Posudek PhD disertace

„Dipeptidylpeptidáza-IV a Fibroblastový aktivační protein v gliomagemezi¨

Předkládané Mgr. Janou Trylčovou, Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1.LF UK, Praha.

Školitel prof. MUDr Aleksi Šedo, DrSc

Práce má 70 stran strojopisu v češtině se standartním členěním textu.Přiloženy jsou kopie 3 časopiseckých primárních publikaci v angličtině.

Celková charakteristika

Cílem práce bylo analyzovat úlohu „Dipeptidylpeptidázy-IV (DPP-IV) a Fibroblastovéhp aktivačního proteinu (FAP) v genezi a růstových vlastnostech mozkových gliomů vyššího stupně malignity.Téma práce je vysoce aktuální vzhledem k infaustnímu průběhu tohoto onemocnění.

Vzhledem k vysoké tkáňové a buněčné pleomorfii gliomů vyššího stupně malignity, autorka analyzovala úlohu uvedených 2 proteinů ve zjednodušených experimentálních podmínkách tj. v buněčných kulturách lidských gliomových buněk a nádorových a nenádorových fibroblastů a jejich růstovým chováním po transplantaci do mozku imunodeficientních myší

Výsledky

1.Byla úspěšně připravena stabilní transfekovaná lidská glioblastomová buněčná linie U373, exprimující enzymově neaktivní a aktivní FAP, s možností aktivace exprese transgenu doxycyklinem. Úspěšnost transfekce byla prokázáná zvýšením DPP IV-like exopeptidázové aktivity i expresí mRNA, a to jak pro enzymaticky aktivní, tak neaktivní FAP protein. Transfekce této linie (U373) vektorem pro kanonickou DPP-IV byla méně úspěšná a autorka proto v další práci používala dříve již jí transfektovaný klon této gliomové linie, exprimující membránovou kanonickou DPP IV. Tento klon úspěšně označila transfekcí fluorescentním vektorem (pcDNA4 s mKate2). Exprese transgenů byla ověřena transplantací do mozku myší, kde po jejich aktivaci doxycyklinem, vyvolal nádor s vysokou enzymatickou aktivitou kanonické DPP IV i proteinu FAP .

2.Kokultivace netrasfektovaných buněk U87, U373 a T98G s kondiciovaným médiem z kultur nádorových fibroblastů výrazně zvýšila jejich proliferaci a chemotakticky indukovanou migrační aktivitu přes mikroporézní insert v kultivační nádobce. Supernatant z kultur nenádorových fibroblastů zvýšil pouze prolifearaci. Tyto výsledky autorka považuje za doklad úlohy látek vylučovaných fibroblast nádorového stromatu na parenchymové buňky nádoru, která by se mohla uplatňovat i v in situ podmínkách (?)

3. Pilotní pokusy s kotransplantací transfektovaných netransfekovaných gliomových buněk (U373 a U87) a nádorových a nenádorových fibroblastických buněk do mozku dospělých myší potencovala růst nádorů.

Větší růstový efekt vykazovala suspense U87 a nádorových fibroblastů než suspense nádorových fibroblastů s gliomovými buňkami U373.

Otázky k diskusi

1.Proč byly zvoleny gliomové linie U373 a U87? Liší se jejich výchozí morfologie, růst, chemoarchitektonika, vč. exprese DPP IV a případně i další vlastnosti (kromě uváděné nezměněné proliferace a adheze) od transfektovaných klonů?

2. Jak lze vysvětlit násobně větší vzestup doxocyklinem aktivovaného obsahu mRNA pro protein FAP v buňkách s mutovaným/enzymaticky neaktivním transgenem než genem aktivním (p. 45, obr 6)?

3. Byly/budou sledovány některé anaplastické změny buněk v kulturách a v transplantovaných tumorech (ohraničenost, apoptozy, morfologická pleomorfie, vícejadernost, nekrózy, některé molekulární markery (např. GFAP, p53, Ki67, PTEN(y), integriny, např. alfa7beta 1 apod.)?

Formální připomínky

-- Bohatější cytologická dokumentace bych považoval za přínosnou. Ojedinělé mikrofotky U87 na str.49,obr.9) jsou velmi malé, až nečitelné.

--Není uváděn počet pasáží gliomových buněk před transfekcemi, případně jejich zdroj pro jednotlivé pokusy, což by mohlo být prospěšné pro navazující podobné pokusy

-- Legislativa pro práci se zvířaty (p.38) by měla být uvedena přesněji.

-- Hodnocení početního růstu populací extinkcí metylenovou modří obarvených buněk (p.35) nelze považovat za spolehlivý ukazatel počtu buněk, např. vzhledem např. k jejich možné hypertrofické nebo hydrotropické reakci apod.

Celkové hodnocení

Práce je tématicky vysoce aktuální, stanovené cíle byly splněny. Práce je provedena na vysoké multi-metodické úrovni a je dostatečně bohatá na původní poznatky, které byly publikovány v mezinárodních časopisech. Otevírá cestu pro racionálnější studium geneze a výhledově i léčbu maligních mozkových nádorů.

Autorka osvědčila schopnost zpracování a dalšího tvůrčího rozvíjení vědeckých poznatků v dané vědní oblasti

Práci doporučují k obhajobě vědecké hodnosti PhD v oboru Biochemie a patobiochemie

Doc.MUDr Vladislav Mareš,DrSc
Katedra biologie
Přírodovědecká Fakulta
Universita J.E. Purkyně
Ústí nad Labem

19.12.2017