

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



Dipeptidylpeptidáza IV v ortotopických modelech gliomu

Marek Hilšer

Praha 2016

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Školící pracoviště: Laboratoř biologie nádorové buňky

Ústav biochemie a experimentální onkologie

1. lékařská fakulta

Univerzita Karlova v Praze

U nemocnice 5

128 53, Praha 2

Školitel: prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah	
Souhrn	4
Summary	5
1. Úvod	6
1.1. DPP-IV a její biologický význam.....	6
1.1.1. Molekulární charakterizace DPP-IV.....	6
1.1.2. Příklady biologických účinků katalytického a nekatalytického působení DPP-IV...7	7
1.1.3. DPP-IV a její fyziologický výskyt v organismech	8
1.1.4. DPP-IV a její výskyt v nádorových tkáních.....	9
1.1.5. Biologické působení DPP-IV v onkogenezi.....	9
1.1.6. DPP-IV v gliomogenezi	11
1.2. In vivo modely experimentálních gliomů	11
1.2.1. Modelování gliomogeneze in vivo pomocí RCAS/tv-a technologie	13
1.3. Validace neinvazivní fluorescenční zobrazovací metody pro analýzu dynamiky růstu xenotransplantačního ortotopického modelu gliomu	15
2. Hypotézy	16
3. Cíle	16
4. Metody	17
3.1. Buněčné linie odvozené z astrocytárních tumorů a jejich transfektanty.....	17
3.2. In vivo implantace gliomových buněk do mozku myši	17
3.3. Transgenní indukce gliomu in vivo	18
3.4. Kvantifikace objemu tumorů.....	18
3.5. In vivo fluorescenční zobrazování růstu tumoru	18
3.6. Analýza relativního zeslabení fluorescenčního signálu v mozkové tkáni	18
3.7. Imunofluorescenční detekce antigenů.....	19
3.8. Katalytická histochemie	19
3.9. Kombinované stanovení enzymové aktivity DPP-IV a exprese CD31	20
3.10. Biochemické stanovení DPP-IV- podobné enzymové aktivity	20
3.11. Stanovení celkového proteinu	20
3.12. Statistická analýza.....	21
4. Výsledky	21
4.1. Zavedení ortotopického xenotransplantačního modelu gliomu	21
4.2. Vliv experimentálně zvýšené exprese katalyticky aktivní DPP-IV na růst ortotopického xenograftu.....	22
4.3. Vliv zvýšené exprese katalyticky neaktivní DPP-IV na růst ortotopického xenograftu	23
4.4. Analýza indexu proliferace Ki-67	24
4.5. Indukce tumorů pomocí retrovirového vektoru RCAS PDGFB-HA	25
4.6. Přítomnost DPP-IV enzymové aktivity v tumorech transgenně indukovaných retrovirovým vektorem.....	26
4.7. Kvantifikace enzymové aktivity kanonické DPP-IV v tumorech transgenně indukovaných retrovirovým vektorem RCAS PDGFB-HA.....	28
4.8. In vivo zobrazování.....	29
5. Diskuse	32
5.1. DPP-IV a její vliv na gliomogenezi in vivo	32
5.2. Validace neinvazivní fluorescenční zobrazovací metody	34
6. Závěry	35
Zkratky	36
Literatura	37

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, popsána 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

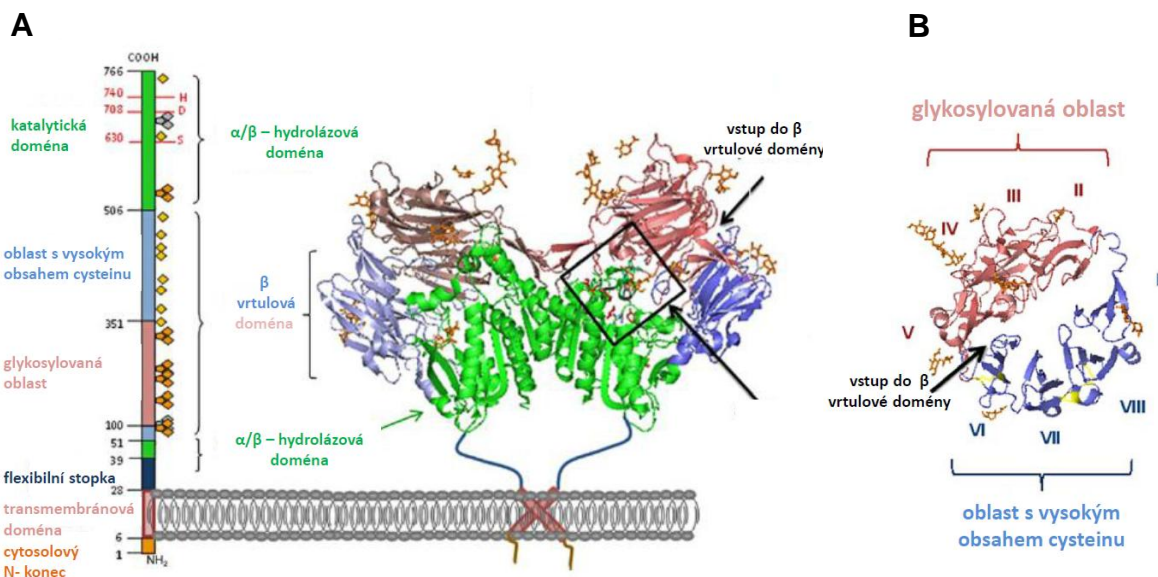
DPP-IV (CD26, EC 3.4.14.5) je transmembránová serinová proteáza, jejíž primární strukturu tvoří 766 aminokyselin (Obrázek 1). Z šesti aminokyselin se skládá krátká cytoplazmatická doména, 22 aminokyselin tvoří hydrofobní transmembránovou doménu a 738 zbytků představuje extracelulární část molekuly. Dominantní 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 (Weihofen 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 přihojování (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 přihojování 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 A₂, CXCR 4 a Na⁺/H⁺ 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).

Expres 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 nepřímě 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 fibronectinem 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 hraje 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 α a substance P, nebo způsobuje zvýšení adheze buněk prostřednictvím vazby na fibronectin 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 (Mares 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; Hambardzumyan 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 morfoloická 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 gliomageneze 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 myši 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 xenotransplantátů 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 multiformního 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).

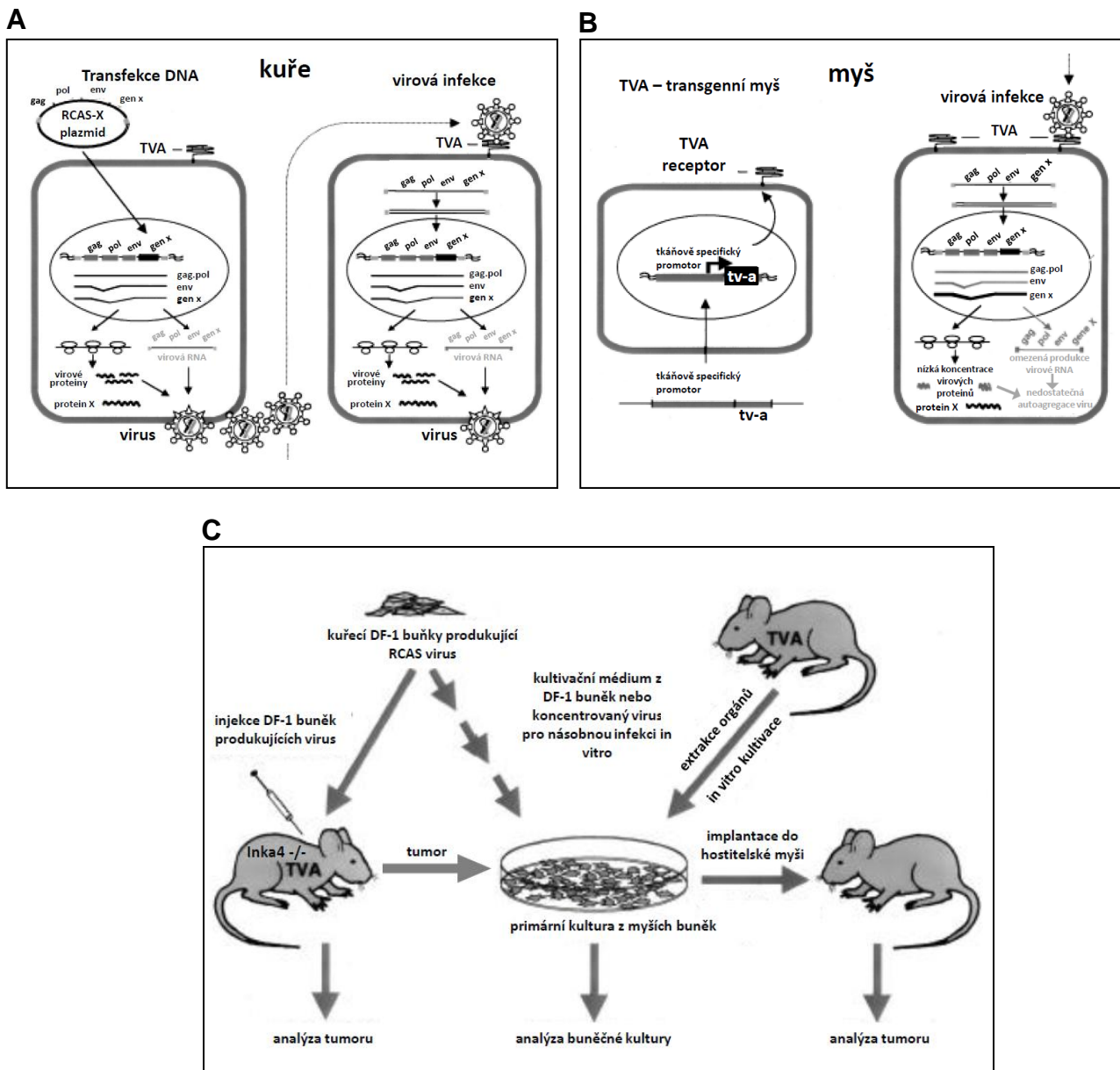
In vivo transfekce onkogenem se realizuje prostřednictvím infekce retrovirovými vektory odvozenými z ptačího viru Rousova sarkomu. Infekce definovaných typů buněk je zajištěna prostřednictvím transgenní exprese specifického receptoru (tv-a) pro daný virový vektor. Exprese receptoru je řízena promotorem 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 myši buňky 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; Killian 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 % CO₂. 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 použítá 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 transfekované 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 µl bylo injikováno do hloubky 3 mm od povrchu mozku 5 µl buněčné suspenze o koncentraci 200 000 buněk/1µl DMEM (Sigma-Aldrich Chemie, Německo). Injektáž buněk probíhala rychlostí 1µl/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, Uppsala 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 μ l v celkovém množství 2 μ 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 popsáním 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 μ 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 μ l kapkou Matrigelu (Matrigel Matrixtm BD Biosciences, USA) obsahující 10⁶ U373MG CD26 mut buněk exprimujících mKate2. Gelatinózní fluorescenční bolus byl umístěn na 3 mm silný koronární řez myšního 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 myšního 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 µm 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 Na₂HPO₄; 2,68 mM KCl; 1,7 mM KH₂PO₄) 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
primární protilátky					
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
sekundární protilátky					
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 µm 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-β-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 gliomageneze byly zkombinovány metody katalytické histochemie a imunochemické barvení křenovou peroxidázou pro marker endoteliálních buněk CD31. 10 µm 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 Na₂HPO₄; 0,6 mM KH₂PO₄; 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)

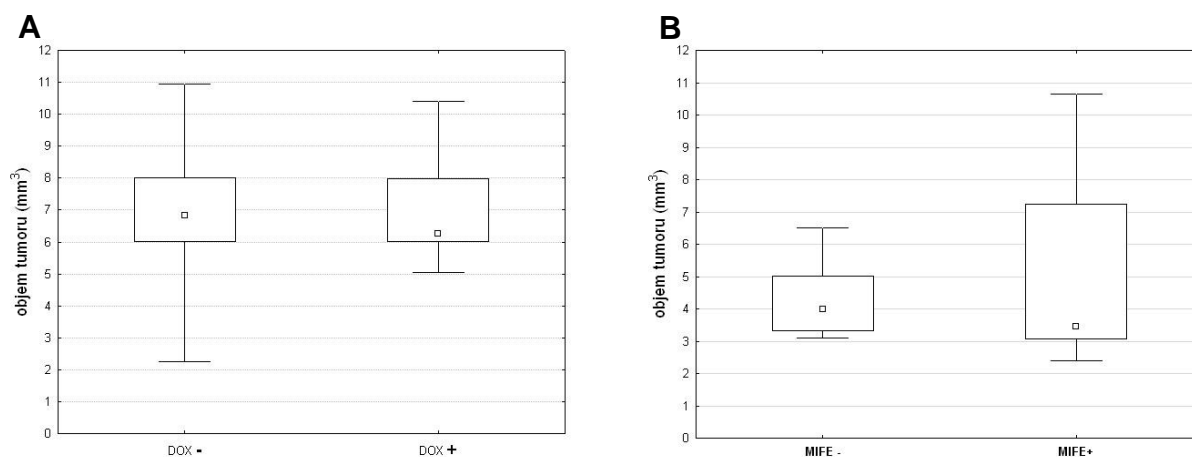
3.12. Statistická analýza

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 doxycyklinu na růst U373MG xenograftu *in vivo*

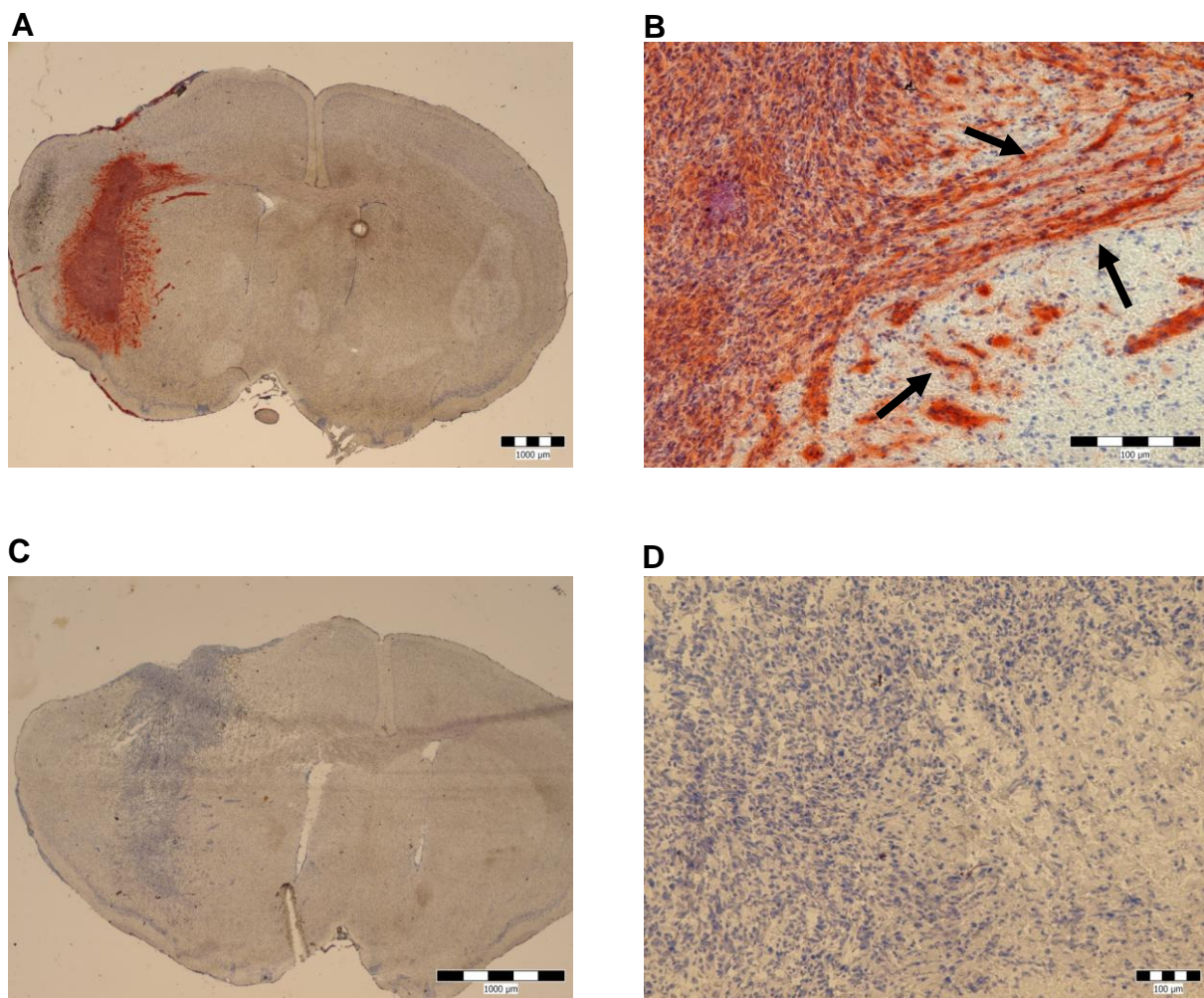
(A) Experimentální skupině zvířat (n=10) byl podáván doxycyklin hyklát v pitné vodě 2 mg/ml ad libitum od prvního dne implantace. Kontrolní skupině zvířat (n=10) byla podávána pouze voda ad libitum. Zvířata byla utracena 33 dnů po implantaci 10^6 buněk. Mann-Whitney U test: p=1; (B) Experimentální skupině zvířat (MIFE+) (n=10) byl podáván mifepriston 270 μ g/kg i.p. rozpuštěný v sezamovém oleji třikrát týdně. Kontrolní skupině zvířat (MIFE-) (n=10) bylo podáváno 100 μ 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 doxycyklinem. 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.

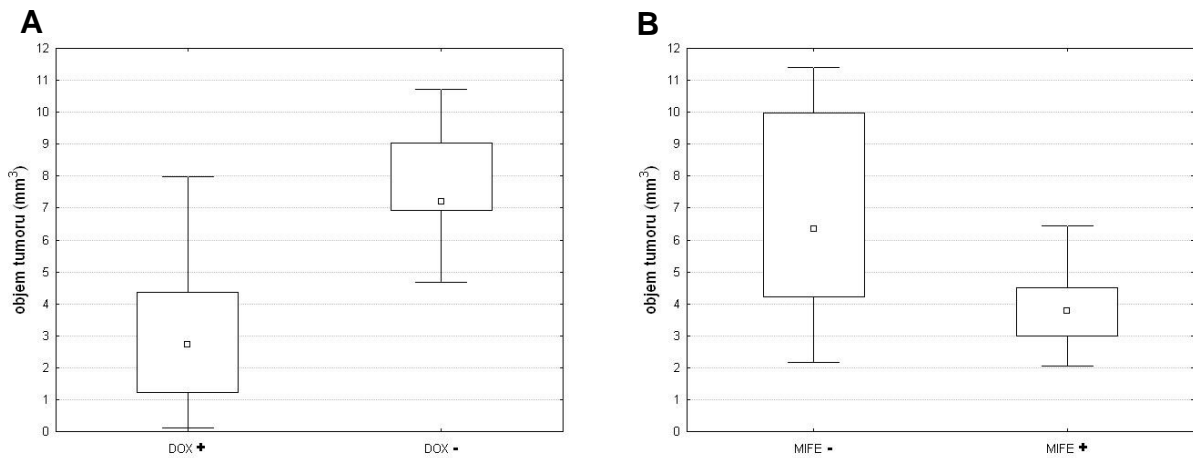
Tumory z buněk U373MG vykazovaly neohrazený růst s infiltrací buněk do okolní mozkové tkáně. Overexprese DPP-IV a zvýšená enzymová aktivita v tumoru byla potvrzena imunofluorescenční metodou a katalytickou histochemií (Obrázek 4).

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 zmrzlých řezech silných 10 μm , jádra barvena HE. Měřítka 1000 μm a 100 μm .

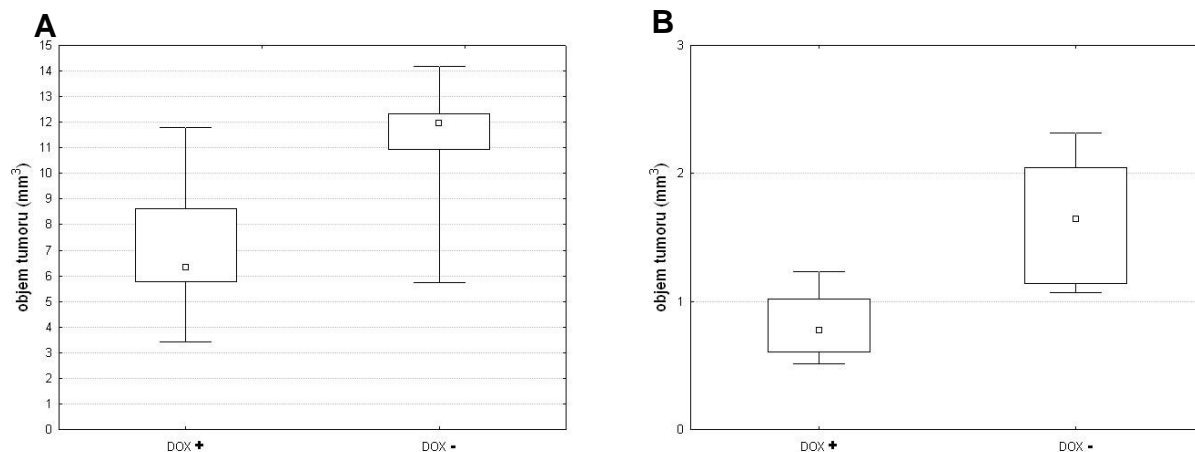


Obrázek 5. Vliv zvýšené exprese katalyticky aktivní DPP-IV na růst xenograftu *in vivo*. **(A)** Expres transgenní DPP-IV v systému Tet-on byla v experimentální skupině zvířat ($n=10$) indukována podáváním hyklát doxycyklinu (2 mg/ml) v pitné vodě ad libitum od prvního dne po implantaci. Kontrolní skupině 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)** Expres transgenní DPP-IV v systému Gen-Switch byla v experimentální skupině zvířat ($n=10$) indukována podáváním mifepristonu 270 $\mu\text{g/kg}$ 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: $p=0,03$; čtverečky: mediány; krabice: 25-75 %; závorčky: 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. Expres 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.

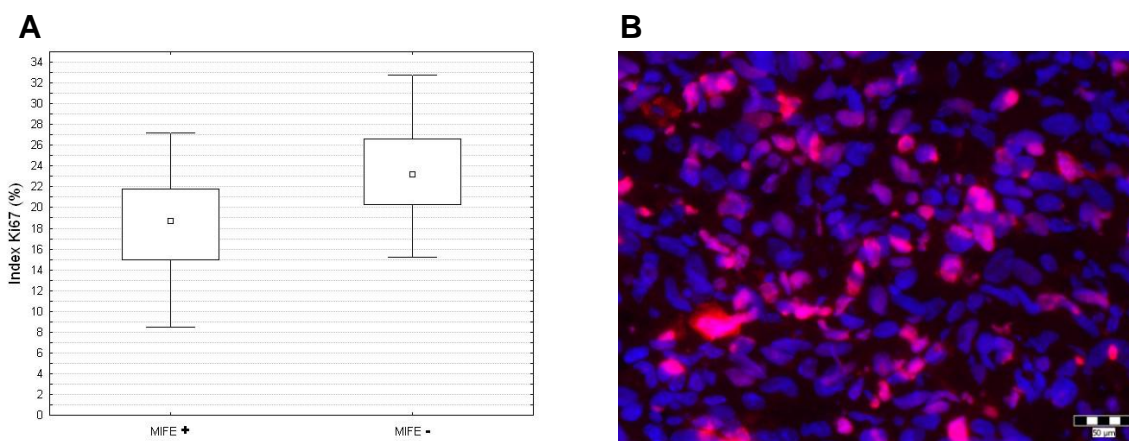
Výsledky prokázaly, že tumory z gliálních buněk, které po indukci transgenní exprese zvýšeně exprimovaly enzymově neaktivní formu DPP-IV byly statisticky významně menší, než kontrolní tumory, u nichž exprese transgenu nebyla navozena. Hodnota mediánu objemu tumorů exprimujících enzymově neaktivní DPP-IV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

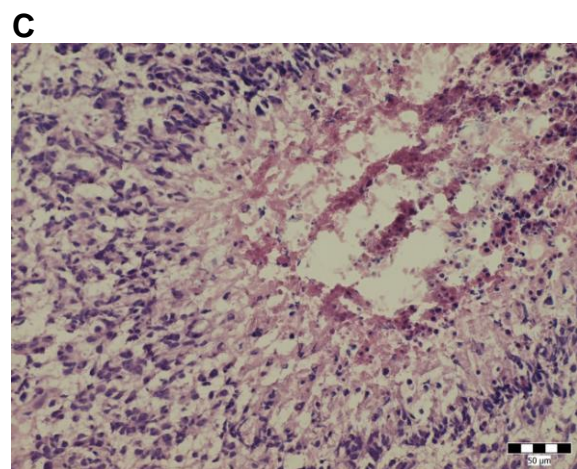
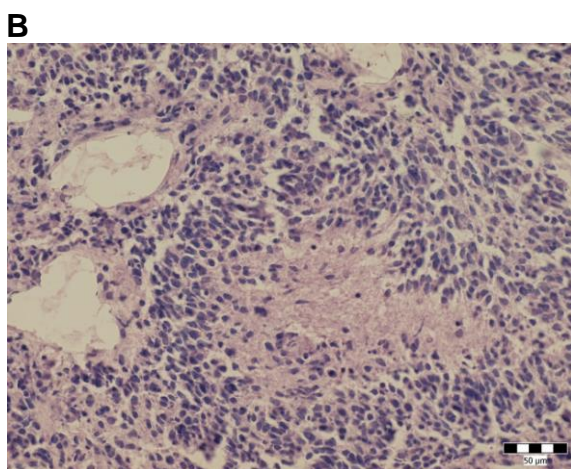
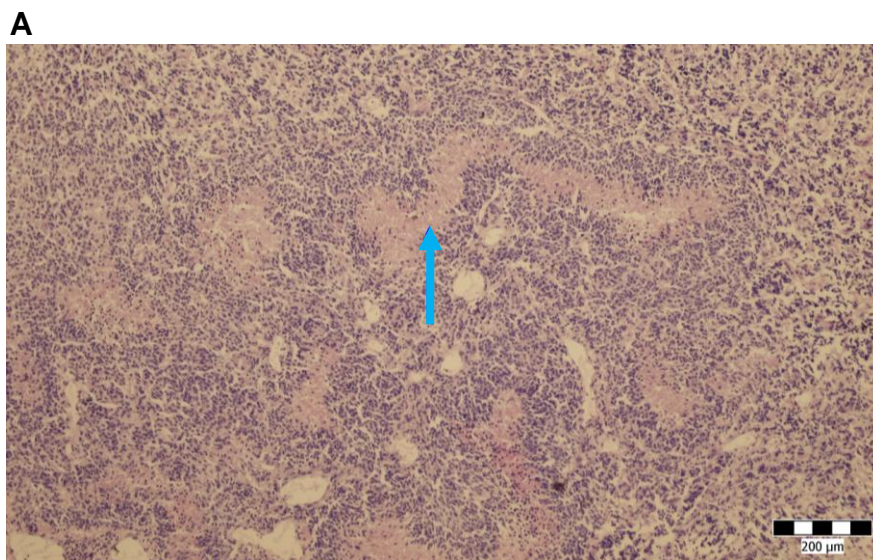


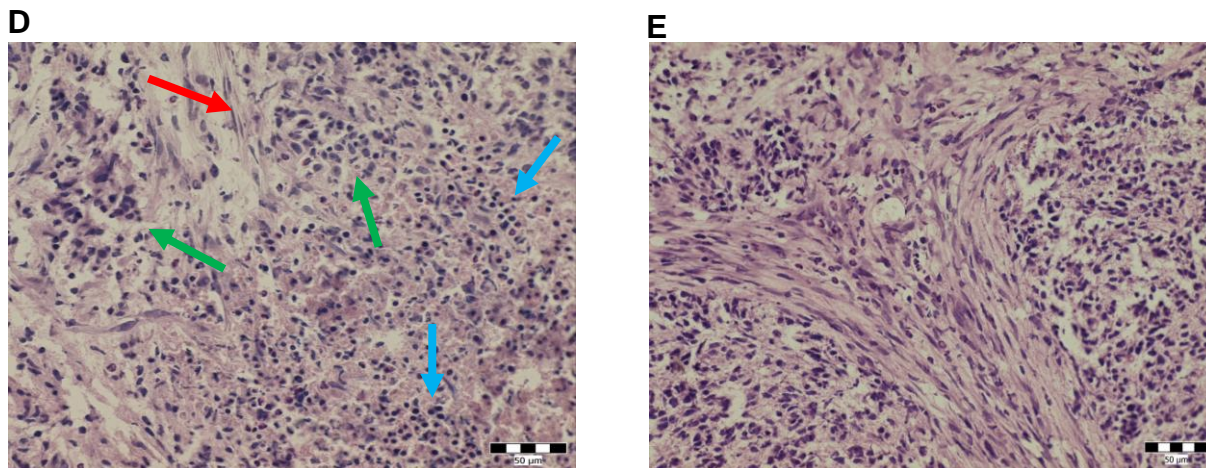
Obrázek 7. Srovnání indexu proliferace Ki-67 u tumorů s indukovanou transgenní expresí DPP-IV. **(A)** Index Ki-67 v experimentální skupině (n=10) a kontrolní skupině (n=10), **(B)** exprese markeru Ki-67 v tumorech s transgenně indukovanou DPP-IV. Expresse transgenní DPP-IV v systému Gen-Switch byla v experimentální skupině zvířat (n=10) idukována podáváním mifepristonu 270 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 50 μ m

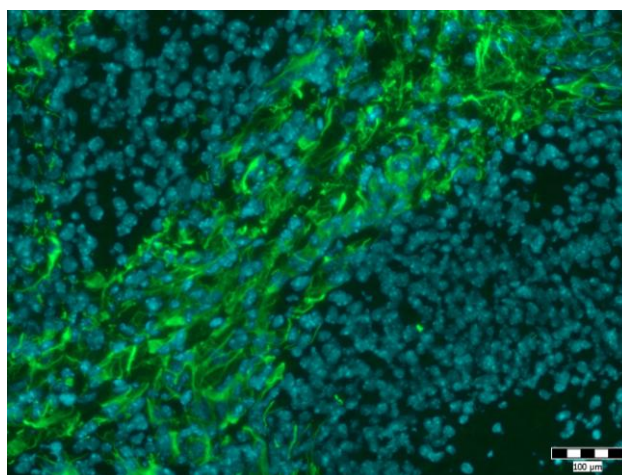
4.5. Indukce tumorů pomocí retrovirového vektoru RCAS PDGFB-HA

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 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 μm; (B), (C) Detaily nekrotizací s pseudopalisádami; měřítko 50 μm; (D) Detail morfologicky odlišných buněk: → - vřetenovité buňky, → - buňky s hyperchromními kulatými jádry, → - buňky s pleomorfními jádry, měřítko 50 μm; (E) Tumory obsahují pruhy s vřetenovitými buňkami, připomínající mezenchymální proliferaci glioblastomu; měřítko 50 μm; zmrazené řezy tumorem 10 μm silné, barvení HE.

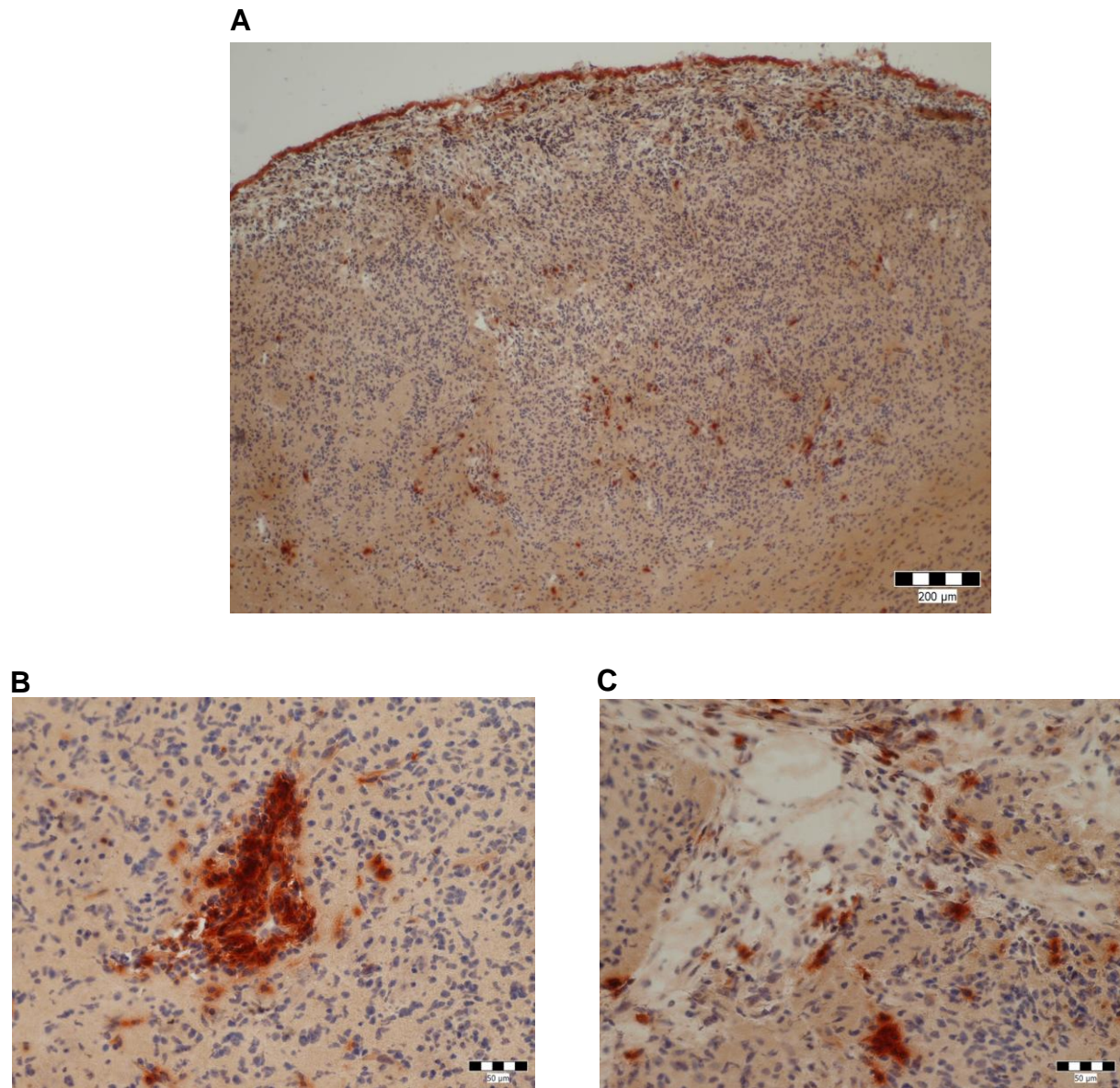


Obrázek 9. Exprese GFAP v tumorech transgenně indukovaných vektorem RCAS PDGFB-HA Detail fokální pozitivní GFAP. Exprese GFAP je fokálně přítomna v celém tumoru, zelená – buňky pozitivní pro GFAP; modrá – buněčná jádra; zmrazené řezy 10 μm silné; měřítko 100 μm.

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

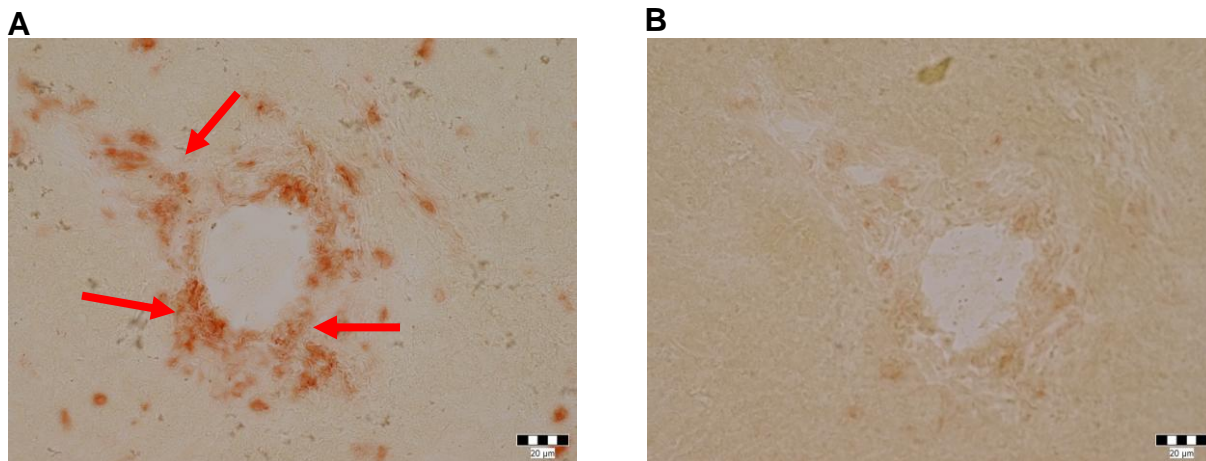
Pro zjištění vzorce distribuce DPP-IV v modelovém systému byla užitá metoda katalytické histochemie ve zmrzlých řezech mozkové tkáně s experimentálním tumorem pomocí chromogenního substrátu (Obrázek 10 A). Po aplikaci sitagliptinu, vysoce specifického inhibitoru enzymové aktivity DPP-IV, byla veškerá 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).



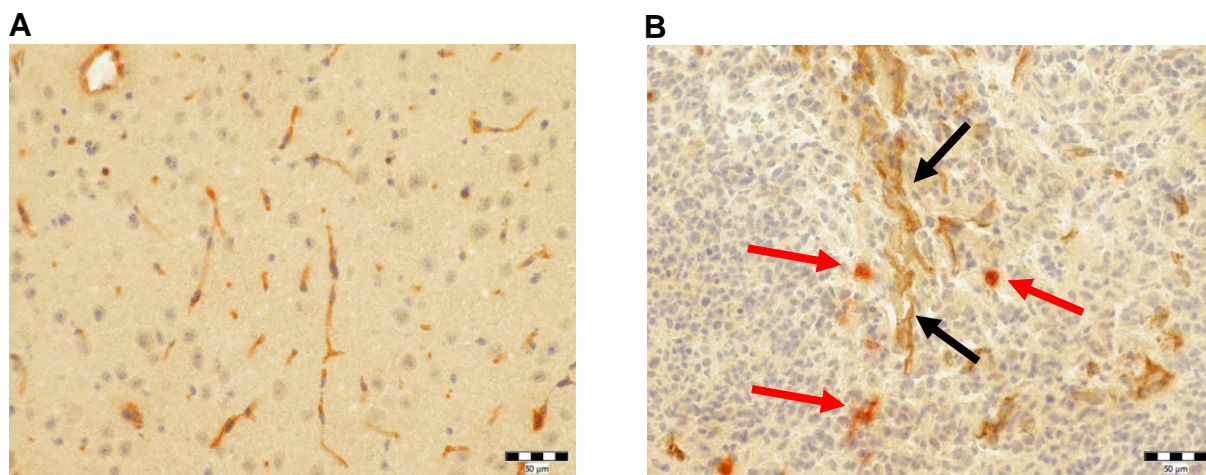
Obrázek 10. Enzymová aktivita DPP-IV v tumorech transgenně indukovaných vektorem RCAS PDGFB-HA

(A) Přehledný snímek distribuce enzymové aktivity DPP-IV v tumoru, měřítko 200 µm; (B) a (C) detail lokalizace DPP-IV enzymové aktivity ve shlučích buněk a kolem cévních útvarů, měřítko 50 µm; zobrazení pomocí katalytické histochemie na zmražených řezech silných 10 µm, 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 zmražených řezech 10 µm silných; měřítko 20 µm

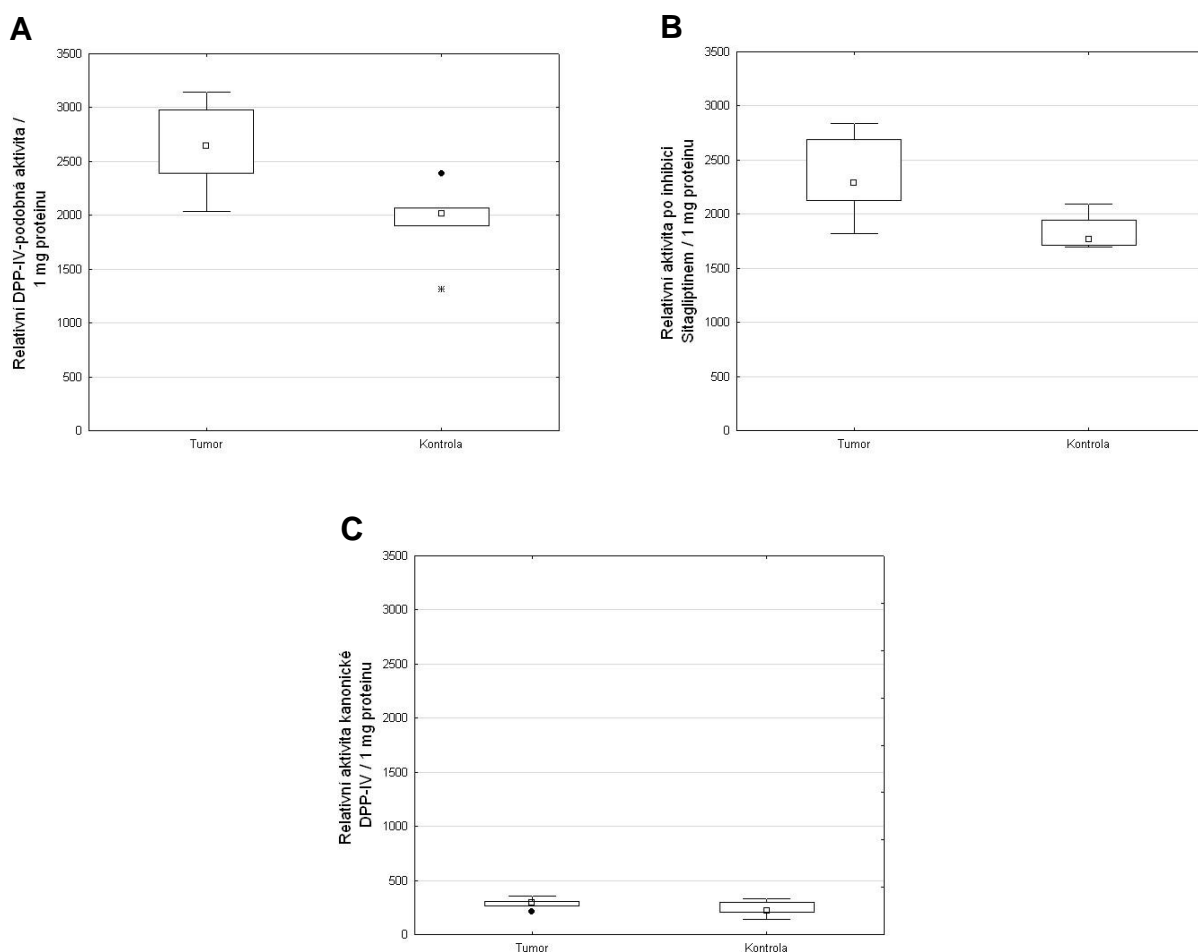


Obrázek 12. Lokalizace DPP-IV a CD31 v tumorech transgenně indukovaných vektorem RCAS PDGFB-HA

(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 transgenně 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 tkání

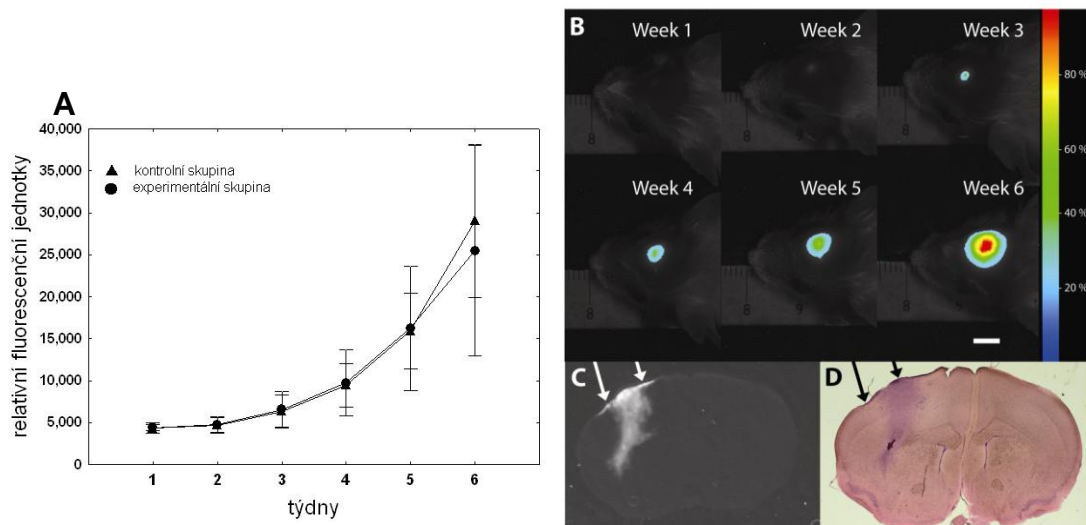
(A) DPP-IV-podobná enzymová aktivita v nádorové a kontrolní tkáni; Mann-Whitney U test: $p=0,047$. (B) DPP-IV-podobná aktivita v nádorové a kontrolní tkáni po inhibici sitagliptinem; **Mann-Whitney** U test: $p=0,021$ (C) Aktivita kanonické DPP-IV v nádorové a kontrolní tkáni; Mann-Whitney U test: $p=0,4$. 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

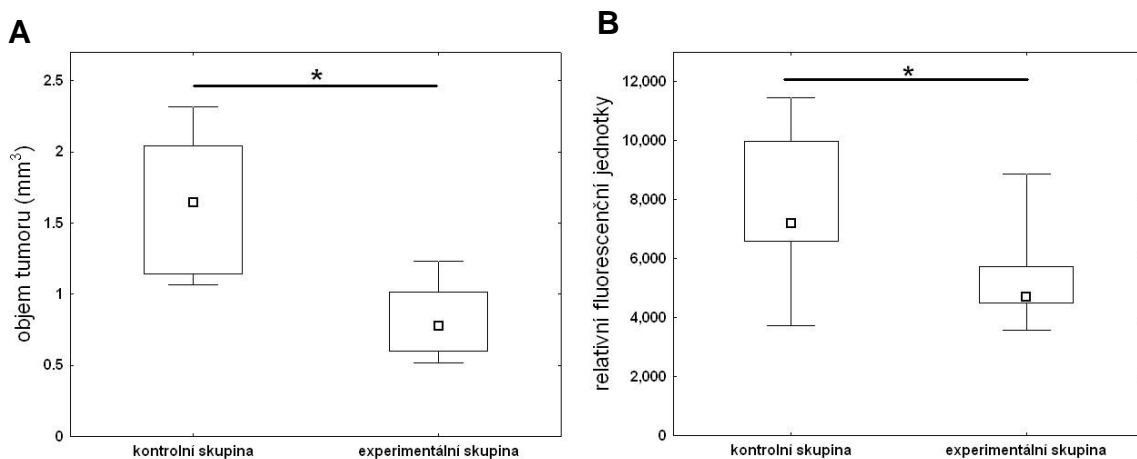
V průběhu šesti týdnů od doby implantace xenograftů exprimujících fluorescenční protein mKate2 byl pozorován rostoucí fluorescenční signál (Obrázek 14 A, B). Hodnoty fluorescence získané focením živých zvířat před odebráním mozku nekorelovaly ($n=19$; $R=0,26$; $p=0,26$) s hodnotami objemů tumorů získaných 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 mozku 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 1 mm a 2 mm mozkové tkáně (Obrázek 17) (Příloha 1).

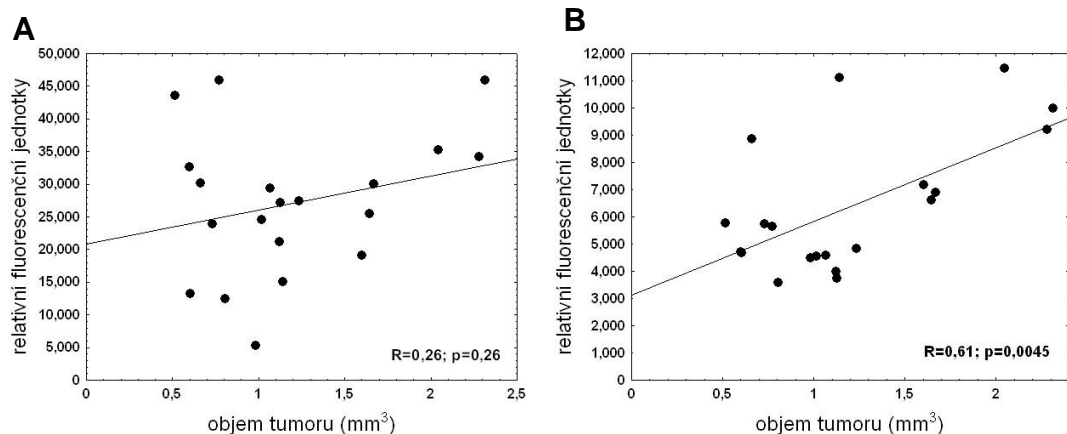


Obrázek 14. Růst tumoru zobrazený in-vivo pomocí FLI (A) Intravitálně měřená fluorescence u kontrolní skupiny (n=9) a experimentální skupiny v průběhu 6 týdenního období po ortotopické implantaci gliomových buněk U373MG exprimujících mKate2 protein. Data jsou prezentována jako průměr ± S.D. **(B)** Zobrazení 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.



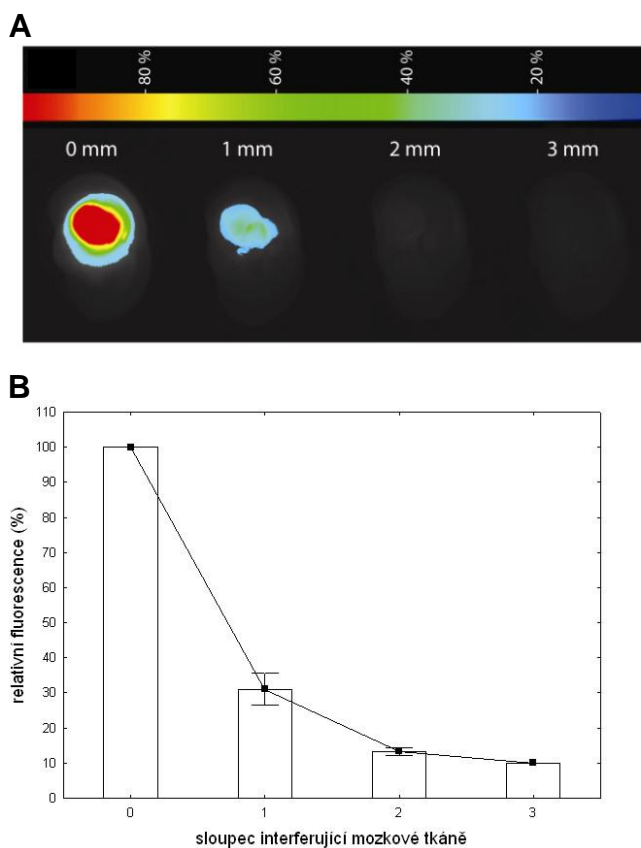
Obrázek 15. Velikost tumorů v xenotransplantačním modelu gliomu

(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. Diskuse

5.1. DPP-IV a její vliv na gliomagenézi *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 myši kmene NOD rag (Shultz a kol., 1995; Shultz a kol., 2000). Pro navazující studie, zaměřené na získání komplexnějšího pohledu na úlohu DPP-IV v gliomagenézi v kontextu funkčního imunitního systému, jsme dále zavedli model transgenně indukované gliomagenéze, 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 xenotransplantátů 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 gliomagenezi 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 gliomageneze.

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). Exprese 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 bércových 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 α . Tento chemokin je jejím substrátem a proteolytická modifikace prostřednictvím DPP-IV jej efektivně inaktivuje (Proost a kol., 1998). SDF-1 α 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 α 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 α 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 antitumorogenní 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 inokulací 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 semikvantitativní 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 α	Stromal cell-Derived Factor 1 α
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., Vlasticova 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.
- Deliolanis 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., Zaraisky 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., Zaraisky 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., Westermarck 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.

Seznam publikací doktoranda, které jsou podkladem disertace:

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

Hilser M., Trylcova J., Busek P., Sedo A., *Folia Biol* 58(3):128-33 2012.

IF: 1,212

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

Busek P, Stremenova J, Sromova L, Hilser M, Balaziová E, Kosek D, Trylcova J, Strnad H, Krepela E, Sedo A.

Int J Biochem Cell Biol. 2012 May;44(5):738-47.

IF: 4,152

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

Stremenova J., Mares V., Lisa V., Hilser M., Krepela E., Vanickova Z., Syrucek M., Soula O., Sedo A. *Int J Oncol.* 36(2): 351-8, 2010.

IF: 2,657