does not depend on its enzymatic activity. In the GEM model, DPP4 was spontaneously expressed primarily by stromal cells. These observations suggest that the biological role of DPP-IV in various tumour compartments may differ.

Our results expand the existing body of knowledge regarding the role of DPP-IV in oncogenesis; understanding these processes is a prerequisite for its further utilization as well as for the recognition of the potential risks posed by the therapeutic uses of this molecule.

## 1. Úvod

Podstatou nádorového onemocnění je transformace normální buňky na buňku nádorovou. Transformované buňky se od netransformovaných buněk odlišují řadou regulačních mechanismů, včetně regulací proliferace, buněčné smrti, diferenciaci, schopnosti migrovat do okolní tkáně a adherovat k buněčným i nebuněčným strukturám tkáňového mikroprostředí. Na změně biologických vlastností buněk souvisejících s jejich transformací se podílí řada proteáz. Výzkumy posledních let ukazují, že jejich působení významnou měrou přispívá k propagaci maligního chování nádorových onemocnění (Kessenbrock a kol., 2010). Významnou skupinu proteáz zapojených v biologických procesech nádorové buňky představují proteázy buněčného povrchu (Mentlein, 2004). Pro tyto proteázy je charakteristické, že jsou ukotveny do cytoplazmatické membrány tak, že se jejich proteolytická aktivita uplatňuje na vnější straně buněčné membrány. Některé z těchto proteáz mají rovněž svou solubilní formu, která je uvolňována do okolí buněk a/nebo do tělních tekutin. Lze je proto chápat jako nástroj pro interakci buňky s vnějším prostředím. Je známo, že funkce mnoha biologicky aktivních peptidů, které se podílejí na mezibuněčné komunikaci, nebo modifikují extracelulární matrix, a tak ovlivňují tkáňovou architekturu, je specificky regulována právě těmito proteázami (Wild-Bode a kol., 2001; Levicar a kol., 2003; Van Lint a Libert, 2007).

Studium výskytu a působení povrchových proteáz v nádorových tkáních má význam při hledání nových onkologických markerů a terapeutických cílů (Heissig a kol., 2015). Jednu ze skupin proteáz, která má potenciální význam pro klinické využití, představují tak zvané molekuly DASH - (Dipeptidylpeptidáze IV Aktivitou a/nebo Strukturou Homologní molekuly“). Kanonickým reprezentantem, od něž je tato skupina odvozena, je dipeptidylpeptidáza IV (DPP-IV) (Scharpe a De Meester, 2001; Busek a kol., 2004; Busek a kol., 2008; Vincenzo a kol., 2014).

Dysregulace exprese a proteolytické aktivity DPP-IV, popsaná u mnoha typů maligních nádorů, vyvolává otázky o jejím biologickém působení a úloze v rozvoji a progresi nádorového bujení. To platí i v případě vysoce maligního gliálního nádoru mozku - multiformního glioblastomu, u kterého byla prokázána zvýšená exprese této proteázy (Stremenova a kol., 2007; Mares a kol., 2012). Odhalení biologické role DPP-IV v rozvoji tohoto závažného onemocnění může poskytnout nové informace pro zlepšení včasné diagnostiky a terapie (Davies a kol., 2015).

## ***1.1. DPP-IV a její biologický význam***

### ***1.1.1. Molekulární charakterizace DPP-IV***

DPP-IV (CD26, EC 3.4.14.5) je transmembránová serinová proteáza, jejíž primární strukturu tvoří 766 aminokyselin (Obrázek 1). Z šesti aminokyselin se skládá krátká cytoplazmatická doména, 22 aminokyselin tvoří hydrofobní transmembránovou doménu a 738 zbytků představuje extracelulární část molekuly. Dominantní prvky extracelulární části DPP-IV představují alfa/beta hydrolázová doména a beta-vrtulová doména. Katalyticky funkční protein je homodimer (Hopsu-Havu a Glenner, 1966).

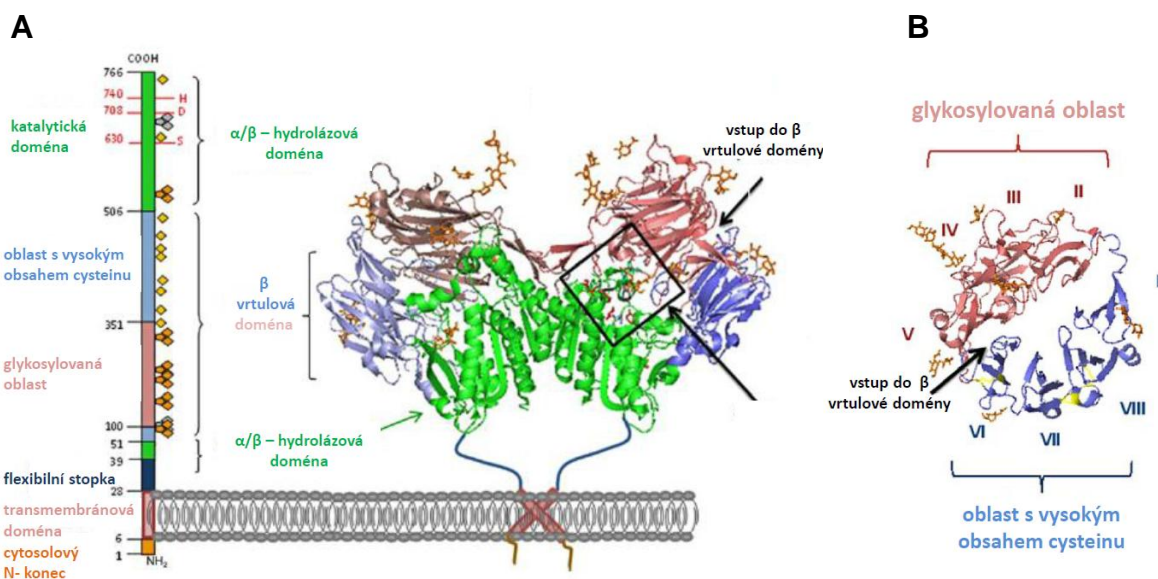
Alfa/beta hydrolázová doména obsahuje aktivní místo enzymu, které se skládá z katalytické triády tvořené aspartátem 708, histidinem 740 a serinem 630. Charakteristikou hydrolázové aktivity DPP-IV je vysoce specifické odštěpování N-terminálního dipeptidu ze substrátů, které ve druhé pozici od N-konce obsahují prolin nebo alanin (Mentlein, 1999).

Tento motiv se vyskytuje v primární struktuře velkého množství biologicky aktivních oligopeptidů a je vysoce evolučně konzervován. Přibližně jedna třetina známých lidských chemokinů obsahuje X-ProNH koncový dipeptidový motiv. Některé z těchto peptidů jsou potvrzenými substráty DPP-IV a o dalších se předpokládá, že jimi na základě své sekvence

mohou být (Wolf a kol., 2008). Poznatky o biologickém působení DPP-IV potvrzují, že enzymová aktivita tohoto proteinu hraje významnou roli v řadě fyziologických a patologických dějích (Vanhoof a kol., 1995).

Beta-vrtulová doména DPP-IV se skládá z osmi skládaných listů. Nacházejí se v ní dvě charakteristické oblasti. První oblast obsahuje vysoký počet glykosylovaných zbytků a druhá se vyznačuje vysokým počtem cysteinu (Weihofer a kol., 2004). Tyto vlastnosti předurčují DPP-IV pro vazebné nehydrolytické interakce s proteiny extracelulárního prostoru (Piazza a kol., 1989; Loster a kol., 1995).

Kromě transmembránové formy DPP-IV byly také popsány solubilní formy této molekuly, které jsou kratší o 30 nebo 39 aminokyselin od N-konce proteinu (Durinx a kol., 2000).



**Obrázek 1. Dipeptidylpeptidáza IV (CD26, EC 3.4.14.5)**

(A) Primární a kvartérní struktura DPP-IV. (B) Pohled shora na beta-vrtulovou doménu s osmi skládanými listy zahrnující oblast s vysokým obsahem cysteinu a oblast s glykosylovanými zbytky. Převzato a upraveno z (Klemann a kol., 2016).

### ***1.1.2. Příklady biologických účinků katalytického a nekatalytického působení DPP-IV***

Funkční efekty podmíněné katalytickým a nekatalytickým mechanismem účinku DPP-IV byly popsány v řadě biologických jevů. Rozlišení těchto funkčních mechanismů má význam pro pochopení vlivu DPP-IV na konkrétní biologické děje, včetně onkogeneticky významných procesů a tedy i možnost návrhu případné terapeutické intervence DPP-IV.

Katalyticky DPP-IV například ovlivňuje celou řadu imunoregulačních mechanismů (Klemann a kol., 2016). Prostřednictvím štěpení neuropeptidu Y, které mění jeho receptorovou preferenci tak, že zvyšuje angiogenní aktivitu endoteliálních buněk a zároveň ovlivňuje proliferaci a konstriční aktivitu buněk hladkého svalstva, se DPP-IV uplatňuje v regulaci angiogeneze. Některé práce naznačují, že takto může DPP-IV ovlivňovat průběh ischemických a rovněž onkologických onemocnění (Zukowska-Grojec a kol., 1998; Kitlinska a kol., 2003; Frerker a kol., 2007).

Enzymová funkce DPP-IV také sehrává roli v procesu přijímání (engraftment) a cílení (homing) kmenových buněk kostní dřeně. Kontrola pohybu a cílení těchto buněk je ovlivňována signalizací receptoru CXCR4 a jeho ligandu CXCL12, který je hydrolyticky štěpen a tím inaktivován DPP-IV. Při experimentální inhibici enzymové aktivity DPP-IV docházelo k významnému posílení cílení a přijímání kmenových buněk do kostní dřeně (Christopherson a kol., 2006; Tian a kol., 2006).

Hydrolytická aktivita DPP-IV sehrává roli i v metabolických regulacích, včetně ovlivnění glukózové homeostázy. Proinzulinogenní peptid GLP-1 je substrátem DPP-IV, která ho štěpením inaktivuje. Specifické inhibitory DPP-IV jsou proto v současnosti využívány v léčbě diabetu mellitu II. typu (Nauck, 2016).

Nekatalytické funkce DPP-IV jsou realizovány vazebnými interakcemi s dalšími molekulárními partnery.

Nehydrolytické funkce DPP-IV jsou zprostředkovány jejími vazebnými interakcemi s dalšími molekulárními partnery. Popsána byla interakce DPP-IV s adenosindeaminázou (ADA) (Schrader a kol., 1990; Gorrell a kol., 2001). Exprese DPP-IV a její asociace s ADA může mít význam pro regulaci koncentrace adenosinu v mezibuněčném mikroprostředí. Tímto mechanismem může exprese DPP-IV ovlivňovat proliferaci T-lymfocytů, a tím zasahovat do imunitních dějů (Kameoka a kol., 1993; Ben-Shooshan a kol., 2002).

Ohnuma ve své práci dokazuje, že caveolin-1 přítomný na membráně antigen prezentujících buněk vazebně interaguje s DPP-IV na T-lymfocytech. Tato interakce se v konečném důsledku podílí na jejich aktivaci (Ohnuma a kol., 2004). Dále byly jako membránové ligandy DPP-IV popsány receptor pro tromboxan A<sub>2</sub>, CXCR 4 a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> transportér proximálních tubulů ledvin (Girardi a kol., 2001; Weihofen a kol., 2005).

Ze skupiny proteinů extracelulární matrix byly popsány vazebné interakce DPP-IV s fibronektinem a kolagenem typu I (Bauvois, 1988; Piazza a kol., 1989).

Interakce buněk zprostředkované vazbami DPP-IV s membránovými proteiny okolních buněk nebo proteiny extracelulární matrix mohou ovlivňovat jak chování okolních buněk, tak i adhezivní vlastnosti, migraci, invazivitu či schopnost buněk exprimujících DPP-IV metastazovat. Tyto interakce tak mohou představovat významný mechanismus biologického působení DPP-IV ve fyziologických a patologicky změněných tkáních (Cheng a kol., 2003; Demuth a Berens, 2004).

### ***1.1.3. DPP-IV a její fyziologický výskyt v organismech***

Dipeptidylpeptidáza IV byla poprvé popsána Glennerem a Hopsu-Havu v roce 1966 (Hopsu-Havu a Glenner, 1966). Je přítomna v řadě tkání, buněk a tělních tekutin za fyziologických stavů a často její exprese či přítomnost doznává změn za patologických stavů (Busek a kol., 2006).

DPP-IV se vyskytuje na řadě populací imunitního systému, zejména ovšem na aktivovaných T lymfocytech, u nichž zprostředkovává kostimulační signalizaci a reguluje transendoteliální migraci (De Meester a kol., 1995; Iwata a Morimoto, 1999; Kahne a kol., 1999).

Přítomnost DPP-IV byla dále prokázána na výběžcích podocytů, buňkách proximálních tubulů ledvin a v kartáčovém lemu tenkého střeva (Schrader a Pollara, 1978; Mentlein, 1999). Její výskyt byl popsán v játrech, plicích, krevních cévách, thymu a melanocytech. Lze ji detekovat v pankreatu v buňkách duktů a je také exprimována A buňkami Langerhansových ostrůvků (Busek a kol., 2014; Omar a kol., 2014).

DPP-IV-podobná proteolytická aktivita je přítomna v krevní plazmě a seminální tekutině. 95 % této aktivity v krevní plazmě je tvořeno aktivitou solubilní formy kanonické DPP-IV (Durinx a kol., 2000).

Ve zdravém lidském a potkaním mozku exprese DPP-IV identifikována nebyla (Schrader a kol., 1987).

Expresa DPP-IV různými buněčnými typy a relativně široká distribuce v lidském organismu napovídá, že DPP-IV zasahuje do řady fyziologických procesů. Podrobnější poznání této molekuly přineslo studium její biologické role v patologických procesech.

#### ***1.1.4. DPP-IV a její výskyt v nádorových tkáních***

Řada studií prokazuje, že exprese a proteolytická aktivita DPP-IV ve zdravých tkáních se odlišuje od exprese a aktivity v nádorových tkáních. Ve většině případů malignit se aktivita a genová exprese DPP-IV oproti zdravým tkáním zvyšuje, ačkoliv ve vlastních nádorových buňkách to může být naopak. (Wesley a kol., 1999; Sedo a kol., 2008).

Nárůst exprese a aktivity DPP-IV v biopsiích lidských nádorů ve většině případů pozitivně koreluje se stupněm malignity těchto nádorů. To platí například pro některé typy hematologických malignit, vycházejících z T-lymfocytů, u nichž se zvýšená exprese DPP-IV omezovala na agresivnější formy těchto onemocnění (Carbone a kol., 1995). Podobně tomu je i u některých solidních tumorů, například u gastrointestinálních stromálních nádorů, nádorů štítné žlázy nebo melanomu. Agresivní tumory z folikulárních buněk štítné žlázy vysoce exprimují DPP-IV, naproti tomu u benigních lézí nárůst aktivity ani genové exprese zjištěn nebyl (Hirai a kol., 1999; Yamaguchi a kol., 2008). Analogicky maligní melanom v radiální růstové fázi zvýšeně exprimuje DPP-IV, ale u benigních lézí je tento jev vzácný (Van den Oord, 1998).

V případě mozkových nádorů vysokostupňové astrocytární tumory a také meningeomy vykazují zvýšenou aktivitu a genovou expresi DPP-IV v porovnání s méně maligními a více diferencovanými formami těchto onemocnění (Stremenova a kol., 2010; Mares a kol., 2012) (Příloha 3).



### **1.1.5. Biologické působení DPP-IV v onkogenezi**

Zvýšení exprese DPP-IV, popsané v řadě typů nádorových tkání, vyvolává otázku, zda DPP-IV hraje v onkogenezi protumorigenní nebo antitumorigenní roli (Hirai a kol., 1999; Stremenova a kol., 2007; Mares a kol., 2012). Nárůst exprese DPP-IV pozorovaný především u vyšších stupňů malignity nádorů nepřímo napovídá, že DPP-IV má spíše protumorigenní účinek. Některé práce ale ukazují, že efekt DPP-IV není v tomto smyslu jednoznačný (Iwata a Morimoto, 1999; Busek a kol., 2008). Studie zabývající se biologickým působením DPP-IV *in vitro*, a také v modelech tumorů *in vivo*, přinášejí výsledky potvrzující antitumorigenní působení DPP-IV (Kajiyama a kol., 2002; Wesley a kol., 2004; Arscott a kol., 2009; Busek a kol., 2012) (Příloha 2).

Dosavadní experimentální práce studující výsledný biologický efekt DPP-IV na onkogenezu nabízejí několik alternativních odpovědí při užití různých druhů experimentálních přístupů.

V prvním přístupu je zkoumáno působení DPP-IV bez zaměření na rozlišení mechanismů, kterými DPP-IV působí. Transgenně vyvolaná stabilní exprese DPP-IV v buněčných liniích odvozených z ovariálního nádoru navodila morfologickou změnu těchto buněk ve směru vyšší buněčné diferenciaci. Zároveň došlo ke snížení invazivity a migrační aktivity takto změněných buněk. V pokusech *in vivo* z buněk stabilně exprimujících DPP-IV na rozdíl od kontrol bez exprese DPP-IV tumory nevznikaly (Kajiyama a kol., 2002). Změna vlastností buněk navozená expresí DPP-IV byla dána do souvislosti se zvýšením produkce E-cadherinu a přirozených inhibitorů matrix metaloproteáz. Příčinný mechanismus působení DPP-IV na zvýšení produkce těchto molekul však nebyl osvětlen (Kajiyama a kol., 2003). V jiném experimentálním přístupu snížení exprese DPP-IV navozené prolongovaným vystavením buněk kolorektálního karcinomu zvýšeným koncentracím adenosinu *in vitro* navodilo protumorigenní chování těchto buněk. Jako mechanismus tohoto efektu byl navržen

pokles vazebné interakce buňky s fibronektinem v důsledku deplece DPP-IV, vedoucí ke snížené adhezivitě buněk (Tan a kol., 2004).

Druhá skupina studií sleduje vliv DPP-IV na různé druhy transformovaných buněk, ale navíc se pokouší odlišit, zda jsou pozorované efekty závislé na enzymové aktivitě DPP-IV či nikoliv. Pro experimentální řešení tohoto problému byly zvoleny dva přístupy. První využívá inhibici katalytické aktivity DPP-IV pomocí specifických inhibitorů a druhý je založen na vyřazení enzymové aktivity pomocí bodové mutace v aktivním místě enzymu. Zvýšení exprese DPP-IV navozené pomocí inducibilní exprese navodilo diferenciaci neuroblastomových buněk, inhibici migrace, snížení jejich invazivity a potlačení angiogeneze *in vitro*. Tento efekt byl eliminován přidáním inhibitoru enzymové aktivity DPP-IV diprotininu A. Jako přímý mechanismus tumorsupresorového efektu up-regulace DPP-IV bylo zjištěno štěpení chemokinu SDF-1 a zároveň potlačení exprese jeho receptoru CXCR4 (Arscott a kol., 2009). V jiném experimentálním uspořádání podání diprotininu A *in vitro* navodilo zvýšení proliferace a migrace u buněk odvozených z karcinomu tlustého střeva, což v tomto systému svědčí pro antitumorigenní efekt DPP-IV. Za mechanismus působení DPP-IV bylo navrženo proteolytické štěpení inkretinu GLP-2, který je v neštěpeném stavu silným induktorem migrační aktivity buněk (Yusta a kol., 2000; Masur a kol., 2006). Diprotinin A rovněž zvyšoval invazivitu buněčných linií odvozených z choriokarcinomu (Sato a kol., 2002). Za pozornost stojí skutečnost, že výsledky studií, v nichž byla v experimentálním přístupu inhibice DPP-IV realizována nikoli inhibitorem, ale mutací jejího aktivního místa, nepřinesly podobně jednoznačné výsledky.

Indukce exprese enzymaticky aktivní formy DPP-IV navodila diferenciaci, snížila proliferaci a potlačila tumorigenicitu transformovaných melanocytů *in vivo*. Zvýšení exprese bodově mutované formy DPP-IV bez enzymové aktivity ve stejném typu buněk tento efekt již nenavodilo (Wesley a kol., 1999). V pracích Pethiyagody i Buška zvýšení DPP-IV také

potlačovalo tumorigenní vlastnosti buněk odvozených z melanomu a gliomu, ale na rozdíl od výsledků Wesleyové byl tento efekt pozorován jak u enzymaticky aktivní tak enzymaticky neaktivní formy DPP-IV (Wesley a kol., 1999; Pethiyagoda a kol., 2000; Yu a kol., 2011; Busek a kol., 2012) (Příloha 2). Závěry těchto prací naznačují, že nejen enzymatická aktivita DPP-IV sehrává roli v mechanismech jejího tumorsupresorového působení, ale pravděpodobně se zapojují i mechanismy nekatalytické.

Komplexita funkčního potenciálu DPP-IV je dokumentována dalšími studii, zabývajícími se specifickými mezimolekulárními interakcemi této molekuly v rámci nádorového mikroprostředí primárního, ale i metastatického nádoru. Interakce DPP-IV s plazminogenem navozovala u transformovaných buněk prostaty zvýšení jejich migrační aktivity (Gonzalez-Gronow a kol., 2001). U buněk odvozených z karcinomu prsu vazebné interakce DPP-IV s fibronectinem přispívaly orgánově specifickému metastazování těchto buněk do plic. DPP-IV exprimovaná endoteliemi plicních kapilár zde působila jako vazebný protein pro metastatické buňky exprimující fibronectin (Cheng a kol., 2003).

Většina autorů v současnosti tedy předpokládá spíše antitumorigenní účinky zvýšené exprese DPP-IV ve většině systémů *in vitro* a také *in vivo*, ale odlišují se v závěrech, do jaké míry, a ve kterých nádorech závisí její účinky na její enzymové aktivitě.

Přesnější rozlišení mechanismů, kterými DPP-IV v onkogenezi působí, nabývá na významu především v kontextu současného klinického užívání specifických inhibitorů DPP-IV v léčbě diabetu mellitu II. typu. Dlouhodobá inhibice katalytické aktivity DPP-IV s efektem na funkce imunitního systému a angiogenezi může být provázena vedlejšími nežádoucími účinky (Stulc a Sedo, 2010; Tseng a kol., 2015).

### ***1.1.6. DPP-IV v gliomogenezi***

Maligní gliomy tvoří asi 50 % nádorů vycházejících z centrálního nervového systému u dospělých jedinců. Průměrná doba přežití u pacientů postižených těmito novotvory nepřesahuje 15 měsíců. Jednou z příčin špatné prognózy je rychlý růst a vysoká invazivita nádoru do okolní zdravé tkáně. Intenzivní výzkum patobiologie gliálních nádorů dosud neposkytl dostatek informací vedoucích k vytvoření efektivní terapie, která by významným způsobem zlepšila dosud infaustní prognózu postižených pacientů. Nový vhled do biologie gliálních nádorů přináší studie zabývající se rolemi extracelulárních proteáz v tumorigenezi. Mezi ně patří i DPP-IV ze skupiny DASH molekul.

Práce Stremeňové popisuje, že exprese i enzymová aktivita DPP-IV je významně zvýšena u gliálních astrocytárních tumorů a meningeomů. V obou případech ke zvýšení exprese i aktivity dochází především u nádorů vysokého stupně malignity (Stremenova a kol., 2007; Stremenova a kol., 2010) (Příloha 3).

Mareš a kol. ve své práci uvádějí, že nárůst DPP-IV- podobné aktivity může být projevem obecné adaptivní odpovědi transformovaných astrocytů na oxidační a metabolický stres. Předpokládá, že DPP-IV zprostředkovává kompenzatorní protionkogenní efekty, jako inhibici migrace a proliferace prostřednictvím štěpení proonkogeních peptidů, SDF-1 $\alpha$  a substance P, nebo způsobuje zvýšení adheze buněk prostřednictvím vazby na fibronektin a kolagen. Protirůstový efekt DPP-IV-podobné aktivity u glioblastomu naznačuje inverzní korelace mezi DPP-IV-podobnou aktivitou a proliferačním indexem Ki-67 a zároveň i kratší doba přežívání pacientů s glioblastomy s nižší DPP-IV-podobnou aktivitou (Mareš a kol., 2012).

## 1.2. *In vivo* modely experimentálních gliomů

Použití vhodného experimentálního modelu v biologických studiích je kritické pro získání interpretovatelných výsledků. Dosavadní práce zabývající se rolí DPP-IV v gliomogenezi kromě *in vitro* a *ex vivo* experimentů využívají modely založené na hetero- či ortotopické implantaci dlouhodobě kultivovaných buněčných linií odvozených z lidských gliálních nádorů (Busek a kol., 2012) (Příloha 2).

Komplexní *in vivo* modely gliomů v současnosti využívají tři základních experimentálních strategií. První přístup, historicky nejstarší, využívá ke vzniku experimentálního gliomu chemickou indukci alkylačním činidlem N-nitrosomethylureou (Druckrey a kol., 1965; Schmidek a kol., 1971). Druhý přístup pro modelování tumoru zavádí orto- či hetro- implantaci syngenních nebo heterologních gliomových buněk do zvířecího modelu a třetí přístup využívá indukce tumoru *in situ* pomocí cílené onkogenní genetické modifikace experimentálních zvířat a cílových tkání (Lyustikman a Lassman, 2006; Hambarzumyan a kol., 2011).

Výhodným parametrem modelu chemické indukce gliomů na rozdíl od xenotransplantačního modelu je existence funkčního imunitního systému. Nevýhodou je nízká incidence tumorů, značná mezinádorová morfologická heterogenita a především vysoká odlišnost histologického obrazu od lidských gliomů. V případě užívání syngenních linií myších glioblastomových buněk derivovaných z chemicky indukovaných nádorů bylo prokázáno riziko jejich částečného odhojování (Parsa a kol., 2000; Barth a Kaur, 2009).

Nevýhody modelu založeného na chemické indukci gliomů vedly k vytvoření xenotransplantačního modelu. Ten byl po dlouhou dobu zlatým standardem experimentální gliomogeneze a přinesl řadu poznatků o rozvoji, růstu a progresi gliálních nádorů. Výhodnými vlastnostmi xenotransplantačního modelu jsou vysoká incidence tumorů při použití linií gliomových buněk kultivovaných v sérovém médiu, interexperimentální histologická

podobnost modelových nádorů a možnost genetické modifikace implantovaných buněk (Lamour a kol., 2015).

Nárůst poznatků o genetickém pozadí lidských gliomů prokázal omezení tohoto modelu pro některé experimentální aplikace (Phillips a kol., 2006; Verhaak a kol., 2010; Jones a Holland, 2011). Studie zabývající se srovnáním genové exprese a změnami genomu mezi dlouhodobě kultivovanými buňkami a buňkami z bioptických vzorků lidských gliálních nádorů prokázaly výrazné rozdíly jak na úrovni genotypu, tak úrovni fenotypu těchto buněk. (Romer a Curran, 2005; Lee a kol., 2006; Li a kol., 2008; Ernst a kol., 2009). Buněčné gliomové linie užívané v xenotransplantačních modelech tak postrádají některé vlastnosti buněk vyskytujících se v reálném nádorovém mikroprostředí (Westphal a Meissner, 1998). Dlouhodobá kultivace v médiích s přídavkem séra navozuje jejich diferenciaci a vede k výrazné klonální selekci. Navíc značné odlišnosti ve fenotypu i genotypu byly pozorovány nejen mezi buňkami primárních kultur a buňkami dlouhodobě kultivovanými v sérových médiích, ale také v rámci jednotlivých typů buněčných linií (Torsvik a kol., 2014).

Kromě prokázaných genotypových a fenotypových rozdílů mezi zmíněnými buňkami existují také výrazné morfologické odlišnosti v histologických obrazech lidských gliomů a experimentálních tumorů vzniklých při ortotopické implantaci gliomových linií (Finkelstein a kol., 1994). Obecně lze říci, že experimentální tumory odvozené z gliomových buněčných linií sice vykazují známky probíhající angiogeneze, ale na rozdíl od lidských glioblastomů se v závislosti na buněčné linii vyznačují více či méně ohraničeným růstem s omezenou invazivitou. Jako příklad lze uvést velmi často užívanou buněčnou linii U87, která v myší mozkové tkáni vytváří ostře ohraničené kulovité tumory bez známek invaze do okolní tkáně. Tumory z těchto buněk se tak spíše podobají implantačním metastázám než invazivnímu gliomu (Zhao a kol., 2012). V histologickém obrazu xenograftů pak zcela chybí typické charakteristiky lidských gliomů vysokého stupně malignity. Nejsou pozorovány specifické

nekrózy obklopené pseudopalisádami buněk, přítomnost rozdílných buněčných typů či jednobuněčná infiltrace do protilehlé hemisféry (Huszthy a kol., 2012).

Významný posun v experimentálním modelování obrazu lidského gliomu přineslo na poli xenotransplantačního modelu zavedení přístupů, jež jsou založeny na implantaci buněk kultivovaných v bezsérových médiích nebo pasážovaných *in vivo*. Buňky získané z bioptických vzorků jsou v tomto případě kultivovány jako neurosféry a zachovávají si charakter nádorových kmenových buněk nebo jsou odvozeny jako sféroidy s více buněčnými populacemi a následně pasážovány v mozku nebo podkoží zvířete. Tumory vznikající těmito přístupy na rozdíl od xentransplantátů ze sérových buněčných linií vykazují značnou genotypickou, fenotypickou i histologickou podobnost s lidskými glioblastomy, z nichž byly odvozeny (Taillandier a kol., 2003; Giannini a kol., 2005; Lee a kol., 2006). Problematickými aspekty tohoto přístupu jsou výrazná heterogenita mezi jednotlivými experimentálními tumory, dlouhé, v průměru 4 měsíční, intervaly iniciálních pasáží *in vivo*, které znesnadňují plánování experimentů a ztěžují potřebnou standardizaci experimentálních postupů (Wang a kol., 2009). Významným nedostatkem všech typů xenotransplantačních modelů je chybění reakce imunitního systému imunodeficientního zvířete (Hussain a kol., 2006; Rolle a kol., 2012).

Nejnovější přístup, jehož zavedení se snaží redukovat problematické prvky chemického i xenotransplantačního modelu, je založen na modelování gliomů pomocí geneticky modifikovaných myší (GEM). Vznik gliomů je v těchto modelech navozen umělou indukcí exprese specifických onkogenů nebo umlčením tumor supresorových genů, případně kombinací obojího. Ke vzniku tumoru dochází *in situ* z přesně definovaných buněčných populací (Macleod a Jacks, 1999; Talmadge a kol., 2007; Hambardzumyan a kol., 2009). Indukce tumoru *in situ* na rozdíl od implantačních přístupů autentičtěji modeluje biologické vztahy mezi transformovanými a stromálními elementy tumoru a to při zachování všech složek imunitního systému.

Výraznými přednostmi GEM modelů jsou relativně vysoká úspěšnost vzniku nádorů, homogenita genetického pozadí, histologická podobnost s lidskými gliomy i mezi jednotlivými tumory v experimentální skupině. Tyto vlastnosti umožňují charakterizaci modelu a standardizaci experimentálních podmínek. Specifický význam GEM modelů spočívá ve schopnosti simulovat genetické aberace, které se s vysokými frekvencemi vyskytují v lidských glioblastomech. Řada z dosud publikovaných modelů napodobuje genetické abnormality vycházející z molekulárně biologické klasifikace jednotlivých subtypů multifornního glioblastomu (Phillips a kol., 2006; Jones a Holland, 2011). Existují tak modely z genetického hlediska napodobující proneurální, klasický, mezenchymální případně neurální subtyp glioblastomu (Verhaak a kol., 2010). Řada studií zabývajících se modelováním jednotlivých subtypů glioblastomu potvrdila významnou roli jednotlivých typů molekulárních změn v rozvoji glioblastomu, ale také ukázala na výraznou histopatologickou podobnost mezi molekulárními subtypy lidských glioblastomů a jejich myšími modely (Hambardzumyan a kol., 2009).

### ***1.2.1. Modelování gliomogeneze in vivo pomocí RCAS/tv-a technologie***

RCAS/tv-a systém (Replication-Competent ASLV long terminal repeat with a Splice acceptor) představuje jeden z řady dosud vyvinutých přístupů modelování glioblastomů pomocí GEM. Vznik gliomu je v tomto systému indukován pomocí stabilní *in vivo* transfekce definovaných somatických buněk konkrétním onkogenem (Federspiel a kol., 1994) (Obrázek 2). Hostitelský organismus může být navíc nositelem transgenní somatické mutace požadovaného onkosupresorového genu. Kombinace transgenně navozeného zvýšení exprese onkogenu a somatický knockout tumorsupresorového genu zvyšuje incidenci vzniku modelových nádorů (Hambardzumyan a kol., 2009). V našem případě užíváme zvířata s transgenním umlčením genu Ink4a/ARF (Ueki a kol., 1996; Nozaki a kol., 1999; Fulci a kol., 2000).

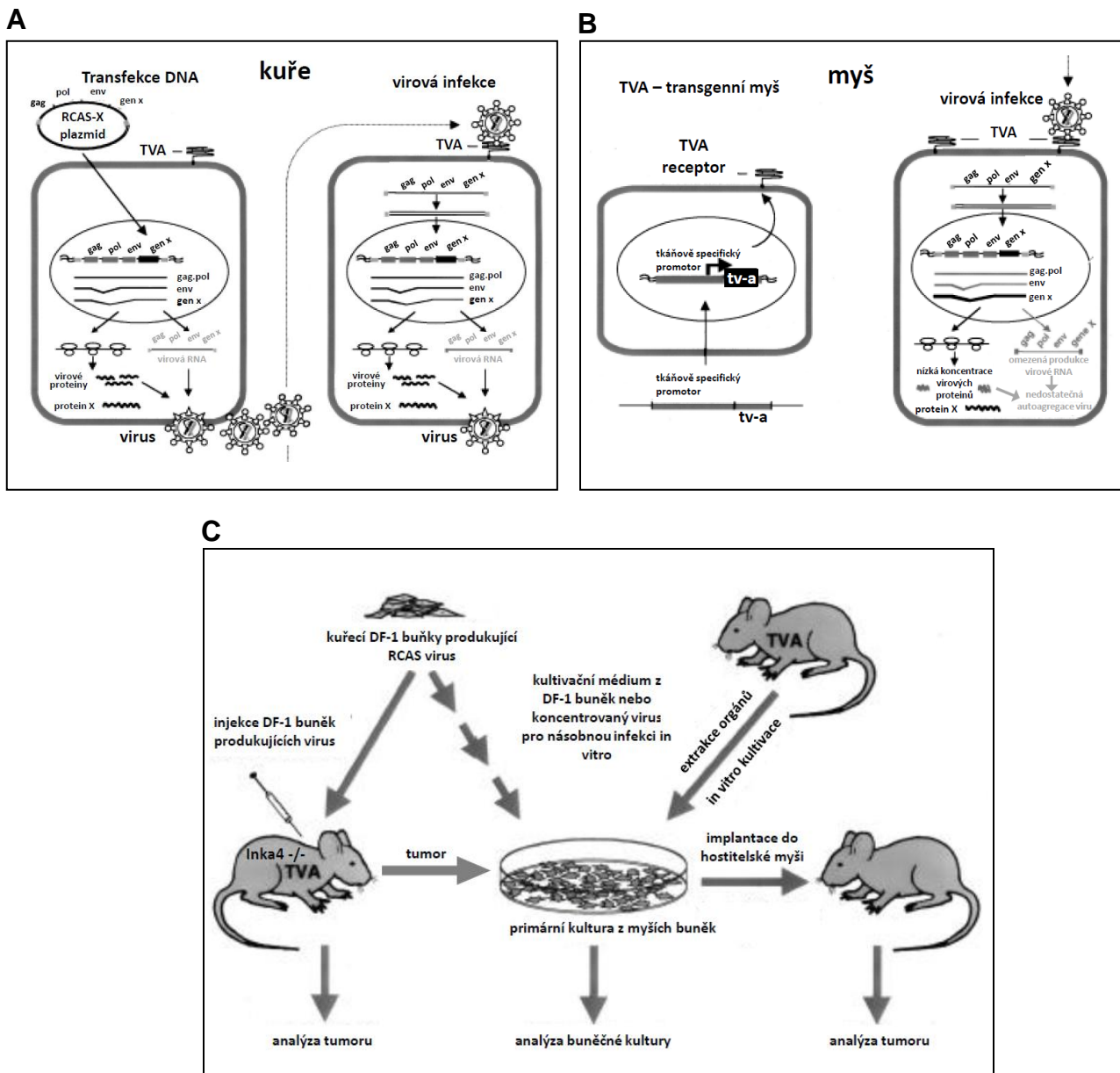


*In vivo* transfekce onkogenem se realizuje prostřednictvím infekce retrovirovými vektory odvozenými z ptačího viru Rousova sarkomu. Infekce definovaných typů buněk je zajištěna prostřednictvím transgenní exprese specifického receptoru (tv-a) pro daný virový vektor. Exprese receptoru je řízena promotorem genu pro stanovený buněčný či diferenciací marker. Pro modelování glioblastomu v RCAS/tv-a jsou využívány promotory pro GFAP nebo Nestin (Uhrbom a kol., 1998; Fisher a kol., 1999).

Nereplikovatelnost virových částic v savčích buňkách zajišťuje indukci glioblastomu v přesně definovaném místě, a také umožňuje sukcesivní transfekci různými genovými inzerty (Macleod a Jacks, 1999; Talmadge a kol., 2007). Díky této vlastnosti lze studovat změny navozené expresí více proteinových produktů v jednom zvířeti. V případě, že virový vektor obsahuje informaci pro interferenční RNA molekuly, je možné sledovat i efekty umlčování specifických genů (Harpavat a Cepko, 2006; Talmadge a kol., 2007).

Vzhledem k tomu, že se experimentální tumory v RCAS/tv-a systému rozvíjejí postupně od počáteční transformace normálních buněk po rozsáhlý infiltrativní růst, umožňuje tento systém studium biologických změn probíhajících v jednotlivých fázích rozvoje glioblastomu. Simulace tohoto parametru je jen obtížně proveditelná v xenotransplantačním modelu, v němž tumory vznikají na základě injekce většího počtu již transformovaných buněk.

Významným aspektem RCAS/tv-a modelu glioblastomu je přítomnost plně funkčního imunitního systému. Tento parametr hraje důležitou roli především v souvislosti se stále rostoucími poznatky o existenci imunitních surveillance-escaping (dohledových-unikových) mechanismů a jejich důležité roli při vzniku a progresi glioblastomu (Jackson a kol., 2011; Vauleon a kol., 2012; Doucette a kol., 2013). V případě molekul, jako je DPP-IV, potenciálně zapojených v regulaci imunitních reakcí, je význam přítomnosti funkčního imunitního systému v modelu zásadní. Z důvodu autentičtější simulace mikroprostředí glioblastomu chceme RCAS/tv-a model využívat pro studium role i dalších membránových proteáz.



**Obrázek 2. Model gliomagenese *in vivo* pomocí RCAS/tv-a technologie**

(A) Kuřecí embrionální fibroblasty DF-1 jsou transfekovány RCAS plazmidem obsahujícím inzert onkogenu (PDGFB-HA). Buňky ve vysokých koncentracích produkují virové částice, které prostřednictvím t-va receptoru infikují další DF-1 buňky v kultuře. (B) Savčí transgenně modifikované myšičky exprimují t-va receptor pod tkáňově specifickým promotorem a stávají se susceptibilními infekci virovými částicemi. Virová DNA vzniklá reverzní transkrypcí je inkorporována do hostitelské buňky a onkogen PDGFB-HA (protein X) je vysoce exprimován infikovanou buňkou. Ostatní proteiny virového genomu jsou produkovány v nízkých koncentracích. Savčí buňky na rozdíl od kuřecích buněk neprodukují infekční virové částice. (C) Geneticky modifikované myši s vyřazeným tumorsupresorovým genem (*Ink4a*  $-/-$ ) exprimují t-va receptor na buňkách exprimujících nestin nebo GFAP. Pouze tyto buňky jsou infikovatelné virovými částicemi RCAS nesoucími onkogen PDGFB-HA. K infekci buněk dochází po ortotopické implantaci DF-1 buněk produkujících RCAS virus nebo injikováním zakoncentrovaného viru. Produkce onkogenu způsobuje transformaci buněk a vznik gliomu. Systém dále umožňuje násobnou infekci/transfekci primárních kultur nádorových buněk *in vitro* a reimplantaci takto modifikovaných buněk do syngenního organismu. Upraveno dle (Fisher a kol., 1999).

### **1.3. Validace neinvazivní fluorescenční zobrazovací metody pro analýzu dynamiky růstu xenotransplantačního ortotopického modelu gliomu**

Výhodou experimentálních modelů tumorů *in vivo* oproti modelům *in vitro* je vyšší míra komplexity blížící se reálným podmínkám nádorového mikroprostředí. Nevýhodou těchto modelů je značná technická obtížnost sledování dynamiky procesů odehrávajících se v experimentu v reálném čase a náročnost analýzy výsledků (Dong a kol., 1994; Fidler a kol., 1994; Killion a kol., 1998).

Dlouhodobé kvantitativní sledování růstu xenograftu v mozku není možné bez usmrcování velkého počtu experimentálních zvířat. Určité řešení tohoto problému přineslo zavedení neinvazivních zobrazovacích metod pro malá experimentální zvířata.

V současnosti existuje několik technik neinvazivního sledování dynamiky růstu xenograftů. Nejrozšířenější jsou magnetická rezonance (MR), pozitronová emisní tomografie (PET), bioluminiscenční zobrazování (BLI) a fluorescenční zobrazování (FLI). Pro používání systémů využívajících detekci světla BLI a FLI v porovnání s MR a PET hovoří jejich relativně nízká finanční náročnost a ekonomická dostupnost (Mook a kol., 2008). Nevýhodou pro přesnou analýzu dynamiky růstu objemu tumoru je dvourozměrný obraz, který jsou tyto systémy schopny poskytnout. Naproti tomu existují studie popisující vysokou korelaci mezi výsledky získanými pomocí MR a BLI (Szentirmai a kol., 2006; Dinca a kol., 2007; Hashizume a kol., 2010). Validace FLI metody pro stanovení dynamiky růstu ortotopického modelu gliomu však popsána nebyla.

Jedním z důvodů tohoto stavu mohlo být chybění vyhovujících fluorescenčních repotérů. Ke změně však dochází s nástupem tak zvaných red-shifted fluorescenčních proteinů (Hoffman, 2008). Technickou výhodou těchto proteinů je maximum excitace při vlnových délkách světla okolo 590 nm a emise světla o vlnové délce nad 600 nm. Tyto vlastnosti dramaticky snižují absorpci a rozptyl emisního světelného signálu okolními

tkáněmi, a také redukuje jejich autofluorescenci (Troy a kol., 2004; Tung a kol., 2004). Proto je v porovnání s klasickým zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) jejich detekovatelnost ve tkáních přibližně o dva řády vyšší (Shcherbo a kol., 2007; Deliolanis a kol., 2008; Shcherbo a kol., 2009). Přestože se výběr fluorescenčních proteinů s těmito parametry rozšiřuje, doposud nebyl popsán vztah mezi morfometricky měřenými hodnotami velikosti xenograftů a hodnotami získanými pomocí fluorescenčního zobrazování. Pro neinvazivní studium dynamiky růstu xenograftů exprimujících DPP-IV jsme experimentálně ověřili vhodnost metody dvojrozměrného fluorescenčního zobrazování v epiiluminačním nastavení při použití Red-shifted fluorescenčního proteinu s názvem mKate2 (Příloha 1).

## 2. Hypotézy

**2.1.** Studie zabývající se biologickým významem DPP-IV pro transformované buňky různých typů maligních nádorů prováděné *in vitro* ukázaly, že experimentálně zvýšená exprese DPP-IV potlačila tumorigenní chování těchto buněk. Výsledky *in vitro* experimentů provedených v naší laboratoři potvrdily stejný efekt u buněčných linií odvozených z gliomů. Na základě těchto výsledků předpokládáme, že navození experimentálního zvýšení exprese DPP-IV v podmínkách *in vivo* bude působit antitumorigenně jako v podmínkách *in vitro*. Předpokládáme, že experimentální zvýšení exprese povede ke snížení růstu ortotopických xenograftů vytvořených z gliomové buněčné linie.

**2.2.** DPP-IV proteolyticky štěpí řadu biologicky aktivních peptidů s protumorigenními účinky. Tím reguluje jejich působení. Předpokládáme, že antitumorigenní účinky DPP-IV prokázané v řadě studií se uplatňují prostřednictvím mechanismu katalytického působení DPP-IV.

**2.3.** Analýza DPP-IV ve vzorcích lidských astrocytárních tumorů a meningeomů prokázala zvýšení její exprese a enzymové aktivity v těchto nádorech. Exprese i enzymová aktivita DPP-IV vzrůstala se stupněm malignity obou onemocnění (Stremenova a kol., 2007; Stremenova a kol., 2010; Mares a kol., 2012) (Příloha 3). Na základě těchto pozorování předpokládáme, že myší model glioblastomu vykazující podobné histologické rysy jako glioblastomy lidské, bude vykazovat zvýšenou aktivitu DPP-IV ve srovnání se zdravou mozkovou tkání.

**2.4.** Na základě výsledků studií, které dokazují vysokou korelaci mezi morfometricky stanovenými objemy tumorů a hodnotami získanými pomocí zobrazovací metody využívající chemiluminiscenci, předpokládáme, že morfometrické stanovení objemů implantačních tumorů bude vysoce korelovat s měřeními získanými pomocí metody fluorescenčního zobrazování.

### **3. Cíle**

**3.1.** Zavedení ortotopického xenotransplantačního modelu gliomu;

**3.2.** Zavedení GEM modelu gliomogeneze *in vivo*;

**3.3.** Ověření antitumorigenního efektu experimentálního zvýšení exprese DPP-IV u buněčné linie odvozené z lidského gliomu v podmínkách ortotopického modelu glioblastomu *in vivo*;

**3.4.** Ověření vlivu katalytické aktivity DPP-IV na růst xenograftu *in vivo*;

**3.5.** Ověření přítomnosti enzymové aktivity DPP-IV v experimentálních tumorech vzniklých v GEM modelu;

**3.6.** Ověření vhodnosti fluorescenční zobrazovací metody s použitím fluorescenčního proteinu mKate2 pro neinvazivní sledování dynamiky růstu ortotopických modelů gliomů *in vivo*.

## 4. Metody

### 3.1. *Buněčné linie odvozené z astrocytárních tumorů a jejich transfektanty*

Buněčné linie U373MG odvozené z lidského gliomu, podle WHO klasifikace stupeň III, byly získány z American Type Culture Collection (ATCC). Kultivace buněk byla prováděna ve tkáňovém plastiku (NUNC, Dánsko) při 37 °C, 90% relativní vlhkosti a vzdušné atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>. Kultivační médium obsahovalo DMEM (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) a fetální bovinní sérum (FCS) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) v poměru 9:1. Buňky byly nasazeny k transfekci v rozmezí 5-25 pasáží po rozmrazení ze zásobní kultury. Inzerty kompletní cDNA nemutované lidské DPP-IV a bodově mutované formy DPP-IV (S630A substituce) byly naklonovány do Tet-on a pGene vektorů Tet-on Advanced (Invitrogen, USA) a Gen Switch (Invitrogen, USA) expresních systémů. Klony buněk U373MG s indukovatelnou transgenní nemutovanou (U373MG CD26 wild) a mutovanou formou DPP-IV (U373MG CD26 mut) byly vytvořeny transfekcí regulačních vektorů a pTet-on a pGen vektorů do buněčných linií U373MG za použití Lipofectaminu (Invitrogen, USA) dle instrukcí výrobce. Stabilně transfekované klony byly selektovány antibiotiky Zeocin (Invitrogen, USA) a Hygromycin (Invitrogen, USA). Z důvodu vysoké přítomnosti buněk bez indukibilních forem DPP-IV a rezistentních na použitá antibiotika byly počáteční klony selektovány metodou magnetické extrakce MACS (magnetic activated cell sorting) za použití anti-DPP-IV protilátky (MA261 Acris, Německo) dle instrukcí výrobce. (DynaL, Invitrogen, USA). Pro validaci fluorescenční zobrazovací metody byly stabilně transfekovány buňky U373MG CD26 mut expresním vektorem pcDNA4 obsahující genový inzert fluorescenčního proteinu mKate2. (dar z laboratoře Doc. Konvalinky, ÚOCHAB – Akademie věd ČR) Transfekci buněk regulačními systémy provedla v rámci svého postgraduálního studia a dizertační práce RNDr. Jana Trylčová.

### **3.2. *In vivo* implantace gliomových buněk do mozku myši**

Experimentální užití zvířat bylo schváleno dle platné legislativy Odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty 1. LF UK a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR. Ve všech experimentech byli použiti dospělí myši samci kmene NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J (The Jackson Laboratory, USA) vážící přibližně 25 g. Před výkonem byla zvířata uspána injekcí roztoku Ketaminu (100 mg/kg) a Xylazinu (20 mg/kg) i.m. Kůže v operační oblasti byla depilována, desinfikována Betadine liq. Následně byl proveden mediální kožní řez o délce 5 mm v oblasti budoucí trepanace. Po provedení řezu byla hlava zvířete umístěna do stereotaktického přístroje (Stoelting, USA) a provedena trepanace lebky kuličkovou frézou o průměru 0,4 mm a koordinátách 1,2 mm před bregmatickým švem a 2,5 mm sagitálně od středního lebečního švu. Injekční stříkačkou typu Hamilton 10  $\mu$ l bylo injikováno do hloubky 3 mm od povrchu mozku 5  $\mu$ l buněčné suspenze o koncentraci 200 000 buněk/1 $\mu$ l DMEM (Sigma-Aldrich Chemie, Německo). Injektáž buněk probíhala rychlostí 1 $\mu$ l/s pomocí mikropumpy (Harward Instruments, USA), po ukončení injektáže byla jehla ponechána na místě po dobu 2 minut, a po té byla pomalu vytažena.

Trepanační otvor byl bezprostředně uzavřen kostním voskem a provedena sutura kožní incize dvěma stehy. Ošetření rány bylo provedeno pomocí sol Novikov a zvířata uložena do vyhřívaných klecí do probrání z anestezie.

### **3.3. *Transgenní indukce gliomu in vivo***

Indukce gliomu *in vivo* byla provedena pomocí ortotopické implantace kuřecích embryonálních fibroblastů DF1 produkujících retrovirový vektor RCAS PDGFB-HA (dar prof. Lene Uhrbomové, Upssala University, Švédsko). Přítomnost exprese PDGFB-HA na úrovni proteinu byla ověřena imunofluorescenčně (data neuvedena). Při implantaci byla



použita buněčná suspenze o koncentraci 50 000 bb/1 $\mu$ l v celkovém množství 2  $\mu$ l na jednu myš. Koordináty implantace byly 0 mm od bregmatického švu, 1,2 mm sagitálně od středního lebečního švu a v hloubce 1,5 mm od povrchu mozku. Ostatní parametry implantace byly identické s výše popsaným postupem. Pro indukci tumoru byli použiti jedinci transgenních myších kmenů G-tva Ink4a -/-, PTEN flox, LSL EGFRIII a N-tva Ink4a Arf -/- , (Becher a kol., 2010) staří 4-6 týdnů. (dar prof. Erika Hollanda, Washington univerzity, USA)

### **3.4. Kvantifikace objemu tumorů**

Zvířata byla 43 dnů po implantaci buněčné suspenze dekapitována v hluboké anestezii, mozky byly vyňaty z lebky a zamrazeny při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v zamrazovacím mediu (Leica Microsystems, Německo). Dále byly zhotoveny sériové koronární řezy o tloušťce 10  $\mu$ m při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  za použití kryotomu (Bright Instruments, UK). Každý pátý řez byl obarven Hematoxylinem a Eosinem (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) a digitalizován při 20 násobném zvětšení. Kvantifikace objemu byla provedena Cavallieriho metodou (Becher a kol., 2010).

### **3.5. *In vivo* fluorescenční zobrazování růstu tumoru**

Detekce fluorescenčního signálu byla prováděna na zařízení iBox® Scientia Small Animal Imaging System, (UVP, USA) vybaveném CCD-kamerou BioChem HR 400 (UVP, USA). Zobrazovací zařízení bylo vybaveno 150 W halogenovou žárovkou, excitačním filtrem o propustnosti 533-587 nm a emisním filtrem o propustnosti 607-682 nm. Vzdálenost zvířete od čočky kamery byla 25 cm. U všech zvířat byl fluorescenční signál focen v týdenních intervalech po dobu 6 týdnů od implantace buněk. Po posledním focení *in vivo* byly mozky vyňaty z lebky a *ex vivo* vyfoceny. Před každým focením byla provedena chemická depilace

snímané oblasti hlavy. Veškeré manipulace se zvířaty byly prováděny v anestezii. Analýza digitálních fotografií byla provedena pomocí volně dostupného software Image J (National Institute of Health, USA). Ke statistické analýze byla použita průměrná hodnota intenzit fluorescence detekovaných v arbitrárně zvolené jednotkové kruhové ploše. (Příloha 1)

### ***3.6. Analýza relativního zeslabení fluorescenčního signálu v mozkové tkáni***

Pro měření vlivu masy mozkové tkáně na zeslabení fluorescenčního signálu byl fluorescenční xenograft simulován 5  $\mu$ l kapkou Matrigelu (Matrigel Matrix<sup>tm</sup> BD Biosciences, USA) obsahující  $10^6$  U373MG CD26 mut buněk exprimujících mKate2. Gelatinozní fluorescenční bolus byl umístěn na 3 mm silný koronární řez myšího mozku a focen při nastavení expozičního času potřebného k téměř maximální saturaci čipu kamery (30s). Další focení při stejném expozičním čase bylo provedeno po přikrytí bolusu 1 mm silným koronárním řezem myšího mozku. Tato procedura byla opakována do celkového zakrytí bolusu vrstvou 3 mm mozkové tkáně. Apertura, ostření a vzdálenost modelu xenograftu byly ve stejném nastavení při každém focení. Excitace fluorescence byla prováděna v epiiluminačním modu.

### ***3.7. Imunofluorescenční detekce antigenů***

#### ***Detekce DPP-IV, Ki-67, CD31, GFAP, PDGFB***

Imunofluorescenční detekce všech antigenů byla provedena dle stejného protokolu při použití specifických protilátek pro daný antigen.

Zmrzlé řezy mozku 10  $\mu$ m silné nebo sklíčka s adherovanými buňkami byly fixovány ve 4% paraformaldehydu po dobu 10 min. při 25 °C a po té byly opláchnuty v PBS pufru (137 mM NaCl; 4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,68 mM KCl; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 2 x 5 min. Dále byla provedena

permeabilizace 0,1% vodným roztokem detergentu Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) po dobu 5 min. při teplotě 25 °C. Pro blokaci nespecifických antigenních epitopů byly řezy inkubovány v blokačním roztoku z TBS obsahujícím 10% FCS a 1% BSA (Bovine Serum Albumine) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) po dobu 30 min. při 25 °C. Neopláchnuté preparáty byly ve vlhké komůrce inkubovány po dobu 16 hodin při teplotě 4 °C s danou primární protilátkou ředěnou v 1% roztoku BSA a TBS. (ředění viz tabulka 1) V dalším kroku byly řezy opláchnuty v 0,03% roztoku Tritonu X-100 v TBS 2x 5 min. a inkubovány 60 min. při teplotě 25 °C v příslušné sekundární protilátce ředěné v 1% roztoku BSA v TBS. (ředění viz tabulka 1) Pro dobarvení buněčných jader byl do roztoku sekundární protilátky přidán interkalační fluorescenční fluorofor bisbenzimid H 33258 (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) tak, aby výsledná koncentrace byla 1:100 000. Na závěr byly řezy opláchnuty v TBS 3x 5 min. a deionizované vodě 30 s a zamontovány do montovacího média Polymount (Polysciences, USA). Fluorescenční mikroskopie byla provedena na mikroskopu Olympus X-80 vybaveného černobílou CCD kamerou Olympus 300. Procentuální zastoupení buněk exprimujících Ki-67 bylo stanoveno ze tří reprezentativních řezů každého tumoru a 6-7 vizuálních polí z daného řezu.

Protilátka	Zdroj	Klonalita	Ředění	Kód	Výrobce
<b>primární protilátky</b>					
anti - DPP-IV	potkan	monoklonální	1:50	E-19	Vitatex
anti - Ki-67	králík	polyklonální	1:800	Ab 15580	Abcam
anti - CD31	potkan	monoklonální	1:100	NB100-1642	Novus-Biologicals
anti - GFAP	králík	polyklonální	1:5000	Ab7260	Abcam
anti - PDGFB	králík	polyklonální	1:250	HPA011972	Sigma Aldrich
<b>sekundární protilátky</b>					
anti-rabbit IgG - Alexa Fluor 546	koza	polyklonální	1:500	A11010	Invitrogen
anti-rabbit IgG - Alexa Fluor 488	koza	polyklonální	1:500	A11034	Invitrogen
anti-rat IgG - Alexa Fluor 488	osel	polyklonální	1:500	A21208	Invitrogen

**Tabulka 1. Protilátky pro imunofluorescenční histochemii**

### **3.8. Katalytická histochemie**

Katalytická aktivita DPP-IV v tumorech s indukovanou expresí transgenní DPP-IV byla analyzována pomocí metody katalytické histochemie dle Lojdy. (Lojda, 1981) Zmrzlé řezy o síle 10  $\mu\text{m}$  byly fixovány v roztoku acetonu a chloroformu v poměru 1:1 dvě min. při 4 °C a po té opláchnuty v PBS po dobu 1 min. Reakční směs pro vizualizaci enzymové aktivity DPP-IV byla připravena rozpuštěním 18 mg Gly-Pro 4-methoxy- $\beta$ -naftylamid hydrochloridu (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) a 21 mg Fast blue B salt (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) v 60 ml PBS. pH reakční směsi bylo korigováno na hodnotu 7,2 –7,4. Fixované řezy byly inkubovány v reakční směsi po dobu 16 hodin při teplotě 4 °C a následně opláchnuty ve vodě. V posledním kroku byly řezy ponořeny do 4% paraformaldehydu po dobu 6 hodin při teplotě 25 °C a zamontovány do roztoku PBS a glycerinu v poměru 1:1.

### **3.9. Kombinované stanovení enzymové aktivity DPP-IV a exprese CD31**

Pro ověření lokalizace myší DPP-IV na endoteliálních buňkách v transgenním modelu gliomogeneze byly zkombinovány metody katalytické histochemie a imunochemické barvení křenovou peroxidázou pro marker endoteliálních buněk CD31. 10  $\mu\text{m}$  silné zmrzlé řezy byly nejprve barveny podle protokolu pro katalytickou histochemii a dále zpracovány následovně. Po 10 minutové inkubaci v 4% paraformaldehydu byly opláchnuty v PBS 2x 5 min. a permeabilizovány 5 min. při 25 °C v 0,01% vodném roztoku Tritonu X-100. Následoval oplach v PBS 2x 5 min. a blokace endogenní peroxidázy pomocí Peroxidase blocking solution (Dako, Dánsko) po dobu 30 min. při 25 °C. Po té byla provedena blokace nespecifických antigenních epitopů blokačním roztokem z TBS obsahujícím 10 % FCS a 1 % BSA po dobu 30 min. při 25 °C. Neopláchnuté preparáty byly ve vlhké komůrce inkubovány po dobu 16 hodin při teplotě 4 °C v primární potkaní monoklonální protilátce anti-CD31 (viz tabulka 1) ředěnou v 1% roztoku BSA a TBS. V dalším kroku byly řezy opláchnuty v 0,03% roztoku

Tritonu x-100 v TBS 2x 5 min. a inkubovány 60 min. při teplotě 25 °C v sekundární protilátce anti-rat ab6733 (Abcam, UK) konjugované s biotinem o objemu 100 µl, ředění 1:250 v 1% roztoku BSA v TBS. Následoval oplach v TBS 2x 5 min. a inkubace 30 min. při 25 °C v ImmPACT™ DAB SK-4105 (Vector Laboratories, USA). Po oplachu v TBS 2x 5min. provedena inkubace v roztoku substrátu ImmPACT DAB (Vector Laboratories, USA) po dobu nezbytnou pro vizualizaci endotelií. Reakce substrátu byla zastavena oplachem vodou z kohoutku. Buněčná jádra byla dobarvena Hematoxilinem (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) a preparát zamontován do roztoku PBS a glycerinu v poměru 1:1. Mikroskopie byla provedena na mikroskopu Olympus X-80 vybaveného fotoaparátem Olympus E-410.

### ***3.10. Biochemické stanovení DPP-IV- podobné enzymové aktivity***

Vzorky tkáně transgenně indukovaného glioblastomu a kontrolní mozkové tkáně byly po odběru okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány při teplotě – 75 °C. Homogenizace vzorků byla provedena při 4 °C v 25mM homogenizačním pufru pH 6 (2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 22,4 mM NaCl) za použití homogenizační sondy S8N-5G a homogenizátoru Ultra – Turax. (IKA, Německo) Výsledný podíl tkáně v homogenátu tvořil 15 % hmotnosti.

DPP-IV-podobná aktivita homogenátu byla stanovena kinetickou metodou jako přírůstek fluorescenčního signálu emitovaného štěpením substrátu H-7-(glycyl-L-prolyl-amido)-4-methylkumarinu (H-Gly-Pro-AMC) (Bachem, Švýcarsko). Koncentrace substrátu v reakci byla 50µmol/l. Reakce probíhala při 37 °C v PBS pufru pH 7,4 při ředění homogenátu 1:100. Aktivita byla stanovována z homogenátu bez přídavku detergentu, s přídavkem 10% roztoku detergentu Triton X-100 (1:100) a při inhibici enzymové aktivity DPP-IV. Inhibice enzymové aktivity pro DPP-IV byla provedena vysoce specifickým inhibitorem DPP-IV Sitagliptinem o koncentraci 50 nM v reakci. Měření bylo provedeno pomocí fluorimetru

(Horiba Jobin Yvon, USA) za použití excitačního světla o vlnové délce 380 nm a snímáním emisního světla o vlnové délce 460 nm.

### ***3.11. Stanovení celkového proteinu***

Stanovení koncentrace celkového proteinu v homogenátu bylo provedeno metodou dle Lowryho a jako standard byl použit albumin hovězího séra. (Lowry a kol., 1951)

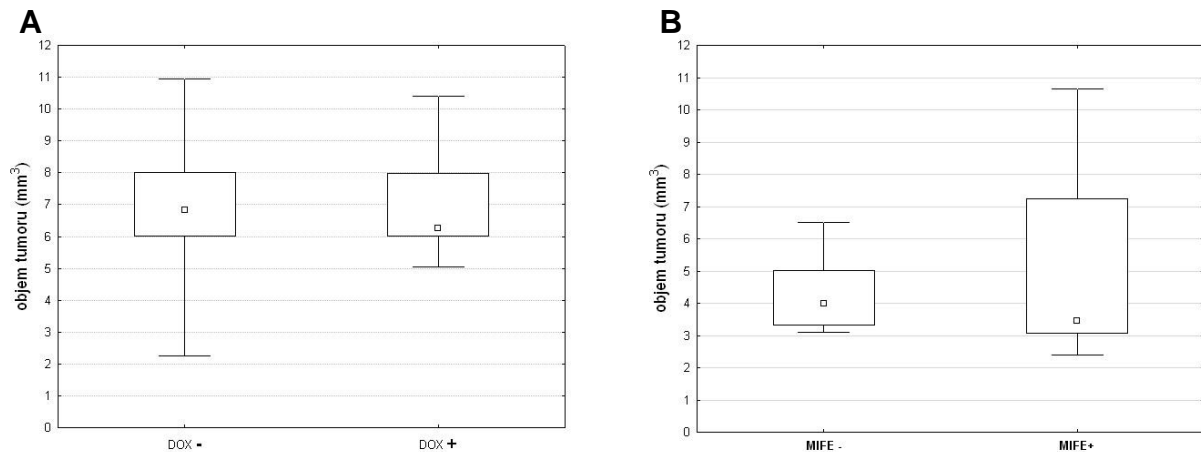
### ***3.12. Statistická analýza***

Statistická analýza byla prováděna v programu Statistica 12.0 (statSoft, USA). Rozdíly mezi jednotlivými skupinami jsou hodnoceny pomocí Mann-Whitneyho U-testu. Korelace byly analyzovány pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

## 4. Výsledky

### 4.1. Zavedení ortotopického xenotransplantačního modelu gliomu

Pro ustavení vhodného ortotopického xenograftového modelu jsme testovali tři gliomové buněčné linie T98G, U87MG a U373MG. Buněčná linie T98G byla v našich podmínkách netumorigenní, tumory po implantaci nevznikaly v žádném z případů (data neuvedena). Po implantaci buněčné linie U87MG do mozku zvířete sice tumory vznikaly ve všech případech, ale vykazovaly ostře ohraničený růst bez invaze transformovaných buněk do okolní tkáně (data neuvedena). V případě buněčné linie U373MG vznikaly experimentální tumory také ve 100 % případů. V histologickém obrazu byla navíc přítomna zřetelná invaze transformovaných buněk do okolní tkáně (Obrázek 4). Tuto buněčnou linii jsme následně používali ve všech experimentech. V dalším kroku jsme provedli kontrolní experiment ověřující vliv indukčních činidel (doxycyklin, mifepriston) na růst xenograftu z netransfekovaných U373MG *in vivo*. Tyto látky jsou využívány pro regulovanou indukci exprese proteinu v systémech Tet-on a Gene Switch a potenciálně mohou přímo ovlivňovat růst xenograftu (Pinski a kol., 1993; Ramaswamy a kol., 2012; Llaguno-Munive a kol., 2013; Wu a kol., 2014). Morfometrická analýza prokázala, že ani jedno z těchto činidel neovlivňuje v námi užívaných koncentracích velikost tumorů z implantovaných buněk (Obrázek 3).



**Obrázek 3. Vliv indukčních činidel mifepristonu a doxycklinu na růst U373MG xenograftu *in vivo***

(A) Experimentální skupině zvířat (n=10) byl podáván doxycklin hyklát v pitné vodě 2 mg/ml ad libitum od prvního dne implantace. Kontrolní skupině zvířat (n=10) byla podávána pouze voda ad libitum. Zvířata byla utracena 33 dnů po implantaci  $10^6$  buněk. Mann-Whitney U test:  $p=1$ ; (B) Experimentální skupině zvířat (MIFE+) (n=10) byl podáván mifepriston 270  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.p. rozpuštěný v sezamovém oleji třikrát týdně. Kontrolní skupině zvířat (MIFE-) (n=10) bylo podáváno 100  $\mu\text{l}$  sezamového oleje i.p. třikrát týdně. Zvířata byla utracena 34 dnů po implantaci  $10^6$  buněk. Mann-Whitney U test:  $p=0,67$ ; čtverečky: mediány; krabice: 25-75 %; svorky: minimální a maximální hodnoty.

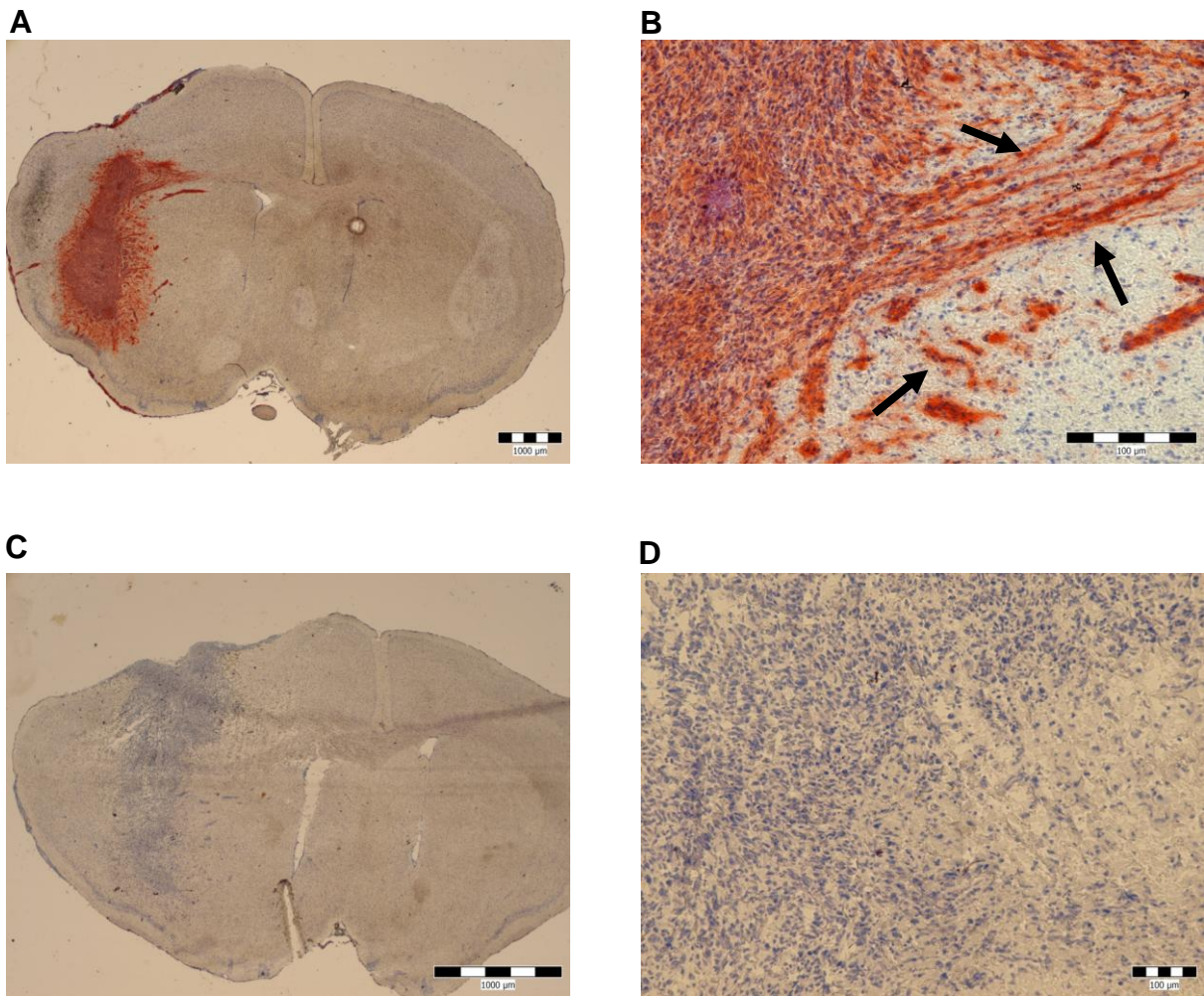
#### **4.2. Vliv experimentálně zvýšené exprese katalyticky aktivní DPP-IV na růst ortotopického xenograftu.**

Pro zhodnocení vlivu katalyticky aktivní DPP-IV na růst ortotopického xenograftů *in vivo* jsme použili dva různé klony transfekovaných gliálních buněk U373MG. První klon exprimoval katalyticky aktivní transgenní lidskou DPP-IV pomocí systému Tet-on Advanced po indukci doxycklinem. Druhý klon exprimoval katalyticky aktivní DPP-IV pomocí systému Gen Switch po indukci mifepristonem. Klony vykazovaly 20 násobný rozdíl v dosažené expresi transgenní DPP-IV, což umožnilo posoudit, zda pozorovaný vliv DPP-IV na růst tumoru závisí na míře její exprese.

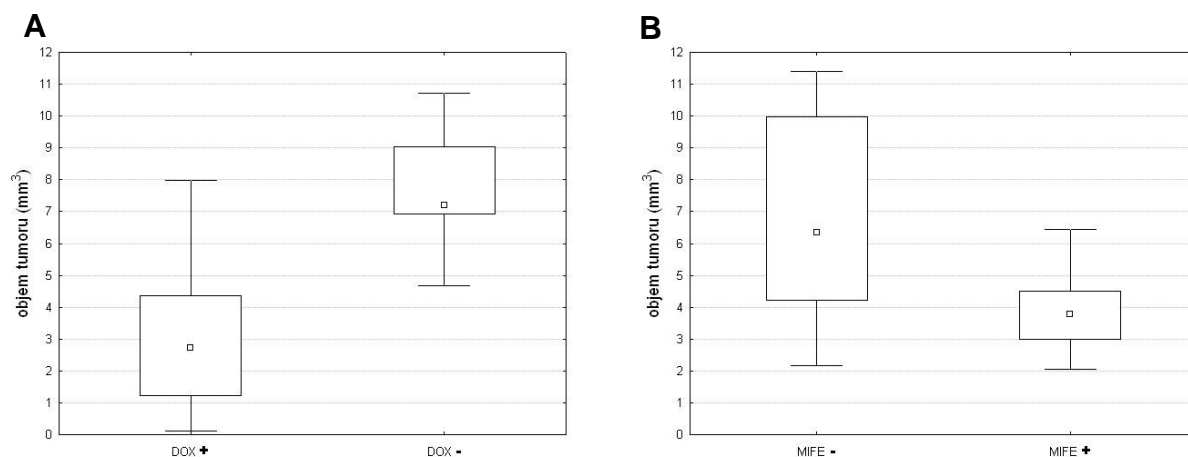
Tumory z buněk U373MG vykazovaly neohrazený růst s infiltrací buněk do okolní mozkové tkáně. Overexprese DPP-IV a zvýšená enzymová aktivita v tumoru byla potvrzena imunofluorescenční metodou a katalytickou histochemií (Obrázek 4).



Naše výsledky prokázaly, že tumory s indukovanou expresí transgenní DPP-IV byly statisticky významně menší než kontrolní tumory, u nichž exprese DPP-IV indukována nebyla. Hodnota mediánu objemu tumorů exprimujících DPP-IV byla přibližně o 50 % menší, než hodnota mediánu objemu tumorů u kontrolní skupiny. Tento rozdíl byl patrný u obou klonů transfekovaných různými expresními systémy a nezávisel na kvantitě exprese. (Obrázek 5).



**Obrázek 4. Tumory z buněk lidského glioblastomu U373MG CD26 wild v myším mozku**  
 (A) Přehledný snímek tumoru s indukovaným zvýšením exprese DPP-IV. (B) Detail infiltrace nádorových buněk do traktů bílé hmoty mozkové, černá šipka – invadující buňky. (C) Kontrolní tumor bez indukce transgenní exprese DPP-IV a (D) detail invaze buněk kontrolního tumoru do okolní tkáně. Zobrazení pomocí katalytické histochemie na zmražených řezech silných 10 µm, jádra barvena HE. Měřítka 1000 µm a 100 µm.



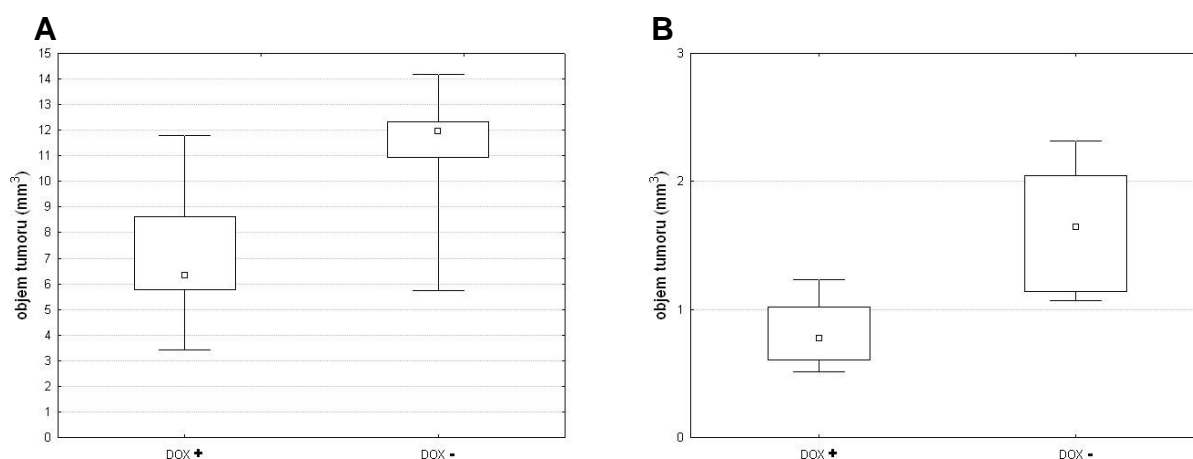
**Obrázek 5. Vliv zvýšené exprese katalyticky aktivní DPP-IV na růst xenograftu *in vivo*.** (A) Expresse transgenní DPP-IV v systému Tet-on byla v experimentální skupině zvířat (n=10) indukována podáváním hyklát doxycyklinu (2 mg/ml) v pitné vodě ad libitum od prvního dne po implantaci. Kontrolní skupině zvířat (n=9) byla podávána pitná voda ad libitum. Zvířata byla utracena 48 dnů po ortotopické implantaci  $10^6$  buněk. Mann-Whitney U test:  $p=0,001$ ; (B) Expresse transgenní DPP-IV v systému Gen-Switch byla v experimentální skupině zvířat (n=10) indukována podáváním mifepristonu 270  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.p. třikrát týdně rozpuštěném v sezamovém oleji. Kontrolní skupině zvířat (n=10) bylo podáváno 100  $\mu\text{l}$  sezamového oleje i.p. třikrát týdně. Zvířata byla utracena 42 dnů po implantaci  $10^6$  buněk. Mann-Whitney U test:  $p=0,03$ ; čtverečky: mediány; krabice: 25-75 %; závorky: minimální a maximální hodnoty.

#### 4.3. Vliv zvýšené exprese katalyticky neaktivní DPP-IV na růst ortotopického xenograftu

K odlišení katalyticky nebo nekatalyticky zprostředkovaného účinku DPP-IV na růst tumoru *in vivo* jsme použili dva odlišné klony transfekovaných gliomových buněk U373MG s indukovatelnou expresí transgenní mutované (enzymově neaktivní) formy DPP-IV. Expresse mutované formy DPP-IV byla v obou klonech navozena pomocí systému Tet-on Advanced system při použití doxycyklinu, jako indukčního činidla. Jeden z klonů navíc stabilně exprimoval fluorescenční protein mKate2 jako reporterový systém pro možnost intravitálního zobrazování xenograftu pomocí FLI.

Výsledky prokázaly, že tumory z gliálních buněk, které po indukci transgenní exprese zvýšeně exprimovaly enzymově neaktivní formu DPP-IV byly statisticky významně menší, než kontrolní tumory, u nichž expresse transgenu nebyla navozena. Hodnota mediánu objemu

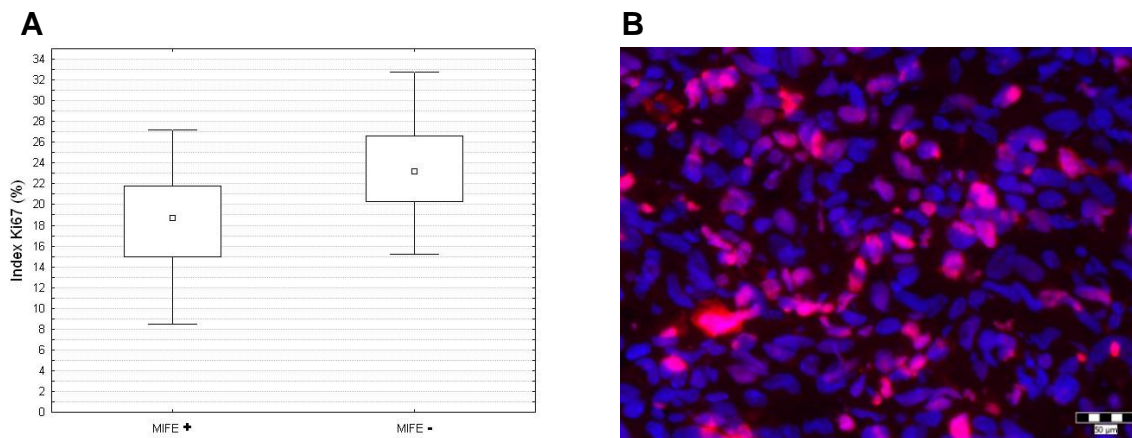
tumorů exprimujících enzymově neaktivní DPP-IV byla, podobně jako v experimentech s indukovanou expresí nativní formy DPP-IV, přibližně o 50 % menší, než hodnota mediánu objemu tumorů u kontrolní skupiny. Tento rozdíl byl patrný u obou klonů gliálních buněk. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že menší objem tumorů byl navozen nekatalytickým mechanismem DPP-IV (Obrázek 6).



**Obrázek 6. Vliv zvýšené exprese katalyticky neaktivní DPP-IV na růst xenograftu *in vivo*.** Expresce transgeně mutované formy DPP-IV byla v experimentálních skupinách zvířat (n=10) indukována podáváním hyklát doxycyklinu (2 mg/ml) v pitné vodě ad libitum od prvního dne po implantaci. Kontrolní skupině zvířat (n=10) byla podávána pitná voda ad libitum. **(A)** Buněčný klon U373MG CD26mut, zvířata byla utracena 47 dnů po implantaci  $10^6$  buněk; Mann-Whitney U test:  $p=0,01$ ; **(B)** Buněčný klon U373MG CD26 mut mKate2, zvířata byla utracena 44 dnů po implantaci  $10^6$  buněk; Mann-Whitney U test:  $p=0,0006$ ; čtverečky: mediány; krabice: 25-75 %; závorky: minimální a maximální hodnoty.

#### 4.4. Analýza indexu proliferace Ki-67

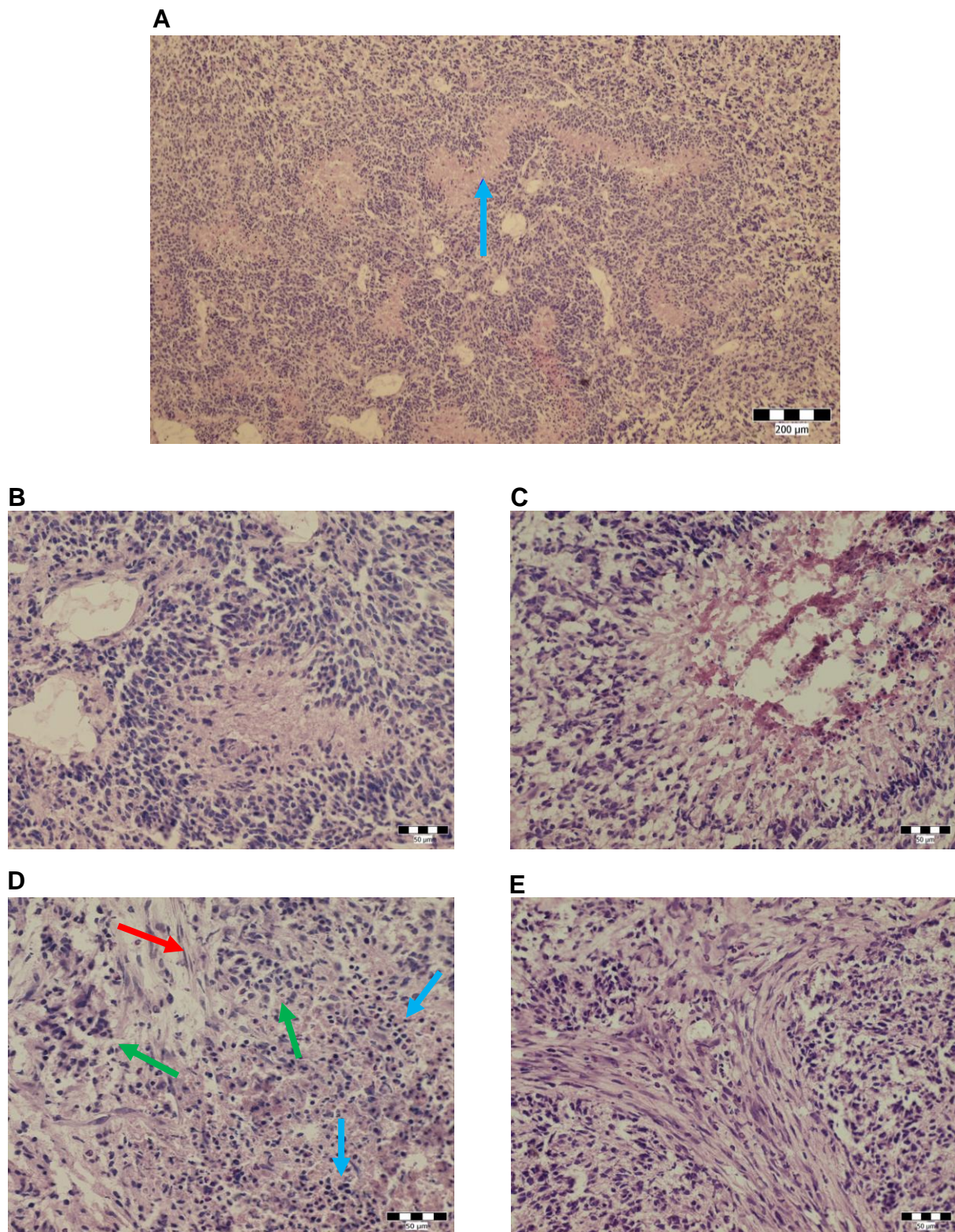
Pro posouzení vlivu exprese DPP-IV na proliferaci gliomových buněk *in situ* jsme stanovili index proliferace Ki-67 v xenograftech z buněk zvýšeně exprimujících katalyticky aktivní DPP-IV a v kontrolních xenograftech. Rozdíl v mediánech indexu Ki-67 mezi skupinou s indukovanou expresí DPP-IV a kontrolní skupinou činil 4,5 % (Obrázek 7).



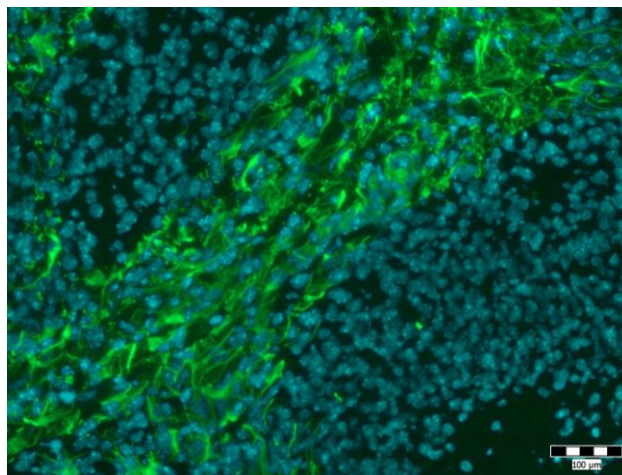
**Obrázek 7. Srovnání indexu proliferace Ki-67 u tumorů s indukovanou transgenní expresí DPP-IV.** (A) Index Ki-67 v experimentální skupině (n=10) a kontrolní skupině (n=10), (B) exprese markeru Ki-67 v tumorech s transgenně indukovanou DPP-IV. Exprese transgenní DPP-IV v systému Gen-Switch byla v experimentální skupině zvířat (n=10) idukována podáváním mifepristonu 270 µg/kg i.p. třikrát týdně rozpuštěném v sezamovém oleji. Kontrolní skupině zvířat (n=10) bylo podáváno 100 µl sezamového oleje i.p. třikrát týdně. Zvířata byla utracena 42 dnů po implantaci  $10^6$  buněk. Mann-Whitney U test:  $p=0,002$ ; čtverečky: mediány; krabice:25-75 %; závorky: minimální a maximální hodnoty. Imunofluorescenční barvení ve zmrzlých řezech. Modře: jádra; červeně: Ki-67, měřítko 50µm

#### 4.5. Indukce tumorů pomocí retrovirového vektoru RCAS PDGFB-HA

Pro indukci tumorů bylo použito 10 myší transgenního kmene G-tva a 10 jedinců N-tva. Neurologické symptomy indikující růst tumorů byly pozorovány v rozmezí 5-7 týdnů po implantaci buněk produkujících retrovirový vektor RCAS PDGFB-HA. V případě kmene N-tva vznikl tumor ve 100 % případů. V případě kmene G-tva vznikl tumor u 50 % jedinců. Vzniklé tumory vykazují histopatologické rysy charakteristické pro lidský multiformní glioblastom. Lze pozorovat přítomnost četných nekrotických oblastí s typickými pseudopalisádami (Obrázek 8 A,B,C). V tumorech se vyskytují různé buněčné typy - buňky s malými kulatými hyperchromními jádry, buňky s výraznou jadernou pleomorfií a vřetenovité buňky připomínající buňky hladké svaloviny tvořící pruhy prostupující nádorovou masou (Obrázek 8 D, E). Nádorová tkáň vykazuje silnou fokální pozitivitu pro GFAP, vyskytující se v oblasti celého tumoru (Obrázek 9).



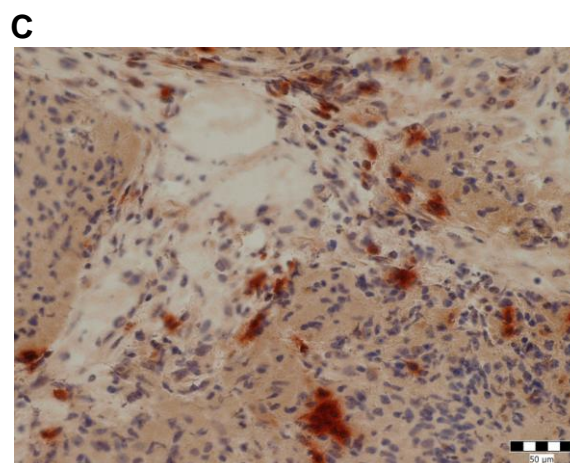
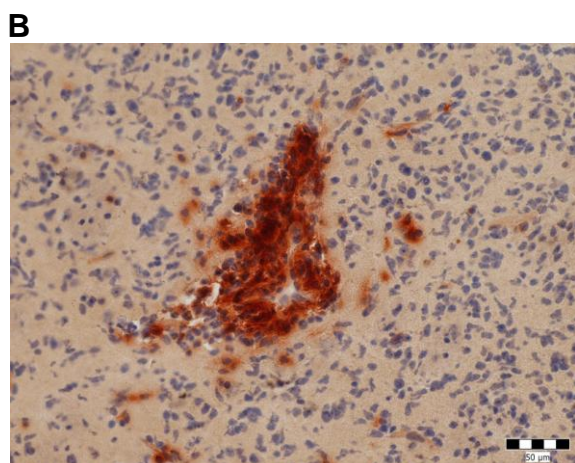
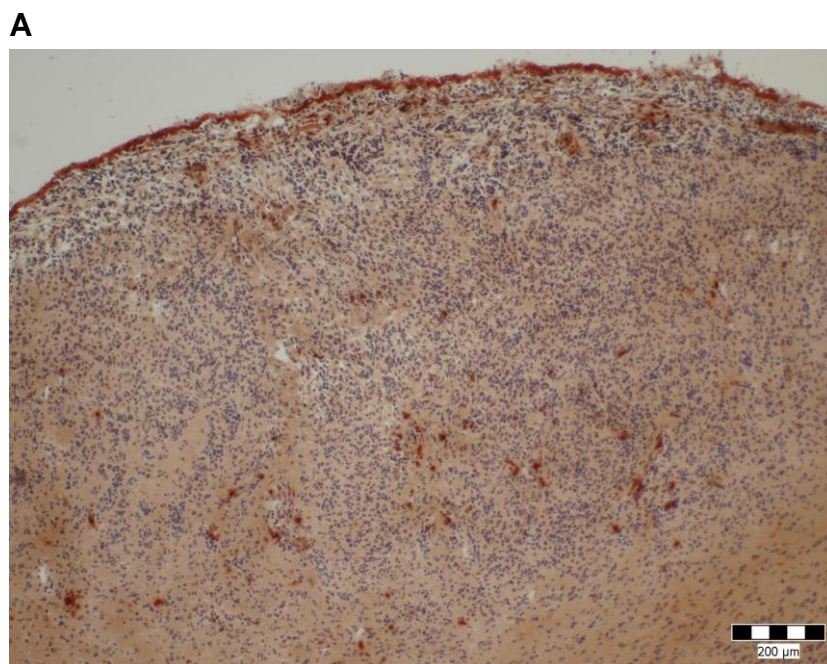
**Obrázek 8. Morfologický obraz tumorů transgenně indukovaných vektorem RCAS PDGFB-HA**  
 (A) Přehledný snímek s četnými nekrotizacemi, → serpiginózní nekróza; měřítko 200  $\mu\text{m}$ ; (B), (C) Detaily nekrotizací s pseudopalisádami; měřítko 50  $\mu\text{m}$ ; (D) Detail morfologicky odlišných buněk: → - vřetenovité buňky, → - buňky s hyperchromními kulatými jádry, → - buňky s pleomorfními jádry, měřítko 50  $\mu\text{m}$ ; (E) Tumory obsahují pruhy s vřetenovitými buňkami, připomínající mezenchymální proliferaci glioblastomu; měřítko 50  $\mu\text{m}$ ; zmrazené řezy tumorem 10  $\mu\text{m}$  silné, barvení HE.



**Obrázek 9. Expres GFAP v tumorech transgenně indukovaných vektorem RCAS PDGFB-HA**  
Detail fokální positivity GFAP. Expres GFAP je fokálně přítomna v celém tumoru, **zelená** – buňky pozitivní pro GFAP; **modrá** – buněčná jádra; zmrazené řezy 10 μm silné; měřítko 100 μm.

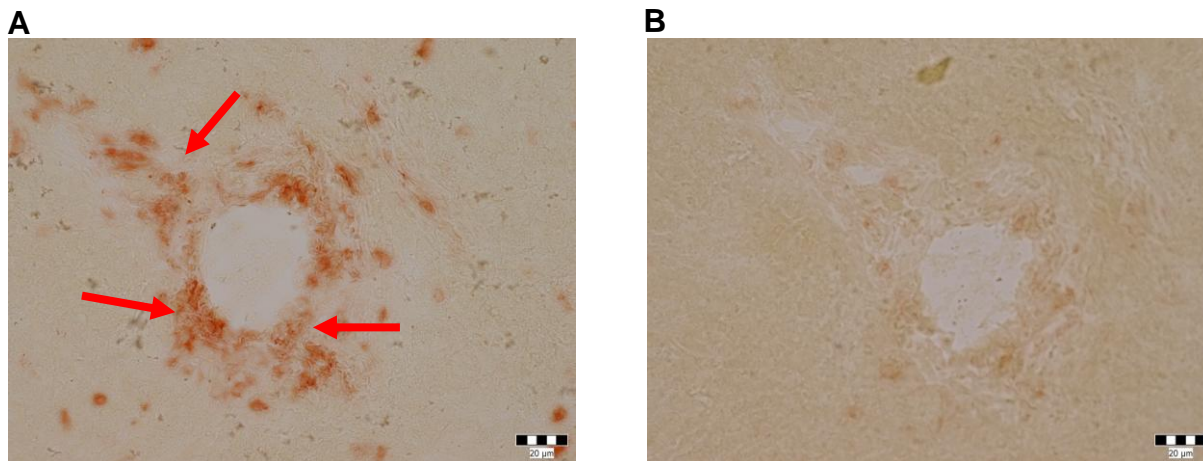
#### ***4.6. Přítomnost DPP-IV enzymové aktivity v tumorech transgenně indukovaných retrovirovým vektorem***

Pro zjištění vzorce distribuce DPP-IV v modelovém systému byla užitá metoda katalytické histochemie ve zmrzlých řezech mozkové tkáně s experimentálním tumorem pomocí chromogenního substrátu (Obrázek 10 A). Po aplikaci Sitagliptinu, vysoce specifického inhibitoru enzymové aktivity DPP-IV, byla veškerá aktivita v řezu eliminována (Obrázek 11 B). Aktivita je přítomna na vnitřní straně cév a kapilár v části mozku nepostíženého růstem tumoru. V oblasti tumoru aktivitu vykazují sporadicky se vyskytující individuální buňky nebo shluky buněk vyskytující se kolem cév, případně v pruzích formovaných vřetenovitými buňkami (Obrázek 10 B, C). Metoda detekující aktivitu DPP-IV a současně expresi antigenu CD31 ukázala, že na rozdíl od fyziologických kapilár zdravého mozku endotel dysplastických kapilár enzymovou aktivitu specifickou pro DPP-IV neobsahuje (Obrázek 12).



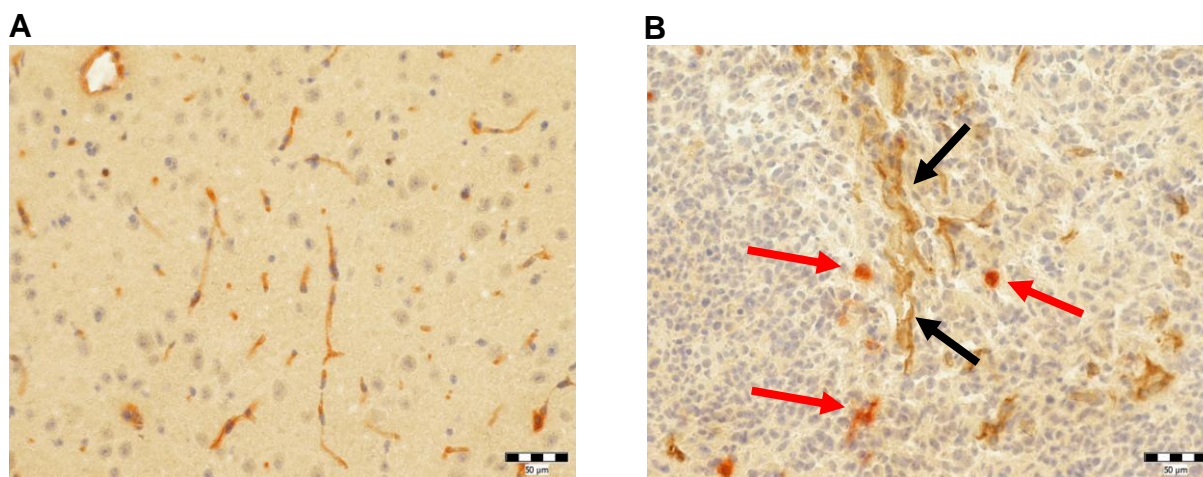
**Obrázek 10. Enzymová aktivita DPP-IV v tumorech transgenně indukovaných vektorem RCAS PDGFB-HA**

(A) Přehledný snímek distribuce enzymové aktivity DPP-IV v tumoru, měřítko 200  $\mu\text{m}$ ; (B) a (C) detail lokalizace DPP-IV enzymové aktivity ve shlucích buněk a kolem cévních útvarů, měřítko 50  $\mu\text{m}$ ; zobrazení pomocí katalytické histochemie na zmrzlých řezech silných 10  $\mu\text{m}$ , jádra barvena HE.



**Obrázek 11. Inhibice enzymové aktivity DPP-IV v tumorech transgenně indukovaných vektorem RCAS PDGFB-HA**

(A) Detail struktury s DPP-IV enzymovou aktivitou, → – DPP-IV pozitivní buňky. (B) Detail stejné struktury v následujícím paralelním řezu s přidáním specifického inhibitoru enzymové aktivity DPP-IV Sitagliptinu. Zobrazení pomocí katalytické histochemie na zmrzlých řezech 10 µm silných; měřítko 20 µm



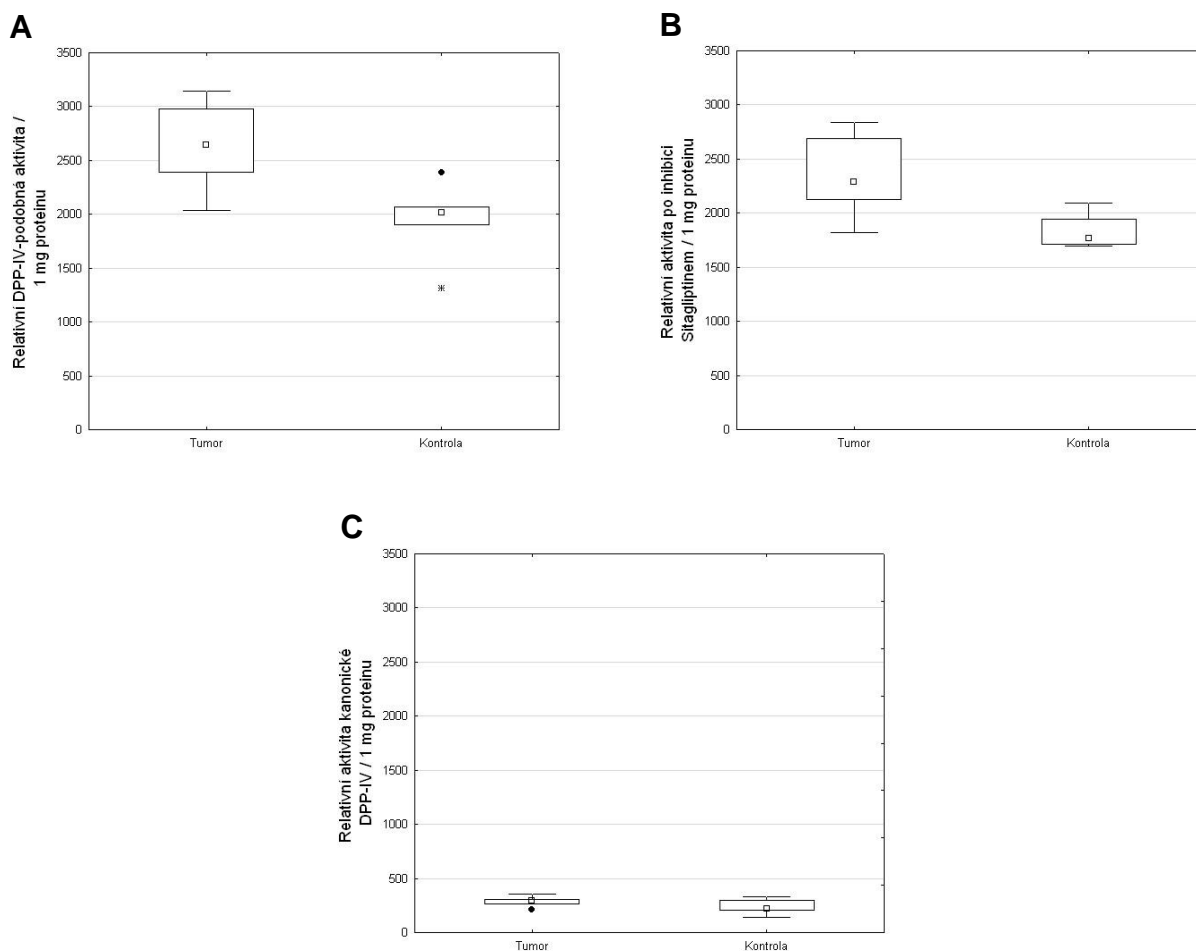
**Obrázek 12. Lokalizace DPP-IV a CD31 v tumorech transgenně indukovaných vektorem RCAS PDGFB-HA**

(A) Ve zdravé mozkové tkáni jsou DPP-IV a CD31 exprimovány v cévních kapilárách. (B) V nádorové tkáni není DPP-IV exprimována na novotvořených kapilárách. → – dysplastické kapiláry; → - DPP-IV exprimující buňky; dvojí barvení pomocí imunohistochemické metody s křenovou peroxidázou (CD31) a katalytické histochemie (DPP-IV); jádra barvena HE; zmrazené řezy 10 µm silné; měřítko 50 µm.



#### 4.7. Kvantifikace enzymové aktivity kanonické DPP-IV v tumorech transgeně indukovaných retrovirovým vektorem RCAS PDGFB-HA

Kvantifikace enzymové aktivity ukázala, že hodnota mediánu DPP-IV-podobné enzymové aktivity byla přibližně 1,3 násobně vyšší než hodnota v kontrolní tkáni (Mann-Whitney U test:  $p=0,047$ ) (Obrázek 13 A). Hodnota mediánu DPP-IV-podobné aktivity po inhibici Sitagliptinem byla v nádorové tkáni také 1,3 násobně vyšší než v kontrolní tkáni (Mann-Whitney U test:  $p=0,021$ ) (Obrázek 13 B). Rozdíl enzymové aktivity kanonické DPP-IV v obou tkáních byl statisticky nevýznamný (Mann-Whitney U test:  $p=0,4$ ) (Obrázek 13 C).



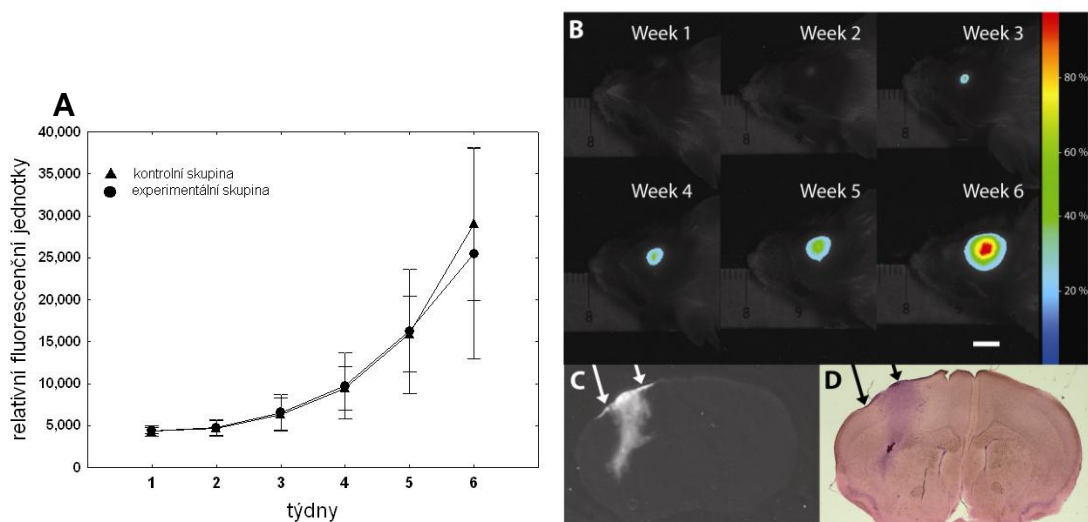
**Obrázek 13. Enzymová aktivita DPP-IV v tumorech transgeně indukovaných vektorem RCAS PDGFB-HA a kontrolních tkáních**

(A) DPP-IV-podobná enzymová aktivita v nádorové a kontrolní tkáni; Mann-Whitney U test:  $p=0,047$ . (B) DPP-IV-podobná aktivita v nádorové a kontrolní tkáni po inhibici Sitagliptinem; **Mann-Whitney** U test:  $p=0,021$  (C) Aktivita kanonické DPP-IV v nádorové a kontrolní tkáni; Mann-Whitney U test:  $p=0,4$ . Experimentální skupina ( $n=5$ ), kontrolní skupina ( $n=5$ ), čtverečky: mediány; krabice: 25-75 %; svorky: minimální a maximální hodnoty; bod: odlehlé hodnoty

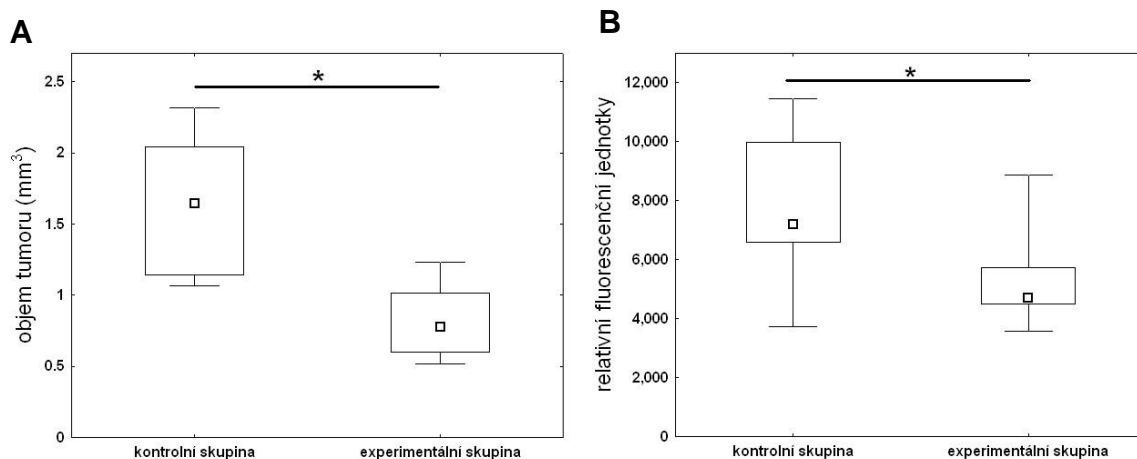
#### ***4.8. In vivo zobrazování***

V průběhu šesti týdnů od doby implantace xenograftů exprimujících fluorescenční protein mKate2 byl pozorován rostoucí fluorescenční signál (Obrázek 14 A, B). Hodnoty fluorescence získané focením živých zvířat před odebráním mozku nekorelovaly ( $n=19$ ;  $R=0,26$ ;  $p=0,26$ ) s hodnotami objemů tumorů získaných morfometrickými metodami (Obrázek 16 A). Narozdíl od tohoto pozorování hodnoty morfometrických dat (Obrázek 15 A) významně korelovaly ( $n=19$ ;  $R=0,61$ ;  $p=0,0045$ ) (Obrázek 16 B) s hodnotami dat získaných skenováním mozků vyňatých z lebky (Obrázek 15 B). U všech zvířat byl pozorován významný extracerebrální růst nádorové masy v epidurálním prostoru a lebeční kosti přilehlé k implantačnímu vstupu (Obrázek 14 C, D).

Za účelem kvantifikace poklesu detekovaného fluorescenčního signálu v závislosti na síle vrstvy mozkové tkáně byl fluorescenční model xenograftu v podobě matrigelové kapky obsahující buňky exprimující mKate2 postupně překryt několika vrstvami mozkové tkáně. Intenzita fluorescenčního signálu poklesla o 65 % a 85 % po postupném přikrytí xenograftu 1mm a 2 mm mozkové tkáně (Obrázek 17) (Příloha 1).

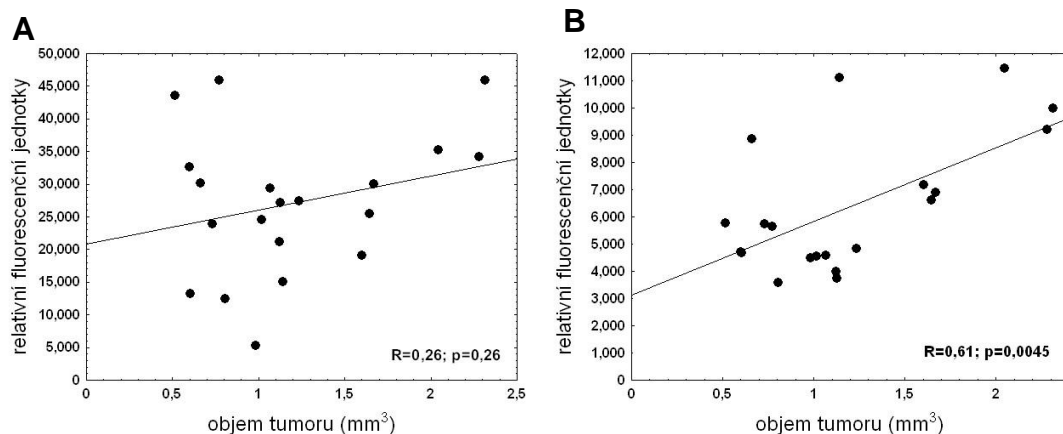


**Obrázek 14. Růst tumoru zobrazený in-vivo pomocí FLI (A)** Intravitálně měřená fluorescence u kontrolní skupiny (n=9) a experimentální skupiny v průběhu 6 týdenního období po ortotopické implantaci gliomových buněk U373MG exprimujících mKate2 protein. Data jsou prezentována jako průměr ± S.D. **(B)** Zobrazení jednoho reprezentativního zvířete, expoziční čas 90s; měřítko: 5 mm. **(C)** Distribuce nádorové masy vizualizována fluorescenčním zobrazením a **(D)** barvením HE. Část tumoru rostoucí mimo mozek je označena šipkami. Měřítka: 2 mm.



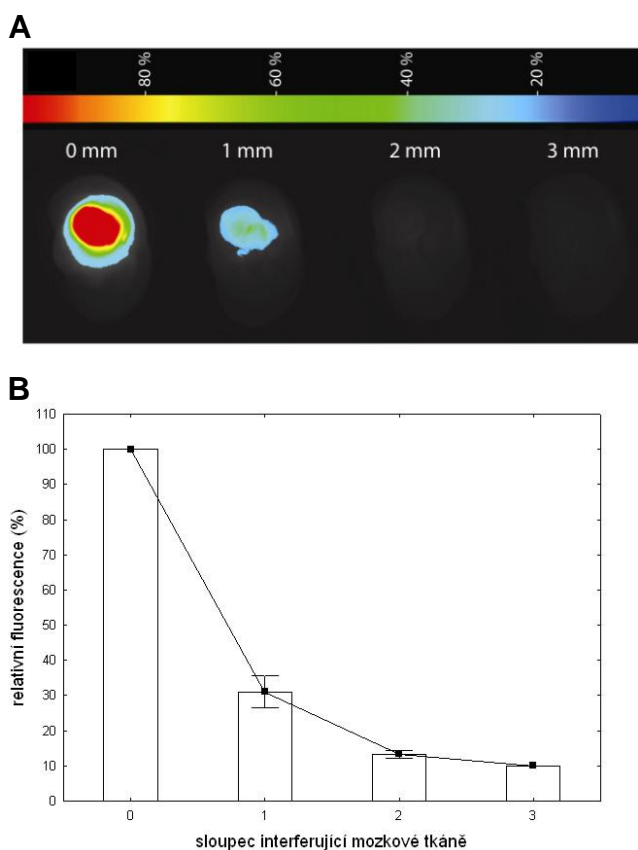
**Obrázek 15. Velikost tumorů v xenotransplantačním modelu gliomu**

**(A)** Velikost tumorů stanovena morfometrickou metodou. **(B)** Hodnoty fluorescence stanoveny pomocí FLI u mozků vyňatých z lebky 6 týdnů po implantaci. Kontrolní skupina (n=9), experimentální skupina (n=11). čtverečky: mediány; krabice: hodnoty v rozmezí 25-75 %; svorky: minimální a maximální hodnoty;  $p < 0.05$ , Mann-Whitney U test.



**Obrázek 16. Korelace hodnot objemů tumorů stanovených morfometricky a hodnot fluorescenčních intenzit**

(A) Korelace morfometricky stanovené velikosti tumoru a fluorescenční intenzity měřené *in vivo* v 6. týdnu po implantaci. (B) Korelace morfometricky stanovené velikosti tumoru a fluorescenční intenzity měřené u mozků vyňatých z lebky. (n=20); Spearmanův korelační koeficient.



**Obrázek 17. Relativní oslabení fluorescenčního signálu interferující mozkovou tkání.** (A) Relativní fluorescence buněk U373MG exprimujících mKate2 protein umístěných v Matrigel matrix a postupně stíněných mozkovými řezy o uvedené síle. (B) Relativní oslabení fluorescenčního signálu ve třech nezávislých experimentech. Data uvedena jako průměrné hodnoty  $\pm$  S.D.

## 5. Diskuze

### 5.1. DPP-IV a její vliv na gliomogenezi *in vivo*

Studie zabývající se biologickým působením DPP-IV v onkogenezi přinášejí nejednoznačné výsledky týkající se jejího pro- či antitumorigenního působení. Zatímco vyšší exprese DPP-IV v malignějších typech lidských nádorů může být interpretována tak, že její přítomnost souvisí s proonkogenními účinky, studie *in vitro* (Wesley a kol., 1999; Wesley a kol., 2004; Wesley a kol., 2005; Masur a kol., 2006) popisují převažující antitumorigenní působení této molekuly. Význam pochopení mechanismů působení DPP-IV v kancerogenezi vzrostl se zavedením inhibitorů enzymové aktivity do běžné praxe léčby diabetu mellitu 2. Podrobnější poznání mechanismů, jimiž DPP-IV působí v procesu kancerogeneze, má rovněž význam v analýze využitelnosti DPP-IV jako možného terapeutického cíle nebo prognostického markeru (Stulc a Sedo, 2010).

Výzkumy realizované v naší laboratoři poprvé prokázaly zvýšenou expresi DPP-IV a nárůst její enzymové aktivity v tkáních vysoce maligních nádorů vycházejících z gliálních buněk a meningeomech vyššího stupně malignity (Stremenova a kol., 2007; Stremenova a kol., 2010) (Příloha 3). Následně byly provedeny *in vitro* experimenty s transgenně zvýšenou expresí DPP-IV v gliomových buněčných liniích, v nichž DPP-IV navodila pokles tumorigenních vlastností (Busek a kol., 2012) (Příloha 2).

Abychom ověřili biologický efekt exprese DPP-IV v mikroprostředí nádorové tkáně *in vivo*, zavedli jsme ortotopický xenograftový model gliomu, založený na implantaci gliomových buněčných linií s regulovatelnou transgenní expresí nativní a mutované DPP-IV do mozků imunodeficientních myší kmene NOD rag (Shultz a kol., 1995; Shultz a kol., 2000). Pro navazující studie, zaměřené na získání komplexnějšího pohledu na úlohu DPP-IV v gliomogenezi v kontextu funkčního imunitního systému, jsme dále zavedli model

transgenně indukované gliomageneze, ve kterém jsme analyzovali přítomnost DPP-IV a kvantifikovali její enzymovou aktivitu.

V xenotransplantačním modelu jsme využili lidskou gliomovou buněčnou linii U373MG, jejíž buňky se vyznačují relativně nízkou bazální expresí DPP-IV, ověřili jsme jejich tumorigenní potenciál a zjistili, že tumory z nich vzniklé dobře reprodukuje některé morfologické rysy lidského glioblastomu. Zjevným rysem xentransplantátů z buněk U373MG bylo relativně rychlé šíření do extracerebrálního prostoru a agresivní prorůstání skrz lebeční kost do podkoží. Jiné morfologické rysy typické pro histologický obraz lidského glioblastomu, jako například četné nekrózy, pseudopalisády, buněčná pleomorfie v experimentálních xenograftech přítomny nebyly. Technickou výhodou zvoleného modelu byla 100 % incidence vzniklých tumorů.

Indukce exprese transgenní katalyticky aktivní formy DPP-IV *in vivo* konzistentně způsobovala nižší růst experimentálních tumorů. Tumory s transgenně zvýšenou expresí DPP-IV byly přibližně o polovinu menší než tumory v kontrolní skupině. Tyto tumory vykazovaly sníženou buněčnou proliferaci. Medián indexu Ki-67 byl přibližně o 4,5 % nižší než v kontrolní skupině. Biologickou relevanci tohoto rozdílu sledovanou v našem modelu podporuje pozorování, které ukazuje podobný rozdíl indexu Ki-67 mezi lidskými astrocytárními tumory nízkého stupně malignity a multifonním glioblastomem (Raghavan a kol., 1990). Souvislost mezi potlačením proliferační aktivity buněk a expresí DPP-IV ukazuje také studie Mareše a kol., ve které je popsána negativní korelace mezi zvýšenou expresí DPP-IV a indexem Ki-67 u biopsických vzorků tumorů odebraných pacientům s diagnostikovaným glioblastomem multiforme (Mares a kol., 2012).

Významné snížení růstu experimentálních tumorů s transgenně navozeným zvýšením exprese DPP-IV *in vivo* je v souladu s výsledky předešlých experimentů prováděných *in vitro*

(Busek a kol., 2008). Náš předpoklad o zpomalení růstu experimentálního gliomu při zvýšené expresi DPP-IV v komplexním mikroprostředí se tak v našich *in vivo* experimentech potvrdil.

Předpoklad, že mechanismus působení DPP-IV v gliomogenezi je založen na katalyticky mediované degradaci prorůstových mediátorů, substrátů DPP-IV, naše výsledky nepotvrdily. Transgenní exprese katalyticky neaktivní formy DPP-IV *in vivo* navodila stejný efekt jako katalyticky aktivní forma DPP-IV. Experimentální tumory jak u enzymově aktivní tak neaktivní formy DPP-IV dosahovaly statisticky významně menších objemů než tumory u kontrolních skupin. Rozdíl mediánu objemu mezi skupinami činil 50 %. Nepozorovali jsme ani morfologické rozdíly mezi tumory exprimujícími mutovanou a nemutovanou formu DPP-IV. Z našich pozorování lze tedy vyvodit, že tumorsupresorový efekt DPP-IV je patrně nezávislý na její enzymové aktivitě, přičemž jsme kontrolními experimenty rovněž vyloučili možný vliv použitých indukčních činidel (doxycyklin, mifepriston) (Pinski a kol., 1993). Menší velikost tumorů s indukovanou expresí DPP-IV by rovněž mohla být způsobena nespecifickým zatížením proteosyntetického aparátu buněk při masivní expresi transgenu. Tento předpoklad nelze v našem modelu pomocí kontrolního experimentu vyloučit. Nicméně výsledky jiných experimentů provedených v naší laboratoři ukazují, že navození exprese jiného proteinu pomocí stejného transgenního expresního systému růst tumoru neovlivnil (data neuvedena).

Abychom se při studiu role DPP-IV a dalších molekul ze skupiny DASH v rozvoji a progresi gliálních nádorů více přiblížili podmínkám nádorového mikroprostředí, zavedli jsme rovněž model transgenně indukované gliomogeneze.

Pro naši práci jsme zvolili RCAS/tv-a technologii. Vznik gliomů je u pokusných zvířat navozován prostřednictvím transformace neuroektodermálních mozkových progenitorových buněk exprimujících nestin nebo mozkových buněk exprimujících GFAP. Transformace buněk je vyvolána transgenním umlčením genu *Ink4a/ARF* v somatických buňkách a

současně *in vivo* transfekcí onkogenem PDGFB. Zatímco u zvířat exprimujících receptor pro onkogenní vektor pod promotorem nestinu vznikaly tumory ve 100 % případů, u zvířat exprimujících receptor pod promotorem GFAP vznikly v 50 % případů. Nízká incidence vzniku tumorů v případě zvířat G-tva v našich experimentech je v rozporu s výsledky publikovanými v literatuře a nenašli jsme pro ni vysvětlení (Hambardzumyan a kol., 2009). Další experimenty jsme prováděli pouze s kmenem N-tva.

Na základě předchozích výsledků naší laboratoře potvrzujících zvýšenou enzymovou aktivitu DPP-IV v lidských gliomech vysokého stupně malignity (Stremenova a kol., 2007) jsme předpokládali, že ke zvýšení oproti zdravé myši mozkové tkáni dojde také v gliomech myšního modelu. Zjistili jsme, že celková DPP-IV-podobná enzymová aktivita byla v experimentální gliomové tkáni oproti kontrolní tkáni statisticky významně zvýšena asi 1,3 násobně. Statisticky významné bylo i zvýšení ne-kanonické DPP-IV-podobné aktivity. Aktivita kanonické DPP-IV překvapivě tvořila pouze 10 % z celkové aktivity jak v gliomové tak kontrolní tkáni, přičemž rozdíl aktivity v nádorové tkáni ve srovnání s kontrolou nedosahoval hranici statistické významnosti. Lze tedy předpokládat, že statistický významný nárůst DPP-IV-podobné aktivity, pozorovaný v transgenním modelu glioblastomu, je důsledkem hydrolytické aktivity jiných molekul ze skupiny DASH než kanonické DPP-IV (Busek a kol., 2008). Naše zatím nepublikované výsledky naznačují, že touto molekulou může být fibroblastový aktivační protein.

Kromě nárůstu DPP-IV-podobné enzymové aktivity jsme v GEM pozorovali různou distribuci DPP-IV v nádorové a kontrolní tkáni. Ve zdravé myši mozkové tkáni se DPP-IV vyskytuje v mozkových obalech a v endoteliích kapilár a cév. V transgenně indukovaných tumorech DPP-IV na endotelu dysplastických kapilár exprimována nebyla. V nádorové tkáni aktivitu vykazovaly především individuální buňky nebo skupiny buněk vyskytující se v perivaskulárním prostoru nebo pruzích připomínajících mezenchymální komponentu



tumoru. Tento obraz distribuce DPP-IV v GEM modelu se podobá lokalizaci DPP-IV v lidských gliálních nádorech. Nositeli DPP-IV jsou zde pravděpodobně perivaskulární extravazované buňky podobné mononukleárním buňkám, jejichž fenotyp je podobný buňkám imunitního systému (Pro a Dang, 2004; Mares a kol., 2012). Expres DPP-IV tak může souviset s aktivací imunitních a adhezivních vlastností těchto buněk (Lojda, 1981; Chen a Kelly, 2003; Kikkawa a kol., 2003). Nepřítomnost exprese DPP-IV u nádorových dysplastických kapilár v GEM modelu v porovnání s krevními kapilárami zdravého mozku, které ji naopak exprimují, lze interpretovat tak, že DPP-IV hraje inhibiční roli v regulaci angiogeneze. Tato interpretace koresponduje se závěry prací, které ukazují, že DPP-IV negativně ovlivňuje angiogenezi (Poncina a kol., 2014). Například Takasawa uvádí, že aktivace proliferace endoteliálních buněk navozená prostřednictvím TNF a IL-1 vedla ke snížení exprese DPP-IV *in vitro*. Snížení exprese DPP-IV pomocí RNA interference posílilo proliferaci takto aktivovaných endoteliálních buněk (Takasawa a kol., 2010). V jiné studii inhibice enzymové aktivity DPP-IV vedla ke zvýšení proliferace endoteliálních buněk a posílení vaskularity u transplantovaných Langerhansových ostrůvků v myším modelu *in vivo* (Samikannu a kol., 2013). Podávání Vidagliptinu (specifický inhibitor enzymové aktivity DPP-IV) pacientům s diabetes mellitus II. typu navodilo zlepšení hojení bérkových vředů způsobené posílením novotvorby kapilár (Marfella a kol., 2012).

Jedním z mechanismů, kterým se může DPP-IV podílet na regulaci angiogeneze je proteolytické štěpení chemokinu SDF-1 $\alpha$ . Tento chemokin je jejím substrátem a proteolytická modifikace prostřednictvím DPP-IV jej efektivně inaktivuje (Proost a kol., 1998). SDF-1 $\alpha$  se řadí mezi angiogenní faktory, které ovlivňují proliferaci a migraci aktivovaných endoteliálních buněk v nádorové tkáni (Hanahan a Folkman, 1996). V myším modelu glioblastomu bylo prokázáno, že SDF-1 $\alpha$  významně posiluje nejen invazivitu transformovaných buněk, ale také pozitivně ovlivňuje proliferaci a migraci endoteliálních

buněk (Mirshahi a kol., 2000; Kuhlmann a kol., 2005; Wang a kol., 2012). Inaktivace SDF-1 $\alpha$  prostřednictvím aktivity DPP-IV tak může přispívat k potlačování proangiogenních vlivů. V tomto ohledu můžeme nepřítomnost exprese DPP-IV na novotvořených kapilárách v tumorech našeho modelu dát do spojitosti s proangiogenními procesy, které přispívají k progresi nádoru.

Zjištění, že DPP-IV v xenotransplantačním modelu potlačuje růst tumoru bez ohledu na její enzymovou aktivitu, může vést k závěru, že inhibice enzymové aktivity DPP-IV specifickými inhibitory nebude mít vliv na její antitumorigenní účinky. Je ovšem třeba zdůraznit, že naše výsledky se týkají případu, kdy je DPP-IV over-exprimována vlastními nádorovými (transformovanými) buňkami. V GEM modelu, kde byla DPP-IV exprimována ojedinelými buňkami stromatu, (a tudíž v jiném kontextu) ovšem může hrát enzymová aktivita DPP-IV jinou biologickou roli. To potvrzují i recentní poznatky o DPP-IV v práci Da Silva, která ukazuje, že inhibice DPP-IV enzymové aktivity pozitivně ovlivňovala infiltraci modelu melanomu *in vivo* imunitními buňkami (Barreira da Silva a kol., 2015). Tyto závěry potvrzují význam užití modelů s funkční imunitou pro zkoumání významu DPP-IV v procesu gliomogeneze.

## **5.2. Validace neinvazivní fluorescenční zobrazovací metody**

Pro posouzení vhodnosti fluorescenční zobrazovací metody pro sledování dynamiky růstu tumoru v ortotopickém modelu gliomu jsme provedli zhodnocení přesnosti určování objemu tumorů pomocí zobrazovací metody založené na detekci světla. Jako kandidát pro využití v experimentech byla zvolena fluorescenční zobrazovací metoda. Na rozdíl od zobrazování pomocí chemiluminiscence není u této metody podmínkou vzniku detekovatelného světelného signálu difuze substrátu k implantovaným nádorovým buňkám. Dostupnost substrátu pro chemiluminiscenční reakci může být v heterogenním prostředí

xenograftu nerovnoměrná, proto jsme pro náš model zvolili buňky stabilně exprimující fluorescenční protein mKate2, jehož optické parametry překonávají nevýhody běžně užívaného GFP (Shcherbo a kol., 2007). Naše měření ukázala, že detekovaný fluorescenční signál v použitém modelu měl původ především v tumorózní masě nacházející se na povrchu mozku, v epidurálním prostoru a v přilehlé lebeční kosti. Fluorescence vycházející z této extracerebrálně rostoucí nádorové buněčné masy přezářila signál vycházející z hlouběji uložených oblastí v mozku uloženého nádoru. Světelný artefakt extracerebrální části tumoru byl příčinou nízké korelace mezi daty získanými pomocí FLI *in vivo* a hodnotami objemu tumorů stanovených post mortem pomocí morfometrických měření. Nežádoucí extracerebrální růst experimentálního tumoru by mohl být hypoteticky omezen hlubší injektáží menších objemů buněčné suspenze. Fluorescenční světlo emitované z hlouběji uloženého xenograftu je ale více pohlceno a rozptýleno silnější vrstvou okolní tkáně. To by s vysokou mírou pravděpodobnosti zapříčinilo ztrátu ostrosti zobrazení (Ntziachristos, 2006). Navíc redukce počtu implantovaných buněk snižuje intenzitu fluorescenčního signálu, což v kombinaci s autofluorescencí tkáně vede k nedostatečnému kontrastu, nezbytnému pro detekci tumoru v časných fázích jeho růstu (Troy a kol., 2004).

Naše zjištění ukazují, že výsledný fluorescenční signál je významně ovlivněn nejen kvantitou nádorové masy, ale také její „geometrií“, danou distribucí nádorových buněk v prostoru.

Lze tedy konstatovat, že makroskopická planární FLI v epi-iluminačním módu s konvenčním zdrojem excitačního světla je zobrazovací metoda vhodná spíše pro semikvantitativní a orientační stanovování dynamiky růstu tumoru, než pro přesné měření a porovnávání objemů xenograftů lokalizovaných hlouběji v mozku.

Naše data, podobně jako výsledky Jostové a kol. (Jost a kol., 2007) napovídají, že neinvazivní zobrazovací metody využívající tomografický přístup jsou pro *in vivo* kvantifikaci objemu tumoru v ortotopických modelech mozkových nádorů vhodnější.

## 6. Závěry

1. Transgenní zvýšení exprese DPP-IV u lidských transformovaných gliálních buněk v ortotopickém myším modelu negativně ovlivňuje růst experimentálních tumorů.
2. Negativní působení zvýšené transgenní exprese DPP-IV na růst experimentálních tumorů z lidských gliálních buněk v ortotopickém myším modelu není závislé na enzymové funkci DPP-IV.
3. V gliálních tumorech, vzniklých transgenní transformací neuroektodermálních progenitorových buněk *in vivo*, dochází ke statisticky významnému zvýšení DPP-IV-like aktivity oproti kontrolní tkáni, ale není způsobeno kanonickou DPP-IV.
4. Na rozdíl od cév a kapilár zdravého myšího mozku, jejichž endotel vykazuje expresi DPP-IV, dysplastické nádorové kapiláry v tumorech vzniklých transgenní indukcí *in vivo* DPP-IV neexprimují.
5. Planární fluorescenční zobrazovací metoda v epiiluminačním módu není vhodná pro přesnou kvantifikaci dynamiky růstu intrakraniálních modelových tumorů *in vivo*, ale umožňuje semikvitatativní monitoraci růstu tumoru *in vivo*.

## Zkratky

ADA	Adenosin Deaminase
BLI	Bioluminescence Imaging
BOFES	Bovine Fetal Serum
BSA	Bovine serum albumine
CD31	Cluster of Differentiation 31
CXCL12	C-X-C motif chemokine Ligand 12
CXCR4	C-X-C motif chemokine Receptor type 4
DASH	Dipeptidyl peptidase IV Activity and/or Structure Homologues
DF-1	Označení pro kuřecí embrionální imortalizované fibroblasty
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPP-IV	Dipeptidyl Peptidase IV (Dipeptidylpeptidáza-IV)
FCS	Fetal Calf Serum
FLI	Fluorescence Imaging
GEM	Genetically Engineered Mouse
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
GLP-2	Glucagon-like Peptide-2
G-tva	Glial fibrillary acidic protein - cellular receptor for subgroup A avian leukosis viruses
HE	Hematoxilin
IL-1	Interleukin-1
Ink4a	Gene for Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
Ki-67	marker proliferace
LSL EGFRvIII	Lox-Stop-Lox Epidermal Growth Factor Receptor Variant III
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
mKate2	Far-red fluorescent protein mKate 2
MR	Magnetic resonance
N-tva	Nestin - cellular receptor for subgroup A avian leukosis viruses
PBS	Phosphate Buffered Saline
pcDNA4	Označení expresního vektoru
PDGFB	Platelet-derived growth factor subunit B
PDGFB-HA	Platelet-Derived Growth Factor subunit B with human influenza HemAgglutinin tag
PET	Positron Emission Tomography
PTEN flox	Phosphatase and Tensin homolog flox (conditional knock out)
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
RCAS/tva	Replication-Competent ASLV long terminal repeat with a Splice acceptor / cellular receptor for subgroup A avian leukosis viruses
RNA	Ribonucleic Acid
SDF-1 $\alpha$	Stromal cell-Derived Factor 1 $\alpha$
TBS	Tris Buffered Saline
TNF	Tumor Necrosis Factor
U373MG	Označení gliomových buněčných linií
WHO	World Health Organization

## Literatura

- Arscott W. T., LaBauve A. E., May V. a Wesley U. V. (2009). "Suppression of neuroblastoma growth by dipeptidyl peptidase IV: relevance of chemokine regulation and caspase activation." Oncogene **28**(4): 479-491.
- Barreira da Silva R., Laird M. E., Yatim N., Fiette L., Ingersoll M. A. a Albert M. L. (2015). "Dipeptidylpeptidase 4 inhibition enhances lymphocyte trafficking, improving both naturally occurring tumor immunity and immunotherapy." Nat Immunol.
- Barth R. F. a Kaur B. (2009). "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas." J Neurooncol **94**(3): 299-312.
- Bauvois B. (1988). "A collagen-binding glycoprotein on the surface of mouse fibroblasts is identified as dipeptidyl peptidase IV." Biochem J **252**(3): 723-731.
- Becher O. J., Hambarzumyan D., Walker T. R., Helmy K., Nazarian J., Albrecht S., Hiner R. L., Gall S., Huse J. T., Jabado N., MacDonald T. J. a Holland E. C. (2010). "Preclinical evaluation of radiation and perifosine in a genetically and histologically accurate model of brainstem glioma." Cancer Res **70**(6): 2548-2557.
- Ben-Shooshan I., Kessel A., Ben-Tal N., Cohen-Luria R. a Parola A. H. (2002). "On the regulatory role of dipeptidyl peptidase IV (=CD=adenosine deaminase complexing protein) on adenosine deaminase activity." Biochim Biophys Acta **1587**(1): 21-30.
- Busek P., Hrabal P., Fric P. a Sedo A. (2014). "Co-expression of the homologous proteases fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase-IV in the adult human Langerhans islets." Histochem Cell Biol.
- Busek P., Krepela E., Mares V., Vlasicova K., Sevcik J. a Sedo A. (2006). "Expression and function of dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cancer." Adv Exp Med Biol **575**: 55-62.
- Busek P., Malik R. a Sedo A. (2004). "Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer." Int J Biochem Cell Biol **36**(3): 408-421.
- Busek P., Stremenova J., Krepela E. a Sedo A. (2008). "Modulation of substance P signaling by dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity in human glioma cell lines." Physiol Res **57**(3): 443-449.
- Busek P., Stremenova J. a Sedo A. (2008). "Dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity bearing molecules in human brain tumors--good or evil?" Front Biosci **13**: 2319-2326.
- Busek P., Stremenova J., Sromova L., Hilser M., Balaziová E., Kosek D., Trylčová J., Strnad H., Krepela E. a Sedo A. (2012). "Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity." Int J Biochem Cell Biol **44**(5): 738-747.

Carbone A., Gloghini A., Zagonel V., Aldinucci D., Gattei V., Degan M., Improta S., Sorio R., Monfardini S. a Pinto A. (1995). "The expression of CD26 and CD40 ligand is mutually exclusive in human T-cell non-Hodgkin's lymphomas/leukemias." Blood **86**(12): 4617-4626.

Davies S., Beckenkamp A. a Buffon A. (2015). "CD26 a cancer stem cell marker and therapeutic target." Biomed Pharmacother **71**: 135-138.

De Meester I. A., Kestens L. L., Vanham G. L., Vanhoof G. C., Vingerhoets J. H., Gigase P. L. a Scharpe S. L. (1995). "Costimulation of CD4+ and CD8+ T cells through CD26: the ADA-binding epitope is not essential for complete signaling." J Leukoc Biol **58**(3): 325-330.

Deliolani N. C., Kasmieh R., Wurdinger T., Tannous B. A., Shah K. a Ntziachristos V. (2008). "Performance of the red-shifted fluorescent proteins in deep-tissue molecular imaging applications." J Biomed Opt **13**(4): 044008.

Demuth T. a Berens M. E. (2004). "Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion." J Neurooncol **70**(2): 217-228.

Dinca E. B., Sarkaria J. N., Schroeder M. A., Carlson B. L., Voicu R., Gupta N., Berger M. S. a James C. D. (2007). "Bioluminescence monitoring of intracranial glioblastoma xenograft: response to primary and salvage temozolomide therapy." J Neurosurg **107**(3): 610-616.

Dong Z., Radinsky R., Fan D., Tsan R., Bucana C. D., Wilmanns C. a Fidler I. J. (1994). "Organ-specific modulation of steady-state mdr gene expression and drug resistance in murine colon cancer cells." J Natl Cancer Inst **86**(12): 913-920.

Doucette T., Rao G., Rao A., Shen L., Aldape K., Wei J., Dziurzynski K., Gilbert M. a Heimberger A. B. (2013). "Immune heterogeneity of glioblastoma subtypes: extrapolation from the cancer genome atlas." Cancer Immunol Res **1**(2): 112-122.

Druckrey H., Ivankovic S. a Preussmann R. (1965). "[SELECTIVE INDUCTION OF MALIGNANT TUMORS IN THE BRAIN AND SPINAL CORD OF RATS BY N-METHYL-N-NITROSOUREA]." Z Krebsforsch **66**: 389-408.

Durinx C., Lambeir A. M., Bosmans E., Falmagne J. B., Berghmans R., Haemers A., Scharpe S. a 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.

Ernst A., Hofmann S., Ahmadi R., Becker N., Korshunov A., Engel F., Hartmann C., Felsberg J., Sabel M., Peterziel H., Durchdewald M., Hess J., Barbus S., Campos B., Starzinski-Powitz A., Unterberg A., Reifenberger G., Lichter P., Herold-Mende C. a Radlwimmer B. (2009). "Genomic and expression profiling of glioblastoma stem cell-like spheroid cultures identifies novel tumor-relevant genes associated with survival." Clin Cancer Res **15**(21): 6541-6550.

Federspiel M. J., Bates P., Young J. A., Varmus H. E. a Hughes S. H. (1994). "A system for tissue-specific gene targeting: transgenic mice susceptible to subgroup A avian leukosis virus-based retroviral vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11241-11245.

Fidler I. J., Wilmanns C., Staroselsky A., Radinsky R., Dong Z. a Fan D. (1994). "Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment." Cancer Metastasis Rev **13**(2): 209-222.

Finkelstein S. D., Black P., Nowak T. P., Hand C. M., Christensen S. a Finch P. W. (1994). "Histological characteristics and expression of acidic and basic fibroblast growth factor genes in intracerebral xenogeneic transplants of human glioma cells." Neurosurgery **34**(1): 136-143.

Fisher G. H., Orsulic S., Holland E., Hively W. P., Li Y., Lewis B. C., Williams B. O. a Varmus H. E. (1999). "Development of a flexible and specific gene delivery system for production of murine tumor models." Oncogene **18**(38): 5253-5260.

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. a von Horsten S. (2007). "Neuropeptide Y (NPY) cleaving enzymes: structural and functional homologues of dipeptidyl peptidase 4." Peptides **28**(2): 257-268.

Fulci G., Labuhn M., Maier D., Lachat Y., Hausmann O., Hegi M. E., Janzer R. C., Merlo A. a Van Meir E. G. (2000). "p53 gene mutation and ink4a-arf deletion appear to be two mutually exclusive events in human glioblastoma." Oncogene **19**(33): 3816-3822.

Giannini C., Sarkaria J. N., Saito A., Uhm J. H., Galanis E., Carlson B. L., Schroeder M. A. a James C. D. (2005). "Patient tumor EGFR and PDGFRA gene amplifications retained in an invasive intracranial xenograft model of glioblastoma multiforme." Neuro Oncol **7**(2): 164-176.

Girardi A. C., Degray B. C., Nagy T., Biemesderfer D. a Aronson P. S. (2001). "Association of Na(+)-H(+) exchanger isoform NHE3 and dipeptidyl peptidase IV in the renal proximal tubule." J Biol Chem **276**(49): 46671-46677.

Gonzalez-Gronow M., Grenett H. E., Weber M. R., Gawdi G. a 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. a McCaughan G. W. (2001). "CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes." Scand J Immunol **54**(3): 249-264.

Hambardzumyan D., Amankulor N. M., Helmy K. Y., Becher O. J. a Holland E. C. (2009). "Modeling Adult Gliomas Using RCAS/t-va Technology." Transl Oncol **2**(2): 89-95.

Hambardzumyan D., Parada L. F., Holland E. C. a Charest A. (2011). "Genetic modeling of gliomas in mice: new tools to tackle old problems." Glia **59**(8): 1155-1168.

Hanahan D. a Folkman J. (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-364.

Harpavat S. a Cepko C. L. (2006). "RCAS-RNAi: a loss-of-function method for the developing chick retina." BMC Dev Biol **6**: 2.



Hashizume R., Ozawa T., Dinca E. B., Banerjee A., Prados M. D., James C. D. a Gupta N. (2010). "A human brainstem glioma xenograft model enabled for bioluminescence imaging." J Neurooncol **96**(2): 151-159.

Heissig B., Eiamboonsert S., Salama Y., Shimazu H., Dhahri D., Munakata S., Tashiro Y. a Hattori K. (2015). "Cancer therapy targeting the fibrinolytic system." Adv Drug Deliv Rev.

Hirai K., Kotani T., Aratake Y., Ohtaki S. a Kuma K. (1999). "Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) staining predicts distant metastasis of 'benign' thyroid tumor." Pathol Int **49**(3): 264-265.

Hoffman R. M. (2008). "A better fluorescent protein for whole-body imaging." Trends Biotechnol **26**(1): 1-4.

Hopsu-Havu V. K. a Glenner G. G. (1966). "A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide." Histochemie **7**(3): 197-201.

Hussain S. F., Yang D., Suki D., Aldape K., Grimm E. a Heimberger A. B. (2006). "The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses." Neuro Oncol **8**(3): 261-279.

Huszthy P. C., Daphu I., Niclou S. P., Stieber D., Nigro J. M., Sakariassen P. O., Miletic H., Thorsen F. a Bjerkvig R. (2012). "In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives." Neuro Oncol **14**(8): 979-993.

Chen W. T. a Kelly T. (2003). "Seprase complexes in cellular invasiveness." Cancer Metastasis Rev **22**(2-3): 259-269.

Cheng H. C., Abdel-Ghany M. a Pauli B. U. (2003). "A novel consensus motif in fibronectin mediates dipeptidyl peptidase IV adhesion and metastasis." J Biol Chem **278**(27): 24600-24607.

Christopherson K. W., 2nd, Uralil S. E., Porecha N. K., Zabriskie R. C., Kidd S. M. a Ramin S. M. (2006). "G-CSF- and GM-CSF-induced upregulation of CD26 peptidase downregulates the functional chemotactic response of CD34+CD38- human cord blood hematopoietic cells." Exp Hematol **34**(8): 1060-1068.

Iwata S. a Morimoto C. (1999). "CD26/dipeptidyl peptidase IV in context. The different roles of a multifunctional ectoenzyme in malignant transformation." J Exp Med **190**(3): 301-306.

Jackson C., Ruzevick J., Phallen J., Belcaid Z. a Lim M. (2011). "Challenges in immunotherapy presented by the glioblastoma multiforme microenvironment." Clin Dev Immunol **2011**: 732413.

Jones T. S. a Holland E. C. (2011). "Molecular pathogenesis of malignant glial tumors." Toxicol Pathol **39**(1): 158-166.

Jost S. C., Wanebo J. E., Song S. K., Chicoine M. R., Rich K. M., Woolsey T. A., Lewis J. S., Mach R. H., Xu J. a Garbow J. R. (2007). "In vivo imaging in a murine model of glioblastoma." Neurosurgery **60**(2): 360-370; discussion 370-361.

Kahne T., Lendeckel U., Wrenger S., Neubert K., Ansorge S. a Reinhold D. (1999). "Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (review)." Int J Mol Med **4**(1): 3-15.

Kajiyama H., Kikkawa F., Khin E., Shibata K., Ino K. a Mizutani S. (2003). "Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells." Cancer Res **63**(9): 2278-2283.

Kajiyama H., Kikkawa F., Suzuki T., Shibata K., Ino K. a Mizutani S. (2002). "Prolonged survival and decreased invasive activity attributable to dipeptidyl peptidase IV overexpression in ovarian carcinoma." Cancer Res **62**(10): 2753-2757.

Kameoka J., Tanaka T., Nojima Y., Schlossman S. F. a Morimoto C. (1993). "Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26." Science **261**(5120): 466-469.

Kessenbrock K., Plaks V. a Werb Z. (2010). "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment." Cell **141**(1): 52-67.

Kikkawa F., Kajiyama H., Ino K., Shibata K. a Mizutani S. (2003). "Increased adhesion potency of ovarian carcinoma cells to mesothelial cells by overexpression of dipeptidyl peptidase IV." Int J Cancer **105**(6): 779-783.

Killion J. J., Radinsky R. a Fidler I. J. (1998). "Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice." Cancer Metastasis Rev **17**(3): 279-284.

Kitlinska J., Lee E. W., Li L., Pons J., Estes L. a Zukowska Z. (2003). "Dual role of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) in angiogenesis and vascular remodeling." Adv Exp Med Biol **524**: 215-222.

Klemann C., Wagner L., Stephan M. a von Horsten S. (2016). "Cut to the chase: A review of CD26/dipeptidyl peptidase-4 (DPP4)'S entanglement in the immune system." Clin Exp Immunol.

Kuhlmann C. R., Schaefer C. A., Reinhold L., Tillmanns H. a Erdogan A. (2005). "Signalling mechanisms of SDF-induced endothelial cell proliferation and migration." Biochem Biophys Res Commun **335**(4): 1107-1114.

Lamour V., Henry A., Kroonen J., Nokin M. J., von Marschall Z., Fisher L. W., Chau T. L., Chariot A., Sanson M., Delattre J. Y., Turtoi A., Peulen O., Rogister B., Castronovo V. a Bellahcene A. (2015). "Targeting osteopontin suppresses glioblastoma stem-like cell character and tumorigenicity in vivo." Int J Cancer **137**(5): 1047-1057.

Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., Li A., Su Q., Donin N. M., Pastorino S., Purow B. W., Christopher N., Zhang W., Park J. K. a Fine H. A. (2006). "Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines." Cancer Cell **9**(5): 391-403.

- Levicar N., Nuttall R. K. a Lah T. T. (2003). "Proteases in brain tumour progression." Acta Neurochir (Wien) **145**(9): 825-838.
- Li A., Walling J., Kotliarov Y., Center A., Steed M. E., Ahn S. J., Rosenblum M., Mikkelsen T., Zenklusen J. C. a Fine H. A. (2008). "Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas." Mol Cancer Res **6**(1): 21-30.
- Llaguno-Munive M., Medina L. A., Jurado R., Romero-Pina M. a Garcia-Lopez P. (2013). "Mifepristone improves chemo-radiation response in glioblastoma xenografts." Cancer Cell Int **13**(1): 29.
- Lojda Z. (1981). "Proteinases in pathology. Usefulness of histochemical methods." J Histochem Cytochem **29**(3A Suppl): 481-493.
- Loster K., Zeilinger K., Schuppan D. a Reutter W. (1995). "The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site." Biochem Biophys Res Commun **217**(1): 341-348.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. a Randall R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Lyustikman Y. a Lassman A. B. (2006). "Glioma oncogenesis and animal models of glioma formation." Hematol Oncol Clin North Am **20**(6): 1193-1214.
- Macleod K. F. a Jacks T. (1999). "Insights into cancer from transgenic mouse models." J Pathol **187**(1): 43-60.
- Mares V., Stremenova J., Lisa V., Kozakova H., Marek J., Syrucek M., Soula O. a Sedo A. (2012). "Compartment- and malignance-dependent up-regulation of gamma-glutamyltranspeptidase and dipetidylpeptidase-IV activity in human brain gliomas." Histol Histopathol **27**(7): 931-940.
- Marfella R., Sasso F. C., Rizzo M. R., Paolisso P., Barbieri M., Padovano V., Carbonara O., Gualdiero P., Petronella P., Ferraraccio F., Petrella A., Canonico R., Campitiello F., Della Corte A., Paolisso G. a Canonico S. (2012). "Dipeptidyl peptidase 4 inhibition may facilitate healing of chronic foot ulcers in patients with type 2 diabetes." Exp Diabetes Res **2012**: 892706.
- Masur K., Schwartz F., Entschladen F., Niggemann B. a Zaenker K. S. (2006). "DPPIV inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells." Regul Pept **137**(3): 147-155.
- Mentlein R. (1999). "Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides." Regul Pept **85**(1): 9-24.
- Mentlein R. (2004). "Cell-surface peptidases." Int Rev Cytol **235**: 165-213.

Mirshahi F., Pourtau J., Li H., Muraine M., Trochon V., Legrand E., Vannier J., Soria J., Vasse M. a Soria C. (2000). "SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in in vitro and in vivo models." Thromb Res **99**(6): 587-594.

Mook O. R., Jonker A., Strang A. C., Veltien A., Gambarota G., Frederiks W. M., Heerschap A. a Van Noorden C. J. (2008). "Noninvasive magnetic resonance imaging of the development of individual colon cancer tumors in rat liver." Biotechniques **44**(4): 529-535.

Nauck M. (2016). "Incretin therapies: highlighting common features and differences in the modes of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors." Diabetes Obes Metab **18**(3): 203-216.

Nozaki M., Tada M., Kobayashi H., Zhang C. L., Sawamura Y., Abe H., Ishii N. a Van Meir E. G. (1999). "Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression." Neuro Oncol **1**(2): 124-137.

Ntziachristos V. (2006). "Fluorescence molecular imaging." Annu Rev Biomed Eng **8**: 1-33.  
Ohnuma K., Yamochi T., Uchiyama M., Nishibashi K., Yoshikawa N., Shimizu N., Iwata S., Tanaka H., Dang N. H. a Morimoto C. (2004). "CD26 up-regulates expression of CD86 on antigen-presenting cells by means of caveolin-1." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(39): 14186-14191.

Omar B. A., Liehua L., Yamada Y., Seino Y., Marchetti P. a Ahren B. (2014). "Dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) is expressed in mouse and human islets and its activity is decreased in human islets from individuals with type 2 diabetes." Diabetologia **57**(9): 1876-1883.

Parsa A. T., Chakrabarti I., Hurley P. T., Chi J. H., Hall J. S., Kaiser M. G. a Bruce J. N. (2000). "Limitations of the C6/Wistar rat intracerebral glioma model: implications for evaluating immunotherapy." Neurosurgery **47**(4): 993-999; discussion 999-1000.

Pethiyagoda C. L., Welch D. R. a Fleming T. P. (2000). "Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) inhibits cellular invasion of melanoma cells." Clin Exp Metastasis **18**(5): 391-400.

Phillips H. S., Kharbanda S., Chen R., Forrest W. F., Soriano R. H., Wu T. D., Misra A., Nigro J. M., Colman H., Soroceanu L., Williams P. M., Modrusan Z., Feuerstein B. G. a Aldape K. (2006). "Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis." Cancer Cell **9**(3): 157-173.

Piazza G. A., Callanan H. M., Mowery J. a Hixson D. C. (1989). "Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix." Biochem J **262**(1): 327-334.

Pinski J., Halmos G., Shirahige Y., Wittliff J. L. a Schally A. V. (1993). "Inhibition of growth of the human malignant glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486." J Clin Endocrinol Metab **77**(5): 1388-1392.

Poncina N., Albiero M., Menegazzo L., Cappellari R., Avogaro A. a Fadini G. P. (2014). "The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor saxagliptin improves function of circulating pro-angiogenic cells from type 2 diabetic patients." Cardiovasc Diabetol **13**: 92.

- Pro B. a Dang N. H. (2004). "CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer." Histol Histopathol **19**(4): 1345-1351.
- Proost P., De Meester I., Schols D., Struyf S., Lambeir A. M., Wuyts A., Opdenakker G., De Clercq E., Scharpe S. a Van Damme J. (1998). "Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/dipeptidyl-peptidase IV. Conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1-infection." J Biol Chem **273**(13): 7222-7227.
- Raghavan R., Steart P. V. a Weller R. O. (1990). "Cell proliferation patterns in the diagnosis of astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastoma multiforme: a Ki-67 study." Neuropathol Appl Neurobiol **16**(2): 123-133.
- Ramaswamy R., Ashton K., Lea R., Roberts P., Davis C. H., Golash A. a Dawson T. (2012). "Study of effectiveness of mifepristone for glioma cell line growth suppression." Br J Neurosurg **26**(3): 336-339.
- Rolle C. E., Sengupta S. a Lesniak M. S. (2012). "Mechanisms of immune evasion by gliomas." Adv Exp Med Biol **746**: 53-76.
- Romer J. a Curran T. (2005). "Targeting medulloblastoma: small-molecule inhibitors of the Sonic Hedgehog pathway as potential cancer therapeutics." Cancer Res **65**(12): 4975-4978.
- Samikannu B., Chen C., Lingwal N., Padmasekar M., Engel F. B. a Linn T. (2013). "Dipeptidyl peptidase IV inhibition activates CREB and improves islet vascularization through VEGF-A/VEGFR-2 signaling pathway." PLoS One **8**(12): e82639.
- Sato Y., Fujiwara H., Higuchi T., Yoshioka S., Tatsumi K., Maeda M. a Fujii S. (2002). "Involvement of dipeptidyl peptidase IV in extravillous trophoblast invasion and differentiation." J Clin Endocrinol Metab **87**(9): 4287-4296.
- Sedo A., Stremenova J., Busek P. a Duke-Cohan J. S. (2008). "Dipeptidyl peptidase-IV and related molecules: markers of malignancy?" Expert Opin Med Diagn **2**(6): 677-689.
- Shcherbo D., Merzlyak E. M., Chepurnykh T. V., Fradkov A. F., Ermakova G. V., Solovieva E. A., Lukyanov K. A., Bogdanova E. A., Zraisky A. G., Lukyanov S. a Chudakov D. M. (2007). "Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging." Nat Methods **4**(9): 741-746.
- Shcherbo D., Murphy C. S., Ermakova G. V., Solovieva E. A., Chepurnykh T. V., Shcheglov A. S., Verkhusha V. V., Pletnev V. Z., Hazelwood K. L., Roche P. M., Lukyanov S., Zraisky A. G., Davidson M. W. a Chudakov D. M. (2009). "Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues." Biochem J **418**(3): 567-574.
- Shultz L. D., Lang P. A., Christianson S. W., Gott B., Lyons B., Umeda S., Leiter E., Hesselton R., Wagar E. J., Leif J. H., Kollet O., Lapidot T. a Greiner D. L. (2000). "NOD/LtSz-Rag1null mice: an immunodeficient and radioresistant model for engraftment of human hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells." J Immunol **164**(5): 2496-2507.

Shultz L. D., Schweitzer P. A., Christianson S. W., Gott B., Schweitzer I. B., Tennent B., McKenna S., Mobraaten L., Rajan T. V., Greiner D. L. a et al. (1995). "Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice." J Immunol **154**(1): 180-191.

Scharpe S. a De Meester I. (2001). "Peptide truncation by dipeptidyl peptidase IV: a new pathway for drug discovery?" Verh K Acad Geneesk Belg **63**(1): 5-32; discussion 32-33.

Schmiddek H. H., Nielsen S. L., Schiller A. L. a Messer J. (1971). "Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea." J Neurosurg **34**(3): 335-340.

Schrader W. P. a Pollara B. (1978). "Localization of an adenosine deaminase-binding protein in human kidney." J Lab Clin Med **92**(4): 656-662.

Schrader W. P., West C. A., Miczek A. D. a Norton E. K. (1990). "Characterization of the adenosine deaminase-adenosine deaminase complexing protein binding reaction." J Biol Chem **265**(31): 19312-19318.

Schrader W. P., West C. A. a Strominger N. L. (1987). "Localization of adenosine deaminase and adenosine deaminase complexing protein in rabbit brain." J Histochem Cytochem **35**(4): 443-451.

Stremenova J., Krepela E., Mares V., Trim J., Dbaly V., Marek J., Vanickova Z., Lisa V., Yea C. a 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.

Stremenova J., Mares V., Lisa V., Hilser M., Krepela E., Vanickova Z., Syrucek M., Soula O. a Sedo A. (2010). "Expression of dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologs in human meningiomas." Int J Oncol **36**(2): 351-358.

Stulc T. a Sedo A. (2010). "Inhibition of multifunctional dipeptidyl peptidase-IV: is there a risk of oncological and immunological adverse effects?" Diabetes Res Clin Pract **88**(2): 125-131.

Szentirmai O., Baker C. H., Lin N., Szucs S., Takahashi M., Kiryu S., Kung A. L., Mulligan R. C. a Carter B. S. (2006). "Noninvasive bioluminescence imaging of luciferase expressing intracranial U87 xenografts: correlation with magnetic resonance imaging determined tumor volume and longitudinal use in assessing tumor growth and antiangiogenic treatment effect." Neurosurgery **58**(2): 365-372; discussion 365-372.

Taillandier L., Antunes L. a Angioi-Duprez K. S. (2003). "Models for neuro-oncological preclinical studies: solid orthotopic and heterotopic grafts of human gliomas into nude mice." J Neurosci Methods **125**(1-2): 147-157.

Takasawa W., Ohnuma K., Hatano R., Endo Y., Dang N. H. a Morimoto C. (2010). "Inhibition of dipeptidyl peptidase 4 regulates microvascular endothelial growth induced by inflammatory cytokines." Biochem Biophys Res Commun **401**(1): 7-12.

Talmadge J. E., Singh R. K., Fidler I. J. a Raz A. (2007). "Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer." Am J Pathol **170**(3): 793-804.

Tan E. Y., Mujoomdar M. a Blay J. (2004). "Adenosine down-regulates the surface expression of dipeptidyl peptidase IV on HT-29 human colorectal carcinoma cells: implications for cancer cell behavior." Am J Pathol **165**(1): 319-330.

Tian C., Bagley J., Forman D. a Iacomini J. (2006). "Inhibition of CD26 peptidase activity significantly improves engraftment of retrovirally transduced hematopoietic progenitors." Gene Ther **13**(7): 652-658.

Torsvik A., Stieber D., Enger P. O., Golebiewska A., Molven A., Svendsen A., Westermark B., Niclou S. P., Olsen T. K., Chekenya Enger M. a Bjerkvig R. (2014). "U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells." Cancer Med **3**(4): 812-824.

Troy T., Jekic-McMullen D., Sambucetti L. a Rice B. (2004). "Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models." Mol Imaging **3**(1): 9-23.

Tseng C. H., Lee K. Y. a Tseng F. H. (2015). "An updated review on cancer risk associated with incretin mimetics and enhancers." J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev **33**(1): 67-124.

Tung C. H., Zeng Q., Shah K., Kim D. E., Schellingerhout D. a Weissleder R. (2004). "In vivo imaging of beta-galactosidase activity using far red fluorescent switch." Cancer Res **64**(5): 1579-1583.

Ueki K., Ono Y., Henson J. W., Efird J. T., von Deimling A. a Louis D. N. (1996). "CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated." Cancer Res **56**(1): 150-153.

Uhrbom L., Hesselager G., Nister M. a Westermark B. (1998). "Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus." Cancer Res **58**(23): 5275-5279.

Van den Oord J. J. (1998). "Expression of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in benign and malignant pigment-cell lesions of the skin." Br J Dermatol **138**(4): 615-621.

Van Lint P. a Libert C. (2007). "Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation." J Leukoc Biol **82**(6): 1375-1381.

Vanhoof G., Goossens F., De Meester I., Hendriks D. a Scharpe S. (1995). "Proline motifs in peptides and their biological processing." Faseb j **9**(9): 736-744.

Vauleon E., Tony A., Hamlat A., Etcheverry A., Chiforeanu D. C., Menei P., Mosser J., Quillien V. a Aubry M. (2012). "Immune genes are associated with human glioblastoma pathology and patient survival." BMC Med Genomics **5**: 41.

Verhaak R. G., Hoadley K. A., Purdom E., Wang V., Qi Y., Wilkerson M. D., Miller C. R., Ding L., Golub T., Mesirov J. P., Alexe G., Lawrence M., O'Kelly M., Tamayo P., Weir B. A., Gabriel S., Winckler W., Gupta S., Jakkula L., Feiler H. S., Hodgson J. G., James C. D.,

Sarkaria J. N., Brennan C., Kahn A., Spellman P. T., Wilson R. K., Speed T. P., Gray J. W., Meyerson M., Getz G., Perou C. M. a Hayes D. N. (2010). "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." Cancer Cell **17**(1): 98-110.

Vincenzo F., Manfredi T., Carmine C. a Mario R. (2014). "CD26: a multi-purpose pharmacological target." Curr Clin Pharmacol **9**(2): 157-164.

Wang J., Miletic H., Sakariassen P. O., Huszthy P. C., Jacobsen H., Brekka N., Li X., Zhao P., Mork S., Chekenya M., Bjerkvig R. a Enger P. O. (2009). "A reproducible brain tumour model established from human glioblastoma biopsies." BMC Cancer **9**: 465.

Wang S. C., Hong J. H., Hsueh C. a Chiang C. S. (2012). "Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model." Lab Invest **92**(1): 151-162.

Weihofen W. A., Liu J., Reutter W., Saenger W. a Fan H. (2004). "Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface." J Biol Chem **279**(41): 43330-43335.

Weihofen W. A., Liu J., Reutter W., Saenger W. a Fan H. (2005). "Crystal structures of HIV-1 Tat-derived nonapeptides Tat-(1-9) and Trp2-Tat-(1-9) bound to the active site of dipeptidyl-peptidase IV (CD26)." J Biol Chem **280**(15): 14911-14917.

Wesley U. V., Albino A. P., Tiwari S. a 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., McGroarty M. a Homoyouni A. (2005). "Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway." Cancer Res **65**(4): 1325-1334.

Wesley U. V., Tiwari S. a 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.

Westphal M. a Meissner H. (1998). "Establishing human glioma-derived cell lines." Methods Cell Biol **57**: 147-165.

Wild-Bode C., Weller M. a Wick W. (2001). "Molecular determinants of glioma cell migration and invasion." J Neurosurg **94**(6): 978-984.

Wolf M., Albrecht S. a Marki C. (2008). "Proteolytic processing of chemokines: implications in physiological and pathological conditions." Int J Biochem Cell Biol **40**(6-7): 1185-1198.

Wu W., Yu L. H., Ma B. a Xu M. J. (2014). "The inhibitory effect of doxycycline on cisplatin-sensitive and -resistant epithelial ovarian cancer." PLoS One **9**(3): e89841.

Yamaguchi U., Nakayama R., Honda K., Ichikawa H., Hasegawa T., Shitashige M., Ono M., Shoji A., Sakuma T., Kuwabara H., Shimada Y., Sasako M., Shimoda T., Kawai A., Hirohashi S. a Yamada T. (2008). "Distinct gene expression-defined classes of gastrointestinal stromal tumor." J Clin Oncol **26**(25): 4100-4108.



Yu D. M., Slaitini L., Gysbers V., Riekhoff A. G., Kahne T., Knott H. M., De Meester I., Abbott C. A., McCaughan G. W. a Gorrell M. D. (2011). "Soluble CD26 / dipeptidyl peptidase IV enhances human lymphocyte proliferation in vitro independent of dipeptidyl peptidase enzyme activity and adenosine deaminase binding." Scand J Immunol **73**(2): 102-111.

Yusta B., Huang L., Munroe D., Wolff G., Fantáske R., Sharma S., Demchyshyn L., Asa S. L. a Drucker D. J. (2000). "Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents." Gastroenterology **119**(3): 744-755.

Zhao Y., Lam D. H., Yang J., Lin J., Tham C. K., Ng W. H. a Wang S. (2012). "Targeted suicide gene therapy for glioma using human embryonic stem cell-derived neural stem cells genetically modified by baculoviral vectors." Gene Ther **19**(2): 189-200.

Zukowska-Grojec Z., Karwatowska-Prokopczuk E., Rose W., Rone J., Movafagh S., Ji H., Yeh Y., Chen W. T., Kleinman H. K., Grouzmann E. a Grant D. S. (1998). "Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium." Circ Res **83**(2): 187-195.

# **Přílohy**

## **Příloha 1**

## Short Communication

# Limitations of Macroscopic Fluorescence Imaging for the Estimation of Tumour Growth in an Orthotopic Glioma Mouse Model

(*in vivo* fluorescence imaging / mKate2 / glioma growth)

M. HILŠER, J. TRYLČOVÁ, P. BUŠEK, A. ŠEDO

Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

**Abstract.** Imaging methods based on light detection are being increasingly used for the non-invasive assessment of tumour growth in animal models. In contrast with bioluminescence imaging, there are no studies assessing the use of macroscopic fluorescence imaging for the longitudinal monitoring of tumour growth in an orthotopic glioma mouse model. Glioma cells expressing the red-shifted fluorescent protein mKate2 were orthotopically implanted to NOD-rag mice and the tumour size estimated by macroscopic fluorescence imaging was compared to the tumour volume determined morphometrically. There was no significant correlation between the data obtained by non-invasive macroscopic fluorescence imaging and post mortem morphometry. In addition, the fluorescence imaging failed to detect a morphometrically verified difference in tumour volume between animals with tumours expressing a potential tumour suppressor gene and controls. The fluorescence signal was affected by the spatial pattern of tumour growth and substantially attenuated by the interfering brain tissue. Our results indicate that the fluorescence signal emitted by glioma cells reflected not only the tumour mass, but also its spatial distribution. Macroscopic planar FLI in an epi-illumination mode and a conventional source of excitation light

therefore appears to be more suitable for semi-quantitative assessment of the tumour growth especially in the case of superficially located tumours rather than for precise volume estimation of the xenografts located deep within the brain tissue.

## Introduction

The orthotopic brain tumour model is an important tool that has been applied in the research of brain malignancies for many years (Kobayashi et al., 1980). The advantage of this model in comparison with the *in vitro* and subcutaneous models lies in more authentic simulation of the actual conditions of malignant processes in the brain (Dong et al., 1994; Fidler et al., 1994; Killion et al., 1998). On the other hand, longitudinal monitoring of the tumour growth in an orthotopic model is a highly laborious and time-consuming task requiring a large number of experimental animals to be killed. To resolve this obstacle, imaging systems such as magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography, bioluminescence imaging (BLI) and fluorescence imaging (FLI) have been put into practice for small animals. Compared to the expensive and low-throughput tomographic systems (Mook et al., 2008), the optical imaging systems based on light detection (i.e. BLI, FLI) have the advantage of low costs and easy equipment handling. Although two-dimensional information provided by these methods may bias precise volumetric estimations, several studies demonstrated high correlation of MRI and BLI results, and thus BLI is often used for brain tumour growth estimation (Szentirmai et al., 2006; Dinca et al., 2007; Hashizume et al., 2010). In contrast to that, the suitability of FLI for this purpose has not been validated, probably also because of the absence of an appropriate fluorescence reporter. The situation could, however, change with the introduction of a new category of red-shifted fluorescent proteins (Hoffman, 2008). Their emission wavelength beyond 600 nm dramatically decreases light absorption and scattering by the surrounding tissues, while their excitation wave-

---

Received September 29, 2011. Accepted January 12, 2012.

This work was supported by Research project MSM 0021620808 of the Czech Ministry of Education, Youth and Sports, grant No. 20410 of the Grant Agency of Charles University in Prague and SVV-2011-262513.

Corresponding author: Aleksí Šedo, Laboratory of Cancer Cell Biology of the Institute of Biochemistry and Experimental Oncology of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, U Nemocnice 5, 128 53 Prague 2, Czech Republic. e-mail: aleksi@cesnet.cz

Abbreviations: BLI – bioluminescence imaging, DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium, FBS – foetal bovine serum, FLI – fluorescence imaging, MRI – magnetic resonance imaging.

---

Folia Biologica (Praha) 58, 128-133 (2012)

length of about 590 nm produces less tissue autofluorescence (Troy et al., 2004; Tung et al., 2004). This improves their detectability by at least two orders of magnitude compared to the so far "gold standard" green fluorescent protein (Shcherbo et al., 2007, 2009; Deliolanis et al., 2008). Despite these promising characteristics of the red-shifted fluorescent proteins, there are no studies to confirm the correlation between the macroscopic FLI results and morphometric quantification of the brain tumour size.

The purpose of our study was to assess the reliability of tumour volume estimation by FLI in the epi-illumination mode for the *in vivo* studies of molecules and interventions affecting gliomagenesis. Our experiments using orthotopically implanted glioma xenografts transfected with red-shifted fluorescent protein mKate2 as a reporter and inducibly expressing growth-suppressing cell surface protease dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV, CD26) (Busek et al., 2008) demonstrate the limitations of the method.

## Material and Methods

### Cell culture

Human glioma cell line U373MG (originally derived from WHO grade III glioma) was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were grown under standard cell culture conditions at 37 °C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich Chemie), under a humidified (> 90 %) atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>/95 % air.

### Generation of transfected glioma cells

U373MG cells inducibly expressing the full-length human DPP-IV (Tet-On Advanced Inducible Gene Expression System, Clontech, Mountain View, CA) were transfected with the pcDNA4 vector (Invitrogen, Paisley, UK) containing the full-length cDNA of mKate2 (Evrogen, Moscow, RU) using Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Stable clones were selected after 6–8 weeks in complete medium containing 400 µg/ml Zeocin (Invitrogen).

### Orthotopic xenotransplantation model

The experimental use of animals was approved by The Commission for Animal Welfare of the First Faculty of Medicine of Charles University in Prague and the Ministry of Education, Youth and Sports according to animal protection laws. Twenty adult male mice NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) weighing approximately 25 g were used in the experiment. All animals were anaesthetized prior to surgery with an intramuscular injection of Ketamine (100 mg/kg) and Xylazine (20 mg/kg). The operating area was depilated, disinfected and a 5 mm midsagittal incision was performed. The animal's head

was fitted into the mouse adapter of a stereotaxic device (Stoelting, Wood Dale, IL) and a 0.4 mm borehole was drilled in the skull at a position 1.2 mm anterior from the bregma, 2.5 mm sagittal from the middle line. The total volume of 6 µl of cell suspension (200 000 cells/µl in DMEM, Sigma-Aldrich Chemie) was injected with a Hamilton syringe.

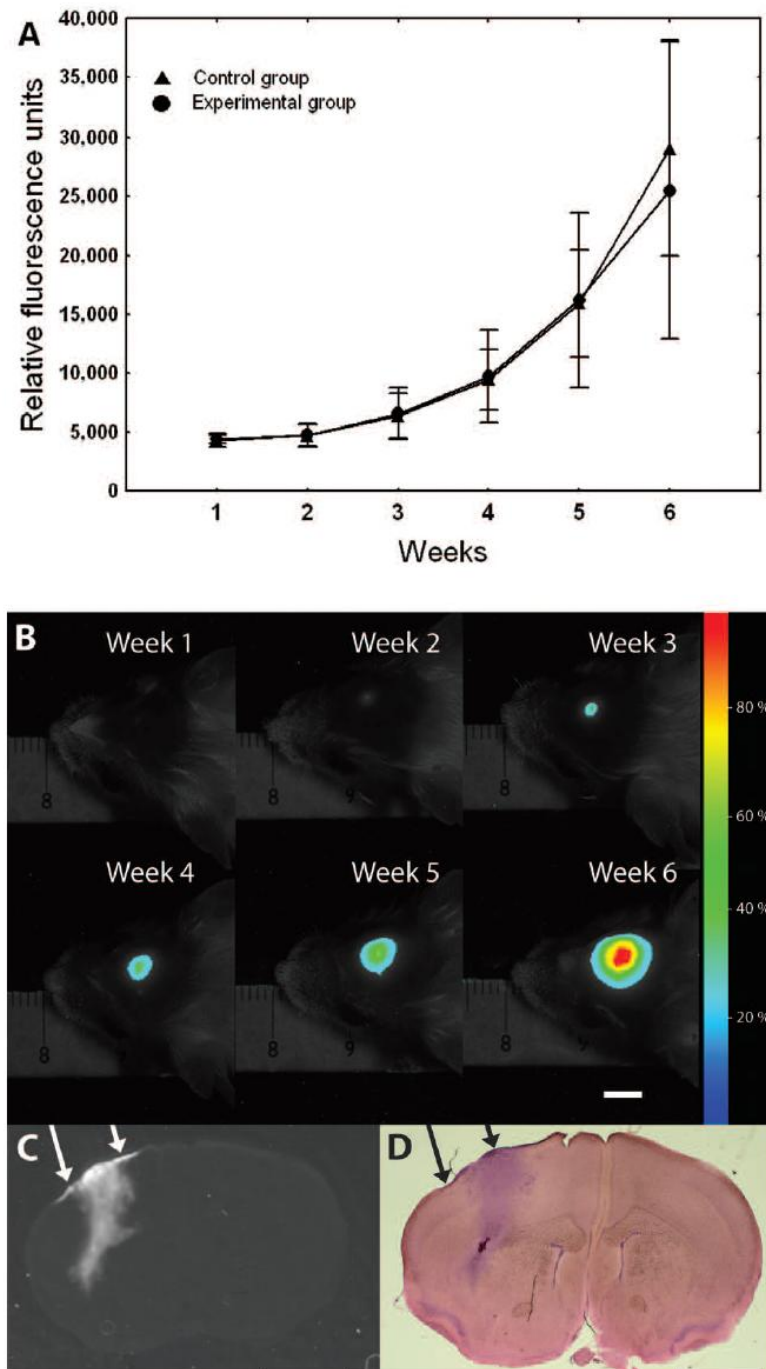
To limit the back flow along the needle track, the needle tip was initially sunk to a depth of 3.5 mm and then withdrawn 1 mm to a final depth of 2.5 mm. The injection time was set at 5 min. The needle was subsequently left in place for another 3 min after which it was slowly withdrawn. Immediately after removing the needle, the skull trephination was sealed with bone wax and the skin incision was closed with two surgical stitches. The animals were placed into heated cages until they awoke from anaesthesia. The experimental group of animals (N = 11) received doxycycline hyclate (Sigma-Aldrich Chemie) in drinking water (2 mg/ml) *ad libitum* during the 6-week period of tumour growth in order to induce DPP-IV expression in the xenografted glioma cells. The control group of animals (N = 9) received drinking water without doxycycline.

### Fluorescence imaging

For animal imaging, an iBox® Scientia Small Animal Imaging System (UVP, Upland, CA) coupled with a BioChemi HR 400 CCD camera (UVP) was used. The system in epi-illumination mode was equipped with a 150W halogen bulb and 533–587 nm excitation filter. A 607–682 nm emission filter was placed in front of the camera lens. The distance of the animal from the camera lens was 25 cm. All animals were scanned (exposure time 90 s) weekly during the 6-week period after implantation, all animal manipulations were done under anaesthesia; the scanned area was depilated prior to every imaging session. After the last imaging session, mice were sacrificed, the brain was removed from the skull within 5 min since the sacrifice and immediately placed into the imaging system at the identical position the live animal was previously scanned. In order to avoid oversaturation of the camera chip, the exposure time was reduced from 90 s to 10 s. Other settings of the system were the same as at the previous *in vivo* scanings. The brains were subsequently processed for morphometric determination of tumour volume as detailed below. Analysis of the scans was performed in the ImageJ software (National Institute of Health, USA). The means of fluorescence intensities of the arbitrary unit area were used for statistical evaluation.

### Morphometric quantification of tumour volume

Forty-three days after cell implantation, all animals were killed under deep anaesthesia, the brains were removed from the skull, embedded in Jung Tissue Freezing Medium (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) and frozen at a temperature of –70 °C. Serial frozen coronal sections 25 µm thick were cut using a cryotome (Bright Instruments, Huntingdon, UK) at a temperature



**Fig. 1.** Intracranial tumour growth assessed by *in vivo* epi-illumination fluorescence imaging and demonstration of tumour mass distribution in the brain section.

(A) Intravitaly measured fluorescence in the control ( $N = 9$ ) and experimental ( $N = 11$ ) group during the 6-week period after the orthotopic implantation of glioma U373MG cells expressing the mKate2 protein. Data presented as mean  $\pm$  S.D. (B) Scan of one representative animal. Exposure time, 90 s; scale bar, 5 mm. (C) Distribution of the tumour mass in the brain section visualized by fluorescence imaging and (D) by haematoxylin-eosin staining. The extracerebral portion of the tumour is indicated with arrows. Scale bars, 2 mm.

of  $-20^{\circ}\text{C}$ . Every fifth section was dyed with haematoxylin and eosin (Sigma-Aldrich Chemie) and digitized. Quantification of the tumour size was done using the Cavalieri's method for unbiased volume estimation (Mayhew and Olsen, 1991).

#### *Assessment of the relative attenuation of fluorescence signal in the brain tissue*

To assess the influence of the mass of surrounding brain tissue on the fluorescence signal detection, a fluorescent xenograft was simulated with a drop of  $5\ \mu\text{l}$  of Matrigel Matrix™ (BD Biosciences, Bedford, MA) containing  $10^6$  U373MG cells expressing mKate2 on the surface of a 3 mm thick coronal section of brain tissue. The gelatinous fluorescent bolus was scanned with a long exposure time (30 s) to achieve almost saturating pixel intensities. The scanning was subsequently performed with identical settings of the imaging system after covering the bolus with 1 mm thick brain tissue

sections. This procedure was repeated until the bolus was covered with a total of 3 mm of brain tissue.

## Results and Discussion

We observed an increasing fluorescence signal in both the control and experimental group over the six-week period after xenograft implantation (Fig. 1A, B). There was no statistically significant difference between the fluorescence intensities in the experimental group and the control group (Fig. 1A) at any time point during the study. In stark contrast with this, tumour volume determined morphometrically post mortem (week 6) was significantly different between the two groups (Fig. 2A). The *in vivo* fluorescence imaging data at week 6 showed no significant correlation ( $r = 0.26$ ;  $P = 0.26$ ;  $N = 20$ ) with the morphometrically determined tumour volumes (Fig. 3A).

In addition to the intracranial tumour mass, we observed extracerebral growth of the tumours through meninges into the adjacent bone in all animals (Fig. 1C, D).

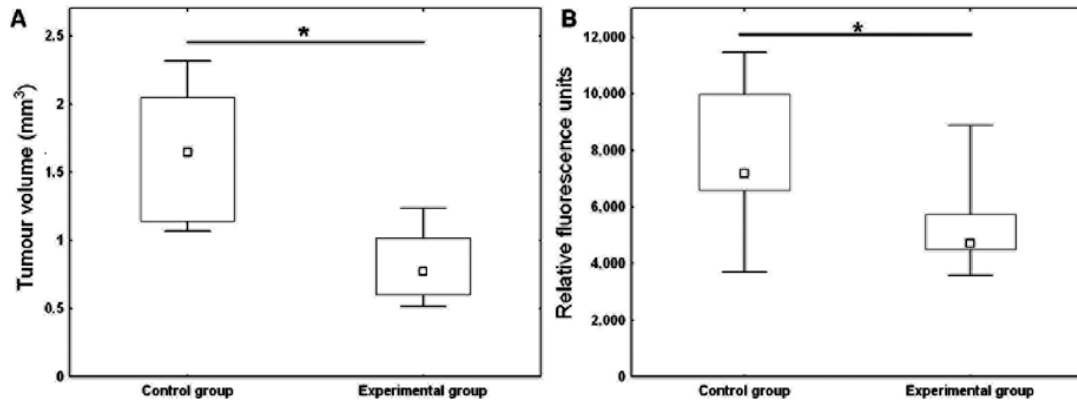


Fig. 2. Comparison of tumour size estimated morphometrically (A) and by the FLI in brains removed from the skull (B) at week 6.

Control group ( $N = 9$ ), experimental group ( $N = 11$ ). Squares: medians; boxes: middle 25–75 % of measured values; bars: minimal and maximal values; \*  $P < 0.05$ , Mann-Whitney U test.

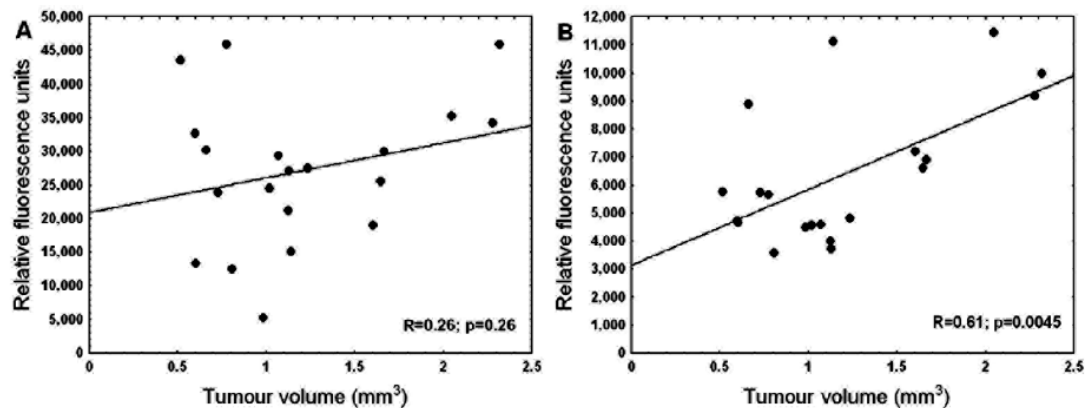


Fig. 3. Correlation of the morphometrically determined tumour volume and the corresponding fluorescence intensity measured *in vivo* (A) and in brains removed from the skull (B) at week 6. Spearman correlation,  $N = 20$ .

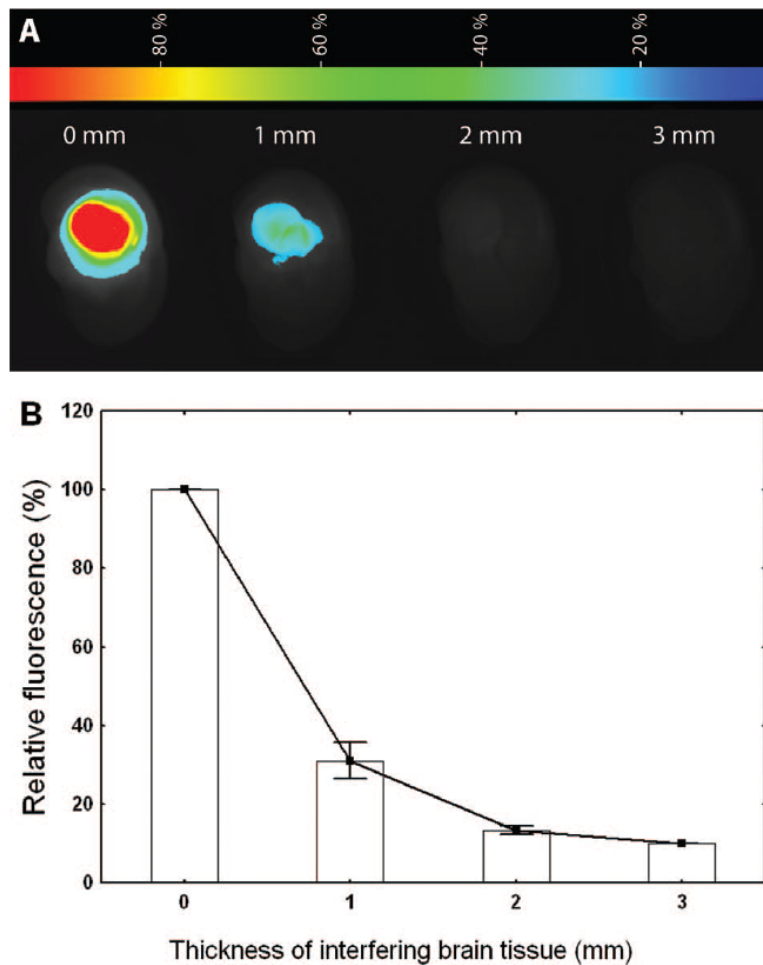


Fig. 4. Relative attenuation of the fluorescence signal by interfering brain tissue.

(A) Relative fluorescence of U373MG cells expressing the mKate2 protein, embedded in the Matrigel matrix, covered with brain tissue sections of the indicated thickness. (B) Relative attenuation of the fluorescence signal. Three independent experiments; data presented as mean  $\pm$  S.D.

Removal of the brains from the skull and thus elimination of the signal from the overlying bone infiltrated by glioma cells led to the improvement of the correlation between the fluorescence signal and the morphometric data ( $r = 0.61$ ;  $P = 0.0045$ ;  $N = 20$ ) (Fig. 3B). In addition, only the FLI data obtained from brains removed from the skull revealed the difference in tumour size between our two experimental groups (Fig. 2B).

In experiments simulating attenuation of the fluorescence signal in the brain tissue (see Material and Methods) the signal decreased by 65 % and 85 % when 1 mm and 2 mm of the brain tissue was superimposed over the fluorescent bolus (Fig. 4). Three mm of the superimposed brain tissue reduced the signal almost to the tissue autofluorescence values.

To the best of our knowledge, this is the first report that evaluates the use of macroscopic fluorescence imaging for the longitudinal monitoring of the growth of

orthotopic gliomas in a mouse model. Our findings suggest that the estimation of the tumour growth based on the intensity of the fluorescence signal is strongly influenced by the spatial distribution of the tumour mass as well as by significant attenuation of the fluorescence signal by the surrounding brain tissue. The variable extracranial portions of the tumour caused by the migration of glioma cells into the subarachnoid or subdural space and eventually the adjacent bone, as well as superficially located intracerebral tumour masses may be responsible for a substantial part of the *in vivo* detected fluorescence signal, although they represent only a small fraction of the whole tumour mass. In our model, this is the most likely cause of the low correlation of the FLI data collected from living animals with the post-sacrifice morphometric volume estimation.

Extracerebral growth of the xenotransplanted brain tumours represents a frequently occurring phenomenon



(Antunes et al., 2000; Jost et al. 2007; Yang et al., 2007; Barth and Kaur, 2009), which can be partially limited by a deeper injection of a smaller volume of the cell suspension. However, the light emitted from a more deeply implanted tumour is more attenuated and scattered by the surrounding tissue, which causes a loss of imaging resolution (Ntziachristos, 2006). Reduction of the number of implanted cells leads to a reduction in the emitted signal, which, due to the interference from the tissue autofluorescence, does not provide a sufficiently strong signal to enable detection (Troy et al., 2004) at least in the early phases of tumour growth.

Together, the fluorescence signal emitted by glioma cells reflected not only the tumour mass, but also its spatial distribution and did not correlate with the tumour volume determined morphometrically. Macroscopic planar FLI in an epi-illumination mode and a conventional source of excitation light therefore appears to be more suitable for semi-quantitative observations and superficially located tumours rather than for precise volume estimation of the xenografts located deep within the brain.

#### Acknowledgement

Acquisition of the iBox was supported by the League Against Cancer Prague.

#### References

- Antunes, L., Angioi-Duprez, K. S., Bracard, S. R., Klein-Monhoven, N. A., Le Faou, A. E., Duprez, A. M., Plénat, F. M. (2000) Analysis of tissue chimerism in nude mouse brain and abdominal xenograft models of human glioblastoma multiforme: what does it tell us about the models and about glioblastoma biology and therapy? *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 847-858.
- Barth, R. F., Kaur, B. (2009) Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J. Neurooncol.* **94**, 299-312.
- Busek, P., Stremenova, J., Sedo, A. (2008) Dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity bearing molecules in human brain tumors – good or evil? *Front. Biosci.* **13**, 2319-2326.
- Deliolanis, N. C., Kasmieh, R., Würdinger, T., Tannous, B. A., Shah, K., Ntziachristos, V. (2008) Performance of the red-shifted fluorescent proteins in deep tissue molecular imaging applications. *J. Biomed. Opt.* **13**, 044008.
- Dinca, E. B., Sarkaria, J. N., Schroeder, M. A., Carlson, B. L., Voicu, R., Gupta, N., Berger, M. S., James, C.D. (2007) Bioluminescence monitoring of intracranial glioblastoma xenograft: response to primary and salvage temozolomide therapy. *J. Neurosurg.* **107**, 610-616.
- Dong, Z., Radinsky, R., Fan, D., Tsan, R., Bucana, C. D., Wilmanns, C., Fidler, I. J. (1994) Organ-specific modulation of steady-state *mdr* gene expression and drug resistance in murine colon cancer models. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 913-920.
- Fidler, I. J., Wilmanns, C., Staroselsky, A., Radinsky, R., Dong, Z., Fan, D. (1994) Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment. *Cancer Metastasis Rev.* **13**, 209-222.
- Hashizume, R., Ozawa, T., Dinca, E. B., Banerjee, A., Prados, M. D., James, C. D., Gupta, N. (2010) A human brainstem glioma xenograft model enabled for bioluminescence imaging. *J. Neurooncol.* **96**, 151-159.
- Hoffman, R. M. (2008) A better fluorescent protein for whole-body imaging. *Trends Biotechnol.* **26**, 1-4.
- Jost, S. C., Wanebo, J. E., Song, S. K., Chicoine, M. R., Rich, K. M., Woolsey, T. A., Lewis, J. S., Mach, R. H., Xu, J., Garbow, J. R. (2007) *In vivo* imaging in a murine model of glioblastoma. *Neurosurgery* **60**, 360-370; discussion 370-371.
- Killion, J. J., Radinsky, R., Fidler, I. J. (1998) Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev.* **17**, 279-284.
- Kobayashi, N., Allen, N., Clendenon, N. R., Ko, L. W. (1980) An improved rat brain-tumor model. *J. Neurosurg.* **53**, 808-815.
- Mayhew, T. M., Olsen, D. R. (1991) Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. *J. Anat.* **178**, 133-144.
- Mook, O. R., Jonker, A., Strang, A. C., Veltien, A., Gambarota, G., Frederiks, W. M., Heerschap, A., Van Noorden, C. J. F. (2008) Noninvasive magnetic resonance imaging of the development of individual colon cancer tumors in rat liver. *BioTechniques* **44**, 529-535.
- Ntziachristos V. (2006) Fluorescence molecular imaging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **8**, 1-33.
- Shcherbo, D., Merzlyak, E. M., Chepurmykh, T. V., Fradkov, A. F., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Lukyanov, K. A., Bogdanova, E. A., Zaraisky, A. G., Lukyanov, S., Chudakov, D. M. (2007) Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat. Methods* **4**, 741-746.
- Shcherbo, D., Murphy, C. S., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Chepurmykh, T. V., Shcheglov, A. S., Verkhusha, V. V., Pletnev, V. Z., Hazelwood, K. L., Roche, P. M., Lukyanov, S., Zaraisky, A. G., Davidson, M. W., Chudakov, D. M. (2009) Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem. J.* **418**, 567-272.
- Szentirmai, O., Baker, C. H., Lin, N., Szucs, S., Takahashi, M., Kiryu, S., Kung, A. L., Mulligan, R.C., Carter, B. S. (2006) Noninvasive bioluminescence imaging of luciferase expressing intracranial U87 xenografts: Correlation with magnetic resonance imaging determined tumor volume and longitudinal use in assessing tumor growth and antiangiogenic treatment effect. *Neurosurgery* **58**, 365-372.
- Troy, T., Jekic-McMullen, D., Sambucetti, L., Rice, B. (2004) Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol. Imaging* **3**, 9-23.
- Tung, C. H., Zeng, Q., Shah, K., Kim, D. E., Schellingerhout, D., Weissleder, R. (2004) *In vivo* imaging of  $\beta$ -galactosidase activity using far red fluorescent switch. *Cancer Res.* **64**, 1579-1583.
- Yang, H., Chopp, M., Zhang, X., Jiang, F., Zhang, Z., Kalkanis, S., Schallert, T. (2007) Using behavioral measurement to assess tumor progression and functional outcome after antiangiogenic treatment in mouse glioma models. *Behav. Brain Res.* **182**, 42-50.

## **Příloha 2**



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biocel](http://www.elsevier.com/locate/biocel)



# Dipeptidyl peptidase-IV inhibits glioma cell growth independent of its enzymatic activity

Petr Busek<sup>a</sup>, Jarmila Stremenova<sup>a</sup>, Lucie Sromova<sup>a</sup>, Marek Hilser<sup>a</sup>, Eva Balaziova<sup>a</sup>, Dalibor Kosek<sup>a</sup>, Jana Trylcova<sup>a</sup>, Hynek Strnad<sup>b</sup>, Evzen Krepela<sup>a</sup>, Aleksí Sedo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague 12853, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Genomics and Bioinformatics, Institute of Molecular Genetics AS CR, Prague 14220, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 November 2011

Received in revised form 10 January 2012

Accepted 17 January 2012

Available online 28 January 2012

#### Keywords:

Protease

Tumor suppression

Primary cell cultures

Astrocytoma

### ABSTRACT

Malignant gliomas exhibit abnormal expression of proteolytic enzymes that may participate in the uncontrolled cell proliferation and aberrant interactions with the brain extracellular matrix. The multifunctional membrane bound serine aminopeptidase dipeptidyl peptidase (DPP)-IV has been linked to the development and progression of several malignancies, possibly both through the enzymatic and nonenzymatic mechanisms.

In this report we demonstrate the expression of DPP-IV and homologous proteases fibroblast activation protein, DPP8 and DPP9 in primary cell cultures derived from high-grade gliomas, and show that the DPP-IV-like enzymatic activity is negatively associated with their *in vitro* growth. More importantly, the DPP-IV positive subpopulation isolated from the primary cell cultures using immunomagnetic separation exhibited slower proliferation. Forced expression of the wild as well as the enzymatically inactive mutant DPP-IV in glioma cell lines resulted in their reduced growth, migration and adhesion *in vitro*, as well as suppressed glioma growth in an orthotopic xenotransplantation mouse model.

Microarray analysis of glioma cells with forced DPP-IV expression revealed differential expression of several candidate genes not linked to the tumor suppressive effects of DPP-IV in previous studies. Gene set enrichment analysis of the differentially expressed genes showed overrepresentation of gene ontology terms associated with cell proliferation, cell adhesion and migration.

In conclusion, our data show that DPP-IV may interfere with several aspects of the malignant phenotype of glioma cells in great part independent of its enzymatic activity.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Gliomas rank among the deadliest human malignancies. The median survival for the most common grade IV tumors (glioblastoma multiforme) is one year despite multimodality treatment with surgery, chemotherapy and radiotherapy (Wen and Kesari, 2008). Disease recurrence is almost a rule due to the uncontrolled proliferation of glioma cells that extensively infiltrate the

surrounding brain parenchyma. In addition to genetic alterations, deregulated expression of para- as well as autocrine mediators and their receptors (Hoelzinger et al., 2007), components of the extracellular matrix and proteolytic enzymes jointly contribute to the malignant phenotype of glioma cells (Rao, 2003; Louis et al., 2002; Levicar et al., 2003).

In our previous work, we detected dipeptidyl peptidase (DPP)-IV-like enzymatic activity in permanent glioma cell lines (Sedo et al., 2004) as well as in astrocytic tumors *in situ* (Stremenova et al., 2007). This enzymatic activity is an attribute of a limited number of proteases such as the canonical DPP-IV (CD26, EC 3.4.14.5) and homologous proteases fibroblast activation protein (FAP), DPP8 and DPP9 belonging to the MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) S9B subfamily (Sedo and Malik, 2001). The most thoroughly characterized of these molecules is DPP-IV, a multifunctional plasma membrane-bound serine dipeptidyl aminopeptidase. It is also found as a cleaved ectodomain in body fluids (Durinx et al., 2000) and is thought to proteolytically modify and thus fine tune the bioavailability and receptor binding of a large number of biologically active peptides in the pericellular space (Mentlein, 1999).

**Abbreviations:** DPP, dipeptidyl peptidase; FAP, fibroblast activation protein; SDF-1, stromal cell derived factor; SP, substance P; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FBS, fetal bovine serum; GFAP, glial fibrillary acidic protein; BSA, bovine serum albumin; MACS, magnetic cell sorting; bFGF, basic fibroblast growth factor.

\* Corresponding author at: Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Laboratory of Cancer Cell Biology, U Nemocnice 5, 128 53 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 224965748; fax: +420 224965826.

E-mail address: [aleksi@cesnet.cz](mailto:aleksi@cesnet.cz) (A. Sedo).

URL: <http://www.lf1.cuni.cz/lbnb> (A. Sedo).

In addition to the well-studied incretins (McIntosh, 2008), the DPP-IV substrates also include several poly- and oligopeptides strongly associated with the malignant behavior of glioma cells, such as the chemokine stromal cell-derived factor (CXCL12, SDF-1) and the neuropeptide substance P (SP) (Mentlein, 1999; Bajetto et al., 2006; Palma and Maggi, 2000). Furthermore, DPP-IV executes several of its functions by protein–protein interactions that are independent of its intrinsic enzymatic activity. The binding partners of DPP-IV include proteins of the extracellular matrix, CD45, caveolin-1, thrombospondin, adenosine deaminase and plasminogen (Ohnuma et al., 2008; Liu et al., 2009; Gonzalez-Gronow et al., 2008). We speculated that plasma membrane localized DPP-IV-like enzymatic activity as well as nonproteolytic protein–protein interactions of DPP-IV may represent an important mechanism regulating the growth properties of human glioma cells (Busek et al., 2004, 2008).

In the current study we explore the role of DPP-IV in gliomagenesis by using primary cell cultures derived from high-grade gliomas and glioma cell lines inducibly expressing DPP-IV. We show that the DPP-IV-like enzymatic activity in primary cell cultures is negatively associated with their *in vitro* growth and DPP-IV overexpressing glioma cells exhibit decreased proliferation *in vitro*. In addition, forced expression of both enzymatically active and enzymatically inactive DPP-IV suppressed glioma growth in an orthotopic xenotransplantation mouse model.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Glioma primary cell cultures and cell lines

Primary cell cultures were derived from tumor tissue samples collected from patients undergoing astrocytic tumor resection at the Department of Neurosurgery, Hospital Na Homolce in Prague, Czech Republic. The study was approved by the Institutional ethics committee and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki; all biopsy donors gave full informed consent. Each fresh tissue sample was sectioned into small pieces and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma, Czech Republic) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS, Sigma), 100 µg/mL Streptomycin (Sigma) and 100 U/mL Penicillin G (Sigma). After 5–7 days, the explants were removed and the medium was replaced with DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics. GFAP expression was detected with a variable intensity in the majority of primary cell cultures supporting their glial origin.

Human glioma cell lines U373, T98G and U87 were from ATCC (LGC Standards, Middlesex, UK) and were cultured under standard conditions in DMEM supplemented with 10% FBS.

The CD26 positive cell subpopulation was isolated using MACS (magnetic activated cell sorting) by incubating the cells with a mouse anti-CD26 antibody (clone M A261, Acris, Germany) and then Dynabeads pre-coated with anti-mouse IgG antibodies (Invitrogen, CA, USA). After isolation, the cells were expanded and subcultured before ascertaining their growth properties.

### 2.2. Construction of vectors with enzymatically inactive mutant DPP-IV

The catalytic Ser<sup>630</sup> of the full-length human DPP-IV inserted in the pGENE or pTRE-Tight vector was mutated to Ala by site-directed mutagenesis (Quik Change II, Agilent Technologies, Inc., CA, USA) using the following primers: forward 5'-GAATTGCAAT-TTGGGGCTGGGCATATGGAGGGTACCGTAACCTC-3' and reverse 5'-GAGGTTACGTACCCTCCATATGCCAGCCCCAAATTCGAATTC-3' (GeneriBioTech, Czech Republic).

The presence of the anticipated mutation was verified by DNA sequencing using automated DNA sequencer (ABI Prism 3100, Life Technologies Corporation, CA, USA).

### 2.3. Transfected cells

U373, T98G and U87 cells were transfected with DPP-IV using the mifepristone inducible Gene Switch system (Invitrogen), as described previously (Busek et al., 2006). Mifepristone (Invitrogen) in concentrations of 0.025–5 nmol/L was used to induce DPP-IV expression. In addition, a tetracycline inducible expression system (Clontech, CA, USA) was utilized. U373 cells were transfected with 4 µg of the regulatory pTet-On-Advanced plasmid and selected clones were co-transfected with the pTRE-Tight vector containing either the wild-type full-length human DPP-IV or the enzymatically inactive DPP-IV carrying an active site S630A substitution, and a linear Hygromycin marker (Clontech) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Stable transfected clones inducibly expressing DPP-IV were subsequently selected with 400 µg/mL G418 (Sigma) and 200 µg/mL Hygromycin B (Invitrogen).

### 2.4. DPP-IV-like enzymatic activity assay

The cell surface DPP-IV-like enzymatic activity was measured in suspensions of viable cells by a continuous-rate fluorimetric kinetic assay using a plasma membrane impermeable (Bank et al., 2011) H-Gly-Pro-7-amino-4-methylcoumarin (Bachem, Bubendorf, Switzerland) as a substrate at pH7.5 and 37°C; the total DPP-IV-like enzymatic activity was measured under the same conditions after permeabilization of the cells with 0.1% Triton X-100 (Sedo et al., 1989).

### 2.5. Characterization of the growth properties of glioma primary cell cultures

Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and counted every 2–3 days using a Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter, CA, USA). The population doubling time was determined from the least square regression fit of the exponential part of the growth curve. The clonogenic assay was performed by seeding cells at a density of 50 and 150 cells/cm<sup>2</sup> in triplicates and counting the colonies after 2–5 weeks.

### 2.6. Growth of DPP-IV transfected cells, co-culture experiments

Glioma cells were grown in the presence of various concentrations of the inducing agent mifepristone and in some experiments together with a DPP-IV inhibitor Diprotin A (Bachem; 5 mmol/L).

In co-culture experiments, 4000 cells/well of wild type cells, DPP-IV transfected cells or a mixture of 1:1 wild type:DPP-IV transfected U373 cells were seeded in 96-well plates. After 24 h, the medium was exchanged with or without the addition of mifepristone, and the cells were allowed to grow for additional 72 h.

For quantification, cells were fixed and stained with methylene blue (5 g/l in 50%, v/v, ethanol) at the indicated time points, lysed with 1% sodium dodecyl sulfate and the relative cell number was determined by reading absorbance at 630 nm using a 96-well plate reader (Sunrise; Tecan, Männedorf, Switzerland). In some experiments, the cells were counted using a Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter) to verify the results of colorimetric quantification.

### 2.7. Cell cycle analysis

Nuclear DNA in ethanol fixed cells was stained for 1 h with 50 µg/mL propidium iodide (Sigma) in PBS with 0.1% NaN<sub>3</sub> and 1 mg/mL bovine serum albumin (BSA; Sigma) in the presence of

1 mg/mL RNase A (Sigma). Samples were analyzed using the flow cytometer FACS Canto II with Diva software (Becton Dickinson) for data acquisition. Histograms were analyzed using the Dean-Jett-Fox model in Flow-Jo (TreeStar Inc., OR, USA).

## 2.8. Migration assay

$6 \times 10^4$  cells in DMEM were applied to the cell culture inserts with 8  $\mu$ m pores (Becton Dickinson) and allowed to migrate for 24 h. Nonmigrated cells were removed using a cotton swab; cells on the lower surface of the inserts were fixed with 5% glutaraldehyde in PBS and stained with methylene blue. Five microscopic fields per insert were counted manually.

## 2.9. Adhesion assay

Cell adhesion was assessed in BioCoat™ Fibronectin 96-well plates (Becton Dickinson).  $5 \times 10^4$  cells were added into the wells blocked with 0.1% BSA in DMEM for 15 min, and allowed to attach at 37 °C for the indicated times, after which the nonadherent cells were gently removed with three PBS washes. The adhered cells were fixed with 5% glutaraldehyde and stained with methylene blue. Colorimetric quantification was performed as described above.

## 2.10. Orthotopic xenograft glioma model

The experimental use of animals was approved by The Commission for Animal Welfare of the First Faculty of Medicine of the Charles University in Prague and The Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic according to the animal protection laws.

Male adult NOD.129S7(B6)-Rag1tm1Mom/J mice (The Jackson Laboratory, ME, USA) weighting approximately 25 g were used. All animals were anesthetized prior to surgery.  $10^6$  DPP-IV transfected U373 cells in 5  $\mu$ L of DMEM were injected with a Hamilton syringe

1.2 mm anterior from the bregma and 2.5 mm sagittal from the midline to a depth of 3 mm using a stereotactic device (Stoelting Co., IL, USA).

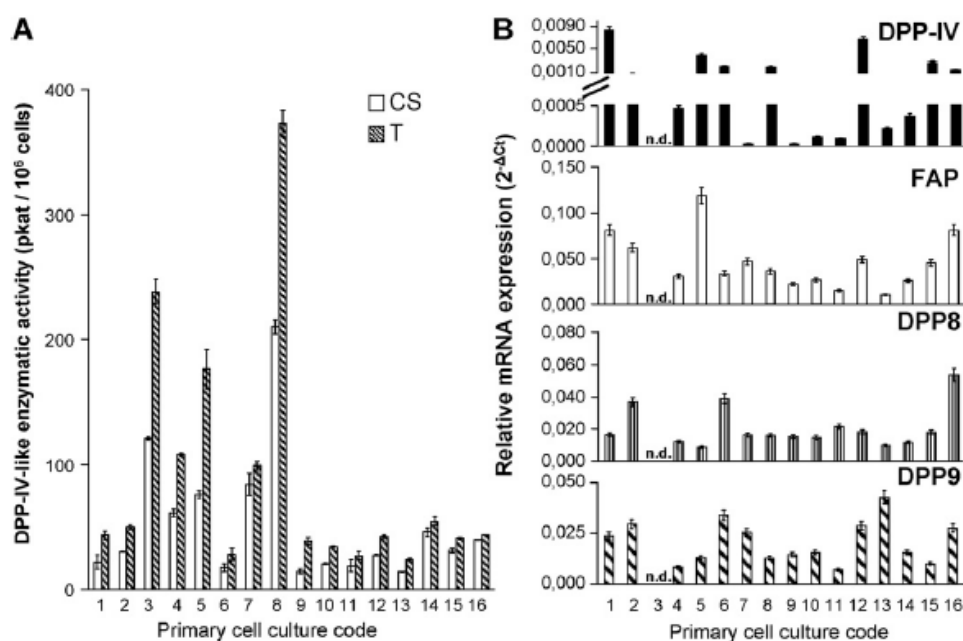
The expression of DPP-IV in the experimental group was initiated with the appropriate induction agent 1–3 days after cell implantation and maintained till the sacrifice of animals. Mifepristone in sesame oil (Sigma) was administered intraperitoneally at a dose of 270  $\mu$ g/kg (100  $\mu$ L total volume) three times a week; the control group received 100  $\mu$ L of the sesame oil alone at the same intervals. Doxycycline hyclate (Sigma) was administered in drinking water at a concentration of 2 mg/mL; the doxycycline solution was changed three times a week.

## 2.11. Tumor volume assessment

Serial 25  $\mu$ m thick coronal sections were cut on a cryostat at  $-20$  °C. Every fifth section was stained with hematoxylin and eosin and digitized at 20 $\times$  magnification. Photographs were used for unbiased tumor volume estimation according to the Cavalieri principle (Mayhew and Olsen, 1991).

## 2.12. Immunodetection of DPP-IV and GFAP

For flow cytometric detection of DPP-IV, cells were fixed in 2% paraformaldehyde, stained for 30 min at room temperature with a phycoerythrin conjugated monoclonal anti-CD26 antibody (clone 222113, 1:40, RD Systems, MN, USA); samples were analyzed using FACS Canto II as described above. For immunocytochemistry, cells were grown on glass coverslips, air-dried at 4 °C, blocked with 3% heat inactivated FBS and incubated overnight at 4 °C with the primary antibody (anti-CD26 [clone M A261, 1:100, Acris, Herford, Germany]; anti-GFAP [GF-01, 1:200, Exbio, Czech Republic]) and then for 1 h at room temperature with the corresponding Alexa Fluor 488 conjugated secondary antibody (Invitrogen). The primary antibodies were omitted in the staining control. Slides were mounted in Aqua Polymount (Polysciences, PA, USA) and viewed on



**Fig. 1.** Dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and homologous proteases in glioma primary cultures. (A) DPP-IV-like enzymatic activity and (B) expression of mRNAs encoding proteases known to exhibit the DPP-IV-like activity in primary cell cultures derived from high-grade gliomas. CS: cell surface; T: total DPP-IV-like enzymatic activity. The expression of the investigated mRNAs was normalized to the expression of human  $\beta$ -actin using the  $\Delta$ Ct method. n.d.: not determined; bar graphs depict mean  $\pm$  SD.

the Olympus IX 70 microscope equipped with the DP30BW camera or the Olympus IX81 confocal microscope (FluoView 300, Olympus, Czech Republic).

### 2.13. DPP-IV-like catalytic histochemistry

25  $\mu\text{m}$  brain sections were fixed in a 1:1 mixture of acetone and chloroform for 2 min at 4°C and incubated with 7-(glycyl-L-prolylamido)-4-methoxy- $\beta$ -naphthylamide hydrochloride (0.83 mmol/L, Sigma) as a substrate and Fast Blue B (Sigma) in PBS (pH 7.4) at room temperature for several minutes (Lojda, 1981).

### 2.14. Real time RT-PCR and microarray analysis (see supplementary methods)

The expression of DPP-IV, FAP, DPP8 and DPP9 was quantified as described previously (Stremenova et al., 2007; Busek et al., 2008).

For the microarray analysis, 0.75  $\mu\text{g}$  of the amplified RNA from control and induced (72 h, 1 nmol/L mifepristone) DPP-IV transfected U373 cells was hybridized on Illumina HumanRef-8 v3 Expression BeadChip (Illumina, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Wild type, untransfected U373 cells were processed identically to correct for the effects of the inducing agent itself. The data were deposited to the ArrayExpress database under the accession number E-MTAB-583.

Functional annotation and gene set enrichment analysis (GSEA) was performed on transcripts with Storey's  $q$ -value  $\leq 0.1$  using the DAVID database (Huang et al., 2009, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>).

### 2.15. Statistical analysis

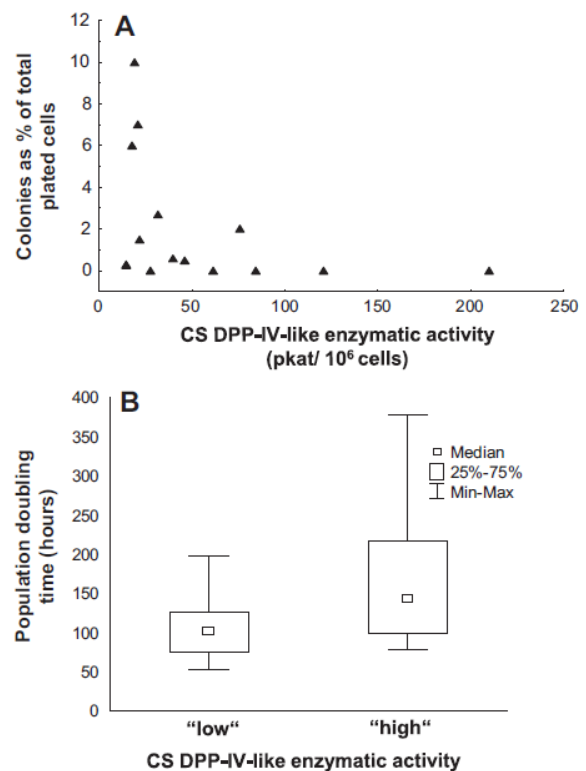
All statistical analyses were performed using the Statistica software (StatSoft CR s.r.o., Czech Republic) and a value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. DPP-IV-like enzymatic activity is associated with slower growth in glioma primary cell cultures

In order to study the function of DPP-IV in a model that closely resembles the heterogeneous cell populations present in gliomas *in vivo*, we examined the DPP-IV-like activity and growth properties of 16 primary cell cultures derived from high-grade gliomas. Primary cell cultures in early passage expressed DPP-IV mRNA as well as mRNAs encoding several proteases known to exhibit the DPP-IV-like enzymatic activity (Fig. 1B). Expression of the canonical DPP-IV was further confirmed using flow immunocytometry and immunocytochemistry (Supplementary Fig. 1). The cell surface DPP-IV-like enzymatic activity (Fig. 1A), probably representing the sum of enzymatic activities of the membrane bound DPP-IV and FAP, was variable and correlated rather poorly with the expression of the corresponding transcripts (DPP-IV mRNA  $r = 0.17$ , not significant ( $p = 0.55$ ), FAP mRNA  $r = 0.51$ ,  $p < 0.05$ ). mRNA expression of the intracellularly localized DPP8 and DPP9 did not correlate with the DPP-IV-like enzymatic activity.

There was a statistically significant negative correlation of the cell surface DPP-IV-like enzymatic activity and the ability to form colonies ( $r = -0.52$ ,  $p < 0.05$ ). In addition, there was a trend for an increase in the doubling time (median 102.5 vs. 143 h,  $p = 0.08$ , Mann-Whitney test) in primary cell cultures with high DPP-IV-like enzymatic activity (Fig. 2). We further isolated the DPP-IV expressing cells using immunomagnetic separation (MACS) from some of the primary cell cultures and assessed their growth properties. The



**Fig. 2.** Growth properties of primary cell cultures derived from high-grade gliomas in relation to their cell surface (CS) dipeptidyl peptidase (DPP)-IV-like enzymatic activity. (A) Negative correlation of the CS DPP-IV-like enzymatic activity and the ability to form colonies ( $r = -0.52$ ,  $p < 0.05$ , Spearman correlation coefficient). (B) A trend for shorter population doubling time of primary cell cultures with "low" CS DPP-IV-like enzymatic activity. An arbitrary threshold for categorizing the cells as having "low" (median = 19.8 pkat/10<sup>6</sup> cells,  $n = 8$ ) or "high" (median = 68.3 pkat/10<sup>6</sup> cells,  $n = 8$ ) CS DPP-IV-like enzymatic activity is based on the median CS DPP-IV-like enzymatic activity of all investigated primary cell cultures (30.3 pkat/10<sup>6</sup> cells).

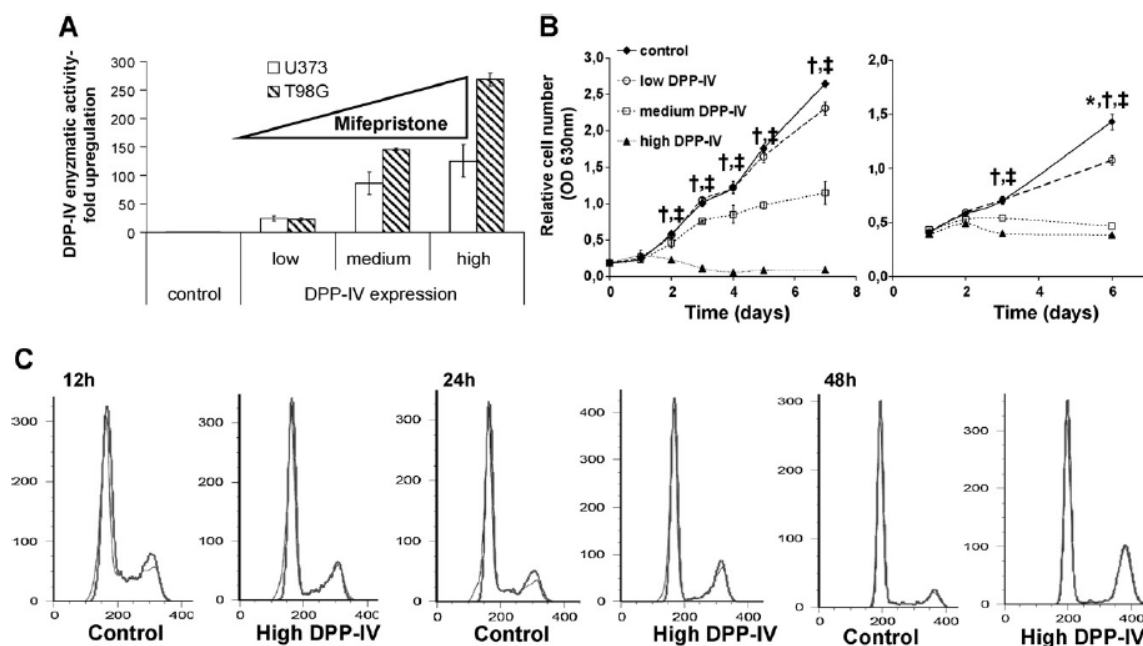
resulting DPP-IV positive subpopulation exhibited minimal *in vitro* growth or progressively lost the DPP-IV-like enzymatic activity (Supplementary Fig. 2). These results corroborate the association between DPP-IV and decreased growth of the primary cell cultures.

### 3.2. DPP-IV overexpression in glioma cells leads to decreased cell growth and a cell cycle block

The inherent heterogeneity of primary cell cultures together with the possible contribution of DPP-IV activity by multiple molecular species precluded a precise analysis in these cells of the effects of DPP-IV on glioma growth. We therefore utilized model glioma cell lines, which frequently exhibited low to undetectable endogenous DPP-IV, and transfected them with DPP-IV using a mifepristone inducible expression system. Transfected cells exhibited a concentration dependent increase of the DPP-IV enzymatic activity (Fig. 3A) that appeared within hours after the addition of the inducing agent mifepristone; DPP-IV expression was further confirmed by flow immunocytometry and immunocytochemistry (Supplementary Fig. 4A).

DPP-IV overexpression in glioma cells led to a decreased *in vitro* cell growth in different clones of T98G, U373 (Fig. 3B) and U87 cells (not shown).

In order to analyze the mechanisms of the growth inhibitory effect of DPP-IV, we performed the cell cycle analysis in DPP-IV



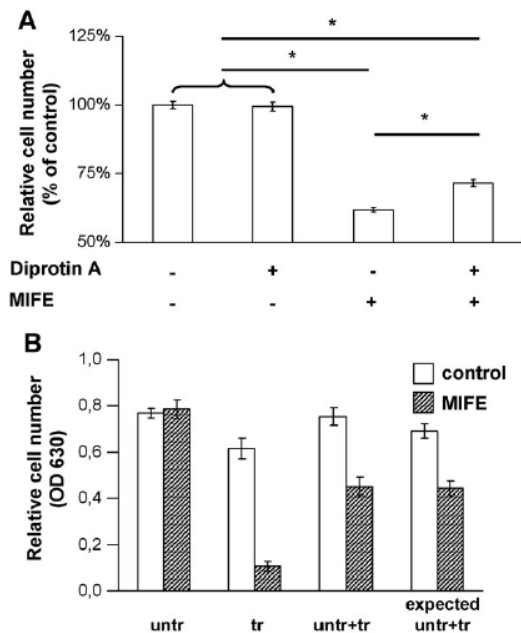
**Fig. 3.** Effect of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV on glioma cell growth and cell cycle. (A) Concentration dependent increase in DPP-IV enzymatic activity in transfected glioma cell lines. DPP-IV enzymatic activity was measured 48 h after the addition of increasing concentrations of the inducing agent mifepristone. Bar graphs depict mean  $\pm$  SD. (B) Growth curves of DPP-IV transfected U373 (left panel) and T98G (right panel) cells. DPP-IV expression was induced with various concentrations of mifepristone, cells were fixed and stained with methylene blue followed by colorimetric quantification.  $^{*}p < 0.05$  for control vs. low, medium and high DPP-IV expression respectively (repeated measurement ANOVA, Tukey *post hoc* test). (C) Flow cytometric analysis of the cell cycle in DPP-IV transfected U373 cells at various time points after the induction with mifepristone. Representative histograms (vertical axis – number of cells, horizontal axis – relative fluorescence intensity) of control cells and cells with induced DPP-IV expression are shown. Control: transfected cells not induced with mifepristone.

overexpressing cells. The proportion of the cells in the S phase declined early after DPP-IV induction and a G2/M block developed within 24–48 h (Fig. 3C). Apoptotic cell death did not significantly contribute to the growth inhibition as we did not observe a significant G0/G1 subpeak or an increase in annexin V staining (not shown). The changes were not due to the expression-inducing agent itself since mifepristone in concentrations up to 10 nmol/L had no effect on the growth or cell cycle in untransfected glioma cells (Fig. 4B and data not shown) and the concentrations used were much lower than those described to have pharmacological effects on glioma cells (Pinski et al., 1993).

We further aimed at elucidating, whether the effects of DPP-IV on glioma cells might be linked to an increased breakdown of putative soluble growth factor(s) and thus depend on its intrinsic enzymatic activity. Culturing the DPP-IV expressing cells in the presence of Diprotin A, an inhibitor that completely abrogated their DPP-IV enzymatic activity at the concentrations used, only mildly affected the growth decrease (Fig. 4A). We also observed no changes in the growth or the morphology of the wild type, untransfected cells when these were co-cultured with DPP-IV overexpressing cells using cell culture inserts (Supplementary Fig. 3). In addition, when wild type and transfected cells were seeded as a mixture at various ratios, which allowed direct interaction of the cells, the observed decline in cell numbers upon the addition of mifepristone corresponded to the decreased growth of transfected cells (Fig. 4B). Finally, expression of an enzymatically inactive mutant DPP-IV with catalytic site S630A substitution hampered the growth and induced a G2/M cell cycle arrest in U373 cells similarly to the wild type DPP-IV (data not shown). Collectively, these data suggest that the effect of DPP-IV on the growth of glioma cells *in vitro* is in large part independent of its enzymatic activity.

DPP-IV was described to interact with proteins of extracellular matrix such as collagen and fibronectin (Loster et al., 1995; Cheng et al., 2003) with possible effects on cell adhesion and migration. However, using cell adhesion and migration assays we observed decreased adhesion and spreading on fibronectin (Fig. 5A) as well as decreased migration (Fig. 5B) and collagen I induced haptotaxis (not shown) in glioma cells with high DPP-IV expression.

To identify potential functional partners and molecular mechanisms underlying the observed effects of DPP-IV in our model, we compared the whole genome expression profile in induced, DPP-IV overexpressing U373 cells and uninduced control cells. Gene set enrichment analysis performed on differentially expressed genes identified overrepresentation of genes linked to cell proliferation, cell adhesion, migration and regulation of cell development and neuron differentiation (Supplementary Tables 1–4). Transcripts for several growth factor receptors (e.g. PDGFRA, CALCRL, GRPR), proteins promoting cell cycle progression (e.g. CCND1, CDK6, PTP4A3) and involved in cell adhesion (CD97, COL8A1, COL13A1, NLGN1, NLGN4X, PCDH20, SCARF2, NrCAM) were downregulated (Supplementary Table 1). DPP-IV overexpression also led to the elevation of several putative or proven glioma associated tumor suppressors such as BEX2 (Foltz et al., 2006), RAPIGAP (Zheng et al., 2009), DUSP26 (Patterson et al., 2010), SYT13 (Jahn et al., 2010), TSPYL2 (Tu et al., 2007). On the contrary, several genes typically overexpressed in gliomas (e.g. CALCRL, COL8A1, HAS2, NES, RRM2; Cancer Genome Atlas Research Network, <http://cancergenome.nih.gov/>) were downregulated. Expression of DPP-IV in glioma cells *in vitro* thus reverses several changes in the expression profile typical of glioblastoma multiforme.



**Fig. 4.** Effect of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV-like enzymatic activity inhibition on the growth of DPP-IV overexpressing glioma cells. (A) Control uninduced U373 cells and cells induced with 1 nmol/L mifepristone (MIFE) to achieve medium overexpression of DPP-IV were cultured for 72 h in the presence or absence of 5 mmol/L DPP-IV inhibitor Diprotin A. Mean  $\pm$  SEM of 3 experiments performed in hexaplicates, \* $p < 0.05$ , ANOVA, Tukey *post hoc* test. (B) Co-culture of untransfected (untr) and DPP-IV transfected (tr) U373 cells. "untr+tr" – cell suspensions of "untr" and "tr" mixed 1:1. "expected untr+tr" – calculated based on the values in "untr" and "tr" without co-culture. 2.5 nmol/L mifepristone was added as indicated to induce DPP-IV expression in transfected cells; cells were grown for 72 h. Bar graphs depict mean  $\pm$  SD.

### 3.3. Forced DPP-IV expression reduces glioma growth in an orthotopic xenograft model

To test the effect of DPP-IV on tumor growth *in vivo*, transfected U373 cells inducibly expressing DPP-IV were orthotopically implanted into immunodeficient mice and DPP-IV expression was induced with mifepristone. DPP-IV induction *in situ* was confirmed by enzyme catalytic histochemistry (Fig. 6B) and immunohistochemistry (Supplementary Fig. 4C). Tumors developed in control mice as well as in animals with DPP-IV expressing cells and both exhibited features typical of high-grade gliomas, *i.e.* high cellularity and infiltrative growth with occasional necrotic areas (Supplementary Fig. 4D). The volume of tumors overexpressing DPP-IV was decreased by  $42 \pm 18\%$  (mean  $\pm$  SD;  $p < 0.05$ ;  $N = 16$  per experimental group) (Fig. 6A) compared to controls 5 weeks after implantation, accompanied by a statistically significant decrease of the Ki67 labeling index (median 23.1% vs. 18.5%,  $p < 0.05$ ; data not shown).

To verify these results we used the tetracycline inducible expression system for transgenic DPP-IV expression. Although this expression system achieved much lower DPP-IV expression compared to the mifepristone system (Supplementary Fig. 4A and B), thus reducing the putative risk of non-specific effects of protein overexpression, we observed similar decrease in the size of the implanted tumors. Importantly, identical results were also obtained with U373 cells transfected with an enzymatically inactive mutant DPP-IV (Fig. 6A).

Neither mifepristone nor doxycycline alone affected the size of tumors originating from untransfected U373 at the doses used for the induction of DPP-IV expression (not shown).

These data demonstrate that DPP-IV functions as an inhibitor of glioma cell growth *in vivo* and that these growth inhibitory effects are independent of its intrinsic enzymatic activity.

## 4. Discussion

Several proteases were shown to participate on the promotion of malignancies due to their involvement in the regulation of cell proliferation, invasion into surrounding tissue or support of neo-vascularization (Kessenbrock et al., 2010). This predominant view of tumor associated proteases as molecules that support tumor progression may however be oversimplified. Protease inhibitors have so far failed in halting tumor progression in clinical trials and several reports demonstrate that proteases may act as tumor suppressors (reviewed in Lopez-Otin and Matrisian, 2007). Abnormal expression of DPP-IV and its association with malignant transformation was demonstrated in a number of malignancies including brain tumors (Stremenova et al., 2007). DPP-IV-like enzymatic activity and DPP-IV expression are often increased in tumor tissue (Sedo et al., 2008), but the clinical implications and the biological effects of DPP-IV on transformed cells are diverse. On the one hand, DPP-IV expression is associated with a more malignant behavior in some T cell malignancies (Sato et al., 2005), thyroid cancer (Hirai et al., 1999), gastrointestinal stromal tumors (Yamaguchi et al., 2008), and has recently been described as a marker of a subpopulation of colorectal cancer stem cells responsible for the metastatic spread of the disease (Pang et al., 2010). On the other hand, DPP-IV was reported to act as a tumor suppressor in ovarian (Kajiyama et al., 2002), prostate (Wesley et al., 2005) as well as non-small cell lung cancer cells (Wesley et al., 2004) and also in the tumor cells derived from neuroectoderm such as melanoma (Wesley et al., 1999) and neuroblastoma (Arscott et al., 2009). The underlying mechanisms of these disparate effects on cancer cells are only scarcely understood and are likely dependent on the cell type and the molecular context within the tumor microenvironment. In neuroblastoma and prostate cancer cells, DPP-IV may proteolytically inactivate the growth promoting and prometastatic chemokine CXCL12 (SDF-1) (Arscott et al., 2009; Sun et al., 2008). However, in several experimental models (Wesley et al., 1999, 2004; Pethiyagoda et al., 2000) overexpression of a mutant, enzymatically inactive form of DPP-IV was shown to produce similar results to the enzymatically active DPP-IV suggesting that in addition to the inactivation of biologically active peptides, nonproteolytic mechanisms must contribute to its tumor suppressive effects. DPP-IV overexpression in cell lines frequently triggers profound changes in cell morphology, growth, migration or invasion (Yu et al., 2010), which may reflect the changed expression of adhesion molecules (*e.g.* E cadherin, Kajiyama et al., 2003), CD44 (Wesley et al., 2004), protease inhibitors (Kajiyama et al., 2003), altered expression and subcellular localization of bFGF (Wesley et al., 2005) or upregulation of the related protease FAP (Wesley et al., 1999, 2004).

We previously reported a grade dependent increase of the DPP-IV-like enzymatic activity in the human glioma tissue (Stremenova et al., 2007). In the present study we therefore aimed at determining the role of DPP-IV and its intrinsic enzymatic activity in the malignant behavior of glioma cells.

We observed varying cell surface DPP-IV-like enzymatic activity and DPP-IV expression on the mRNA as well as protein level in primary cell cultures derived from high-grade gliomas. Somewhat surprisingly, higher DPP-IV-like enzymatic activity was associated with slower proliferation of primary cell cultures at early passage. Although DPP-IV mRNA expression did not correlate with the DPP-IV-like enzymatic activity in the set of primary cell cultures at early passage that were used in this study, we later observed a modest



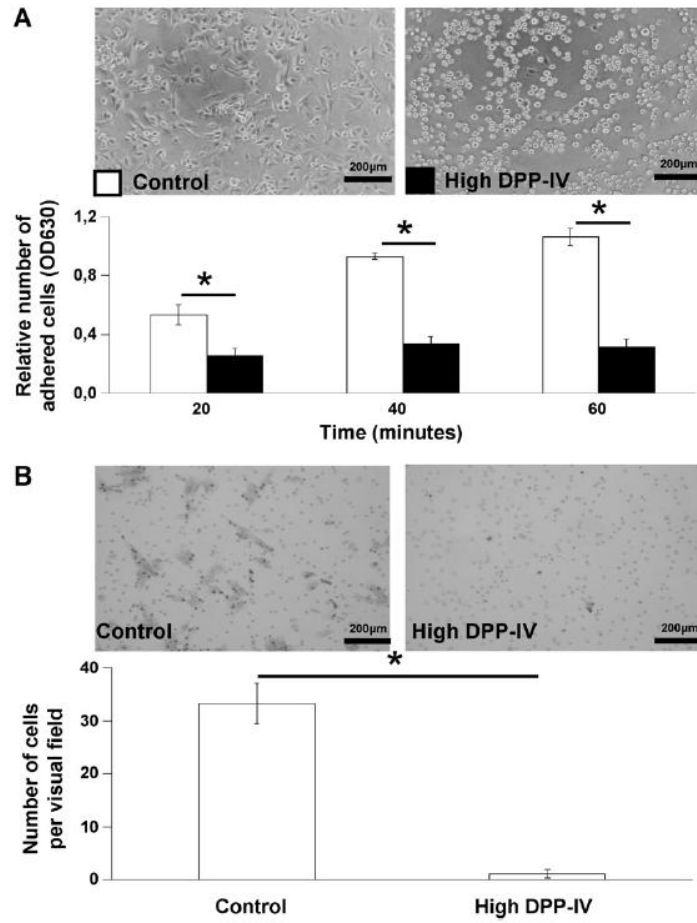


Fig. 5. Effect of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV on glioma cell adhesion and migration. (A) Cell adhesion was evaluated 20, 40 and 60 min after seeding the DPP-IV transfected U373 cells into fibronectin-coated wells. Insets – phase contrast microphotographs of cells that were allowed to attach for 180 min without washing. \* $p < 0.05$ , repeated measurement ANOVA. (B) Cell migration was evaluated by a modified Boyden chamber assay using tissue culture inserts with 8  $\mu\text{m}$  pores. The assay was performed in quadruplicates. Insets – representative microphotographs of the transmigrated cells. \* $p < 0.05$ , Mann–Whitney test; bar graphs depict mean  $\pm$  SD.

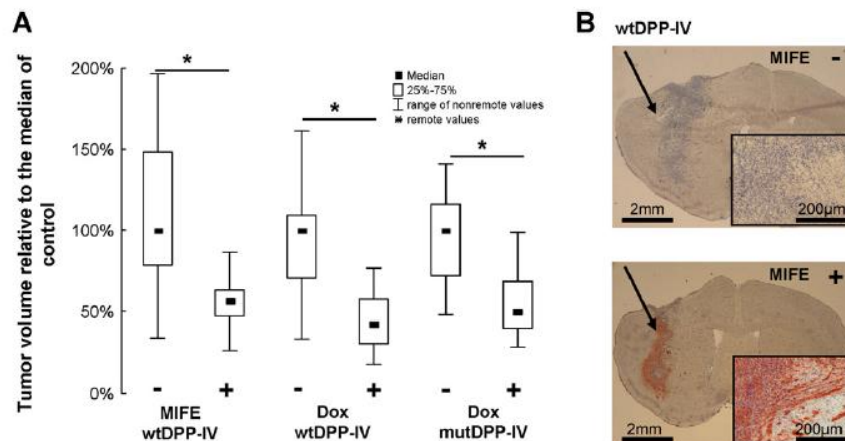


Fig. 6. Effect of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV on glioma growth *in vivo*. (A) Tumor volume in mice orthotopically implanted with U373 cells inducibly expressing enzymatically active (wtDPP-IV) or enzymatically inactive (mutDPP-IV) DPP-IV. DPP-IV expression was induced by mifepristone (MIFE) or doxycycline (Dox) as indicated. A total of 14–19 animals per experimental group were analyzed. (B) Representative microphotographs of control and DPP-IV expressing tumors (arrows) with the detection of the DPP-IV-like enzymatic activity by enzyme histochemistry (red); nuclei were counterstained with hematoxylin. \* $p < 0.05$ , Mann–Whitney test.

correlation ( $r=0.56$ ,  $p\leq 0.05$ ,  $n=47$ ) in a substantially extended panel of primary cultures (Balaziová et al., 2011). In addition to the canonical DPP-IV (CD26), the cell surface DPP-IV-like enzymatic activity may in part reflect the presence of FAP. FAP was detected on the surface of glioma cells by Mentlein et al. (2011) and is increased in 40–60% of patients with glioblastoma (Stremenova et al., 2007; Mentlein et al., 2011; Dolznig et al., 2005; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). So far, there are no data on the possible effects of FAP on glioma cell proliferation and a recent report by Mentlein et al. (2011) suggests that FAP may rather be involved in glioma cell invasion. There is one report suggesting that a minor fraction of the typically intracellularly localized DPP8 and DPP9 might also be loosely bound on the cell surface of immune cells under certain circumstances (Bank et al., 2011). However, the washing steps preceding the enzymatic assay in our studies and no correlation of the DPP8 and DPP9 mRNA expression with the DPP-IV-like enzymatic activity make their putative contribution less probable.

Importantly, the DPP-IV positive subpopulation isolated from our primary cell cultures using immunomagnetic separation showed decreased growth. The antiproliferative effect of CD26 binding, which was previously demonstrated for certain anti-CD26 antibodies in renal cell carcinoma and mesothelioma cells (Inamoto et al., 2006, 2007), cannot be completely ruled out. However, the higher proliferation of the CD26 negative subpopulation compared to the parental population before MACS indirectly argues that it is rather CD26 itself than the antibody binding that is responsible for the slower cell growth. In addition, we routinely use the respective anti CD26 antibody for the enrichment of CD26 transfected cells without significant effects on cell proliferation.

The observed negative association of DPP-IV and glioma cell growth is also consistent with our reports of DPP-IV upregulation in serum withdrawal-induced differentiation and growth arrest of glioma cells (Sedo et al., 2004; Balaziová et al., 2011).

To directly address the role of DPP-IV in glioma cells we transfected glioma cell lines with DPP-IV using an inducible expression system. Consistently with the primary cell culture data, we observed a diminished cell growth in cells expressing high levels of transgenic DPP-IV, which was associated with delayed progression of the cell cycle as suggested by the decreased proportion of cells in the S phase and a subsequently developing G2/M block. Similarly to the previous studies in lung cancer cell lines and melanoma (Wesley et al., 1999, 2004; Pethiyagoda et al., 2000), the effects of DPP-IV were largely independent of its intrinsic enzymatic activity as demonstrated using enzymatically inactive DPP-IV with an active site S630A substitution and coculture experiments. These results suggested that similarly to other cancer cell types (Arscott et al., 2009; Wesley et al., 1999, 2004, 2005), DPP-IV may function as a negative growth regulator also in glioma cells. We therefore tested the importance of DPP-IV for *in vivo* growth of glioma induced by orthotopic implantation of glioma cells into immunodeficient mice. Compared to the controls, tumor size was significantly reduced in animals with the overexpression of the transgenic DPP-IV in implanted cells. Similar results were obtained with two different expression systems with differing levels of the transgene expression and irrespective of the DPP-IV enzymatic activity. This further supports specific growth inhibitory effect of DPP-IV on glioma cells and its independence on the enzymatic activity.

The whole genome expression profiling of glioma cells overexpressing DPP-IV revealed alterations of several pathways critical for cell proliferation, as well as cell–cell and cell–extracellular matrix interactions. In addition, DPP-IV overexpression reverted the expression of a number genes typically overexpressed in gliomas. Somewhat surprisingly, DPP-IV overexpression was

also accompanied by the upregulation of a number of growth factors (e.g. BMP4, BDNF, FGF18, GPI, IL11, PDGFB, TGFB3), invasion promoting genes (MMP15) and genes that may support glioma cell survival (ACSL5; Mashima et al., 2009). These gene expression changes may indicate activation of compensatory mechanisms counteracting the observed growth inhibitory effects of DPP-IV. Functional validation and determining the biological relevance of these changes require further studies. To the best of our knowledge, this is the first study on the changes in the whole genome expression profile induced by DPP-IV in cancer cells.

The growth inhibitory effects of DPP-IV in glioma cells might seemingly be in contradiction to the observation of higher DPP-IV expression and activity in glioma tissue homogenates (Stremenova et al., 2007). The “net” pro- or anti-oncogenic effects of proteases seems to represent an outcome of several factors including their differing functions in individual cell populations of both the tumor parenchyma and stroma, and varying (in)dependence of these functions on the intrinsic enzymatic activity. For example, forced expression of MT1-MMP was described to cause glioma cell death, although its presence in the tumor microenvironment promoted tumor expansion (Markovic et al., 2009). Thus, DPP-IV may – independent of its enzymatic activity – negatively influence the proliferation of glioma cells, slowing their growth possibly as a part of an adaptive response to the limited nutrition supply or hypoxia (Dang et al., 2008), yet support angiogenesis or promote intratumoral deregulation of immune response through the proteolytic processing of neuropeptides and chemokines (Gherzi et al., 2001; Mentlein, 1999). By degrading the chemokines such as CXCL12 (SDF-1), DPP-IV might also impair the recruitment of tumor suppressive neural precursor cells (Chirasani et al., 2010; Charles et al., 2011) and as a result promote glioma progression. Understanding of the complex role and the molecular mechanisms by which DPP-IV participates on gliomagenesis would allow its rational therapeutic targeting with the advantage of the availability of several specific, clinically tested DPP-IV inhibitors that are used in patients with type 2 diabetes (Neumiller et al., 2010).

Taken together, in the present work we demonstrate a growth inhibitory effect of DPP-IV on glioma cells. We show for the first time that primary cell cultures derived from high-grade gliomas express several molecules with DPP-IV-like enzymatic activity, which is negatively associated with their proliferation. DPP-IV overexpression in glioma cell lines does not promote their malignant behavior but rather slows their growth and may decrease their migration and adhesion. Our data also indicate that nonproteolytic mechanisms are important for these effects of DPP-IV in glioma cells. The whole genome expression profiling of DPP-IV overexpressing glioma cells revealed several candidate genes that shed light on the molecular pathways potentially affected by DPP-IV and will serve as a lead for further functional studies.

## Acknowledgments

The cooperation of the clinical staff of the Departments of Neurosurgery and Pathology, Hospital Na Homolce in Prague is acknowledged, as well as the excellent technical assistance of Kvetoslava Vlasicova and Karin Roubickova. We are indebted to patients who contributed tissue samples for the derivation of the glioma primary cell cultures. We thank Jonathan Duke-Cohan (Harvard School of Medicine) for critical reading of the manuscript and useful suggestions. The work was supported by the grants of the Ministry of Education, Youth and Sports (MSMT 0021620808) and the Grant Agency of the Charles University in Prague (projects 257896, 251029, SVV-2011-262513).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.biocel.2012.01.011.

## References

- Arscott WT, LaBauve AE, May V, Wesley UV. Suppression of neuroblastoma growth by dipeptidyl peptidase IV: relevance of chemokine regulation and caspase activation. *Oncogene* 2009;28:479–91.
- Bajetto A, Barbieri F, Dorcaratto A, Barbero S, Daga A, Porcile C, et al. Expression of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. *Neurochem Int* 2006;49:423–32.
- Balaziova E, Busek P, Stremenova J, Sromova L, Krepela E, Litzcova L, et al. Coupled expression of dipeptidyl peptidase-IV and fibroblast activation protein- $\alpha$  in transformed astrocytic cells. *Mol Cell Biochem* 2011;354:283–9.
- Bank U, Heimbürg A, Wohlfarth A, Koch G, Nordhoff K, Julius H, et al. Outside or inside: role of the subcellular localization of DP4-like enzymes for substrate conversion and inhibitor effects. *Biol Chem* 2011;392:169–87.
- Busek P, Krepela E, Mares V, Vlasicova K, Sevcik J, Sedo A. Expression and function of dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cancer. *Adv Exp Med Biol* 2006;575:55–62.
- Busek P, Malik R, Sedo A. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:408–21.
- Busek P, Stremenova J, Krepela E, Sedo A. Modulation of substance P signaling by dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity in human glioma cell lines. *Physiol Res* 2008;57:443–9.
- Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia* 2011;59:1169–80.
- Cheng HC, Abdel-Ghany M, Pauli BU. A novel consensus motif in fibronectin mediates dipeptidyl peptidase IV adhesion and metastasis. *J Biol Chem* 2003;278:24600–7.
- Chirasani SR, Sternjak A, Wend P, Momma S, Campos B, Herrmann IM, et al. Bone morphogenetic protein-7 release from endogenous neural precursor cells suppresses the tumorigenicity of stem-like glioblastoma cells. *Brain* 2010;133:1961–72.
- Dang DT, Chun SY, Burkitt K, Abe M, Chen S, Havre P, et al. Hypoxia-inducible factor-1 target genes as indicators of tumor vessel response to vascular endothelial growth factor inhibition. *Cancer Res* 2008;68:1872–80.
- Dolz nigg H, Schweifer N, Puri C, Kraut N, Rettig WJ, Kerjaschki D, et al. Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immunol* 2005;5:10.
- Durinx C, Lambier AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers A, et al. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum – soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem* 2000;267:5608–13.
- Foltz G, Ryu GY, Yoon JG, Nelson T, Fahey J, Frakes A, et al. Genome-wide analysis of epigenetic silencing identifies BEX1 and BEX2 as candidate tumor suppressor genes in malignant glioma. *Cancer Res* 2006;66:6665–74.
- Gherzi G, Chen W, Lee EW, Zukowska Z. Critical role of dipeptidyl peptidase IV in neuropeptide Y-mediated endothelial cell migration in response to wounding. *Peptides* 2001;22:453–8.
- Gonzalez-Gronow M, Kaczowka S, Gawdi G, Pizzo SV. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) is a cell-surface plasminogen receptor. *Front Biosci* 2008;13:1610–8.
- Hirai K, Kotani T, Aratake Y, Ohtaki S, Kuma K. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) staining predicts distant metastasis of 'benign' thyroid tumor. *Pathol Int* 1999;49:264–5.
- Hoelzinger DB, Demuth T, Berens ME. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1583–93.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44–57.
- Inamoto T, Yamada T, Ohnuma K, Kina S, Takahashi N, Yamochi T, et al. Humanized anti-CD26 monoclonal antibodies as a treatment for malignant mesothelioma tumors. *Clin Cancer Res* 2007;13:4191–200.
- Inamoto T, Yamochi T, Ohnuma K, Iwata S, Kina S, Inamoto S, et al. Anti-CD26 monoclonal antibody-mediated G1-S arrest of human renal clear cell carcinoma Caki-2 is associated with retinoblastoma substrate dephosphorylation, cyclin-dependent kinase 2 reduction, p27(kip1) enhancement, and disruption of binding to the extracellular matrix. *Clin Cancer Res* 2006;12:3470–7.
- Jahn JE, Best DH, Coleman WB. Exogenous expression of synaptotagmin XIII suppresses the neoplastic phenotype of a rat liver tumor cell line through molecular pathways related to mesenchymal to epithelial transition. *Exp Mol Pathol* 2010;89:209–16.
- Kajiyama H, Kikkawa F, Khin E, Shibata K, Ino K, Mizutani S. Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 2003;63:2278–83.
- Kajiyama H, Kikkawa F, Suzuki T, Shibata K, Ino K, Mizutani S. Prolonged survival and decreased invasive activity attributable to dipeptidyl peptidase IV overexpression in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:2753–7.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010;141:52–67.
- Levicar N, Nuttall RK, Lah TT. Proteases in brain tumour progression. *Acta Neurochir* 2003;145:825–38.
- Liu Z, Christensson M, Forslow A, De Meester I, Sundqvist KG. A CD26-controlled cell surface cascade for regulation of T cell motility and chemokine signals. *J Immunol* 2009;183:3616–24.
- Lojda Z. Proteinases in pathology. Usefulness of histochemical methods. *J Histochem Cytochem* 1981;29:481–93.
- Lopez-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2007;7:800–8.
- Loster K, Zeilinger K, Schuppan D, Reutter W. The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217:341–8.
- Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG. Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell* 2002;1:125–8.
- Markovic DS, Vinnakota K, Chirasani S, Synowitz M, Raguet H, Stock K, et al. Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:12530–5.
- Mashima T, Sato S, Sugimoto Y, Tsuruo T, Seimiya H. Promotion of glioma cell survival by acyl-CoA synthetase 5 under extracellular acidosis conditions. *Oncogene* 2009;28:9–19.
- Mayhew TM, Olsen DR. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. *J Anat* 1991;178:133–44.
- McIntosh CH. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors and diabetes therapy. *Front Biosci* 2008;13:1753–73.
- Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Peptides* 1999;85:9–24.
- Mentlein R, Hattermann K, Hemion C, Jungbluth A, Held-Feindt J. Expression and role of the cell surface protease seprase/fibroblast activation protein-alpha (FAP-alpha) in astroglial tumors. *Biol Chem* 2011;392:199–207.
- Neumiller JJ, Wood L, Campbell RK. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 2010;30:463–84.
- Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Front Biosci* 2008;13:2299–310.
- Palma C, Maggi CA. The role of tachykinins via NK1 receptors in progression of human gliomas. *Life Sci* 2000;67:985–1001.
- Pang R, Law WL, Chu AC, Poon JT, Lam CS, Chow AK, et al. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell* 2010;6:603–15.
- Patterson KI, Brummer T, Daly RJ, O'Brien PM. DUSP26 negatively affects the proliferation of epithelial cells, an effect not mediated by dephosphorylation of MAPKs. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:1003–12.
- Pethiyagoda CL, Welch DR, Fleming TP. Dipeptidyl peptidase IV (DPP/IV) inhibits cellular invasion of melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:391–400.
- Pinski J, Halmos G, Shirahige Y, Wittliff JL, Schally AV. Inhibition of growth of the human malignant glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1388–92.
- Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 2003;3:489–501.
- Sato T, Yamochi T, Yamochi T, Aytac U, Ohnuma K, McKee KS, et al. CD26 regulates p38 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of integrin beta1, adhesion to extracellular matrix, and tumorigenicity of T-anaaplastic large cell lymphoma Karpas 299. *Cancer Res* 2005;65:6950–6.
- Sedo A, Busek P, Scholzova E, Malik R, Vlasicova K, Janackova S, et al. 'Dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologs' (DASH) in growth-modulated glioma cell lines. *Biol Chem* 2004;385:557–9.
- Sedo A, Krepela E, Kasafirek E. A kinetic fluorometric assay of dipeptidyl peptidase IV in viable human blood mononuclear cells. *Biochimie* 1989;71:757–61.
- Sedo A, Malik R. Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? *Biochim Biophys Acta* 2001;1550:107–16.
- Sedo A, Stremenova J, Busek P, Duke-Cohan JS. Dipeptidyl peptidase-IV and related molecules: markers of malignancy? *Exp Opin Med Diagn* 2008;2:677–89.
- 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;31:785–92.
- Sun YX, Pedersen EA, Shiozawa Y, Havens AM, Jung Y, Wang J, et al. CD26/dipeptidyl peptidase IV regulates prostate cancer metastasis by degrading SDF-1/CXCL12. *Clin Exp Metastasis* 2008;25:765–76.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008;455:1061–8.
- Tu Y, Wu W, Wu T, Cao Z, Wilkins R, Toh BH, et al. Antiproliferative autoantigen CDA1 transcriptionally up-regulates p21(Waf1/Cip1) by activating p53 and MEK/ERK1/2 MAPK pathways. *J Biol Chem* 2007;282:11722–31.
- Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008;359:492–507.
- 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;190:311–22.
- Wesley UV, McGroarty M, Homoyouni A. Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway. *Cancer Res* 2005;65:1325–34.

- 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;109:855–66.
- Yamaguchi U, Nakayama R, Honda K, Ichikawa H, Hasegawa T, Shitashige M, et al. Distinct gene expression-defined classes of gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2008;26:4100–8.
- Yu DM, Yao TW, Chowdhury S, Nadvi NA, Osborne B, Church WB, et al. The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology. *FEBS J* 2010;277:1126–44.
- Zheng H, Gao L, Feng Y, Yuan L, Zhao H, Cornelius LA. Down-regulation of Rap1GAP via promoter hypermethylation promotes melanoma cell proliferation, survival, and migration. *Cancer Res* 2009;69:449–57.

## **Příloha 3**

## Expression of dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologs in human meningiomas

JARMILA STREMENOVA<sup>1</sup>, VLADISLAV MARES<sup>1</sup>, VERA LISÁ<sup>1</sup>, MAREK HILSER<sup>1</sup>, EVZEN KREPELA<sup>1</sup>, ZDISLAVA VANICKOVÁ<sup>1</sup>, MARTIN SYRUCEK<sup>2</sup>, OLDRICH SOULA<sup>3</sup> and ALEKSI SEDO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Joint Laboratory of Cancer Cell Biology of the Institute of Biochemistry and Experimental Oncology of the 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague and the Institute of Physiology of Academy of Sciences of Czech Republic; Departments of <sup>2</sup>Pathology and <sup>3</sup>Neurosurgery, Hospital Na Homolce, Prague, Czech Republic

Received September 16, 2009; Accepted November 13, 2009

DOI: 10.3892/ijo\_00000506

**Abstract.** Meningiomas are tumors derived from arachnoid cap cells that represent ~30% of all intracranial tumors. In this study, we investigated 22 human meningiomas for the expression of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV activity and/or structure homologs (DASH), including canonical DPP-IV/CD26, fibroblast activation protein- $\alpha$  (FAP $\alpha$ ), DPP8 and DPP9. DPP-IV-like enzymatic activity, including all enzymatically-active DASH molecules, was found in all 18 benign meningiomas WHO grade I and IV atypical meningiomas WHO grade II by continuous rate fluorimetric assay in tissue homogenates and catalytic enzyme histochemistry *in situ*. In atypical meningiomas, this activity was significantly higher and was associated with higher cell proliferation as detected by Ki67 antigen immunohistochemistry. The expression of DPP-IV/CD26 and FAP $\alpha$  demonstrated by real-time RT-PCR and immunohistochemistry was low. As shown histochemically, it occurred most often on the surface of fibrous bundles and whorls rich in extracellular matrix. Compared to DPP-IV/CD26 and FAP $\alpha$ , the expression of DPP8 and DPP9 was higher and, in addition, it was present also in the cells inside these structures. Expression of CXCR4, the receptor of pro-proliferative chemokine stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ), DPP-IV substrate, was found in all tumors, suggesting higher values in atypical grade II samples. This is the first report on the expression status of dipeptidyl peptidase-IV and related molecules in meningiomas. It shows that DPP8 and DPP9 prevail over canonical DPP-IV/CD26 and FAP $\alpha$  in all examined patients. In addition, the study suggests an increase of DPP-IV-like enzymatic activity in these tumors of WHO grade II.

### Introduction

Meningiomas are the most common non-glial brain tumors originating from arachnoid cap cells of the brain and spinal cord leptomeninges. They account for ~30% of all intracranial human tumors and are more common in older age and females. Among the wide variety of histological subtypes, meningothelial, fibrous and transitional meningiomas prevail. They are mostly benign WHO grade I or, more rarely, atypical WHO grade II or, exceptionally, most aggressive anaplastic WHO grade III tumors. Typical phenotypic markers of meningiomas are epithelial membrane antigen (EMA, MUC1), protein S-100, vimentin and cytokeratin although their expression has not been explicitly related to tumor malignancy (reviewed in refs. 1 and 2). Similarly to other neoplasms, growth of these tumors is influenced by several peptidases, such as matrix-metalloproteinases (3), cysteine proteinases, e.g. cathepsins (4) and/or serine proteases, e.g. urokinase-/tissue-plasminogen activators (5,6), acting via cleavage of extra-cellular matrix proteins, which enhance migration and invasiveness of the tumor cells. Other peptidases, e.g. dipeptidyl peptidases, may, similarly to other tumor types, influence invasiveness and proliferation of the tumor cells via cleavage of a wide array of paracrine regulatory peptides and cytokines (7,8).

Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV/CD26, EC 3.4.14.5) is a serine protease identical with the lymphocyte differentiation antigen CD26 (9). It specifically splits off N-terminal dipeptides from peptide and protein substrates with the proline or alanine residues at the penultimate position (10,11). Molecules displaying DPP-IV-like enzymatic activity and/or structural similarity to the canonical DPP-IV/CD26 have been grouped to a family of 'dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologs' (DASH) (12). The DASH group comprises enzymatically active members, including seprase fibroblast activation protein- $\alpha$  (FAP $\alpha$ ), DPP-II/DPP7/ quiescent cell proline dipeptidase, DPP8, DPP9 and the enzymatically inactive members, such as DPP6 and DPP10.

Enzymatic activity of DASH molecules can modify signaling functions of a number of biological mediators, such as incretins (e.g. glucagone-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide), neuropeptides (e.g. substance P and

---

*Correspondence to:* Dr Aleksí Sedo, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, U Nemocnice 5, 128 53, Prague 2, Czech Republic  
E-mail: aleksi@cesnet.cz

**Key words:** meningioma, dipeptidyl peptidase, DASH, CXCR4

Table I. Primers and TaqMan probes used for the real-time RT-PCR quantitation of expression of the investigated transcripts.

Transcript	GeneBank accession no.	Sequences and final concentration of primers and TaqMan probes	
DPP-IV	NM_001935	Forward:	5'-TGGAAGGTTCTTCTGGGACTG-3', 200 nmol/l Reverse: 5'-GATAGAATGTCCAAACTCATCAAATGT-3', 200 nmol/l TaqMan probe: 5'-(6-FAM)CACCGTGCCCGTGGTTCTGCT(TAMRA)-3', 200 nmol/l
FAP $\alpha$	NM_004460	Forward:	5'-TGCCACCTCTGCTGTGC-3', 200 nmol/l Reverse: 5'-GAAGCATTACACTTTTCATGGT-3', 200 nmol/l TaqMan probe: 5'-(6-FAM)TGCAATTGCTTACGCCCTCAAGAGTTC (TAMRA)-3', 200 nmol/l
DPP8	NM_130434 <sup>a</sup> NM_197960 <sup>b</sup>	Forward:	5'-CCTGTCACCGAGGGCTTAA-3', 400 nM Reverse: 5'-AACCCTGAAGATATCTGACCTCTG-3', 400 nM TaqMan probe: 5'-(6-FAM)CAGGTGGAAGGACTCCAATATCTAGCTTCTCG (TAMRA)-3', 200 nM
DPP9	NM_139159	Forward:	5'-GGTGGAGATCGAGGACCAG-3', 400 nM Reverse: 5'-TGGCCACCTTGAACACCT-3', 400 nM TaqMan probe: 5'-(6-FAM)AAGCCATACTTCTCGGCCACGAACTG (TAMRA)-3', 200 nM
CXCR4	NM_001008540	Forward:	5'-CATGGGTTACCAGAAGAACTGA-3', 400 nmol/l Reverse: 5'-GACTGCCTTGCATAGGAAGTTC-3', 400 nmol/l TaqMan probe: 5'-(6-FAM)CACCTGTCAGTGGCCGACCTCCT (TAMRA)-3', 200 nmol/l
$\beta$ -actin	NM_001101	Forward:	5'-CTGGCACCCAGCACAAATG-3', 200 nmol/l Reverse: 5'-GGGCCGACTCGTCATAC-3', 200 nmol/l TaqMan probe: 5'-(VIC)AGCCGCCGATCCACACGGAGT (TAMRA)-3', 200 nmol/l

<sup>a</sup>Transcript variant 1; <sup>b</sup>Transcript variant 3.

neuropeptide Y) and chemokines, e.g. eotaxin and stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ). Their cleavage can lead to their inactivation or changes their receptor-binding preference resulting in different functional effects. Therefore, DASH may exhibit multiple, although not yet enough elucidated functions controlling tumor growth as well as other pathophysiological processes (8).

The present study is the first analysis of the expression pattern of DASH molecules in human meningiomas. Additionally, since SDF-1 $\alpha$  is a substrate of DPP-IV-like enzymatic activity and has a pro-proliferative effect on meningeothelial cells *in vitro* (13), expression of its receptor CXCR4 was determined in meningiomas *in situ*.

## Materials and methods

*Patients, sample preparation and histological characterization.* Tumor specimens were collected from 22 patients (20 female and 2 male) undergoing brain tumor resection (18 benign meningiomas and 4 atypical meningiomas) at the Department of Neurosurgery, Hospital Na Homolce, Prague. Written informed consent was obtained from all patients entering this study, according to the guidelines of the Institutional Ethics Committee. Tissue samples, clear of macroscopic vessels and necrotic segments having the fresh wet weight of ~80-150 mg,

were frozen on solid CO<sub>2</sub> and were stored at -80°C. Vascularisation and necrotic areas were scored microscopically on a 4-tiered scale (0 to 3 crosses).

*Isolation and quantification of total RNA, real-time RT-PCR.* Total RNA was isolated using the TRIzol Reagent (Invitrogen, UK). The concentration of total RNA was determined using the RiboGreen RNA Quantitation Kit (Molecular Probes, USA). The expression of DPP-IV, FAP $\alpha$ , CXCR4, DPP8 (variants 1 and 3) and DPP9 mRNAs (target transcripts) and  $\beta$ -actin mRNA (internal reference transcript) was quantified by a coupled real-time RT-PCR assay on the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) as described previously (14). The gene coding region-specific oligonucleotide primers and fluorogenic TaqMan probes for the coupled real-time RT-PCR assay were designed with the program Primer Express (Applied Biosystems) and were synthesized at Proligo (France) and Applied Biosystems (UK), respectively (Table I).

The statistical difference of the  $\beta$ -actin mRNA-normalized target transcript expression in tumor and normal tissues was calculated from the linearized  $\Delta$ CT data (i.e. 2<sup>- $\Delta$ CT</sup>) and the tumor/normal ratio of the  $\beta$ -actin mRNA-normalized target transcript expression was calculated by means of the 2<sup>- $\Delta$ CT</sup> method (15).

Table II. Characterization of the experimental cohort.

Diagnosis	Gender female/male	Age	p53	Ki67	Vascularisation	Necrosis
<b>Meningiomas WHO grade I</b>						
Transitional	10/0	55 (36-66)	27.2% (0-75%)	3.0% (1-5%)	0.15 (0-1)	0
Fibrous	3/0	54 (47-64)	8.7% (0-25%)	1.7% (1-2%)	0	0.33 (0-1)
Angiomatous	1/1	49 (46-52)	23.5% (2-45%)	3% (1-5%)	1.75 (1.5-2)	0
Microcystic	1/0	59	40%	5%	0	0
Meningothelial	1/0	79	30%	2%	1	0
Psammomatous	1/0	78	0%	1%	0	0
<b>Meningiomas WHO grade II</b>						
Atypical	3/1	51 (37-71)	33.8% (5-80%)	7.8% (3-12%)	0.75 (0-1)	0.25 (0-1)

Values are presented as the mean; the ranges of values are shown in the brackets. Vascularisation and necrosis were scored on a 4-tiered scale (0 to 3 crosses).

**DPP-IV-like enzymatic activity biochemical assay and total protein determination.** Tissue samples were homogenized in ice-cold 25 mM phosphate-buffered saline (PBS, 2.0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 22.4 mM NaCl) pH 6.0, with an Ultra-Turrax homogenizer fitted with a S8N-5G probe (IKA, Germany) and the tissue homogenates were used for the enzyme activity assay immediately.

The DPP-IV-like and DPP-II-like enzymatic activities were determined by continuous rate fluorimetric assay at 37°C in PBS buffer (137 mM NaCl, 4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, and 0.1 M citric acid/0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer, pH 5.5, respectively, and with 50 µmol/l of H-7-(glycyl-L-prolyl-amido)-4-methylcoumarin (Gly-Pro-AMC) and 50 µmol/l of H-7-(L-lysyl-L-alanyl-amido)-4-methylcoumarin (Lys-Ala-AMC) as substrates (both from Bachem, Switzerland), respectively (16). The release of 7-amino-4-methylcoumarin was monitored at the excitation and emission wavelengths of 380 and 460 nm, respectively.

Based on the enzymatic activity histogram, samples were categorized to 3-tiered scale: low = 0-4 arbitrary units, with the median of 3.22; medium = 4-8 arbitrary units, with the median of 6.10 and high = 8-17 arbitrary units, with the median of 11.20.

Total protein concentration in tissue homogenates was determined colorimetrically according to the Lowry procedure (17) using bovine serum albumin as a standard.

**DPP-IV-like catalytic enzyme histochemistry.** Histochemical demonstration of DPP-IV-like catalytic activity *in situ* was performed according to Lojda (18) in 10 µm cryostat tissue sections cut at -20°C (Bright Instrument Company Ltd., UK). The sections were fixed in a 1:1 mixture of acetone and chloroform for 2 min at 4°C and were incubated with 830 µM of H-7-(glycyl-L-prolyl-amido)-4-methoxy-2-naphthylamide as a substrate (Bachem, Switzerland) and Fast Blue B as a coupler of the enzymatically released 4-methoxy-2-naphthylamine, in PBS pH 7.4, at 4°C. In controls, the DPP-IV substrate was omitted from the incubation medium. The staining intensity was scored on a 4-tiered scale (low = 1;

medium = 2, high = 3, 0 = control reaction without the enzyme substrate), averaged from 8-10 fields, observed at a magnification of 400-fold in several non-consecutive tissue sections.

**Immunohistochemistry.** Immunodetection of DPP-IV, FAP $\alpha$ , DPP8, DPP9 and CXCR4 was performed in 10 µm cryostat tissue sections preincubated in 3% of heat-inactivated bovine fetal serum for 20 min, followed by overnight incubation with the respective primary antibodies at 4°C: mouse monoclonal anti-human DPP-IV (1:100, clone M-A261, Acris, Germany), mouse monoclonal anti-human FAP $\alpha$  (1:200, clone F11-24, Alexis Biochemical, USA), rabbit polyclonal anti-human DPP8 and anti-human DPP9 (1:150, Abcam, UK) and rabbit polyclonal anti-human CXCR4 (1:200, Acris, Germany). This was followed by incubation with anti-mouse- or anti-rabbit-IgG-FITC conjugates (1:200, Sigma, USA) or anti-mouse-IgG-AlexaFluor 488 conjugate (1:1000, Invitrogen, USA). In staining controls, the primary antibodies were omitted. Staining intensity was scored using the above-mentioned 4-tiered scale. The proliferation activity was analyzed *in situ* by immunohistochemical staining of Ki67 antigen expression, using a mouse monoclonal anti-human Ki67 antibody (clone MIB-1, Dako, Denmark). The *in situ* expression of p53 protein was examined using immunostaining with a mouse monoclonal anti-human p53 antibody (clone DO-7; Dako).

**Statistical analysis.** Statistica 8.0 software was used. Differences between groups were evaluated with Kruskal-Wallis test or Mann-Whitney test; correlations were analyzed by means of Spearman correlation coefficient.

## Results

**General characteristics of tumor samples.** As shown in Table II, the studied set of patients consisted of 18 patients with benign meningiomas WHO grade I (including 6 histological subtype groups), and 4 patients with atypical meningiomas WHO grade II. The age range was 36-79 years, with



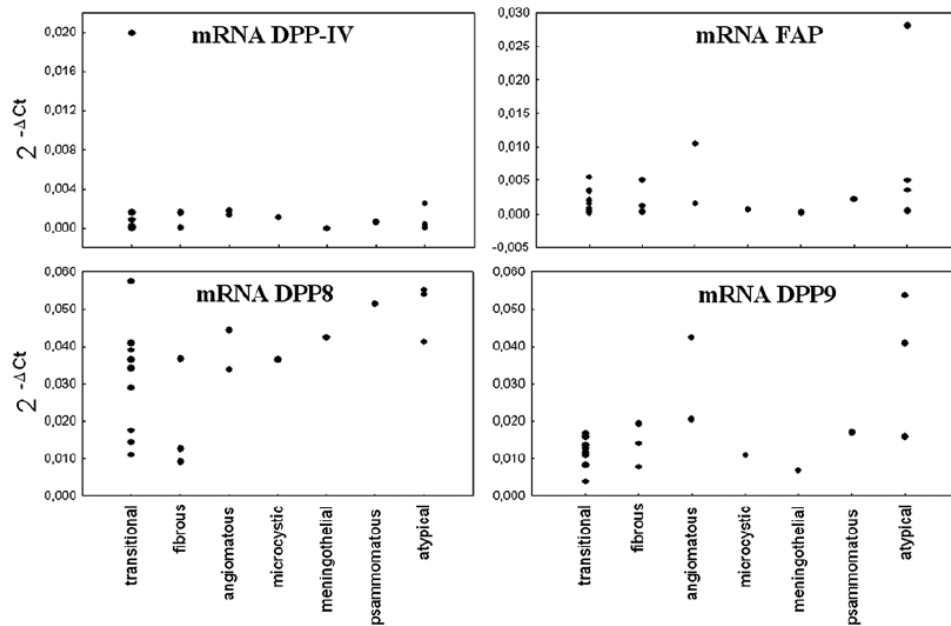


Figure 1. The mRNA expression of DPP-IV/CD26, FAP $\alpha$ , DPP8 and DPP9 determined by real-time RT-PCR normalized to human  $\beta$ -actin in various histological types of meningiomas WHO grade I and II.

an average of 61 years (SD $\pm$ 12). In this group of meningioma patients, there were 20 women and 2 men. As assessed by Ki67 immunostaining, the proliferation activity in tissue sections ranged from 1 to 12%, with prevalence in atypical meningiomas. The immunorexpression of p53 protein in tissue sections varied from 0 to 80%, without an evident relationship to WHO grade. Vascularisation was, except in 2 transitional, 2 angiomatous, 1 meningothelial and 3 atypical meningiomas, very low. All tumors were free of necrosis, except 1 fibrous and 1 atypical meningioma.

**DASH mRNA expression.** As shown by real-time RT-PCR (Fig. 1), DPP-IV, FAP $\alpha$ , DPP8 and DPP9 mRNAs were expressed in all analyzed tumor samples. The expression level of individual DASH molecules varied among individual types of tumors. Compared to DPP-IV/CD26 and FAP $\alpha$  mRNA expression, the scatter of DPP8 and DPP9 values was relatively broader. There was statistically significant difference in DPP8 mRNA expression between benign meningiomas grade I and atypical meningiomas grade II ( $p=0.039$ ). However, no statistical significance occurred in any DASH mRNA expression between individual histological tumor subtypes ( $p>0.05$ ).

The expression of DPP-IV/CD26 mRNA showed a positive correlation with FAP $\alpha$  mRNA expression in all examined samples ( $R=0.672$ ,  $p=0.001$ ).

#### DPP-IV-like enzymatic activity determined biochemically and histochemically

**Biochemical approach.** Most benign meningiomas grade I exhibited medium (14 of 18 samples, 78%) and high (2 of 18 samples, 11%) DPP-IV-like enzymatic activity measured by

fluorimetric assay using Gly-Pro-AMC as a substrate. Low enzymatic activity occurred only in 2 of 18 benign samples (11%). In the atypical meningioma variants grade II, all samples had high or medium activity (4 of 4 samples, 100%, Table III). Moreover, in the WHO grade II group, there was statistically significant higher activity than in WHO grade I group ( $p=0.011$ , Fig. 2).

The enzymatic activity of tissue homogenates measured at the acidic pH 5.5 using Lys-Ala-AMC as a substrate, was only slightly above detection limit (mean  $0.74 \pm$  SD 0.31 arbitrary units). This suggests that DPP-II does not significantly contribute to the overall DPP-IV-like enzymatic activity (data not shown).

In addition, higher DPP-IV-like enzymatic activity was accompanied by higher intensity of proliferation activity as detected by Ki67 immunohistochemistry (Fig. 3; Spearman correlation coefficient  $R=0.553$ ,  $p=0.008$ ). Furthermore, the proliferation activity was higher in atypical meningiomas grade II compared to the benign ones ( $p=0.014$ ).

**Catalytic enzyme histochemistry.** Similarly to biochemical data, the DPP-IV-like enzymatic activity was revealed in all examined samples. Medium or high activity occurred in 17 of 22 (77%) meningiomas, irrespective of the tumor grade (Table III). The enzymatic activity greatly varied both in the group of patients as well as in the individual tumors. The stained cells occurred either solitary or in the nests of different size and irregular shape scattered throughout specimens. As evident in samples with low DPP-IV-like activity staining, the enzymatic activity occurred primarily in the perivascular cell compartment, from where stained cells were spreading to the surrounding parenchyma (Fig. 4E and F). In

Table III. Number of meningioma samples with DPP-IV-like enzymatic activity, DPP-IV, FAP $\alpha$ , DPP8, DPP9 and CXCR4 receptor expression detected biochemically and histochemically.

Low/medium/high <sup>a</sup> Diagnosis	No. of cases	Enzymatic activity		Immunohistochemistry				
		Biochemical assay	Catalytic histochemistry	DPP-IV/ CD26	FAP $\alpha$	DPP8	DPP9	CXCR4
<b>Meningiomas WHO grade I</b>								
Transitional	10	1/7/2	1/5/4	4/5/1	10/0/0	1/3/6	2/5/3	7/2/1
Fibrous	3	0/3/0	1/1/1	3/0/0	3/0/0	0/3/0	2/1/0	3/0/0
Angiomatous	2	1/1/0	1/1/0	2/0/0	2/0/0	0/1/1	0/2/0	2/0/0
Microcystic	1	0/1/0	0/0/1	0/1/0	1/0/0	0/0/1	0/1/0	1/0/0
Meningothelial	1	0/1/0	0/1/0	1/0/0	1/0/0	0/0/1	0/0/1	0/0/1
Psammomatous	1	0/1/0	1/0/0	1/0/0	1/0/0	0/0/1	0/1/0	1/0/0
All subtypes	18	2/14/2	4/8/6	11/6/1	18/0/0	1/7/10	4/10/4	14/2/2
<b>Meningiomas WHO grade II</b>								
Atypical	4	0/1/3	1/2/1	4/0/0	4/0/0	0/2/2	0/3/1	2/1/1

<sup>a</sup>The scale low, medium and high is described in Materials and methods.

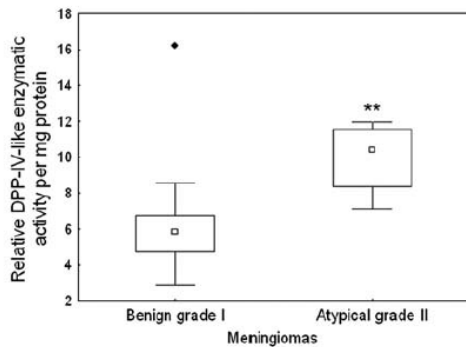


Figure 2. Specific DPP-IV-like enzymatic activity determined in human meningiomas. Squares, medians; boxes, middle 25-75% of the measured values; bars, minimal and maximal values; ♦, extreme value; \*\*p=0.011; spearman correlation.

fibrous and transitional meningioma subtypes, the enzymatic activity-bearing cells trimmed fibrous bundles rich in extracellular matrix at their surface or also inside their interior (Fig. 4H). Positive staining also appeared at the surface of outermost as well as deeper whorl lamellas (Fig. 4G, insert).

**DASH protein immunopositivity pattern.** DPP-IV/CD26 immunopositivity was low in most benign grade I (11 of 18 patients, 61%) and all atypical grade II meningiomas (4 of 4 patients, 100%). Medium or high DPP-IV/CD26 immunopositivity appeared in 7 of 18 (39%) benign meningiomas (Table III). The immunostaining usually trimmed the surface of fibrous bundles and whorls, where it was often present only in the cells of the outermost lamellas (Fig. 4I and J, insert). In samples with very low positivity only a few solitary cells were stained.

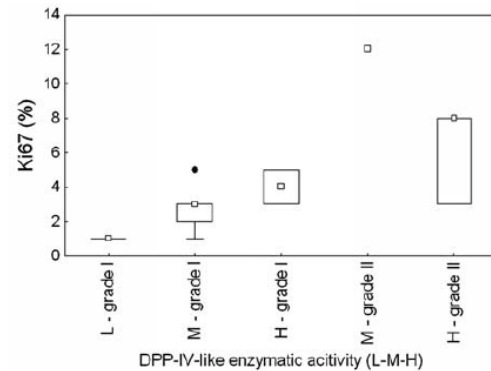


Figure 3. Relation of proliferation activity and DPP-IV-like enzymatic activity in meningiomas WHO grade I and WHO grade II. L, low; M, medium; H, high activity subgroups classified as described in Materials and methods; squares, medians; boxes, middle 25-75% of measured values; bars, minimal resp.; maximal values; ♦, remote values.

The immunohistochemical expression of FAP $\alpha$  (Fig. 4K and L) was low in all examined meningiomas (Table III). The tissue localization was similar to the DPP-IV/CD26 expression.

On the other hand, the immunopositivity of DPP8 was high or medium in 21 of 22 (95%) examined meningioma patients (Table III, Fig. 4M and N). The immunostaining of DPP9 was similar, although its intensity was lower; it was high or medium in 18 of 22 (82%) meningioma patients (Table III, Fig. 4O and P). The staining tissue distribution of both these peptidases was similar to the total DPP-IV-like activity. It occurred in flat meningocytes over the fibrous bundles and the whorl lamellas as well as patches scattered in the interspaced parenchyma (Fig. 4M-P).

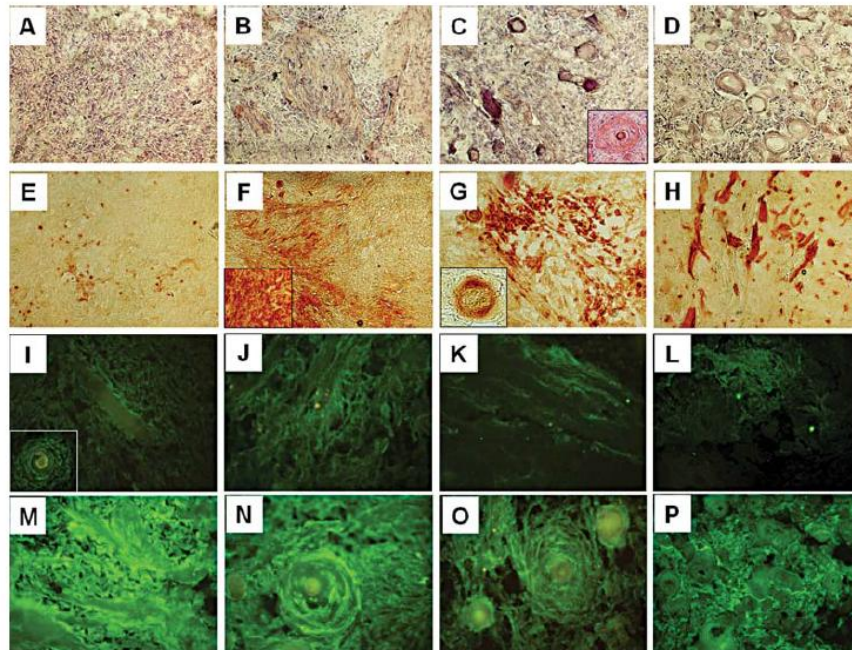


Figure 4. Histology of meningiomas WHO grade I subtypes: fibrous (A), transitional (B), psammomatous (C) and angiomatous (D). Hematoxylin-eosin staining, original magnification x400. Catalytic DPP-IV-like activity present in solitary or grouped cells or larger irregular patches in angiomatous and fibrous meningiomas, respectively (E and F), or trimming fibrous bundles and whorl lamellas in transitional subtypes (G and H). Low expression of DPP-IV/CD26 (I and J) and FAP $\alpha$  (K and L) present mainly over the surface of fibrous bundles and whorl lamellas in fibrous and transitional subtypes, respectively. High expression of DPP8 (M and N) and DPP9 (O and P) on the surface of fibrous bundles and whorl lamellas as well as the interspaced parenchyma; original magnification x400.

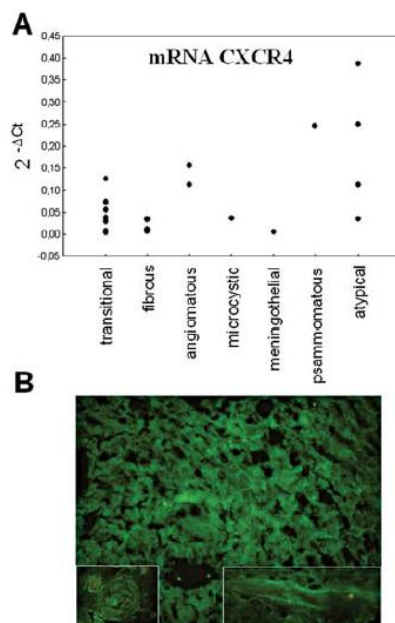


Figure 5. Expression of CXCR4 receptor determined by real-time RT-PCR normalized to human  $\beta$ -actin in various histological types of WHO grade I and II meningiomas (A). Immunohistochemical expression of CXCR4 over the surface of fibrous bundles and whorl lamellas; original magnification x400 (B).

**CXCR4 receptor expression.** The expression of CXCR4 receptor was found by real-time RT-PCR in all meningioma tissue samples, suggesting higher values in atypical grade II meningiomas ( $p=0.05$ , Fig. 5A). Medium or high CXCR4 protein expression was detected in 3 of 4 (75%) atypical grade II meningiomas, while only 4 of 18 (22%) benign grade I tumors demonstrated medium or high CXCR4 expression (Table III). Cytologically, the immunostaining pattern was similar to DPP-IV/CD26, except the less distinct trimming of fibrous bundles (Fig. 5B).

## Discussion

This study is the first analysis of the expression and relative proportions of DASH molecules in human meningiomas. As shown here, the DPP-IV-like enzymatic activity carried by these molecules was detected in all 22 meningiomas. Compared to benign grade I meningiomas, the enzymatic activity was often higher in atypical grade II tumors, in which also the cell proliferation was higher, as detected by Ki67 immunostaining.

As revealed by real-time RT-PCR mRNA expression and immunohistochemical analysis of protein expression, both DPP8 and DPP9 are more abundantly expressed in meningiomas as compared to DPP-IV/CD26 and FAP $\alpha$ . This indicates that the total DPP-IV-like enzymatic activity in these tumors is mainly attributable to DPP8 and DPP9, while the contribution of DPP-IV/CD26 and FAP $\alpha$  is relatively

low. This is different to the human high-grade astrocytomas, in which the canonical DPP-IV/CD26 is the main contributor to the elevated DPP-IV-like enzymatic activity and is even proposed to be an indicator of grade progression of these tumors (14). This inter-tumor difference may reflect distinctions in cellular phenotypes and/or embryonic origins of astrocytic gliomas and meningiomas as well as lower degree of malignancy of the meninges-derived tumors. Putative mesodermal/mesenchymal expression pattern of a spectrum of DASH molecules, in which the expression of DPP8 and DPP9 would prevail, is suggested by immunostaining of meningocytes localized on the surface and inside the fibrous bundles and whorls rich in extra-cellular matrix secreted by these cells. Moreover, in our ongoing study, DPP8 and DPP9 have also been found to be prevalent contributors to the total DPP-IV-like enzymatic activity in normal human brain meninges. Cell differentiation changes in expression of DASH members, as another their pattern-determining factors, was observed in male reproductive organs (19). However, the role of DPP8 and DPP9 in the cell metabolism and growth is still poorly understood. In contrast to the plasma membrane-bound DPP-IV/CD26 and FAP $\alpha$ , both these enzymes are cytosolic and therefore are not likely to process extracellular growth regulators. Besides their possible but unknown enzymatic intracellular functions, the enzyme activity-independent role of DPP8 and DPP9 in cell-ECM interactions has also been shown in cell culture (20).

Albeit low, the expression levels of DPP-IV/CD26 and FAP $\alpha$  transcripts, showed a close correlation. Proportional expression of both these paralogous molecules, products of the same gene duplication (21) was observed also in glioblastomas *in situ* and glioma cell cultures (14,22), and their co-regulation on the transcriptional level has been suggested. This fits well with the observation in fibroblast cell cultures, in which observed DPP-IV/CD26 and FAP $\alpha$  heterodimers participate in cell migration (23,24). In contrast to the high-grade astrocytomas, no difference in the expression of these two molecules between grade I and grade II meningiomas has yet been found.

It is also to be pointed out that in high-grade meningiomas, higher expression of CXCR4, the receptor of chemokine SDF-1 $\alpha$ , was observed. The SDF-1 $\alpha$ -mediated signaling stimulates cell proliferation and migration in a number of tumor types (25-28). This mechanism was considered to be responsible also for increased proliferation of primary meningeothelial cell cultures (13). Indeed, increased expression of CXCR4 was associated with higher proliferation and the degree of cell cycle control disruption as indicated by Ki67 and p53 protein levels in CXCR4 matched samples.

In conclusion, this study is the first report on expression and tissue distribution of DASH molecules showing that DPP8 and DPP9 are the main DASH representatives in non-neuroectodermally-derived brain tumors. This is at variance with high-grade astrocytomas, in which expression of DPP-IV/CD26 prevails.

#### Acknowledgements

This work was supported by grant MSMT 0021620808 and AV 0Z50110509. We are thankful to associate professor

Josef Marek from Department of Pathology, Hospital na Homolce, Prague for supervising histopathobiological analyses.

#### References

1. Marosi C, Hassler M, Roessler K, *et al*: Meningioma. Critical reviews in oncology. Hematology 67: 153-171, 2008.
2. Riemenschneider MJ, Perry A and Reifenberger G: Histological classification and molecular genetics of meningiomas. Lancet Neurol 5: 1045-1054, 2006.
3. Okada M, Miyake K, Matsumoto Y, Kawai N, Kunishio K and Nagao S: Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with the recurrence of intracranial meningiomas. J Neurooncol 66: 29-37, 2004.
4. Strojnik T, Zidanik B, Kos J and Lah TT: Cathepsins B and L are markers for clinically invasive types of meningiomas. Neurosurgery 48: 598-605, 2001.
5. Siddique K, Yanamandra N, Gujrati M, Dinh D, Rao JS and Olivero W: Expression of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and urokinase plasminogen activator in human meningiomas. Int J Oncol 22: 289-294, 2003.
6. Goh KY, Poon WS, Chan DT and Ip CP: Tissue plasminogen activator expression in meningiomas and glioblastomas. Clin Neurol Neurosurg 107: 296-300, 2005.
7. Mentlein R: Cell-surface peptidases. Int Rev Cytol 235: 165-213, 2004.
8. Sedo A, Stremenova J, Busek P and Duke-Cohan J: Dipeptidyl peptidase-IV and related molecules: markers of malignancy? Exp Opin Med Diagn 2: 677-689, 2008.
9. Ulmer AJ, Mattern T, Feller AC, Heymann E and Flad HD: CD26 antigen is a surface dipeptidyl peptidase-IV (DPPIV) as characterized by monoclonal-antibodies clone Tii-19-4-7 and 4e11c7. Scand J Immunol 31: 429-435, 1990.
10. Tanaka T, Camerini D, Seed B, *et al*: Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. J Immunol 149: 481-486, 1992.
11. Vanhoof G, Goossens F, De Meester I, Hendriks D and Scharpe S: Proline motifs in peptides and their biological processing. FASEB J 9: 736-744, 1995.
12. Sedo A and Malik R: Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? Biochim Biophys Acta 1550: 107-116, 2001.
13. Bajetto A, Barbieri F, Pattarozzi A, *et al*: CXCR4 and SDF1 expression in human meningiomas: a proliferative role in tumoral meningeothelial cells *in vitro*. Neurooncology 9: 3-11, 2007.
14. Stremenova J, Krepla E, Mares V, *et al*: Expression and enzymatic activity of dipeptidyl peptidase-IV in human astrocytic tumours are associated with tumour grade. Int J Oncol 31: 785-792, 2007.
15. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. Methods 25: 402-408, 2001.
16. Sedo A, Krepla E and Kasafirek E: A kinetic fluorometric assay of dipeptidyl peptidase IV in viable human blood mononuclear cells. Biochimie 71: 757-761, 1989.
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275, 1951.
18. Lojda Z: Proteinases in pathology. Usefulness of histochemical methods. J Histochem Cytochem 29: 481-493, 1981.
19. Dubois V, Van Ginneken C, De Cock H, *et al*: Enzyme activity and immunohistochemical localization of dipeptidyl peptidase 8 and 9 in male reproductive tissues. J Histochem Cytochem 57: 531-541, 2009.
20. Yu DM, Wang XM, McCaughan GW and Gorrell MD: Extraenzymatic functions of the dipeptidyl peptidase IV-related proteins DP8 and DP9 in cell adhesion, migration and apoptosis. FEBS J 273: 2447-2460, 2006.
21. Irwin DM: Ancient duplications of the human proglucagon gene. Genomics 79: 741-746, 2002.
22. Busek P, Stremenova J and Sedo A: Dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity bearing molecules in human brain tumours - good or evil? Front Biosci 13: 2319-2326, 2008.
23. Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, *et al*: Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. Cancer Res 53: 3327-3335, 1993.

24. Ghersi G, Dong H, Goldstein LA, *et al*: Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *J Biol Chem* 277: 29231-29241, 2002.
25. Bajetto A, Barbero S, Bonavia R, *et al*: Stromal cell-derived factor-1alpha induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. *J Neurochem* 77: 1226-1236, 2001.
26. Marchesi F, Monti P, Leone BE, *et al*: Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4. *Cancer Res* 64: 8420-8427, 2004.
27. Mizokami Y, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Kikkawa F and Mizutani S: Stromal cell-derived factor-1 alpha-induced cell proliferation and its possible regulation by CD26/dipeptidyl peptidase IV in endometrial adenocarcinoma. *Int J Cancer* 110: 652-659, 2004.
28. Zhao D, Li XP, Gao M, Zhao C, Wang JL and Wei LH: Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human endometrial carcinoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt. *Gynecol Oncol* 103: 932-937, 2006.

**Identifikační záznam:**

HILŠER, Marek. *Dipeptidylpeptidáza IV v ortotopických modelech gliomu. [Dipeptidyl peptidase IV in orthotopic models of glioma]*. Praha, 2016. 74 s., 3 příl. Dizertatační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav biochemie a experimentální onkologie. Vedoucí práce Šedo, Aleksi.

**Klíčová slova:** Dipeptidylpeptidáza IV, Dipeptidyl peptidase IV, Modely gliomu, Glioma models, Fluorescenční zobrazování, Fluorescent light imaging.