

## OPONENTSKÝ POSUDEK

### „ Definition of the expression pattern of DASH system in transformed glial cells , the coupled expression of fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase-IV.“

(Ph.D. these MUDr Evy Balážiové).

Předkládaná disertační práce „Definice expresního vzorce „DASH systému“ v transformovaných gliových buňkách , koexprese proteinu aktivace fibroblastů a dipeptidylpeptidázy –IV“ v doktorském studijním programu biochemie a patobiochemie MUDr Evy Balážiové vychází z ideové studnice jejího školitele prof MUDr A. Šeda, DrSc a jeho skupiny, neboť definice „**Dipeptidylpeptidase-IV** Aktivitou a/nebo **Strukturou Homologních molekul (DASH)** se zrodila právě zde.

Disertantka se zaměřuje zejména na dva důležité příslušníky DASH skupiny – na dipeptidylpeptidasu IV (EC 3.4.14.5; DPPIV; /antigen CD26/) a na seprasu (fibroblastový aktivační protein a (EC3.4.21.B28; FAPa), které patří mezi serinové aminopeptidasy s jedinečnou reakční specifitou = post prolylovou peptidasovou aktivitou. DASH molekuly se zapojují do regulace řady biochemických a biologických procesů. Z hlediska biochemické onkologie je nejzajímavější jejich schopnost modulovat růst, diferenciaci, adhezi a metastasování nádorových buněk. Ve fázi promoce mohou DASH molekuly , zejména FAPa řídit růst nádoru zvyšováním angiogeneze a snižováním antitumorové odpovědi ze strany imunitního systému. DPPIV zase může rušit nezávislost nádorových buněk na růstových faktorech – gen DPPIV bývá řazen mezi tumor-supresorové geny. Mohu tedy konstatovat, že zvolená problematika je žhavá s velkým potenciálem pro praktické využití.

V předkládané disertační práci si autorka vytýčila 4 cíle:

1. Charakterisovat expresi a celulární topografii DPPIV a FAPa barvicími technikami v lidských buňkách glioblastoma multiforme.
2. Ověřit koexpresi DPPIV a FAPa v permanentních buněčných liniích gliomů a v primárních kulturách lidského glioblastoma multiforme.
3. Pokusit se osvětlit mechanismus sdružené exprese DPPIV a FAPa v gliomových buněčných liniích.
4. Určit vztah DPPIV, FAPa a jejich enzymových aktivit k adhesivním vlastnostem gliomových buněk vůči komponentám extracelulární matrix *in vitro*.

Studie byla provedena na biotických vzorcích gliomů i na buněčných liniích lidských gliomů (odvozených vesměs z high-grade nádorů) U138MG, U87MG a U373 získaných z ATCC. Vedle těchto základních linií byly studovány i linie transfekované cDNA pro DPPIV –klony DPPIV-U87MG a DPPIV- U373 nebo cDNA pro FAPa FAPa-U3T3 připravené v laboratoři autorky. Dále byly studovány primokultury připravované z lidských gliomů a to do jejich 12.pasáže. Po metodické stránce mohou vyzvednout využívání bohaté sady moderních

biochemických a molekulárně-biologických technik, jako jsou fluorescenční *in situ* hybridizace = FISH, reversní polymerasová řetězová reakce v reálném čase = RT-PCR, gelová chromatografie, Western blotting a zymografické postupy, ELISA, metody měřící buněčnou adhezi anebo šíření, i metody imunocytochemické a imunohistochemické. Na str. 50 je specifikováno, co autorka dělala vlastníma rukama a kterými metodickým postupy přispěli kolegové a kolegyně. Vlastní podíl autorky se blížil 90%.

Výsledky byly zveřejněny ve formě dvou vědeckých článků:

- 1) **Balážiová E**, Bušek P., Stremeňová J., Šromová L., Křepela E. Lizcová L., Šedo A.  
Coupled Expression of Dipeptidyl Peptidase-IV and Fibroblast Activation Protein  $\alpha$  in Transformed Astrocytic Cells.  
Mol Cell Biochem 354, 283-289, 2011. **(IF = 2,0)**
- 2) Bušek P, Stremeňová J, Šromová L, Hilšer M, **Balážiová E**, Kosek D, Trylčová J, Strnad H, Křepela E, Šedo A.  
Dipeptidyl Peptidase IV Inhibits Glioma Cell Growth Independent of Its Enzymatic Activity.  
Int J Biochem & Cell Biology 44, 738-747, 2012. **(IF = 4.7)**

Tím byla ve standardním recenzním řízení zahraničními oponenty potvrzena jejich platnost v mezinárodním měřítku, což umožňuje oponentovi disertační práce dosažené výsledky jen stručně vyjmenovat:

V lidském glioblastomu multiforme:

- 1) DPPIV a FAP $\alpha$  jsou exprimovány na GFAP a SOX-2 pozitivních buňkách, což svědčí pro jejich gliomový původ.
- 2) Studium celé nádorové tkáně bylo demonstrováno, že FAP $\alpha$  je rovněž exprimován na populaci mesenchymálních buněk, která je asociovaná s dysplastickými cévami v nádorovém stromatu. **Tento nálezn je originální!**
- 3) DPP-IV a FAP $\alpha$  jsou společně exprimovány na části populací gliomových buněk. Experimenty s permanentními gliomovými liniemi dokazují, že jejich sdružená exprese je důsledkem koregulace na úrovni transkripční.
- 4) Exprese DPP-IV a FAP $\alpha$  má negativní vliv na adhezi gliomových buněk.

Presentované výsledky svědčí pro možnou účast DPPIV a FAP $\alpha$  na progresi gliomů včetně ovlivnění vaskularisace.

Třetí příložená práce

Kotačková L, **Balážiová E**, Šedo A. Expression Pattern of Dipeptidyl Peptidase IV Activity and/or Structure Homologues in Cancer. Folia biologica 55, 77-84, 2009 **(IF = 1,1)** je přehledným článkem umožňujícím chápat výsledky v širším kontextu.

Dr Balážiová predložila Ph.D. these v anglickém jazyce v rozsahu 59 stran a 5 příloh publikací a posterů, rovněž v anglické verzi. Proto je nutno je posuzovat v anglickém znění a překlad názvu do češtiny je otázkou osobního citového ladění. Po technické stránce je členění práce standardní: Úvod, Cíle, Materiál a metody, Výsledky, Diskuse, Závěry, Další perspektivy, Poděkování, Literatura. Po obsahové stránce i z hlediska způsobu prezentace je práce **znameníá, srozumitelná, moderní**, metodicky bohatá, přesvědčivá a **přinášející řadu nových poznatků**. Mám jedinou výhradu - v tabulce 1 postrádám uvedení hodnot počtu měření (n=?).

Jako greenhorn v oblasti gliomů a jako pilný čtenář literatury o melanomech dovoluji si vznést dvě otázky: 1) Byl učiněn pokus studovat i normální astrocyty in vitro a pokud ano, jaké byly parametry DPPIV a FAPa ve srovnání s maligními astrocyty? 2) Uvažovala/uvažuje autorka se spolupracovníky o testování dipeptid prolin difenylfosfonátů jako potentních ireversibilních inhibitorů seprasy a DPPIV, které u melanomů vykazují silné antiinvasivní účinky?

### Závěr

S odvoláním na svrchu provedený rozbor předložené disertační práce (Ph.D. thesí) konstatuji, že recensovaná práce jednoznačně prokazuje předpoklady MUDr Evy Balážové k samostatné tvořivé vědecké práci, a tím i k udělení titulu Ph.D. za jménem.

V Praze 26.11.2012



Prof MUDr Jan Borovanský, CSc, FTI  
ÚBEO, 1.lékařská fakulta UK  
U nemocnice 5  
128 53 Praha 2