

Oponentský posudek disertační práce Petra Buška „The role of dipeptidyl peptidase-IV in glioma cell growth“

Disertační práce Petra Buška se zabývá vlivem exprese a aktivity peptidasy a povrchového markeru DPP IV (CD26) na růst, migraci a adhezi gliomových buněk na jedné straně, a na druhé na aktivaci signálních kaskád vlivem zvýšené exprese nebo aktivity DPP IV. Autor použil tři různé gliomové buněčné linie transfekované plasmidem umožňujícím indukovatelnou expresi DPPIV, a s využitím řady method buněčné biologie (real-time PCR, Western blot, konfokální mikroskopie, průtoková cytometrie aj.) zjistil, že exprese DPP IV zpomaluje růst lidských gliomových buněk a vede k jejich snížené adhezi a migraci *in vitro*. Kontrolními pokusy s použitím specifického inhibitoru DPP IV ověřil, že aktivita DPP IV má vliv na vnitrobuněčnou signalisaci spuštěnou substancí P. Současně ukázal, že vliv DPP IV na růst nádorových buněk nemusí nutně souviset s funkcí DPP IV jako proteolytického enzymu. Autor tak svůj oblíbený enzym vlastně zařazuje do skupiny melouchařících enzymů („moonlighting enzymes“), které vedle své hlavní enzymové aktivity nepozorovaně provozují i jinou funkci, často ještě důležitější než ta původní, lehce měřitelná a tedy známější. Ukazuje se, že příroda v evoluci využívá identické nebo podobné strukturní motivy k řadě velmi rozličných funkcí, a dokonce i identické proteiny využívá v různých buněčných kompartmentech nebo tkáních k velmi odlišným úkolům. Studium takových proteinů, ke kterým musíme funkci teprve přiřadit, je samozřejmě mnohem náročnější a méně „výnosné“ než studium proteinů a modelů s ověřenou funkcí pomocí spolehlivé metodiky. Rád bych ocenil, že se kandidát touto obtížnější cestou vydal.

Práce má 49 stran, napočítal jsem v ní 10 obrázků a je k ní přiloženo 6 příloh (dvě původní práce v recensovaných mezinárodních časopisech, kapitola sborníku, review, plakátové sdělení z mezinárodní konference a sdělení z domácí studentské konference). Osobně považuji uvádění plakátových sdělení a příspěvků na konferencích v disertační práci za zbytečné. Tato práce je nepotřebuje, zbytečně rozměňují výsledky presentované v recensovaných časopisech. Výsledky jsou v hlavní části disertace stručně, ale dostatečně

jasně vysvětleny a dokumentovány, diskuse je zajímavá a dobře podložená, obzvláště se mi líbily „výhledy do budoucna“.

Práce je formálně zpracována velmi dobře, překlepy a typografické chyby tam buď nejsou, a nebo neruší, takže jsem si jich nevšiml. Je napsaná (pokud to jsem schopen posoudit) dobrou a srozumitelnou angličtinou.

Četba této disertační práce ve mně vyvolala následující otázky a náměty:

- ověřoval autor, jestli exprese mRNA (kvantifikovaná pomocí RT-PCR) dobře koreluje s expresí příslušných proteinů?
- Buňky U373 mají měřitelnou DPP IV aktivitu, přesto (skoro) neexprimují příslušnou mRNA (Obr. 1, str. 20). Jak to?
- Na obr. 2D (str. 21) dokazuje autor membránovou i cytoplasmatickou expresi DPP IV snímkem buněk s imunofluorescenční detekcí. Byl proveden pokus s permeabilisací membrán?
- Jak ochotně a s jakou specificitou štěpí DPP IV substanci P? Jsou k tomu literární údaje? Přesvědčil se autor nějakým přímým experimentem (HPLC analýza a pod.), že ke štěpení peptidu dochází i v jeho případě?
- Existuje gliomová buněčná linie bez endogenní exprese DPP IV?
- Lze ovlivnění migrace gliomových buněk DPP IV zablokovat inhibicí diprotonem A?
- Jsou heterodimery DPP IV a proteinu FAP (jejichž exprese, jak autor ukazuje, v buňkách vystavených stejným vlivům koreluje) enzymově aktivní?

Těším se na odpovědi. Závěrem bych rád konstatoval, že práci Petra Buška považuju za kvalitní základ k další cestě za odhalením role DPP IV ve vývoji nádorů, a plně ji doporučuji jako podklad pro další řízení k udělení hodnosti PhD.

V Praze, 14.6. 2009

Jan Konvalinka

