

# Posudek Ph.D. disertace

4 strany

## předkládané MUDr Evou Balážiovou

Definice expresního vzorce „DASH systému“ v transformovaných gliálních buňkách, ko-exprese proteinu aktivovaných fibroblastů a dipeptidylpeptidázy-IV.

### Celková charakteristika

Disertace má 59 A4 strojopisných stran v angličtině a 5 Příloh, dokumentujících publikační aktivitu autorky (2 primární a 1 přehledová publikace v impaktovaných časopisech a 3 posterové prezentace z mezinárodních vědeckých akcí).

### Cíle

Práce vychází z výsledků řady světových i domácího pracoviště o expresi DPP-IV a proteinu aktivovaných fibroblastů (FAP) v různých typech nádorů, vč. mozkových gliomů a o účasti těchto molekul v regulaci jejich růstových vlastností.

Cílem bylo studovat:

- (a) lokalizaci a regulaci exprese DPP-IV a FAP v lidském glioblastomech in situ a v primárních astrocytárních kulturách, odvozených z nádorových bioptických vzorků.
- (b) expresi DPP IV a FAP molekul a DPP IV-like enzymatické aktivity v transfektovaných komerčních liniových nádorových buňkách v extra situ kulturách a dopad takto vyvolaných změn na jejich růstové vlastnosti.

Tyto cíle jsou podloženy obsáhlým a výstižným úvodním přehledem současných poznatků o tzv. Dipeptidylpeptidase-IV Aktivitou a/nebo Strukturou Homologních, molekul (DASH), mezi které DPP-IV i FAP patří, vč. přehledu poznatků o jejich výskytu a funkci v nádorových buňkách.

### Biologický materiál a metodiky

Materiál. V práci byly použity bioptické vzorky glioblastoma multiforme a buněčné kultury odvozené z těchto vzorků. Dále, použity byly komerční buněčné linie U138MG a U87MG a U373, odvozené z lidských gliomů WHO grade III a IV. Buňky linie U87MG byly transfekovány genovým konstruktem DPP-IV a linie U373 i konstruktem FAP

Použité metody: Fluorescenční in situ hybridizace (FISH), konstrukce DPP-IV a FAP cDNA vektorů, buněčné transfekce, reverzní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR), enzymatické eseje, gelová filtrace a chromatografie, Western blotting a zymografie, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). Imunocytochemie a imunohistochemie. Měření adheze a rozptřeni buněk v kulturách

## Výsledky .

(1) V biopsiích glioblastomů byla DPP IV přítomna hlavně v gliovém parenchymu, zatímco v perivaskulárním kompartmentu se vyskytovala pouze sporadicky. FAP byl výrazně přítomen v obou těchto tkáňových oddílech a ve srovnatelném množství.

FAP pozitivní buňky v gliovém parenchymu biopsických vzorků obsahovaly rovněž DPP IV, Gliový Fibrilární Kyselý Protein (GFAP) a transkripční faktor SOX-2, svědčící pro neuroektodermální fenotyp těchto buněk, včetně jejich prekurzorů. Tyto buňky nevykazovaly naopak molekuly specifické pro cévní endotel a mesenchymální buňky.

Perivaskulární FAP pozitivní struktury byly, na rozdíl od parenchymu, vW, GFAP, CD105 a SOX-2 negativní a pouze se sporadickou expresí SMA, TEM-1 a fibroblastického antigenu, vážícího TE-7 protilátku, což dokládá mesenchymální povahu těchto struktur. Výskyt FAP positivity byl častější v okolí dysplastických a hypertrofických cév.

(2) V primárních kulturách odvozených z GBM byla zjištěna ko-lokalizace DPP IV a FAP proteinů a jejich mRNA. Membrane overlay assay, s použitím H-Gly-Pro-AMC, potvrdila DPP-IV-like enzymatickou aktivitu obou těchto molekul. Vyšší obsah těchto molekul byl provázen pomalejší proliferací buněk

(3) Buňky linie U87MG a U138MG ko-exprimovaly DPP-IV a FAP a jejich geny byly prokázány na chromosomu 2. V kulturách s bezsérovým médiem se DPP-IV-like enzymatická aktivita zvyšovala, spolu se vzestupem proteinu a mRNA obou studovaných těchto molekul. Podobně jako v primárních kulturách mol. hm. FAP a DPP IV byla cca 145 kDa a obě molekuly vykazovaly DPP-IV-like enzymatickou aktivitu, která byla dále analyzována gelovou filtrací.

(4) Analýza exprese FAP in DPP-IV v transfekovaných buňkách linie U87MG ukázala, že exprese proteinů těchto molekul je na sobě nezávislá.

(5) V transgenních U373 buňkách s up-regulovanou DPP-IV i FAP se snížila buněčná adheze na růstové podložky potažené kolagenem I. Tento účinek neměly mutované a enzymaticky neaktivní molekuly DPP-IV a FAP .

### **Autorka proto uzavírá:**

(1) V glioblastoma multiforme (GBM) jsou DPP-IV a FAP ko-lokalizovány na gliomových buňkách s GFAP a SOX-2

(2) Přítomnost FAP v mesenchymálních buňkách GBM je častěji vázána na dys- a hyperplastické cévy.

(3) Ko-lokalizace DPP-IV a FAP je výsledkem společné transkripční kontroly.

(4) Zvýšená exprese DPP IV a FAP v transgenních buňkách zhoršuje jejich adhezi, zatímco enzymaticky inaktivní molekuly tento efekt nevykazovaly

(5) Předpokládá se účast DPP-IV a FAP ve vaskularizaci gliomů

Zapojení DPP IV a FAP do sítě molekul účastnících se degradace molekul extracelulární matrix je shrnut v závěrečných Perspektivách a Fig.9.

### Otázky a komentáře

Moje dotazy se týkají převážně cytologické části disertace.

**Dotaz 1:** Jaká byla reprezentativnost bioptických vzorků pro celý GBM? Byla exprese DPP IV a FAP v parenchymu stejná v jednotlivých vzorcích a přítomna u všech pacientů? Byl cévní endotel vždy DPP IV a FAP negativní? Byly sledovány nějaké známky aktivace endotelu?

**Dotaz 2:** Co považuje autorka za možnou primární příčinu vyvolávající zvýšení DPP-IV a FAP v gliomech in situ? Co je možný/pravděpodobný strukturální nosič/senzor?

**Dotaz 3** Jsou v literatuře informace o tom, zda DPP-IV je exprimována v nezralých neádorvých gliových buňkách, či podobně jako FAP ve fibroblastech, se její aktivita zvyšuje v diferencované glii po fyziologické či patologické zátěži?

**Dotaz 4** Byla sledovaná korelace DPP-IV a FAP s pat-anat nálezy či klinickým průběhem pacientů s GBM (proliferace, nekrózy, vaskularizace, EGFR, Ki67, doba přežití a pod) ?

Práce je velmi pečlivě, přehledně a čtivě zpracovaná, a to jak v anglické části, tak v českém souhrnu.

K formální stránce disertace, nicméně, poznamenávám:

1. V relativně podrobném popisu materiálu ve strojopisné část disertace není uveden zdroj a pat-anat charakteristiky biopsií a jejich případná variabilita v rámci nádoru. U komerčních gliomových linií nejsou uvedeny počty předchozích pasáží, což může být důležité při reprodukci experimentů v jiných laboratořích.
2. Ve výčtu perivaskulárních struktur postrádám astrocytární obaly mozkových cév a extravasální mononukleáry.
3. V Tab.1 by mohla být citace na DASH molekuly v meningeomech, kde je jiné jejich zastoupení než v gliomech (Stremeňová et al. 2010).
3. Mikrofotografická dokumentace imunocytochemicky detekovaných molekul cévního řečiště v GMB je málo zřetelná. Pomohlo by označení a bližší fenotypická specifikace imunopozitivních struktur v těchto obrázcích.
4. Proč se v práci, s výjimkou Fig.8, nevyskytuje akronym CD26?

Závěr

Předložená disertace představuje ucelený soubor prioritních poznatků o lokalizaci DPP IV a FAP v neuroektodermálním a mesenchymálním kompartmentu glioblastomů mozku, jejich expresi na genomové úrovni a dopadu na růstové vlastnosti buněk v extra situ kulturách.

Disertace je jasně a výstižně napsána/sestavena.

Disertace je tématicky velmi kompaktní a je v ní patrné soustředěné úsilí cíleně řešit úlohu DASH molekul v nádorových buňkách mozku.

Výsledky byly publikovány v kvalitních mezinárodních časopisech.

Vyzdvihnout je třeba náročný multimetodický a mezioborový přístup.

Studovaná tematika je nesporně velmi perspektivní a závažná pro experimentální a klinickou onkologii.

*Předloženou disertaci doporučuji k obhajobě a udělení vědecké hodnosti*

*Ph.D.*

*v oboru*

*Biochemie a patobiochemie*



Doc. MUDr Vladislav Mareš, DrSc  
Fyziologický ústav AV ČR, Praha  
Přírodovědecká fakulta Univerzity J.E.Purkyně, Ústí n.Labem

26. 11. 2012