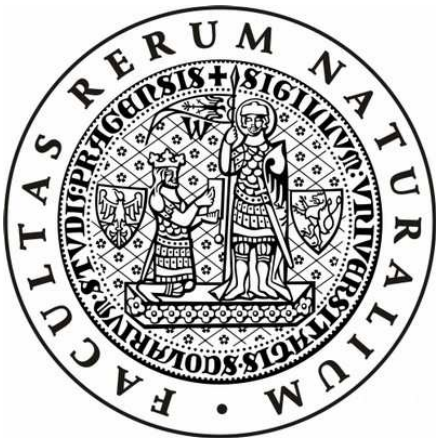
KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Laboratoř biologie nádorové buňky, společné pracoviště UK LF1 a FgU AV ČR



Model experimentálně regulovatelné exprese dipeptidylpeptidasy IV v gliomových buněčných liniích

Model of experimentally regulated expression of dipeptidyl peptidase IV in glioma cell lines

Jana Němečková

Praha 2009

Vedoucí diplomové práce:

Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.
Ústav biochemie a experimentální onkologie UK LF1
Laboratoř biologie nádorové buňky, společné pracoviště
UK LF1 a FgU AV ČR.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury a pod vedením svého školitele.

Praha 2009 Jana Němečková

Poděkování:

Především bych ráda poděkovala Prof. MUDr. Aleksi Šedovi, DrSc., za vedení mé práce, trpělivost a ochotu vždy poradit a pomoci. Mé poděkování patří všem kolegům z Laboratoře biologie nádorové buňky za jejich praktické rady, uvedení do studované problematiky a přátelskou atmosféru během naší práce. Zvláště bych chtěla poděkovat Ivaně Vomelové a Evženu Křepelovi za purifikaci RNA a real time RT-PCR, dále Jarmile Stremeňové za pomoc při metodě MACS a Lucii Šromové za provedení průtokové cytometrie.

Mé poděkování patří Daliboru Koškovi a Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, CSc. za přípravu vektorů a DNA inzertů.

Ráda bych poděkovala své rodině za její neúnavnou podporu během celého mého studia.

Tato práce byla vytvořena za podpory výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM 0021620808.

Abstrakt

„Dipeptidylpeptidase IV aktivitou a/nebo strukturou homologní“ (DASH) molekuly představují nově definovanou skupinu multifunkčních molekul, z nichž většina nese hydrolytickou aktivitu podobnou dipeptidylpeptidase IV (DPPIV, EC 3.4.14.5, identická s diferenciačním antigenem lymfocytů CD26), která odštěpuje X-Pro dipeptidy od N-konce peptidů a bílkovin. Dosavadní poznatky svědčí o významu těchto molekul v procesech vzniku a rozvoje řady nádorových onemocnění.

Cílem práce je (i) přehled problematiky DASH molekul a jejich funkčních substrátů v nádorech odvozených z neuroektodermu a (ii) příprava stabilně transfekovaných lidských glioblastomových buněčných linií s indukovatelnou expresí DPPIV. Pro tuto práci byly připraveny originální vektory s lidským genem DPPIV a s její v aktivním centru mutovanou formou pro posouzení významu vlastní enzymové aktivity výsledného produktu. Transgenní buněčné linie umožní studovat biologické úlohy DPPIV v procesech vzniku a rozvoje nádorů odvozených z neuroektodermu – v buněčném růstu, invazi a migraci na úrovni vlastní transformované buňky v modelu *in vitro* a v komplexním systému *in vivo* po homotopní implantaci do imunodeficientní myši. Vzniklé buněčné linie budou tedy použity jako nástroj studia jak „autokrinního“ významu DPPIV pro vlastní exprimující transformované buňky, tak i jejího „parakrinního“ působení na úrovni nádorového mikroprostředí.

Klíčová slova: Dipeptidylpeptidase IV aktivitou a/nebo strukturou homologní“ molekuly, dipeptidylpeptidasa IV, transfekce, nádorová onemocnění

Abstract

"Dipeptidyl peptidase IV Activity and/or Structure Homologues" (DASH) represent a newly defined group of multifunctional molecules, typically bearing dipeptidyl peptidase IV-like hydrolytic activity. Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV, EC 3.4.14.5, identical to CD26) cleaves out X-Pro dipeptides from the N-terminus of peptides. Recent knowledge shows substantial role of DASH in cancer pathogenesis.

Here we present (i) an overview of the issue of DASH molecules and their functional substrates in the neuroectodermal tumor and (ii) a preparation of stable transfected human glioblastoma cell lines with inducible gene expression of DPPIV. Vectors containing human DPPIV gene and its mutated form in the catalytic active site have been prepared to assess the importance of the enzymatic activity of the final product. This will enable us to study the biological role of DPPIV in genesis and progression of neuroectodermal tumors – cells growth, invasion and migration of transformed glial cells *in vitro*. Moreover, complex role of DPPIV will be studied using a model of homotopic application of transfected cells into the brain of immunodeficient mice.

Prepared cell lines provide more consistent information about DPPIV from the point of view of its „autocrine" importance for the expressing cells, as well as its potential „paracrine" effect „on other insiders/bystanders" within the tumor.

Key words: Dipeptidyl peptidase IV Activity and/or Structure Homologues, dipeptidyl peptidase IV, transfection, neoplasia

Obsah

SEZNAM ZKRATEK **8**

1. ÚVOD **10**

2. DASH MOLEKULY V NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍCH **12**

2.1. DIPEPTIDYLPEPTIDASA IV (DPPIV) 13
2.2. FIBROBLASTOVÝ AKTIVAČNÍ PROTEIN ALFA (FAP-A, SEPRASE) 16
2.3. „QUIESCENT CELL“ PROLINOVÁ DIPEPTIDASA (QPP, DPPII) 18
2.4. DIPEPTIDYLPEPTIDASA 8 (DPP8) 18
2.5. DIPEPTIDYLPEPTIDASA 9 (DPP9) 19
2.6. DIPEPTIDYLPEPTIDASA 6 (DPP6) 19
2.7. DIPEPTIDYLPEPTIDASA 10 (DPP10) 19

3. REGULAČNÍ PEPTIDY– DASH SUBSTRÁTY V NÁDORECH **20**

3.1. NEUROPEPTID Y (NPY) A PEPTID-YY (PYY) 21
3.2. SUBSTANCE P (SP) 21
3.3. CHEMOKINY 22
3.4. GASTRIN RELEASING PEPTID (GRP) 24
3.5. HORMON UVOLŇUJÍCÍ RŮSTOVÝ HORMON (GHRH) 24
3.6. GLUKAGONU PODOBNÝ PEPTID 1 (GLP-1) 24

4. STUDIUM PROTEINŮ – METODY TRANSFEKCE **26**

5. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE **30**

6. MATERIÁL A METODY **31**

6.1. LABORATORNÍ MATERIÁL 31
6.1.1. Laboratorní přístroje a pomůcky *31*
6.1.2. Spotřební materiál *31*
6.1.3. Chemikálie, roztoky *32*
6.2. BUNĚČNÉ KULTURY 33
6.2.1. Trypsinizace/pasážování *33*
6.2.2. Selekční antibiotika pro transfekované buňky *34*
6.2.3. Mražení buněk *34*
6.2.4. Rozmrazování buněk *35*
6.2.5. Stanovení počtu buněk *35*
6.2.6. Sběr buněk PBS/EDTA *35*
6.2.7. Příprava buněčných lyzátů *35*
6.3. PŘÍPRAVA VEKTORŮ, TRANSFEKCE A USTANOVENÍ STABILNÍCH TET ON BUNĚČNÝCH LINIÍ 36
6.3.1. Vektory *36*
6.4. TRANSFEKCE A SELEKCE TET-ON-ADVANCED STABILNÍCH BUNĚČNÝCH LINIÍ…. 37
6.4.1. Testování indukovatelnosti Tet-On Advanced klonů *38*
6.4.2. Transfekce a selekce Tet-On-Advanced buněčných linií obsahujících pTRE-Tight-CD26 ..... *38*
6.5. MAGNETIC-ACTIVATED CELL SORTING (MACS) 39
6.6. BIOCHEMICKÉ STANOVENÍ ENZYMATICKÉ AKTIVITY DPPIV 40
6.7. ENZYME-LINKED IMMUNOASSAY (ELISA) PRO LIDSKOU DPPIV/CD26 40

6.8. STANOVENÍ BUNĚČNÉ PROLIFERACE 40
6.9. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE 41
6.10. IZOLACE A KVANTIFIKACE CELKOVÉ RNA, REAL TIME RT-PCR 41
6.11. STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINU 42
6.12. STANOVENÍ LUCIFERÁZOVÉ AKTIVITY 43
7. VÝSLEDKY 44
7.1. PŘÍPRAVA PLAZMIDU 44
7.2. TRANSFEKCE BUNĚK 47
7.3. PŘÍPRAVA DVOJITĚ TRANSFEKOVANÝCH TET-ON-ADVANCED BUNĚČNÝCH LINIÍ S PTRE-TIGHT-DPPIV VEKTOREM 49
7.3.1. Buněčná linie U373MUT 49
7.3.2. Buněčná linie U373OnDPPIV 53
7.4. VLIV DOXYCYKLINU NA U373MG A EXPRESE DPPIV PROTEINU V U373MUT PF 54
8. DISKUZE 56
9. ZÁVĚR 61
10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 62

Seznam zkratek

ADA	Adenosindeaminasa
BSA	Hovězí sérový albumin
CD26	Diferenciační antigen lymfocytů, znám také jako DPPIV
DASH	Dipeptidylpeptidase IV aktivitou a/nebo strukturou homologní molekuly
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxycyklin
DPP	Dipeptidylpeptidasa
ECM	Extracelulární matrix
EDTA	Kyselina ethylen-diamin-tetraoctová
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting/selekce buněk aktivovaná fluorescencí
FAP-α	Fibroblastový aktivační protein alfa
f.c.	Výsledná koncentrace
FBS	Fetální hovězí sérum
GHRH	Hormon uvolňující růstový hormon
GLP-1	Glukagonu podobný peptid 1
GRP	Gastrin releasing peptid/gastrin uvolňující peptid
MACS	Magnetic-activated cell sorting/magnetická separace buněk
mDPPIV	Mutovaná forma DPPIV
MFI	Medián intenzity fluorescence
NF	Negativní frakce
NPY	Neuropeptid Y
OD	Optická denzita
PBS	Fosfátový pufr
PF	Pozitivní frakce
PYY	Peptid-YY
RANTES	“Regulated on Activation Normal T-cell expressed and Secreted”
RT-PCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
rtTA	Reverse Tc-controlled transactivator/reverzní tetracyklinem kontrolovaný transaktivátor
SDF-1	Stromal cell-derived faktor 1
SP	Substance P
T98G	Lidská gliomová buněčná linie
T98GOn	Transfekované buňky T98G vektorem pTet-On-Advanced
U373MG	Lidská gliomová buněčná linie
U373MUT	Transfekované buňky U373MG vektorem pTre-Tight s mDPPIV
U373On	Transfekované buňky U373MG vektorem pTet-On-Advanced

U373OnDPPIV	Transfekované buňky U373MG vektorem pTre-Tight s wt DPPIV
WHO	Světová zdravotnická organizace
wt	Wild type/divoký typ

1. Úvod

Proteolytická posttranslační úprava patří mezi základní mechanismy kontrolující funkci biologicky aktivních peptidů, včetně těch, které se podílejí na regulacích komplexních procesů buněčné transformace, proliferace, migrace nádorových buněk a angiogeneze. Tím se řada proteas významně účastní na kontrole nádorové progrese a vzniku metastáz [Carl-McGrath et al, 2004].

Vzhledem k jedinečné struktuře prolinu mezi ostatními aminokyselinami, peptidová vazba na níž se prolin podílí, je relativně rezistentní proti štěpení běžnými proteasami. Řada biologicky aktivních peptidů obsahuje prolinový zbytek jako vývojově konzervovaný regulační prvek a pouze omezený počet peptidas je schopen hydrolyzovat tuto vazbu [Vanhoof et al, 1995].

Dipeptidylpeptidasa IV (DPPIV, EC 3.4.14.5, identická s diferenciačním antigenem lymfocytů CD26) byla po mnoho let považována za jedinou membránově vázanou proteasu, schopnou odštěpovat X-Pro dipeptidy od N-konce peptidů a bílkovin. V současné době byla ovšem popsána celá skupina “Dipeptidylpeptidase IV aktivitou a/nebo strukturou homologních” (DASH) molekul. Kromě DPPIV zahrnuje několik dalších molekul nesoucích podobnou enzymatickou aktivitu a dále i několik DPPIV strukturou podobných, ale hydrolyticky neaktivních molekul [Šedo & Malík, 2001]. Tato skupina obsahuje například seprasu, fibroblastový aktivační protein alfa, dipeptidylpeptidasy 6, 8, 9, N-acetylovanou-alfa-vázanou kyselou dipeptidasu I, II a L, "Quiescent cell" prolinovou dipeptidasu a thymus-specifickou serinovou proteasu. Podobná enzymatická aktivita molekul v rámci DASH skupiny vede k předpokladu jejich společné účasti na biologických funkcích zprostředkovaných štěpením, a tím změnou signálního významu biologicky aktivních peptidů - substrátů DASH molekul.

Současné práce mnoha autorů poukazují na široké spektrum nádorových onemocnění ve spojení se skupinou DASH molekul a pokoušejí se vysvětlit jejich význam v rozvoji nádorů. Funkční studie většiny DASH molekul v nádorové patogenesi jsou dosud nedostatečné. Jejich závěry zůstávají zatím v mnoha případech spekulativní.

Tato práce přináší současný přehled o molekulách DASH a jejich substrátech v nádorových onemocněních se zaměřením na nádory neuroektodermu, tedy nervové soustavy a struktur odvozených z buněk neurální lišty.

2. DASH molekuly v nádorových onemocněních

Nádorová transformace, jakožto podklad neoplastických onemocnění, je mnohastupňový proces vedoucí k narušení normální kontroly růstových vlastností buněk a řady mezibuněčných interakcí. Podstatou přechodu od normálního k transformovanému fenotypu jsou obecně poruchy funkcí dvou tříd genů: onkogenů a tumor-supresorových genů [Louis et al, 1995].

Tato práce je zaměřena na nádory neuroektodermálního původu, které vycházejí především z buněk gliálního původu. Do této skupiny patří ependymální buňky (které dávají po své transformaci vznik ependymomům a subependymomům), dále oligodedrocyty (a následně jejich neoplastická forma oligodendrogliomy) a astrocyty (dávající vznik astrocytomům – nejčastěji vyskytujícím se nádorům centrální nervové soustavy).

Během normálního vývoje mozku dochází k diferenciaci neuroepitelových prekurzorových buněk, které zahrnují i neurální kmenové buňky. Pochopení procesu gliogenese povede k objasnění buněčných a molekulárních mechanismů gliomagenese a možného návrhu nových léčebných terapií gliomů, zvláště jeho nejzávažnější formy, glioblastoma multiforme. Obecně se při gliomagenesi předpokládá deregulace signálních drah receptor-tyrozinových kináz a jejich ligandů – růstových faktorů. V zájmu studia stojí proteiny podílející se na regulaci průběhu buněčného cyklu: p16-cdk4-pRb a ARF-MDM2-p53 [Soni et al, 2005; Tabu et al, 2006].

Přes intenzivní studium zůstávají patogenetické mechanismy gliomagenese dosud nedostatečně objasněny a maligní gliomy z hlediska klinické medicíny představují vzhledem k velmi špatné prognóze *quod vitam* stále závažný problém [Ohgaki et al, 2005, Parsons et al, 2008].

Mnoho primárních lidských mozkových nádorů vykazuje navýšení exprese proteas – serinových, cysteinových a metalloproteas, které usnadňují penetraci transformovaných buněk přes bariéry pojivových tkání. Proteolytické enzymy se tak podílejí na invazivní povaze maligních tumorů lokální destrukcí a narušením sousedící normální tkáně [Rao, 2003].

Signifikantně zvýšená exprese proteas v nádorech různého původu svědčí o významu těchto molekul v nádorové progresi. Nedávno popsaná koexprese

některých DASH molekul společně s receptory jejich biologicky aktivních substrátů naznačuje význam koregulace těchto funkčně souvisejících molekul [Ma et al, 2007]. DASH molekuly se podílejí na regulaci růstových vlastností transformovaných gliálních buněk, a proto je předpokládán jejich vztah ke vzniku a rozvoji mozkových nádorových onemocnění [Šedo et al, 2008].

Ačkoliv funkční mechanismus uplatnění DASH molekul v gliomagenesi není zcela jasný, některé výsledky poukazují na souvislost regulace se signální osou chemokinu SDF-1 a jeho receptoru CXCR4 s DPPIV [Busek et al, 2008b]. Dosud publikované práce většinou nepopisují původ DASH molekul z hlediska exprimující buněčné populace v rámci nádorového mikroprostředí. Přitom lze předpokládat, že funkční důsledky exprese DASH molekul se mohou *in vivo* realizovat nejen na úrovni vlastní exprimující buňky, ale i „parakrinně“, v rámci různých buněčných, stromálních i transformovaných subpopulací obsažených v nádoru [Šedo et al, 2008; Wen & Kesari, 2008]. Tímto může docházet k proteolytické úpravě konkrétního biologicky aktivního peptidu jednou buněčnou populací, vedoucí k modifikaci biologické odpovědi jiné buněčné populace, ve vztahu „poskytovatel-klient“ [Busek et al, 2008a].

2.1. Dipeptidylpeptidasa IV (DPPIV)

Dipeptidylpeptidasa IV (obrázek 1) je v současné době nejvíce prozkoumanou molekulou ze skupiny DASH molekul. DPPIV je vysoce glykosylovaná serinová proteasa se širokou tkáňovou distribucí.

DPPIV je transmembránový protein, v krevní plazmě a seminární tekutině můžeme najít její solubilní formu, která nemá intracelulární a transmembránový segment [De Meester et al, 2000]. Katalytická triáda DPPIV je složena z následujících aminokyselinových zbytků: Ser^{630}, Asp^{708} a His^{740}, které se nacházejí v rámci 140-ti posledních aminokyselin C-terminálního regionu. Ser^{630} se nachází v „nukleofilní obálce“ formované ze zbytků Gly-Trp-Ser^{630}-Tyr-Gly. Tato sekvence je esenciální pro hydrolytickou aktivitu DPPIV [Ogata et al, 1992]. V případě řady transmembránových dipeptidylpeptidas je glykosylace podmínkou jejich enzymatické aktivity a správného proteinového sbalení. Krystalografické studie DPPIV odhalily zřejmou N-glykosylaci devátého Asn zbytku v molekule. Nicméně důležitost každého glykosylačního místa pro fyziologicky významné reakce, jako

například pro vlastní hydrolytickou funkci, formaci dimerů a vazbu na adenosindeaminasu (ADA), zůstává nadále ne zcela objasněna [Aertgeerts et al, 2004]. Další autoři objasnili mutačními studiemi význam konzervovaných aminokyselinových zbytků pro správné proteinové sbalení, glykosylaci a buněčný transport krysí DPPIV, vysoce příbuzné molekuly s lidskou DPPIV [David et al, 1999; Dobers et al, 2000].

DPPIV je multifunkční molekula, svojí dipeptidylpeptidasovou aktivitou vykonává řadu imunoregulačních funkcí, mnoho úloh zastává v metabolismu živin a v patogenesi diabetu mellitu [Aytac et al, 2004; De Meester et al, 2000; Van Damme et al, 1999]. Zprostředkovává kontakt buňka – buňka, buňka – extracelulární matrix (ECM), působí rovněž jako koreceptor pro HIV a podílí se na některých mechanismech signální transdukce. Cestou řady z výše zmíněných mechanismů se DPPIV uplatňuje v procesech buněčné proliferace, diferenciace, nádorové transformace a apoptózy [Šedo & Malík, 2001].

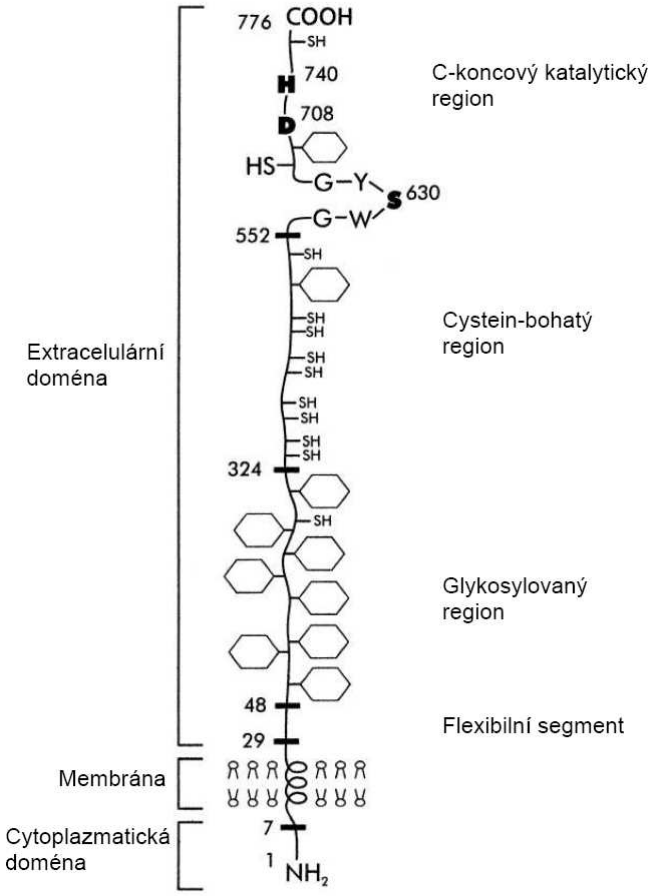
Jedním z předpokládaných mechanismů, jímž se DPPIV účastní vzniku a rozvoje nádorových onemocnění, je její schopnost vazby ke kolagenu a fibronektinu; interakce DPPIV s proteiny ECM je významná jak pro cílení lymfocytů, tak pro některé případy orgánově specifického metastazování [Dang & Morimoto, 2002; Kikkawa et al, 2003, 2005].

V práci autorů Dang & Morimoto [2002] je přehledně popsána též řada úloh DPPIV nezávislých na její enzymatické aktivitě. Lidská DPPIV fyzicky interaguje s ADA, což je významné pro některé imunoregulace. Sekvence šesti aminokyselin intracelulární domény DPPIV je patrně příliš krátká pro přímé spojení s dalším intracelulárním signálním partnerem. Jedním z možných mechanismů je proto předpokládána interakce DPPIV s membránově vázanou protein–tyrozin fosfatasou CD45 nebo již zmíněnou ADA [Tanaka et al, 1994; Aytac et al, 2004].

Změna exprese DPPIV byla doposud popsána v bioptickém materiálu z mnoha lidských tumorů, kde například v případě karcinomu prostaty, plic, štítné žlázy, endometria a melanomu je považována za možný pomocný diagnostický ukazatel [Bušek et al, 2004; Tanaka et al, 1995].

V případě malignit vycházejících z neuroektodermu byla DPPIV dosud studována zejména v maligním melanomu a v transformovaných nervových a gliálních buňkách. DPPIV je exprimována buňkami melanocytů, ale nikoliv jejich maligně transformovanou formou. DPPIV může hrát roli v regulaci růstu

melanocytů/melanomových buněk snad pomocí limitované proteolýzy rozhodujících růstových faktorů [Houghton et al, 1988; Morrison et al, 1993].



Obrázek 1: DPP-IV je transmembránový protein II, skládající se ze šesti aminokyselinové intracelulární domény, extracelulární doménou s krátkým flexibilním segmentem a C-koncovým regionem se serin-proteasovým typem katalytického centra. Serin[630] tvoří katalytickou triádu s kyselinou asparagovou[708] a histidinem[740]. Upraveno dle Mentlein, 1999.

Wesley et al. [1999] popsala restauraci nemaligního fenotypu buněk lidského melanomu po experimentálně navozené re-expresi DPPIV v mezích srovnatelných s normálními melanocyty. Důsledkem bylo potlačení schopnosti tumorigenese, navození diferenciace a normalizace závislosti na exogenních růstových faktorech. Ačkoliv enzymatická aktivita je v případě melanocytů nezbytná pro řadu biologických funkcí DPPIV, bodovou mutací aktivního centra nebylo ovlivněno vlastní přežití buňky. Podobný efekt poklesu nebo úplné ztráty exprese DPPIV a její enzymatické aktivity byl pozorován v neuroblastomech, maligních tumorech vycházejících ze struktur odvozených z neurální lišty. *In vitro* obnovení exprese DPPIV vedlo k inhibici proliferace neuroblastomových buněk, a tím k potlačení některých rysů maligního fenotypu buněk [Arscott et al, 2009].

V souladu s výše uvedenými výsledky je práce skupiny Pethiyagody, potvrzující absenci exprese DPPIV téměř ve všech zkoumaných buněčných liniích melanomů a její inverzní vztah ke schopnosti invaze. Ve své studii porovnává melanomové buňky transfekované a netransfekované vektorem pro DPPIV. Zatímco netransfekované – maligní buňky vykazovaly značnou schopnost invaze, transfektanty exprimující DPPIV této schopnosti pozbyli, přičemž vlastní hydrolytická aktivita ani intaktní cytoplazmatická doména patrně nejsou podmínkou tohoto efektu [Pethiyagoda et al, 2000].

Schopnost DPPIV snížit invazivitu maligních melanomových buněk není vždy provázena ztrátou schopnosti tvořit nádory. DPPIV může mít protinádorové vlastnosti pokud je exprimována v raných stádiích nádorů, kde zvyšuje potřebu adheze pro růst buněk, podporuje morfologickou rediferenciaci a obnovuje potřebu exogenních růstových faktorů. Na druhé straně, Pethiyagoda et al. [2000] jasně demonstroval, že exprese DPPIV v pokročilém stádiu tumoru s vysokým potenciálem pro tvorbu metastáz již nesnižuje buněčnou invazi a nemá ani jiný zjevný protinádorový efekt.

Významná část DPP aktivity v gliomech je důsledkem zvýšené exprese kanonické DPPIV. Navýšení enzymatické aktivity bylo popsáno v tkáních pocházejících z tumorů s vyšším stupněm malignity dle WHO. Výsledky enzymových inhibičních studií vedou k předpokladu spolupůsobení DPPIV a FAP-α molekul [Stremenova et al, 2007].

Závěrem je možno říci, že DPPIV představuje molekulu schopnou v závislosti na daném buněčném systému či orgánu a fyziologických či patologických okolnostech vykonávat různými mechanismy řadu funkcí. Deregulace její exprese a/nebo enzymatické aktivity může přispívat k rozvoji nádorů jak přímo, na úrovni transformované buňky, tak i nepřímo v rámci svého imuno-modulačního potenciálu a vlivu na neovaskularizaci [Bušek et al, 2004].

2.2. Fibroblastový aktivační protein alfa (FAP-α, seprase)

FAP-α je 170 kDa integrální membránová koleganasa/gelatinasa. Svou orientací v plazmatické membráně patří mezi transmembránové proteiny typu II. Skládá se ze 760 aminokyselin, přičemž je tvořena šesti aminokyselinovou intracelulární sekvencí, transmembránovou doménou o velikosti 20 aminokyselin

a extracelulární doménou čítající 734 aminokyselin. C-konec obsahuje katalytický region (cca 200 aminokyselin), který je z 68% identický s DPPIV [Goldstein et al, 1997].

Proteasový motiv Gly-X-Ser-X-Gly je u této molekuly obsažený jako Gly-Trp-Ser-Tyr-Gly. Krystalová struktura ukázala pět potenciálních míst pro N-glykosylaci, ale přesný dopad na správné proteinové sbalení, dimerizaci a katalýzu není jasný. Odlišná aminokyselinová sekvence v aktivním místě molekuly FAP-α oproti DPPIV a kinetická data potvrdila schopnost endopeptidasové aktivity FAP-α [Aertgeerts et al, 2005].

Stejně jako u DPPIV, homodimerizace FAP-α je podmínkou její hydrolytické aktivity, přičemž existuje předpoklad možné heterodimerizace DPPIV/FAP-α [Nakahara et al, 1996]. Exprese FAP-α nebyla popsána ve zralých somatických elementech, ale je typická pro reaktivní stromální fibroblasty v nádorové tkáni, některé transformované buňky a pro fetální mezenchymální tkáň. Proto je předpokládán význam FAP-α zejména v procesech tkáňové remodelace, hojení a v embryonálním vývoji. Zvýšená exprese proteinu byla nalezena v transformovaných buňkách různého původu [přehledně popsáno v O'Brien & O'Connor, 2008]. Tato molekula může být markerem tumorové invazivity některých typů nádorů, neboť je lokalizována v invadopodiích maligních buněk [Kennedy et al, 2009; Ramirez-Montagut et al, 2004; Šedo & Malík 2001]. Exprese FAP-α je v takových buňkách součástí jejich invazivního fenotypu, v němž spolu s dalšími secernovanými proteasami hraje roli v degradaci složek ECM [Monsky et al, 1994]. Ghersi a kolegové [2002] popisují formaci proteasových komplexů složených z membránově vázaných FAP-α a DPPIV v invadopodiích migrujících aktivovaných fibroblastů.

V transformovaných neuroektodermálních buňkách je význam FAP-α patrně jiný. FAP-α je konstitutivně exprimován v několika melanomových buněčných liniích. Obdobně jako DPPIV, exprese FAP-α je umlčena během progrese maligní transformace melanocytů. V takových buňkách je FAP-α považován za tumorový supresor, který snižuje schopnost buněk tvořit nádory. Tato silná tumor-supresorová aktivita je nezávislá na vlastní enzymatické aktivitě FAP-α [Ramirez-Montagut et al, 2004]. Experimentálně navozená re-exprese DPPIV vede ne zcela jasným mechanismem k sekundárnímu navýšení povrchové exprese FAP-α [Wesley et al,

1999]. Koregulaci DPPIV a lidské, nikoliv myší, FAP-α molekuly potvrzuje rovněž Ramirez-Montagut [2004].

FAP-α tedy může hrát důležitou roli v utváření nádorového mikroprostředí, a tím ovlivňovat růst tumoru. Společně s DPPIV spolupůsobí na úspěšné degradaci substrátů a změnám jejich biologických funkcí.

2.3. „Quiescent cell“ prolinová dipeptidasa (QPP, DPPII)

DPPII byl nalezen jako intracelulární homodimer složený z 60 kDa podjednotek primárně lokalizovaný ve vesikulárním systému. pH optimum se nachází v rozmezí 5 - 5,5, kompletní ztráta aktivity nastává při pH 8,0 [Leiting et al, 2003].

DPPII je syntetizován jako propetid a v Golgiho aparátu podstupuje N-glykosylaci, která je nutná pro enzymatickou aktivitu, ale ne pro lokalizaci proteinu. DPPII je secernována ve funkčně aktivní formě jako odpověď na uvolnění vápníku. DPPII má velmi podobnou substrátovou specifitu jako DPPIV, tedy odštěpuje N-terminální dipeptidy ze substrátů, kde je na předposledním místě prolin, přičemž na rozdíl od DPPIV efektivně štěpí substráty s alaninem na druhé pozici od N-konce [Chiravuri et al, 2000, Maes et al, 2007].

2.4. Dipeptidylpeptidasa 8 (DPP8)

DPP8 byla dosud nalezena v řadě buněčných a orgánových systémů. Protein je složen z 882 aminokyselin, vykazuje 20% identitu a 32% podobnost s lidskou molekulou DPPIV [Qi et al, 2003]. Nejvýznamnější podobnost je popsána s lidskou DPP9 (79% aminokyselinová podobnost, 61% aminokyselinová identita) [Ajami et al, 2004].

Enzymová aktivita DPP8 je podobná s molekulami DPPIV a FAP-α, avšak DPP8 je cytoplazmatický neglykosylovaný protein, katalyticky aktivní v monomerní podobě. pH optimum se nachází v neutrálním rozmezí, tudíž není aktivní v lysozomálním a endozomálním kompartmentu. Na základě podobné tkáňové distribuce s DPPIV a enzymové specifity, někteří autoři předpokládají význam

DPP8 pro aktivaci T buněk a v dalších imunoregulačních funkcích [Abbott et al, 2000].

2.5. Dipeptidylpeptidasa 9 (DPP9)

DPP9 sdílí DPPIV podobnou aktivitu, obdobné pH optimum a citlivost k inhibitorům jako DPPIV a DPP8. Protein je 863 aminokyselin dlouhý, 19% identický a 31% podobný s DPPIV [Qi et al, 2003]. Do dnešní doby nebyly popsány přirozené substráty DPP8 a DPP9, pouze se předpokládá význam některých biologicky aktivních molekul na základě své sekvence. Efekt DPP8 a DPP9 na buněčnou adhezi, migraci a apoptózu je nezávislý na enzymatické aktivitě [Yu et al, 2006].

2.6. Dipeptidylpeptidasa 6 (DPP6)

DPP6 obsahuje jen dva ze tří aminokyselinových zbytků katalytické triády. Vzhledem k tomu, že serin je esenciální pro katalýzu, DPP6 je enzymaticky neaktivní. Důsledkem alternativního sestřihu se vyskytuje ve dvou formách – s 90 aminokyselin dlouhou N-koncovou sekvencí nebo s 32 aminokyselinovou sekvencí. DPP6 sdílí 33% aminokyselinovou identitu s DPPIV [Chen et al, 2003]. DPP6 molekula je pravděpodobně spojena s funkcí kanálů Kv4 v mozku [Clark et al, 2008].

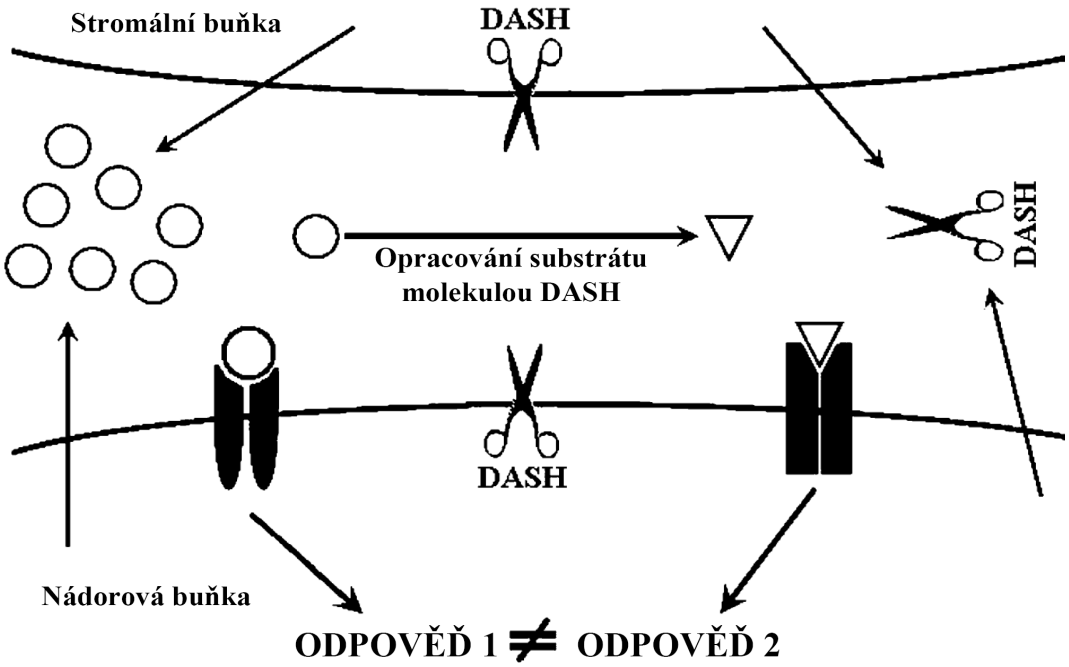
2.7. Dipeptidylpeptidasa 10 (DPP10)

DPP10 sekvence obsahuje 796 aminokyselinových zbytků a je ze 32% identická s DPPIV a z 51% s DPP6. Serinový zbytek katalytické triády je zaměněn glycinovým reziduem, což vede, obdobně jako u DPP6, k absenci hydrolytické aktivity. Exprese DPP10 byla dosud pozorována zejména v mozku a slinivce břišní [Qi et al, 2003].

3. Regulační peptidy– DASH substráty v nádorech

Nádorová transformace je provázena autonomní a nekoordinovanou proliferací, která uniká centrálním i lokálním regulačním mechanismům. Maligní nádory obvykle invadují do okolní tkáně, stimulují angiogenezi, působí na funkce imunitního sytému a jsou schopné tvořit vzdálené metastázy. DASH molekuly se mohou účastnit řady z výše uvedených procesů. Většinu svých funkcí realizují proteolytickou modifikací biologicky aktivních peptidů, lokálně regulujících růstové vlastnosti jak vlastních nádorových, tak stromálních, ale i imunitních buněk [Šedo & Malík, 2001]. Jak již bylo zmíněno, limitovaná proteolýza DASH substrátů může vést jak ke kvantitativní (funkční aktivace nebo inaktivace), tak i ke kvalitativní změně jejich signálního potenciálu (cestou změny preference receptorového subtypu – obrázek 2).

Lokalizace proteasových komplexů na výčnělcích buněčného povrchu, invadopodiích, má prominentní roli v úpravě solubilních faktorů a je významná též v degradaci složek lokální ECM, esenciální pro buněčnou migraci, lokální invazi, angiogenezi a tvorbu vzdálených metastáz [Chen & Kelly, 2003].



Obrázek 2: Funkce DASH molekul jakožto hypotetického „molekulárního přepínače“ buněčné odpovědi regulované biologicky aktivními peptidy. Upraveno dle Bušek et al, 2004.

Dosud bylo popsáno několik desítek přirozených biologicky aktivních peptidů, DASH substrátů, z nichž některé jsou známými autokrinními nebo parakrinními regulátory významnými v patogenezi nádorových onemocnění [De Meester et al, 2000; Mentlein, 1999]. V další kapitole jsou uvedeny některé jejich příklady relevantní pro vznik a rozvoj nádorů.

3.1. Neuropeptid Y (NPY) a peptid-YY (PYY)

Mezi členy pankreatické polypeptidové rodiny patří neuropeptid Y a peptid-YY. Tvoří důležitou skupinu substrátů DPPIV [Chen et al, 2003]. Jejich terciární struktura, charakteristická pro celou pankreatickou polypeptidovou rodinu, jim umožňuje vazbu do stejné sady receptorů (Y1 – Y6).

Peptid-YY je přirozený střevní hormon s většinou inhibičním působením na mnohonásobné tkáňové cíle. Jedná se o 36 aminokyselin velký peptid s tyrozinovým zbytkem na C- a N-konci. Ze 70% je identická s neuropeptidem Y a pankreatickým peptidem. Snížená exprese PYY byla pozorována během vzniku a progrese střevních adenokarcinomů [Tseng & Liu, 2002].

NPY se hojně vyskytuje v centrálním i periferním nervovém systému. DPPIV odštěpuje Tyr-Pro z N-konce NPY, a tím dává vznik další biologicky aktivní formě peptidu, NPY(3-36). Tato forma NPY není dále schopná vazby na Y1 receptor, čímž je terminována jeho pro-vasokonstrikční signalizace, zatímco schopnost interakce s dalšími receptorovými subtypy (Y2/Y5) není narušena. NPY(3-36), stejně tak jako NPY(1-36) stimulují proliferaci endoteliálních buněk [Kitlinska et al, 2003].

3.2. Substance P (SP)

Jako člen tachykininové rodiny s širokým polem působnosti v celém organismu signalizuje substance P především cestou NK1 receptoru, nicméně v řadě dalších případů rovněž i interakcí s NK2 a NK3 receptory.

SP je lokální mediátor, účinkující jako autokrinní/parakrinní růstový faktor [Palma et al, 1999]. V souvislosti s nádorovou transformací a progresí je významná

mitogenní aktivita SP, která byla prokázána v mnoha buněčných typech nejen ektodermálního, ale i mezodermálního původu. Angiogenní aktivita SP zlepšuje krevní zásobení tumoru [Ziche et al, 1991] a komplex imunoregulačních efektů SP modifikuje odpověď hostitele [Harrison & Geppetti, 2001; Palma et al, 1999].

DPPIV postupně štěpí SP do podoby SP(3-11) a dále SP(5-11), oba fragmenty stále zůstávají aktivní, nicméně jejich afinita k receptorům klesá [Mentlein, 1999].

Kvantita exprese NK1 receptorů je významná v patologii mozkových nádorů – jejich denzita koreluje se stupněm malignity [Palma et al, 1999]. Stimulace tohoto receptoru v liniích transformovaných glioblastomových buněk vede ke zvýšení jejich proliferační aktivity a uvolnění interleukinu 6 [Yamaguchi et al, 2005]. Možná role SP byla studována v rámci gliomagenese, kde DPPIV může proteolyticky inaktivovat SP, což vede ke ztrátě jejího signálního potenciálu [Busek et al, 2008a].

3.3. Chemokiny

Chemokiny, rodina relativně malých cytokinů, indukují migraci leukocytů (chemotaxe). Chemokiny jsou rozděleny do čtyř podrodin (CXC, CC, C a CX3C) v závislosti na množství a rozestupu prvních dvou až čtyř cysteinových zbytků. Na základě své sekvence patří řada z nich mezi předpokládané substráty DPPIV *in vitro* nebo *in vivo* [Mentlein, 1999], přičemž nejenom přítomnost „konsensus sekvence“, ale i jejich velikost nebo strukturní konformace je rozhodující, zda jsou opravdu štěpeny DPPIV nebo *in vitro* pomocí DPP8 a DPP9 [Bjelke, 2006].

Mezi prokázané substráty patří stromal cell-derived faktor 1 (SDF-1, CXCL12), „regulated on activation normal T-cell expressed and secreted“ (RANTES, CCL5), eotaxin (CCL11), „macrophage derived chemokine“ (MDC, CCL22), jejichž biologické aktivity jsou regulovány DPP enzymatickou aktivitou. To vede například k ovlivnění jejich chemotaktických a antivirových vlastností [Van Damme et al, 1999].

Několik chemokinů bylo popsáno v gliomových buňkách *in situ* a *in vitro* – CCL2, IL-8 (CXCL8), RANTES (CCL5), SDF-1 (CXCL12) – jejich funkce zůstává

neznámá, je však předpokládán jejich podíl na maligním potenciálu gliomových buněk [Robledo et al, 2001; Salmaggi et al, 2004].

Více než 23 typů lidských tumorů, například karcinom prsu, vaječníku, prostaty, melanom, exprimují receptor CXCR4 (člen G-proteinové receptorové rodiny). Jeho jediný ligand, SDF-1 (ve dvou izoformách – α a β) je konstitutivně produkován v mnoha tkáních, mezi něž patří zejména tkáně s vysokou afinitou a permisivitou pro metastázy [Ben-Baruch, 2008; Kakinuma et al, 2006; Luker et al, 2006]. V nádorových buňkách dochází působením SDF-1 ke změnám a přestavbám mnoha cytoskeletárních proteinů. Růst nádorových buněk v přítomnosti SDF-1 se vyznačuje výrazným zvýšením počtu a síly F-aktinových svazků. Stimulace SDF-1 vede k formaci přední hrany migrujících nádorových buněk [Kucia et al, 2004]. To vše podporuje zvýšenou migraci a invazi nádorových elementů.

SDF-1 je chemotaktický faktor pro T buňky, monocyty, pre B buňky, dendritické buňky a hematopoetické progenitorové buňky. *In vitro* byla prokázána úloha SDF-1 v regulaci růstu glioblastomů, pravděpodobně autokrinními/parakrinními mechanismy [Barbero et al, 2003]. Výsledek po štěpení DPPIV je biologicky i biochemicky variabilní. Štěpený produkt ztrácí svoji chemotaktickou aktivitu, ale je dokonce schopen účinkovat jako receptorový antagonista CXCR4 [Van Damme et al, 1999].

Významným chemokinovým receptorem exprimovaným v kulturách gliomových buněk je právě CXCR4. Jeho exprese prokazatelně souvisí s malignitou gliomových buněk. CXCR4 v buňkách gliomových linií po aktivaci ligandem, SDF-1, vede k fosforylaci mitogenem aktivovaných proteinkinas. SDF-1 indukuje fosforylaci Akt (proteinkinasy B), což je kinasa asociovaná s přežíváním a blokuje apoptózu gliomových buněk [Zhou et al, 2002]. Kinasa stimuluje syntézu VEGF maligními gliomovými buňkami. Nedávno byla popsána nadměrná exprese SDF-1 v glioblastomových progenitorových buňkách, kde podporuje specifické proliferativní odpovědi [Ehtesham et al, 2009]. SDF-1/CXCR4 dráha se tím stává potenciálním cílem pro anti-angiogenní terapii maligních lidských gliomů [Yang et al, 2005].

Chemokinové receptory by mohly být přirovnány k Achillově patě nádorů. Jsou-li aktivované, chrání nádor proti rozmanitým apoptotickým spouštěčům a jejich inhibice může zvyšovat „zranitelnost“ nádorové buňky k mnoha modalitám protinádorové léčby.

Přímý efekt úpravy, a tím funkční regulace chemokinů molekulou DPPIV u nádorových onemocnění, není dostatečně studován. Výsledky mnoha autorů ovšem naznačují významný potenciál v této oblasti [Bušek et al, 2004; Herrera et al, 2001; Khin et al, 2003].

3.4. Gastrin releasing peptid (GRP)

GRP je 27 aminokyselin dlouhý protein náležící do bombensin/GRP rodiny s širokou tkáňovou distribucí. Má vliv na řadu metabolických, behaviorálních a endokrinních procesů. Je předpokládaným autokrinním a/nebo parakrinním růstovým faktorem mnoha nádorů [Schally et al, 2001]. Ačkoliv je prokázaným substrátem DPPIV, fyziologický význam jeho N-koncového zkrácení není znám.

3.5. Hormon uvolňující růstový hormon (GHRH)

GHRH se vyskytuje v několika molekulových formách (40-44 aminokyselin) v řadě tkání. Jeho uvolnění v adenohypofýze stimuluje sekreci růstového hormonu. Jakožto lokální mediátor hraje rovněž významnou roli v patogenezi nádorů, například plic, mozku, prostaty a prsu [Schally et al, 2001], přičemž jeho N-koncová sekvence je kritická pro vazbu na receptor [Schally & Varga, 1999].

DPPIV rychle degraduje GHRH *in vitro*, ale i *in vivo* [Frohman et al, 1989] čímž může být společně s dalšími DASH molekulami důležitým regulátorem biologické aktivity GHRH.

3.6. Glukagonu podobný peptid 1 (GLP-1)

GLP-1 patří mezi inkretinové hormony. Do oběhu je uvolňován po příjmu potravy. Stimuluje sekreci insulinu, inhibuje sekreci glukagonu, zpomaluje vyprazdňování žaludku a podporuje pocit sytosti [Green & Flatt, 2007]. U pacientů s diabetem mellitu 2 dochází postupně k úbytku B-buněk a ke snížení exprese insulinu. Účinek GLP-1 je u těchto pacientů zachován, bohužel dochází k jeho degradaci proteasou DPPIV, a tím ke zkrácení poločasu účinku tohoto hormonu.

Inhibitory DPPIV se staly slibným terapeutickým cílem. V dnešní době jsou dostupné již dva inhibitory DPPIV tzv. gliptiny – Sitagliptin (Januvia, Merck) a Vildagliptin (Galvus, Novartis) [Demuth et al, 2005; McIntosh, 2008].

4. Studium proteinů – metody transfekce

Snaha objasnit funkci genu a jeho významu pro vývoj a život dané buňky, případně i celého organismu, vedla ke vzniku metod a přípravě geneticky modifikovaných organismů. Schopnost klonovat a přenášet nukleovou kyselinu do hostitelských buněk umožnila rozvoj našeho poznání genetické regulace a proteinových funkcí v eukaryotických buňkách, primárních buněčných kulturách, tkáních a celých organismech. Metody genového inženýrství se uplatňují nejen v biologickém výzkumu, ale přináší i významné poznatky v medicíně (kde mimo jiné slouží k produkci léčiv) a také v zemědělství a dalších oborech.

Zvířecí a jiné modely poskytují možnost studia v přirozených *in vivo* podmínkách, ale ne vždy jsou tyto modely plně dostupné. Využití buněčných linií *in vitro* z části nahrazuje a hlavně rozšiřuje možnosti studia. Vždy je však nutné brát na zřetel rozdílnost obou systémů, jak je například uvedeno v práci Vogel et al [2005], která je zaměřena na porovnání několika komerčně dostupných buněčných glioblastomových linií s primárními kulturami odvozeným z bioptického materiálu glioblastoma multiforme. V podmínkách *in vivo* a *in vitro* jsou buňky vystavovány rozdílným selekčním tlakům, které vedou k různým proteinovým expresním vzorcům, a tím k potřebě opatrné interpretace výsledků získanými *in vitro* a *in vivo*.

Savčí buněčné linie mají heterologní expresní systém, který obsahuje kompletní výbavu organel a enzymů, což umožňuje fyziologické proteinové sbalení a posttranslační modifikace vlastních, ale i vnesených genů a jejich proteinových produktů. Proces přenesení transgenu (cizorodého genu nebo úseku nukleové kyseliny) do eukaryotických buněk pomocí nevirových metod je definován jako „transfekce".

S postupem doby byly vytvořeny účinné metody přenosu nukleové kyseliny, a tím se rozšířil i repertoár hostitelských eukaryotických buněk. Integrace DNA do chromozomu, nebo stabilní udržení episomu reportérového či jiného genu, se děje s velmi nízkou frekvencí.

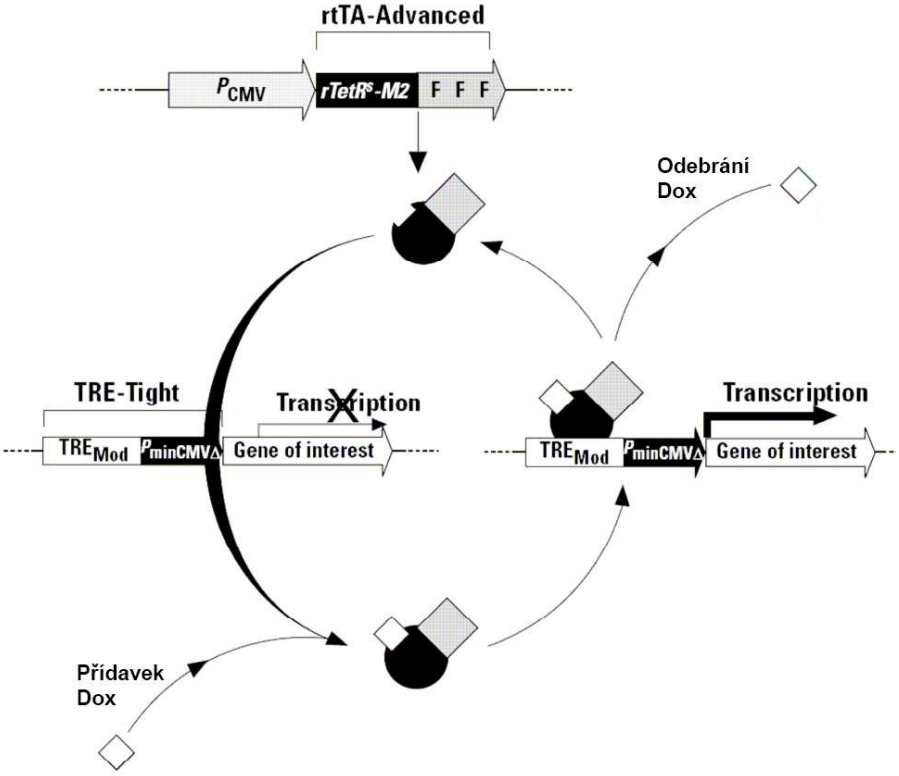
Z hlediska stability přenášeného genu v hostitelské buňce rozlišujeme transfekci na **přechodnou** a **stabilní**. Přechodná transfekce vede k zajištění tranzientní exprese proteinu, protože nedochází ke spojení inzertu s hostitelským genomem. Buňky udrží cizorodou DNA maximálně několik dnů a následně dojde

k jejímu vyředění, neboť replikace plazmidu není sladěna s replikací genomu buňky. Stabilní vnesení DNA do hostitelské buňky nastává v případě inkorporace rekombinantní DNA do hostitelského genomu a k následnému přenosu do dceřiných buněk.

Při přípravě stabilně transfekovaných buněk je nutné odlišit buňky transfekované od netransfekovaných. Plazmid nesoucí rekombinantní gen je doplněn genem zajišťující rezistenci k určitému selekčnímu činidlu, případně je možné buňky kotransfekovat dalším plazmidem nesoucí gen pro rezistenci samostatně. Pro selekci pozitivních transfekovaných eukaryotických buněk se běžně používají selekční činidla, jako například antibiotikum G418 (geneticin), hygromycin B a zeocin. Další možností selekce je obnovení porušených metabolických drah v průběhu transfekce v hostitelských buňkách. Jednotlivé transfekované buňky, které přežijí v selekčních podmínkách, jsou dále kultivovány, selektovány a expandovány. Na závěr je ověřena integrace a exprese transgenu do buňky.

Bakteriální plazmid se používá pro snadnou manipulaci s DNA - pro její vlastní klonování a udržení. Plazmidy jsou upravovány metodami genetického inženýrství pro zajištění specifity a požadovaného výtěžku. Mezi časté úpravy patří modifikace promotorových oblastí a připojení reportérových genů. Komerčně dostupné systémy pro transfekci genů obsahují plazmidy, které se skládají z regulačních komponent odvozených z různorodých lidských, virových a kvasinkových transkripčních faktorů. Výhodné se jeví systémy pro regulovatelnou genovou expresi obsahují indukovatelný expresní plazmid, regulační plazmid a chemické agens pro indukci exprese vneseného genu [Kaufman, 2000]. Například tetracyklinem regulovaný Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System (obrázek 3) od společnosti Clontech, kde dvojnásobné stabilní transfektanty nesoucí gen zájmu, dovolují reverzibilní kontrolu genové exprese v buňce. rtTA protein slouží jako aktivátor genové exprese druhého vloženého genu. Po indukci indukčním činidlem – doxycyklinem, dochází k formaci heterodimeru s chimérickým syntetickým rtTA proteinem a aktivaci transkripce cílového promotoru. Tet On systém je úspěšně používán pro kontrolovanou expresi transgenů v buněčných liniích a v celých organismech, zejména v myších. Aplikace tohoto systému přináší neocenitelný pohled na funkci a regulaci genů za fyziologických

a patologických podmínek spolu s mnoha výhodami, jako je účinnost a efektivnost mechanismu a příznivá charakteristika indukčního činidla.



Obrázek 3: Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System: Systém indukovatelné genové exprese. rtTA protein je konstitutivně exprimován. Po indukci tvoří komplex s doxycyklinem a následně nasedá do promotorové oblasti Tre-Tight a spouští transkripci vloženého genu. Upraveno dle Clontech.

V současné době řada firem nabízí velké množství specifických systémů a protokolů potřebných pro transfekci řady buněčných typů, tkání a celých organismů.

Transfekční metody můžeme rozdělit do dvou skupin dle použitého postupu: **biochemické** metody s využitím chemických činidel a **fyzikální** metody.

Jako jedna z prvních biochemických metod byla využita transfekce zprostředkovaná vysokomolekulárním kladně nabitým polymerem **dietylaminoetyl (DEAE) dextranem**, který asociuje s negativně nabitou nukleovou kyselinou a do buňky je pohlcován endocytózou.

Do dnešní doby velmi oblíbenou metodou je koprecipitace **fosforečnanu vápenatého** [Graham et al, 1973]. Jedná se o poměrně levnou a dostatečnou metodu pro mnoho transfekčních protokolů.

Nejen přenos DNA, ale i transfer různých RNA je možný pomocí uměle vytvořených membránových měchýřků (liposomů) metodou **lipofekce**. Tuto metodu původně popsal Felgner [1987] a později byla dále upravena dalšími autory. Používaly se liposomální transfekční činidla s negativně nabitými liposomy, ale dnes jsou více upřednostňované techniky využívající lipidy s kladným nábojem. Eukaryotické buňky jsou více citlivé a liposomem-zprostředkovaná transfekce vykazuje nižší toxicitu a vyšší efektivnost systému. Jedná se o jednoduchou a vysoce reprodukovatelnou metodu. Lipofekce je nejvíce účinná při použití adherentních buněk.

Jako fyzikální transfekční postup, který využívá mechanický přenos, je známá technika **mikroinjekce** do cytoplazmy kultivovaných buněk nebo přímo do buněčného jádra. Využívá se zvláště u embryonálních kmenových buněk a oocytů.

Další metodou je **elektroporace** užívaná pro obtížně transfekovatelné buňky, nejen eukaryotické, ale i bakteriální a rostlinné. Podstatou této metody je vytvoření krátkého elektrického pulzu o vysokém napětí, které vyvolá vznik pórů v plazmatické membráně, a tím se transfekovaná DNA může dostat do cytoplazmy buněk. Dalším metodickým přístupem je přímý přenos **balistických nanočástic** pokrytých DNA, metoda je užívaná hlavně u rostlin. Transfekční techniky jsou dnes již téměř rutinní záležitostí. Každá z výše zmíněných metod nese své výhody a nevýhody. Například DEAE-dextran a kalcium fosfátová metoda jsou vhodné pro tranzientní transfekci, kdy gen je v buňce dočasně exprimován. Ostatní metody jsou více vhodné pro stabilní transfekci, ale finanční náklady jsou mnohem vyšší. Pro výběr vhodného postupu je třeba zvažovat konkrétní cíle daného experimentu – požadovaná metoda vnesení transgenu do buňky, doba exprese proteinu a jeho výtěžky. Výběr metody záleží na vlastnostech dané buněčné linie a požadované účinnosti celého systému. Některé buněčné linie nejsou vhodné pro určité transfekční techniky. V neposlední řadě je důležité zvážit finanční možnosti a technické vybavení [Bonetta, 2005].

5. Cíle diplomové práce

- Připravit stabilně transfekované lidské gliomové buněčné linie s indukovatelnou expresí genu lidské enzymaticky aktivní DPPIV jako instrument pro další experimenty zaměřené na posouzení významu DPPIV v gliomagenesi.

- Připravit stabilně transfekované lidské gliomové buněčné linie s indukovatelnou expresí mutovaného genu lidské enzymaticky neaktivní DPPIV pro studium funkčního významu vlastní hydrolytické aktivity DPPIV v gliomagenesi.

6. Materiál a metody

6.1. Laboratorní materiál

6.1.1. Laboratorní přístroje a pomůcky

- Pipety Gilson, Francie
- Vortex-Genie2, Scientific Industries, USA
- Orbitální třepačka, PTR 30, Grant-Bio, UK
- Kryokontejner, Nalgene, Nunc, USA
- 12-ti zkumavkový magnet, Qiagen, USA
- Centrifuga s výkyvným rotorem, Hettich Zentrifugen Universal 16R, Německo
- Centrifuga, Hettich Zentrifugen Universal 320R
- CO_2 termostat, Sanyo, Japonsko
- Světelný mikroskop, Nikon TMS, Japonsko
- Spektrofluorimetr FluoroMax-4, Horiba Jobin Yvon, USA
- Spektrofluorimetr1420 multilabel counter Victor 3, Perkin Elmer, USA
- Spektrofotometr Helios Unicam, Thermo Scientific, USA
- Vodní lázeň Neslab RTE7, Thermo Scientific
- Autokláv, SterilCave 18BDH, Cominox, Itálie
- Coulter Counter Z2 se 100 μm kapilárou, Beckman Coulter, Německo
- Microplate reader Sunrise, Tecan, Švýcarsko

6.1.2. Spotřební materiál

- Pipetovací špičky, Gilson, Francie
- Mikrozkumavky, Eppendorf, Německo
- Plastik pro tkáňové kultury, Nunc, USA
- Sterilní filtry Millex GV 0,22 μm, Millipore, Irsko
- Laboratorní rukavice, Promedica, ČR

6.1.3. Chemikálie, roztoky

- Trypsin-kyselina ethylen-diamin-tetraoctová (trypsin-EDTA), Sigma, ČR
- Fosfátový pufr (PBS) – 137 mM NaCl, 4 mM Na_2HPO_4, 2,68 mM KCl, 1,76 mM KH_2PO_4, pH 7,4
- PBS/EDTA byla připravena přídavkem EDTA do fosfátového pufru (0,02%, pH 7,4)
- PBS pufr s přídavkem azidu sodného (0,1%)
- Kompletní kultivační médium bylo připraveno z Dulbecco's modified Eagle's médium (D-MEM, Sigma) s doplňkem fetálního hovězího séra (FBS, 10%) Sigma
- Opti-Mem Reduced Serum Medium, Gibco, Invitrogen, Německo
- Tet System Approved FBS, Clontech-Takara Bio Europe, Francie
- Hygromycin B (zásobní koncentrace 50 mg/ml) byl připraven rozředěním v PBS na koncentraci 10 mg/ml a sterilně filtrován (filtr Millex GV 0,22 μm), Invitrogen
- Geneticin/G418 byl připraven ředěním v deionizované sterilní vodě na koncentraci 50 mg/ml a sterilně filtrován (filtr Millex GV 0,22 μm), Sigma
- Doxycyklin byl připraven ředěním v deionizované sterilní vodě na koncentraci 1 mg/ml a sterilně filtrován (filtr Millex GV 0,22 μm), Clontech-Takara Bio Europe
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma
- Hovězí sérový albumin (BSA), Sigma
- Coulter Izoton II Diluent, Beckman Coulter
- Lyzační pufr s přídavkem inhibitorů proteas - Tris-HCL 10 mM pH 7,5; Triton X-100 1%; SDS 0,1%; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; glycerol 10%; Pepstatin A 25 μM; E64 50 μM; AEBSF 200 μM
- Lipofectamine^{TM}2000, Invitrogen
- Dynabeads Sheep anti-Mouse IgG, Dynal Biotech, Invitrogen
- Primární protilátka mouse anti-CD26, klon M-A261, Acris, Německo
- Protilátka Anti-human CD26/DPPIV-Phycoerythrin (anti-CD26-PE), klon PAB 1180P, Acris
- Substrát 7-(Glycyl-L-Prolylamido)-4-methylkumarin (Gly-Pro-NHMec), Bachem AG, Švýcarsko

- Methylenová modř (5 g/l v 50% v/v ethanolu)
- 1% roztok SDS
- 4% paraformaldehyd
- TriZol reagent, Invitrogen
- ThermoScript One-Step System, Invitrogen
- Roztok SDS pro stanovení koncentrace proteinů (2% Na_2CO_3, 0,4% NaOH, 0,16% vínan sodný, 1% SDS)
- 4% roztok modré skalice ($CuSO_4$)
- Folin & Ciocalteu's fenolového činidla, Sigma
- ELISA-kit Quantikine Human DPPIV/CD26, R&D Systems, Německo
- Kit RiboGreen RNA Quantitation Kit, Molecular Probes, Eugene, USA
- Detekční kit Luciferase Assay System, Promega Corporation, Madison, USA

6.2. Buněčné kultury

Lidské maligní gliomové buněčné kultury U373MG (glioblastoma multiforme, tumorový stupeň malignity III) a T98G (glioblastoma multiforme, tumorový stupeň malignity IV) byly získány od společnosti ATCC. Lidské osteosarcomové buňky U2-OS-Luc Tet-On Control byly pořízeny u firmy Clontech.

Buňky byly kultivovány podle standardních protokolů a doporučení společnosti American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) nebo Clontech (Clontech-Takara Bio Europe, Francie). Buňky byly pěstovány v kultivačních plastových nádobách o ploše 25 cm^2 v termostatu při 37°C (5% CO_2/95% vzduch) v kultivačním médiu D-MEM, které bylo doplněno 10% fetálním hovězím sérem a kontrolovány pod mikroskopem. Všechny metody byly upraveny dle předešlých zkušeností a podle protokolů Freshney R. I. [2000].

Fosfátový pufr, deionizovaná voda a ostatní nesterilní materiál byl ošetřen autoklávováním.

6.2.1. Trypsinizace/pasážování

Buňky byly pasážovány pomocí roztoku trypsin-EDTA. Nejprve bylo odsáto medium a proveden oplach PBS pufrem (0,2 ml/cm^2) a následně přidán trypsin-EDTA (0,04 ml/cm^2). Láhev nebo Petriho miska s trypsin-EDTA byla inkubována v

CO_2 termostatu po dobu 1-3 minuty. Aktivita trypsin-EDTA byla zastavena přidáním čerstvého kompletního média se sérem (v poměru 1:1 s Trypsin-EDTA) a několikanásobným pipetováním resuspendovány agregáty buněk. Do nové nádoby s kompletním médiem byl přenesen požadovaný objem buněčné suspenze. V případě transfekovaných buněk byly přidány selekční antibiotika.

6.2.2. Selekční antibiotika pro transfekované buňky

Testován byl hygromycin B a geneticin. Před použitím selekčních antibiotik a ustanovení stabilně transfekovaných buněk, byla antibiotika titrována pro určení optimální selekční koncentrace pro U373MG a T98G buňky. Optimální koncentrace byla stanovena pro všechny typy antibiotik a pro buněčné linie U373MG a T98G. Buňky byly nasazeny do 6-ti jamkové destičky o objemu 3 ml kompletního média. Po čtyřech hodinách byly přidány jednotlivá antibiotika o různé koncentraci (0; 50; 100; 200; 400, a 800 μg/ml). Jako selekční koncentrace byla vybrána nejnižší koncentrace, která u buněk způsobila masivní úhyn během prvních pěti dnů a buňky byly celkově usmrceny do dvou týdnů.

6.2.3. Mražení buněk

Z transfekovaných buněk v přibližně v osmé pasáži byly připraveny zásobní podíly a ty následně zmraženy. Buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích o celkové ploše 75cm^2 do dosažení log fáze. Následně byly buňky trypsinizovány (dle stejného protokolu jako trypsinizace/pasážování). Buněčná suspenze byla doplněna čerstvým kompletním médiem do objemu 9 ml a centrifugována (4 minuty, 4°C, 130 g). Supernatant byl odsát a pelet buněk resuspendován v 1,5 ml D-MEM. Po pěti minutách chlazení buněčné suspenze v ledové lázni byl přidán 1,5 ml mrazící směsi FBS a dimethyl sulfoxidu (1,2 ml FBS a 0,3 ml DMSO). Buněčná suspenze byla rozdělena po 1 ml do tří kryozkumavek a pomalu zamražena v kryokontejneru při teplotě –80°C. Následující den byly kryozkumavky přemístěny do papírové krabice a nadále udržovány při -80°C.

6.2.4. Rozmrazování buněk

Buňky byly rychle rozmraženy ve vodní lázni o 37°C. Když byla buněčná suspenze téměř rozmražená, kryozkumavka byla otřena 70% etanolem a otevřena v laminárním boxu. Obsah byl rozředěn v kompletním D-MEM médiem s 10% FBS a centrifugován (4 minuty, 4°C, 130g). Supernatant byl odsát a pelet resuspendován v čerstvém kompletním médiu (D-MEM + 20% FBS). Po 24 hodinách inkubace buněk v CO_2 termostatu médium bylo vyměněno za nové kompletní médium (D-MEM + 10% FBS).

6.2.5. Stanovení počtu buněk

Buněčná suspenze byla řádně promíchána a naředěna v poměru 1:200 (40 μl buněčné suspenze v 8 ml Coulter Izoton II Diluent v plastové vzorkové kyvetě. Buňky byly počítány na přístroji Coulter Counter Z2 ve 100 μm kapiláře.

6.2.6. Sběr buněk PBS/EDTA

Buňky v miskách byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS a následně bylo přidáno dostatečné množství roztoku PBS/EDTA, aby bylo zajištěno rovnoměrné pokrytí buněk. Misky byly inkubovány 10 – 15 minut při 37°C a sbírány do centrifugačních zkumavek.

6.2.7. Příprava buněčných lyzátů

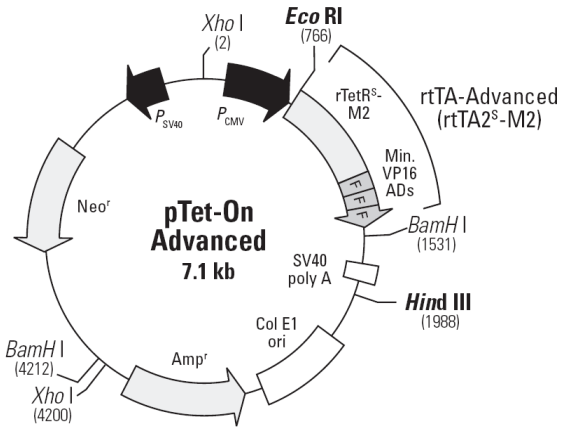
Buňky byly sbírány roztokem PBS/EDTA. Část buněčné suspenze byla použita pro stanovení počtu buněk. Zbylá suspenze byla centrifugována (6 minut, 4°C, 225 g). Supernatant byl odsát a pelet resuspendován v lyzačním pufru s přídavkem inhibitorů proteas. Suspenze byla řádně promíchána vortexováním a inkubována 20 minut při 4°C. Lyzát byl centrifugován (30 minut, 4°C, 23500 g). Vzniklý supernatant byl skladován při –18°C a použit pro další experimenty.

6.3. Příprava vektorů, transfekce a ustanovení stabilních Tet on buněčných linií

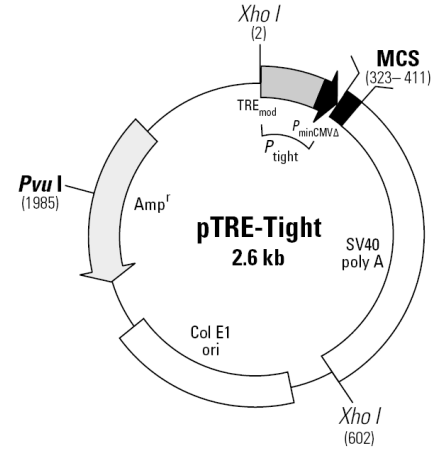
6.3.1. Vektory

Příprava vektorů, konstrukce a ověření mutace $Ser^{630} \rightarrow$ Ala byla provedena Daliborem Koškem pod vedením Prof. RNDr. Karla Bezoušky, CSc. v laboratoři architektury proteinů, PřF UK. cDNA lidské DPPIV byla získána z předešlých experimentů naší laboratoře. cDNA byla množena a zaklonována do pTRE-Tight vektoru indukovatelného expresního genového systému Tet-On Advanced (Clontech). Připraveny a sekvenací ověřeny byly celkem dva plazmidy: pTRE-Tight-DPPIV (s wt podobou genu lidské DPPIV) a pTRE-Tight-mDPPIV (s enzymaticky neaktivní podobou genu lidské DPPIV).

Jako transfekční postup byl použit nevirový, liposomem-zprostředkovaný přenos nukleové kyseliny do buněk. Pro vlastní transfekci byl použit Lipofectamine^{TM}2000 s vysokým transfekční výtěžkem. Selekce na základě antibiotické rezistence následovala pro zisk stabilně transfekovaných buněk. Vektor pTet-On-Advanced (obrázek 4) nese společně s genem pro regulační protein rtTA antibiotickou rezistenci na geneticin a pTRE-Tight vektor (obrázek 5) byl kontransfekován společně s lineárním hygromycin B markerem (Clontech).



Obrázek 4: Restrikční mapa vektoru pTet-On-Advanced. Unikátní restrikční místa jsou uvedena tučným písmem (převzato z Clontech).



Obrázek 5: Mapa a mnohonásobná klonovaní místa (MCS) vektoru pTRE-Tight. Unikátní restrikční místa jsou označena tučným písmem (převzato z Clontech).

323
GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGTCAGCTGACGCGT
*Eco*R I *Kpn* I *Bam*H I *Pvu* II *Mlu* I
368
Sma I
GCTAGCGCGGCCGCATCGATAAGCTTGTCGACGATATCTCTAGA
Nhe I *Eag* I *Cla* I *Hind* III *Sal* I *Eco*R V *Xba* I
Not I *Acc* I

6.4. Transfekce a selekce Tet-On-Advanced stabilních buněčných linií

Obě buněčné linie byly nasazeny do 6-ti jamkové destičky jeden den před transfekcí o hustotě 1 x 10^6 buněk na jamku. Byly pěstovány za standardních podmínek (D-MEM + 10% FBS) v CO_2 termostatu do druhého dne, kdy dosáhly zhruba 90% konfluence.

V den transfekce byla připravena transfekční směs obsahující 4 μg, 2 μg nebo 1 μg pTet-On-Advanced vektoru ve 250 μl Opti-MEM média bez obsahu séra. Směs byla jemně promíchána a inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Stejným způsobem bylo připraveno 10 μl Lipofectamine^{TM}2000 ve 250 μl Opti-MEM média a přidáno ke směsi vektoru (celkový objem 500 μl transfekční směsi/jamka). Transfekční směs byla inkubována po dobu dvaceti minut při pokojové teplotě, aby byla zajištěna formace komplexů DNA-Lipofectamine^{TM}2000. Buňkám bylo odsáto médium a nahrazeno transfekční směsi a doplněno 1,5 ml D-MEM obsahující 5% FBS. Buňky byly 6 hodin inkubovány v termostatu a poté jim bylo vyměněno médium za čerstvé obsahující 10% FBS.

48 hodin po transfekci byly buňky pasážovány a naředěny v poměru 1:10 v čerstvém kultivačním médiu (D-MEM a 10% FBS). Další den bylo do všech nádob přidáno selekční antibiotikum geneticin. Buňky byly denně kontrolovány, zhruba každé tři dny bylo měněno selekční médium. Geneticin-rezistentní kolonie

buněk byly izolovány a přeneseny do 24-jamkové destičky a následně dalším pasážováním byly dále expandovány pro ověření stability inzerce DNA a následující transfekce.

6.4.1. Testování indukovatelnosti Tet-On Advanced klonů

Klony U373On a T98GOn byly testovány transientní transfekcí vektorem pTRE-Tight-Luc nebo pTRE-Tight-mDPPIV. Cílem bylo nalézt klon s nejnižším pozadím exprese a nejvyšší mírou indukce luciferázy nebo mDPPIV proteinu po indukci doxycyklinem (Dox).

Všechny klony z obou buněčných linií byly trypsinizovány a rozděleny na tři podíly – jedna část zanechána v jamce 6-ti jamkové destičky jako „záložní buňky“, další dvě části byly kultivovány ve 24-jamkové destičce a využity pro ověření indukovatelnosti. Obě jamky byly transientně transfekovány vektorem (dle stejného protokolu pro transfekci, jako je uvedeno výše). Buňky byly transfekovány směsí 0,8 μg DNA a 2 μl Lipofectamine^{TM}2000 a inkubovány 24 hodin.

Další den byla jedna část transfekovaných buněk indukována přídavkem Dox o finální koncentraci 1000 ng/ml a kontrolní skupině jen vyměněno čerstvé médium. Buňky byly pěstovány dalších 48 hodin za běžných podmínek. Funkčnost systému indukovatelné exprese byla stanovena vyhodnocením luciferázové aktivity nebo z buněk byly připraveny buněčné lyzáty a hodnoceny imunodetekcí. Navýšení exprese indukovaných buněk bylo kalkulováno z poměru: +Dox klon/-Dox klon.

6.4.2. Transfekce a selekce Tet-On-Advanced buněčných linií obsahujících pTRE-Tight-CD26

V případě druhé transfekce je nutné využít kotransfekce lineárního hygromycinového markeru a vlastního plazmidu pTRE-Tight. U373On a T98GOn buněčné linie byly kotransfekovány dle standardního protokolu vektorem pTRE-Tight-DPPIV a lineárním hygromycinovým markerem (v poměru 20:1). Populace byla pasážována a přenesena do nádob s větším kultivačním povrchem. Jako selekční médium bylo použito kompletní médium obsahující optimální koncentrace geneticinu a hygromycinu. Buňky byly denně kontrolovány, přibližně každý třetí den bylo měněno selekční médium.

Velké hygromycin-rezistentní klony byly izolovány a přeneseny do 24-jamkové destičky. Při dalším pasážování byly expandovány na větší povrch a do více kultivačních nádob pro ověření inzerce a exprese transgenu.

Získané klony byly postupně testovány na doxycyklinem-indukovanou genovou expresi a výsledná hodnota exprese proteinu byla porovnána s bazální enzymovou aktivitou DPPIV neindukovaných buněk.

Z každého vhodného stabilního transfekovaného klonu byl připraven alikvot k mražení.

6.5. Magnetic-Activated Cell sorting (MACS)

Dynabeads Sheep anti-Mouse IgG společně s primární myší protilátkou byl použit pro pozitivní izolaci buněk exprimujících wt nebo mutovanou podobu genu DPPIV. Byla zvolena nepřímá metoda separace.

Exprese proteinu v buňkách byla indukována po dobu 48 hodin přídavkem doxycyklinu do média (f.c. 10^{-6} g/ml). Buňky byly trypsinizovány a byl stanoven počet buněk. Buňky byly centrifugovány (4 minuty, 4°C, 130 g) a buněčný pelet resuspendován v PBS pufru obsahujícím 0,1% hovězího sérového albuminu na výslednou koncentraci buněk 10 x 10^6 buněk/ml.

Dynabeads (25 μl Dynabeads/10 x 10^6 buněk) byly před použitím dvakrát opláchnuty 1 ml PBS obsahujícím 0,1% BSA. Ve 2 ml centrifugační zkumavce byl smíchán 1 ml buněčné suspenze s primární myší protilátkou anti-CD26. Buňky byly inkubovány po dobu 15 minut při 4°C. Následoval dvakrát oplach PBS s 0,1% BSA a centrifugace (8 minut, 4°C, 225 g). Buněčný pelet byl resuspendován v čerstvém PBS s 0,1% BSA na stejnou buněčnou koncentraci. K buněčné suspenzi byla přidána suspenze Dynabeads a inkubováno společně 20 minut při 4°C na orbitální třepačce. Objem PBS s 0,1% BSA byl zdvojnásoben a zkumavka uložena do 12-ti místného magnetu. Dynabeads navázané na buňky byly přichyceny k magnetu, zbylá suspenze byla odsáta a přenesena do malé Petriho misky (tato frakce pojmenována jako negativní frakce, NF). Pro pozitivní separaci byly použity buňky zachycené na magnetu. Buňky byly 4x opláchnuty (1 ml PBS s 0,1% BSA) a nasazeny do 10 cm Petriho misky a pěstovány ve standardních podmínkách.

6.6. Biochemické stanovení enzymatické aktivity DPPIV

Enzymatická aktivita byla stanovována v kyvetách kontinuální fluorimetrickou metodou při excitační vlnové délce 380 nm a emisní vlnové délce 405 nm v PBS pufru (pH 7,4) s 7-Gly-Pro-NHMec jako substrát ve finální koncentraci 50 μM. Stanovení aktivity bylo provedeno v temperované (37°C) reakční směsi (celkový objem 2000 μl) obsahující 20 μl vzorku, 1980 μl PBS pH 7,4 a 20 μl substrátového roztoku. Reakce byla zahájena v kyvetě se směsí PBS a substrátu, po 30 vteřinách byl přidán vzorek a kinetika stanovena po dobu 60 sekund. Dále byl přidán Triton X-100 (f.c. 1%). A reakce ukončena po 150 sekundách. Uvolnění 7-amino-4-methylkumarinu bylo monitorováno na spektrofluorimetru FluoroMax-4 a vyhodnoceno v programu Fluor Essence V3. Všechna měření byla prováděna v duplikátech.

6.7. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) pro lidskou DPPIV/CD26

Připravený ELISA-kit byl použit pro kvantitativní stanovení lidské DPPIV. Příprava vzorků a reagencií byla provedena dle protokolu výrobce. DPPIV standard nebo vzorky (50 μl) byly v duplikátech pipetovány do připravené 96-jamkové destičky a doplněny 100 μl assay diluent RD1-57. Po dvouhodinové inkubaci při RT, jamky byly 4x opláchnuty (Wash buffer). Do každé jamky bylo přidáno 200 μl konjugátu a následovala opět dvouhodinová inkubace při RT a následně oplach. Každá jamka byla naplněna 200 μl substrátového roztoku (peroxid vodíku a tetramethylbenzidin) a inkubována 30 minut při pokojové teplotě v temnu. Reakce byla zastavena přídavkem 2 M kyseliny sírové (50 μl).

Optická denzita byla stanovena do 30 minut na přístroji Microplate reader Sunrise při vlnové délce 450 nm a korekce byla odečtena při vlnové délce 570 nm.

6.8. Stanovení buněčné proliferace

Stanovení proliferace buněk bylo provedeno v 96 jamkové destičce. Do každé jamky bylo nasazeno 2000 buněk a po 24 hodin byly kultivovány za standardních podmínek. Druhý den bylo vyměněno kultivační médium za indukční

médium (D-MEM + 10% FBS + různé koncentrace doxycyklinu), kontrolním buňkám bylo vyměněno pouze čerstvé médium. Buňky byly fixovány a barveny methylenovou modří v různých časových úsecích. Pro každou koncentraci a časový úsek bylo použito 8 jamek.

Buňky byly lyzovány 1% SDS a relativní počet buněk stanoven odečtením absorbance při vlnové délce 630nm na přístroji Microplate reader Sunrise. Odečtená absorbance byla úměrná počtu buněk. Pro ověření správnosti výsledků, buňky byly v některých experimentech počítány na přístroji Coulter Counter jak bylo popsáno výše.

6.9. Průtoková cytometrie

Buňky byly sbírány trypsinizací a centrifugovány (4 minuty, 4°C, 130 g). Pelet byl resuspendován v PBS pufru s azidem sodným a pomalu byl k buněčné suspenzi pipetován 4% paraformaldehyd (v poměru 1:1). Buňky byly fixovány 1 hodinu při 4°C. Po fixaci byly buňky dvakrát opláchnuty PBS pufrem a centrifugovány (4 minuty, 4°C, 130 g). Na závěr byly buňky resuspendovány v PBS pufru (0,1% azid sodný) a byl stanoven počet buněk (Coulter Counter).

Přibližně 100000 buněk bylo pipetováno do zkumavky a centrifugováno (5 minut, 4°C, 130 g). K peletu byly přidány 2 µl neředěné anti-CD26-PE protilátky a inkubovány v temnu 30 minut. Po inkubaci byly buňky dvakrát opláchnuty ve třech mililitrech PBS pufru a centrifugovány (5 minut, 4°C, 130 g). Supernatant byl odsát.

Vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru FACS Canto II (BD Biosciences, USA) v programu Diva. Histogramy byly vyhodnoceny v programu Flow Jo (TreeStar Inc.) využitím modelu Dean-Jett-Fox.

6.10. Izolace a kvantifikace celkové RNA, real time RT-PCR

Buňky byly sbírány a celková RNA byla izolována činidlem TriZol (2,5 ml/ 10 cm Petriho miska). Celková RNA byla izolována činidlem TriZol dle instrukcí výrobce. Koncentrace celkové RNA byla stanovena kitem RiboGreen RNA Quantitation Kit.

Gen kódující region-specifické oligonukleotidové priméry a fluorogenní TaqMan próby pro real time RT-PCR metodu exprese zkoumaných transkriptů byly připraveny v programu Primer Express (Applied Biosystems, USA) a syntetizovány v Proligo (Francie) a Applied Biosystems. Přehled primérů a prób je uveden v tabulce 1. Exprese mRNA DPPIV a beta-aktinu (interní referenční transkript) byla kvantifikována párovou RT-PCR využitím ThermoScript One-Step System. Real time RT-PCR byla provedena dvakrát v MicroAmp Optical 96-jamkové reakční desce na přístroji ABI PRISM 7700 Sequence Detection System v programu Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA). Reverzní transkripce byla provedena při 58°C po dobu 30 minut a následné spuštění amplifikační reakce (tzv. hot start) probíhalo s iniciální denaturací při 95°C po dobu 5 minut. V každém ze 45 amplifikačních cyklů pak denaturace trvala 15 sekund při 95°C a nasednutí primérů a prób spolu s elongací řetězců 1 minutu při 58°C. Prahová hodnota cyklů (Ct) amplifikačních reakcí byla zobrazována graficky po odečtení pozadí intenzity fluorescence (ΔFI) reportérové barvy (6-FAM nebo VIC) proti počtu PCR cyklů v programu Sequence Detection System. Exprese cílových transkriptů byla normalizována na expresi mRNA beta-aktinu použitím metody ΔCt a linearizace byla použita pro možnost porovnání (například $2^{-\Delta Ct}$, Livak & Schmittgen, 2001).

Transkript	GeneBank Vstupní č.	Sekvence a finální koncentrace primérů a TaqMan prób
DPPIV	**NM_001935**	
	Forward primér:	**5'-TGGAAGGTTCTTCTGGGACTG-3', 200 nmol/l**
	Reverse primer:	**5'-GATAGAATGTCCAAACTCATCAAATGT-3', 200 nmol/l**
	TaqMan próba:	**5'-(6-FAM)CACCGTGCCCGTGGTTCTGCT(TAMRA)-3', 200 nmol/l**
beta-aktin	**NM_001101**	
	Forward primér:	**5'-CTGGCACCCAGCACAATG-3', 200 nmol/l**
	Reverse primer:	**5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3', 200 nmol/l**
	TaqMan próba:	**5'-(VIC)AGCCGCCGATCCACACGGAGT(TAMRA)-3', 200 nmol/l**

Tabulka 1: Přehled primérů a prób pro real time RT-PCR.

6.11. Stanovení koncentrace proteinu

Celková koncentrace proteinu ve vzorcích byla stanovena metodou dle Lowryho [Lowry et al, 1951]. Vzorky byly doplněny deionizovanou vodou do celkového objemu 400 µl. Do každé zkumavky bylo přidáno 1,2 ml roztoku SDS

a okamžitě promícháno (smícháno v poměru 100:1 se 4% $CuSO_4$). Po 10 minutách inkubace bylo do každé zkumavky napipetováno 120 μl Folin & Ciocalteu's fenolového činidla (1:1 naředěno v deionizované vodě) a okamžitě promícháno. Vzorky byly 45 minut inkubovány v temnu při pokojové teplotě. Absorbance byla odečtena na spektrofotometru při nastavené vlnové délce 660 nm. Standardní křivka byla připravena použitím BSA. Všechny vzorky byly stanoveny třikrát.

6.12. Stanovení luciferázové aktivity

Transkripční aktivita byla ověřena expresí luciferázy využitím detekčního kitu Luciferase Assay Systém. Přechodně transfekované buňky byly dvakrát opláchnuty PBS pufrem a byl připraven buněčný lyzát (1x lyzační pufr v deionizované vodě, 400 μl/60 mm Petriho miska). Lyzát byl důkladně vortexován a centrifugován (2 minuty, 4°C, 12,000 g). Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a uchován při –70°C.

Stanovení aktivity luciferázy bylo provedeno v 96-jamkové neprůhledné destičce (Nunc) na přístroji 1420 multilabel counter Victor 3. Nejprve bylo pipetováno 10 μl buněčného lyzátu a následně přidáno 50 μl Luciferase Assay Reagent činidla. Hodnoty byly stanoveny jako impulsy za sekundu (CPS) a upraveny odečtením hodnoty blanku (10 μl 1x lyzačního pufru). Získané hodnoty byly normalizovány na koncentraci celkového proteinu vstupního lyzátu. Každý vzorek byl stanoven dvakrát.

U2-OS-Luc Tet-On Control buněčná linie je připravená stabilně transfekovaná Tet-On buněčná linie, která je schopna po indukci doxycyklinem navýšit expresi proteinu 500x. Tato buněčná linie byla použita pro stanovení efektivní koncentrace doxycyklinu a pro ověření možné kontaminace FBS tetracyklinem. Buňky byly nasazeny v počtu 0,5 x 10^5 do 12 jamek 6-ti jamkové destičky a kultivovány v D-MEM médiu (10% FBS) a do 12-ti jamek 6-ti jamkové destičky a kultivovány v D-MEM médiu s 10% Tet System Approved FBS. Doxycyklin byl přidán po čtyřech hodinách do dvou sérií jamek o celkové koncentraci: 0,1 x 10^{-3}; 1 x 10^{-2}; 0,1; 1,0; 10; 100 a 1000 ng/ml. Buňky byly pěstovány po dobu 48 hodin a následně byla stanovena exprese luciferázy.

7. Výsledky

Cílem této práce je příprava stabilně transfekovaných lidských glioblastomových buněčných linií. Jako expresní systém byl využit tetracyklinem regulovaný Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System od společnosti Clontech.

7.1. Příprava plazmidu

Pro transfekci byli připraveny plazmidy s genem pro lidskou DPPIV (Daliborem Koškem, Laboratoř architektury proteinů, PřF UK). Genová sekvence lidské wt DPPIV je znázorněna na obrázku 6.

Pro transfekci byly připraveny dvě podoby genu pro lidskou DPPIV. První, divoká forma genu lidské DPPIV s neporušenou katalytickou triádou a druhá, s mutací DPPIV, při které byla provedena aminokyselinová záměna serinu z katalytické triády za alanin na pozici 630. CD26forward primer byl použit při sekvenaci pro potvrzení přítomnosti serinu nebo alaninu na pozici 630.

```
5 -.. tatctgtatttttgctagcagtaatactaacggttnttttttttctcttcacagg
                         BamHI                    EcoRI
Ccnccnagcttggtaccgagctcggatccnctagtccagtgtggtggaattcggcttacg

ATGaagacaccgtggaaggttcttctgggactgctgggtgctgctgcgcttgtcaccatc      60
 M  K  T  P  W  K  V  L  L  G  L  L  G  A  A  A  L  V  T  I      20

atcaccgtgcccgtggttctgctgaacaaaggcacagatgatgctacagctgacagtcgc      120
 I  T  V  P  V  V  L  L  N  K  G  T  D  D  A  T  A  D  S R       40

aaaacttacactctaactgattacttaaaaatacctacttatagactgaagttatactcc      180
 K  T  Y  T  L  T  D  Y  L  K  N  T  Y  R  L  K  L  Y  S L       60

cgatggatttcagatcatgaatatctctacaaacaagaaaataatatcttggtattcaat      240
 R  W  I  S  D  H  E  Y  L  Y  K  Q  E  N  N  I  L  V  F  N       80
                                        SEDOSQR1(rev)
gctgaatatggaaacagctcagtttcttggagaacagtacatttgatgagtttggacat      300
 A  E  Y  G  N  S  S  V  F  L  E  N  S  T  F  D  E  F  G  H      100

tctatcaatgattattcaatatctcctgatgggcagtttattctcttagaatacaactac      360
 S  I  N  D  Y  S  I  S  P  D  G  Q  F  I  L  L  E  Y  N  Y      120
                                              SwaI
gtgaagcaatggaggcattcctacacagcttcatatgacatttatgatttaaataaaagg      420
 V  K  Q  W  R  H  S  Y  T  A  S  Y  D  I  Y  D  L  N  K  R      140

cagctgattacagaagagaggattccaaacaacacacagtgggtcacatggtcaccagtg      480
 Q  L  I  T  E  E  R  I  P  N  N  T  Q  W  V  T  W  S  P  V      160

ggtcataaattggcatatgtttggaacaatgacatttatgttaaaattgaaccaaattta      540
```

```
 G  H  K  L  A  Y  V  W  N  N  D  I  Y  V  K  I  E  P  N  L      180

ccaagttacagaatcacatggacggggaaagaagatataatatataatggaataactgac     600
 P  S  Y  R  I  T  W  T  G  K  E  D  I  I  Y  N  G  I  T  D      200

tgggtttatgaagaggaagtcttcagtgcctactctgctctgtggtggtctccaaacggc     660
 W  V  Y  E  E  E  V  F  S  A  Y  S  A  L  W  W  S  P  N  G      220

acttttttagcatatgcccaatttaacgacacagaagtcccacttattgaatactccttc     720
 T  F  L  A  Y  A  Q  F  N  D  T  E  V  P  L  I  E  Y  S  F      240

tactctgatgagtcactgcagtacccaaagactgtacgggttccatatccaaaggcagga     780
 Y  S  D  E  S  L  Q  Y  P  K  T  V  R  V  P  Y  P  K  A  G      260

gctgtgaatccaactgtaaagttctttgttgtaaatacagactctctcagctcagtcacc     840
 A  V  N  P  T  V  K  F  F  V  V  N  T  D  S  L  S  S  V  T      280

aatgcaacttccatacaaatcactgctcctgcttctatgttgataggggatcactacttg     900
 N  A  T  S  I  Q  I  T  A  P  A  S  M  L  I  G  D  H  Y  L      300

tgtgatgtgacatgggcaacacaagaaagaatttctttgcagtggctcaggaggattcag     960
 C  D  V  T  W  A  T  Q  E  R  I  S  L  Q  W  L  R  R  I  Q      320

aactattcggtcatggatatttgtgactatgatgaatccagtggaagatggaactgctta    1020
 N  Y  S  V  M  D  I  C  D  Y  D  E  S  S  G  R  W  N  C  L      340

gtggcacggcaacacattgaaatgagtactactggctgggttggaagatttaggccttca    1080
 V  A  R  Q  H  I  E  M  S  T  T  G  W  V  G  R  F  R  P  S      360

gaacctcattttacccttgatggtaatagcttctacaagatcatcagcaatgaagaaggt    1140
 E  P  H  F  T  L  D  G  N  S  F  Y  K  I  I  S  N  E  E  G      380

tacagacacatttgctatttccaaatagataaaaaagactgcacatttattacaaaaggc    1200
 Y  R  H  I  C  Y  F  Q  I  D  K  K  D  C  T  F  I  T  K  G      400

acctgggaagtcatcgggatagaagctctaaccagtgattatctatactacattagtaat    1260
 T  W  E  V  I  G  I  E  A  L  T  S  D  Y  L  Y  Y  I  S  N      420

gaatataaaggaatgccaggaggaaggaatctttataaaatccaacttagtgactataca    1320
 E  Y  K  G  M  P  G  G  R  N  L  Y  K  I  Q  L  S  D  Y  T      440

aaagtgacatgcctcagttgtgagctgaatccggaaaggtgtcagtactattctgtgtca    1380
 K  V  T  C  L  S  C  E  L  N  P  E  R  C  Q  Y  Y  S  V  S      460

ttcagtaaagaggcgaagtattatcagctgagatgttccggtcctggtctgcccctctat    1440
 F  S  K  E  A  K  Y  Y  Q  L  R  C  S  G  P  G  L  P  L  Y      480

actctacacagcagcgtgaatgataaagggctgagagtcctggaagacaattcagctttg    1500
 T  L  H  S  S  V  N  D  K  G  L  R  V  L  E  D  N  S  A  L      500

gataaaatgctgcagaatgtccagatgccctccaaaaaactggacttcattattttgaat    1560
 D  K  M  L  Q  N  V  Q  M  P  S  K  K  L  D  F  I  I  L  N      520

gaaacaaaattttggtatcagatgatcttgcctcctcattttgataaatccaagaaatat    1620
 E  T  K  F  W  Y  Q  M  I  L  P  P  H  F  D  K  S  K  K  Y      540

cctctactattagatgtgtatgcaggcccatgtagtcaaaaagcagacactgtcttcaga    1680
 P  L  L  L  D  V  Y  A  G  P  C  S  Q  K  A  D  T  V  F  R      560

ctgaactgggccacttaccttgcaagcacagaaaacattatagtagctagctttgatggc    1740
 L  N  W  A  T  Y  L  A  S  T  E  N  I  I  V  A  S  F  D  G      580
       CD26forw(forw)
agaggaagtggttaccaaggagataagatcatgcatgcaatcaacagaagactgggaaca    1800
 R  G  S  G  Y  Q  G  D  K  I  M  H  A  I  N  R  R  L  G  T      600
```

```
tttgaagttgaagatcaaattgaagcagccagacaattttcaaaaatgggatttgtggac      1860
 F  E  V  E  D  Q  I  E  A  A  R  Q  F  S  K  M  G  F  V  D      620

aacaaacgaattgcaatttggggctggtcatatggagggtacgtaacctcaatggtcctg      1920
 N  K  R  I  A  I  W  G  W  S  Y  G  G  Y  V  T  S  M  V  L      640

ggatcgggaagtggcgtgttcaagtgtggaatagccgtggcgcctgtatcccggtgggag      1980
 G  S  G  S  G  V  F  K  C  G  I  A  V  A  P  V  S  R  W  E      660

tactatgactcagtgtacacagaacgttacatgggtctcccaactccagaagacaacctt      2040
 Y  Y  D  S  V  Y  T  E  R  Y  M  G  L  P  T  P  E  D  N  L      680

gaccattacagaaattcaacagtcatgagcagagctgaaaattttaaacaagttgagtac      2100
 D  H  Y  R  N  S  T  V  M  S  R  A  E  N  F  K  Q  V  E  Y      700

ctccttattcatggaacagcagatgataacgttcactttcagcagtcagctcagatctcc      2160
 L  L  I  H  G  T  A  D  D  N  V  H  F  Q  Q  S  A  Q  I  S      720

aaagccctggtcgatgttggagtggatttccaggcaatgtggtatactgatgaagaccat      2220
 K  A  L  V  D  V  G  V  D  F  Q  A  M  W  Y  T  D  E  D  H      740

ggaatagctagcagcacagcacaccaacatatatatacccacatgagccacttcataaaa      2280
 G  I  A  S  S  T  A  H  Q  H  I  Y  T  H  M  S  H  F  I  K      760
                  EcoRI                        NotI
caatgtttctcttaagccgaattctgcagatatccagcacagtggcggccgctcgaggtc      2292
 Q  C  F  S ***                                                   764

acccattcgaaggtaagcctatccctaaccctctcctcggtctcgattctacgcgtaccg

gtcntcnncaccnncnccnnnnnn – 3
```

Obrázek 6: Sekvence wtDPPIV: pozice restrikčních míst je označena červeným písmem a restrikční enzymy jsou popsány nad sekvencí. Počáteční kodón ATG je napsán velkými písmeny. Modrá část sekvence reprezentuje transmembránovou doménu DPPIV. EcoRI restrikční místo bylo použito pro vnesení inzertu do pTre-Tight vektoru (Obrázek 4). V sekvenci DPPIV jsou označeny dvě polohy pro priméry (SEDOSQR1 a CD26forw), které byly použity pro ověření správnosti vložení inzertu do vektoru pTRE-Tight. Pozice serinu[630] je označena červenou barvou.

Pro přípravu stabilních transfektantů byly použity vektory: pTet-On-Advanced (obsahující regulační protein rtTA, obrázek 4), pTRE-Tight-DPPIV (nesoucí wt podobu genu lidské DPPIV) a pTRE-Tight-mDPPIV (nesoucí enzymaticky neaktivní podobu genu lidské DPPIV). Očekávané buněčné linie jsou přehledně uvedeny v tabulce č. 2.

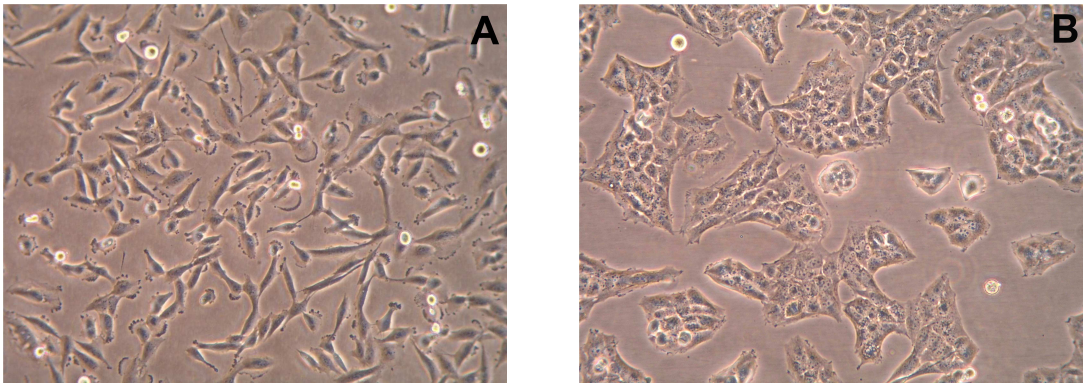
Plazmid → / **Buněčná linie ↓**	**pTet-On-Advanced**	**pTRE-Tight-DPPIV**	**pTRE-Tight-mDPPIV**
U373MG	U373On	U373DPPIV(NF, PF, PPF)	U373MUT (NF, PF, PPF)
T98G	T98GOn	T98GDPPIV (NF, PF, PPF)	T98GMUT (NF, PF, PPF)

Tabulka 2: Očekávané buněčné linie U373MG a T98G; metodou imunomagnetické separace předpokládaný zisk negativní frakce (NF), pozitivní frakce (PF). Po imunomagnetické separaci buněčného klonu PF, předpokládaný zisk dvojitě pozitivní frakce (PPF).

7.2. Transfekce buněk

Na začátku příprav transfekovaných buněk byla provedena pilotní studie s buňkami U2-os podle doporučení výrobce. Byla ozkoušena případná kontaminace hovězího séra tetracyklinem. Buňky byly transientně transfekovány vektorem pTre-Tight-Luc, pěstovány v běžně používaném séru netestovaném na přítomnost antibiotik (Sigma) a v hovězím séru s ověřenou absencí tetracyklinu (Clontech). Buňky byly indukovány různou koncentrací doxycyklinu. Nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi buňkami pěstovaným v běžném séru a séru s ověřenou absencí tetracyklinu (data nejsou uvedena).

Optimální koncentrace selekčních antibiotik a optimální podmínky pěstování byly testovány pro buněčné linie U373MG a T98G (obrázek 7). Jako dostatečná koncentrace geneticinu pro buněčnou linii U373MG byla stanovena f.c. 400 μg/ml kultivačního média; pro buňky T98G 200 μg/ml. Hygromycin B, jako druhé selekční antibiotikum bylo přidáváno do média buněk U373MG a T98G ve finální koncentraci 200 μg/ml. Během selekce transfekovaných klonů byly buňky udržovány na nízké konfluenci - přibližně 30 – 40% konfluence.

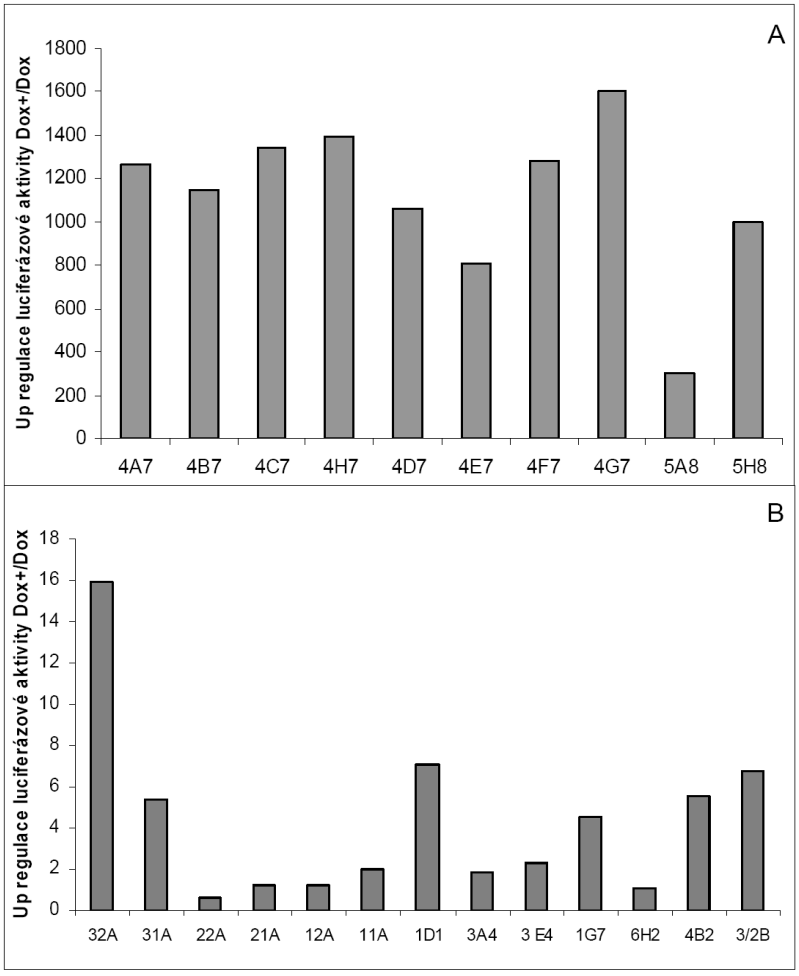


Obrázek 7: Buňky **U373MG** (A) a **T98G** (B). Zvětšení 100x.

Obě buněčné linie byly transfekovány vektorem pTet-On-Advanced. K získání stabilních transfekovaných buněk byla zahájena selekce pomocí antibiotika geneticin/G418. Během několika týdnů se začaly objevovat první rezistentní klony, z kterých bylo vybráno zhruba 30 geneticin-rezistentních klonů z U373On a T98GOn buněk. Rostoucí rezistentní klony byly následně dále expandovány pro ověření inzerce genu do genomu buňky, která byla provedena transientní transfekcí vektoru pTre-Tight-Luc a stanovení aktivity luciferázy.

Pro každý klon byl vyhodnocen poměr doxycyklinem indukované exprese luciferázy ku kontrolním buňkám stejného klonu (bez indukce doxycyklinem). Výsledky exprese luciferázy byly vztaženy na celkový buněčný protein lyzátu. Téměř všechny testované klony U373On vykazovaly vysokou indukovatelnost exprese luciferázy v porovnání s kontrolou. Zvýšení exprese se pohybovala v tisícinásobcích (graf 1 A). Pro další transfekci byl vybrán klon U373On/4G7, u kterého byla tímto experimentem ověřena správná inzerce vektoru pTet-On-Advanced.

Nízká indukce luciferázové aktivity byla pozorována u klonů T98GOn. Pro pokračování v přípravě transfektantů byl vybrán klon s největší schopností zvýšit expresi luciferázové aktivity.



Graf č. 1: Navýšení luciferázové aktivity u klonů buněčné linie U373On (A) a T98GOn (B). Jednotlivé sloupce značí hodnotu navýšení luciferázové aktivity pro testované klony.

Oba vybrané klony byly pěstovány za standardních podmínek až do páté pasáže. Transfekované U373On/4G7 a T98GOn32a buňky rostly jako kompaktní buňky a morfologicky se výrazně neodlišovaly od netransfekovaných U373MG, respektive T98G buněk.

Schopnost indukce DPPIV buněk byla v páté pasáži ověřena tranzientní transfekci vektoru pTRE-Tight obsahující mutovanou podobou genu DPPIV a následnou indukcí doxycyklinem. Z buněčných lyzátů byla provedena ELISA pro kvantifikaci exprese mDPPIV proteinu. U373On/4G7 prokázaly opět vysokou expresi DPPIV, zatímco klon T98GOn/32a nevykazoval žádnou expresi proteinu DPPIV po 48 hodinové indukci doxycyklinem 10^{-6} g/ml. T98G wt buňky byly opětovně transfekovány cirkulárním vektorem pTet-On-Advanced. V jednotlivých transfekcích byl měněn poměr Lipofectamin^{TM}2000:DNA. Do dnešní doby se nepodařilo izolovat žádný indukce schopný klon T98GOn. Buňky vždy vykazují rezistenci na antibiotikum geneticin, ale nejsou schopné indukce exprese DPPIV po přechodné transfekci. Ve spolupráci s Daliborem Koškem byla připravena lineární forma pTet-On-Advanced vektoru a tato forma použita k dalším transfekcím. Momentálně probíhá selekce transfekovaných buněk a stále nebyl získán geneticin rezistentní klon.

7.3. Příprava dvojitě transfekovaných Tet-On-Advanced buněčných linií s pTRE-Tight-DPPIV vektorem

U373On/4G7 geneticin rezistentní klon byl použit pro další kotransfekci vektorem pTRE-Tight-DPPIV a pTRE-Tight-mDPPIV společně s markerem pro hygromycinovou rezistenci. Buňky byly po tranfekci nadále udržovány pod selekčním antibiotikem geneticinem. Antibiotikum hygromycin B bylo přidáno jako další selekční činidlo pro získání klonů transfekovaných DPPIV.

7.3.1. Buněčná linie U373MUT

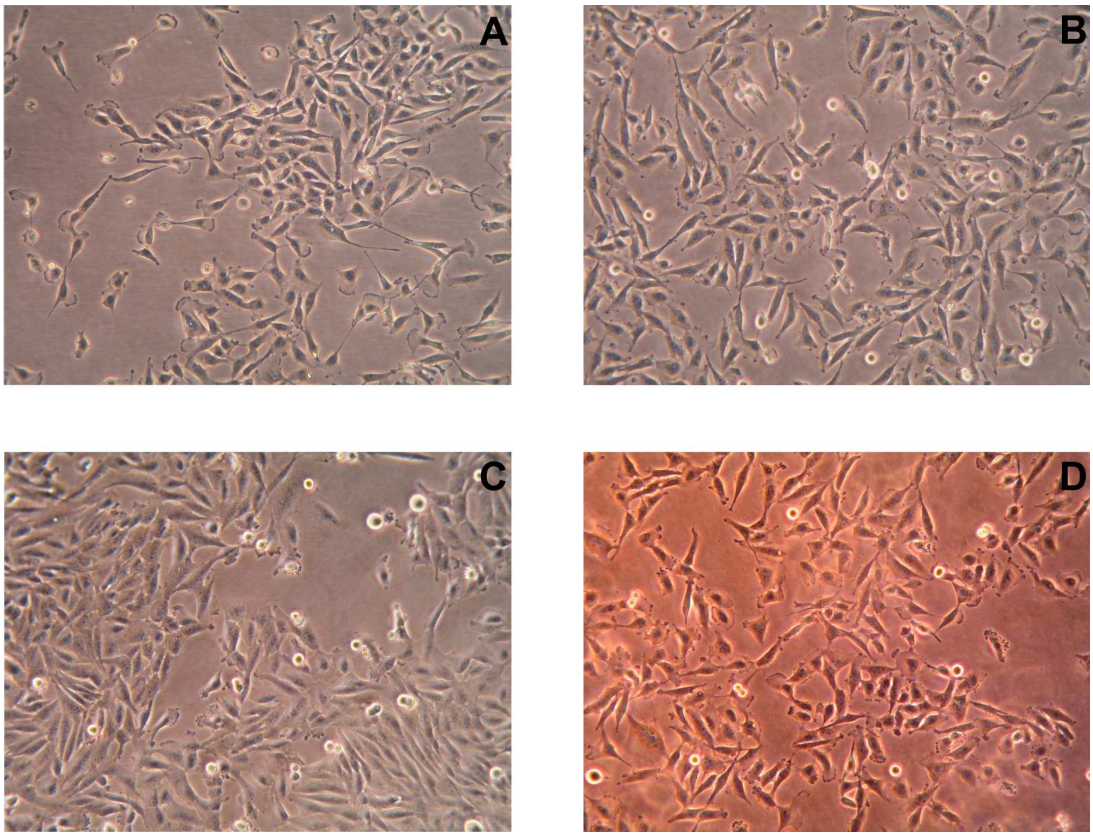
Po několika týdnech selekce byly získány klony s mDPPIV. Stabilní rezistentní klony byly dále expandovány a byla ověřena schopnost indukce exprese DPPIV po indukci doxycyklinem. Z každého klonu byl připraven buněčný lyzát z buněk indukovaných doxycyklinem a jeho příslušná kontrola (bez indukce doxycyklinem) a metodou ELISA kvantifikováno zvýšení genové exprese. Klon 1 z U373MUT prokázal nízkou expresi DPPIV a v lyzátu se enzymatická aktivita DPPIV nelišila od kontrolních vzorků. Potvrzení exprese DPPIV bylo ověřeno metodou průtokové cytometrie s použitím specifické protilátky. Všechny výsledky

potvrdily klon č. 1 U373MUT jako dvojitě transfekovaný stabilní klon nesoucí mutovanou podobu genu DPPIV.

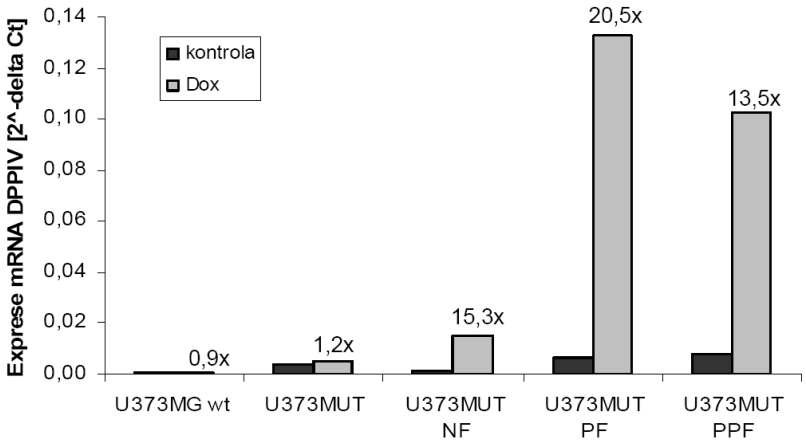
Byla provedena magnetická separace buněk U373MUT klonu č. 1 po 48 hodinové indukci buněk koncentrací 10^{-6} g/ml doxycyklinu byly buňky separovány přímou metodou a rozděleny na pozitivní frakci (PF; buňky exprimující mDPPIV) a negativní frakci (NF; směs neexprimujících buněk a slabě exprimujících mDPPIV). U373MUT PF buňky byly následně po první pasáži tříděny ještě jednou stejným způsobem a pouze pozitivní frakce byla dála kultivována. Negativní frakce obsahovala minimální množství buněk, což značí vysokou úspěšnost již první separace. Buňky se mezi sebou morfologicky neodlišovaly, ke změnám nedocházelo ani po indukci doxycyklinem (obrázek 8).

Enzymatická aktivita DPPIV byla měřena u získaných dvojitě transfekovaných buněk U373MUT, U373MUT PF a U373MUT PPF (popis viz tabulka 2). Nárůst specifické enzymatické aktivity nebyl detekován u žádné z výše zmíněných linií po 48 hodinové indukci koncentrací 10^{-6} g/ml doxycyklinu. Hodnoty indukovaných buněk se pohybovaly na úrovni kontrolních neindukovaných buněk.

Exprese mRNA mDPPIV byla stanovena v buňkách wt U373MG a u všech buněčných linií získaných magnetickou separací (graf 2).

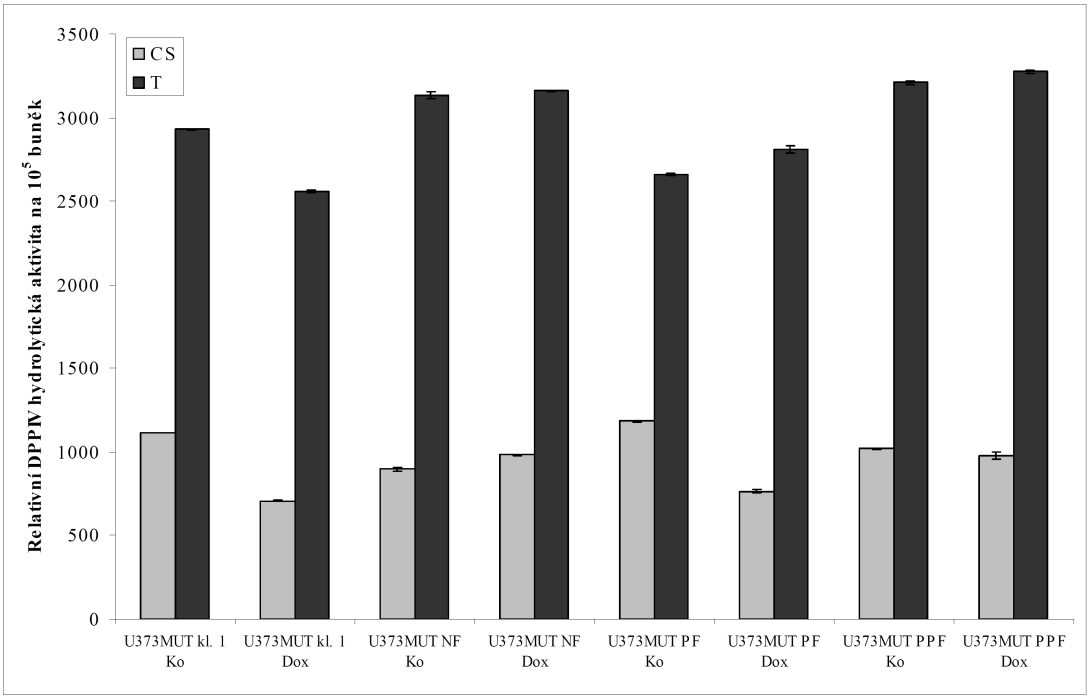


Obrázek 8: Buňky **U373MUT** (A), **U373MUT PF** (B), **U373MUT PPF** (C) a **U373MUT PF** po 48 hodinové indukci doxycyklinem (10^{-6} g/ml). Zvětšení 100x.

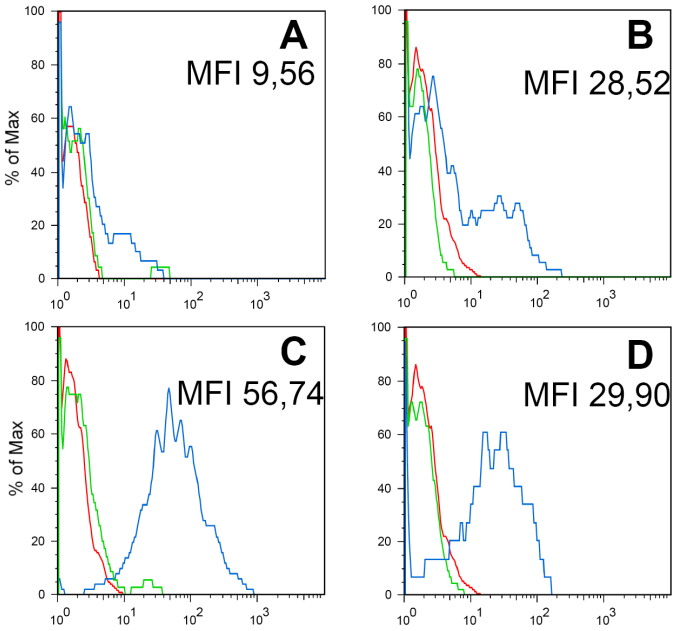


Graf 2: Exprese mRNA mDPPIV získaná metodou RT-PCR, normalizováno na lidský beta-aktin v transfekovaných liniích odvozených z U373MG. Černé sloupce: neindukované kontrolní buňky; šedé sloupce: indukované buňky (Dox 10^{-6} g/ml). Čísla značí násobek exprese proteinu daného klonu vůči kontrole.

Data enzymatických aktivit (graf 3), FACS histogram a medián intenzity fluorescence (MFI) je zobrazen na obrázku 9.



Graf 3: Relativní hydrolytická aktivita U373MUT buněk (různé frakce) exprimujících DPPIV po indukci doxycyklinem 10^{-6} g/ml. Šedivé sloupce – hydrolytická aktivita stanovena na povrchu buněk, černé sloupce – hydrolytická aktivita stanovena po přídavku Tritonu X-100 (f.c. 1%).

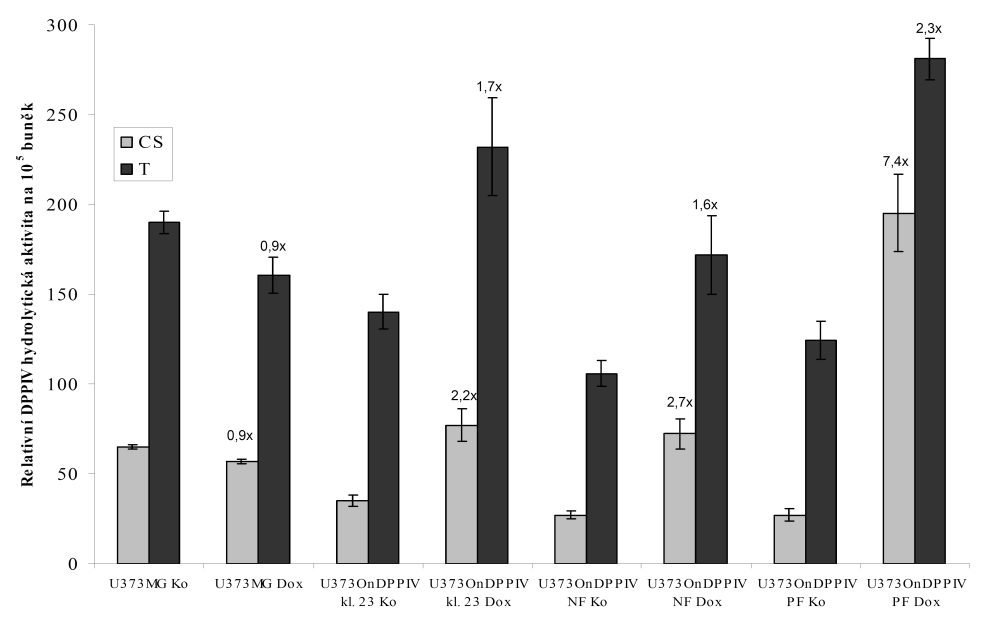


Obrázek 9: FACS histogram buněk U373Mut kl. 1 (A), U373MUT NF (B), U373MUT PF (C), U373MUT PPF (D). Červená linie značí kontrolu barvení, modrá je pro kontrolní buňky a zelená linie je pro buňky exprimující DPPIV po indukci doxycyklinem 48 hodin (f.c. 10^{-6} g/ml). Uváděná hodnota MFI je pro DPPIV exprimující buňky.

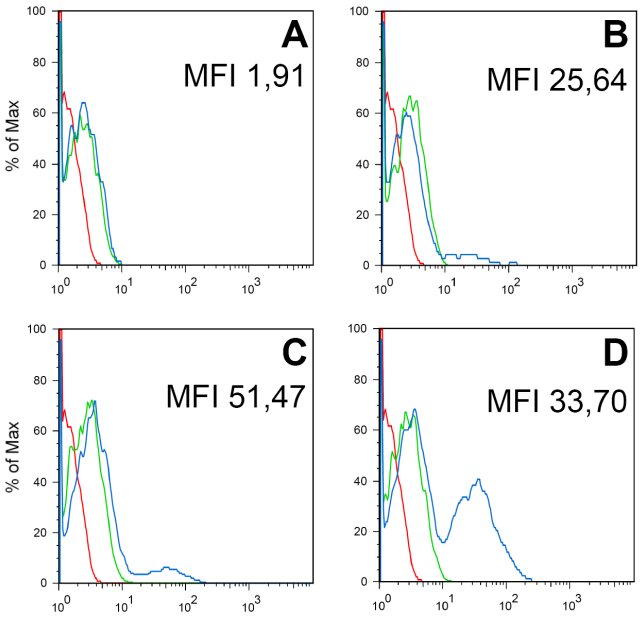
7.3.2. Buněčná linie U373OnDPPIV

V první transfekci vektorem pTRE-Tight-DPPIV nebyla získána žádná hygromycin rezistentní kolonie buněk. Po optimalizaci transfekčních podmínek (úprava poměru Lipofectamine^{TM}2000:DNA) při druhé transfekci byly získány hygromycin rezistentní kolonie. Bylo vybráno 30 kolonií pro ověření enzymatické aktivity po indukci doxycyklinem (48 hodin, 10^{-6} g/ml). Většina buněk vykazovala zhruba dvojnásobný nárůst povrchové a celkové aktivity ke své kontrole. Několik klonů bylo testováno metodou průtokové cytometrie s využitím specifické protilátky. Ze všech stanovených buněčných klonů byl vybrán klon č. 23 U373OnDPPIV, který vykazoval 12-ti procentní subpopulaci exprimující wtDPPIV (graf 4 - hydrolytická aktivita a FACS histogramy – obrázek 10B).

DPPIV exprimující subpopulace byla izolována magnetickou separaci U373OnDPPIV buněk a následně tato frakce bude použita pro další ověření zvýšení exprese DPPIV. Enzymatická aktivita a FACS profil izolované pozitivní a negativní frakce, vstupních buněk a wt U373MG buněk je uveden v grafu č. 4 a na obrázku 10. Průtoková cytometrie buněk U373OnDPPIV PF prokázala 40-ti procentní subpopulaci exprimující DPPIV. Pro získání jednotné populace buněk schopné exprese DPPIV bude provedena další magnetická separace této buněčné linie a ověřena indukce exprese, zastoupení exprimujících buněk a další parametry.



Graf 4: **Relativní hydrolytická aktivita U373OnDPPIV buněk** (různé frakce) exprimujících DPPIV po indukci doxycyklinem 10^{-6} g/ml, 48 hodin. Šedivé sloupce – hydrolytická aktivita stanovena na povrchu buněk, černé sloupce – hydrolytická aktivita stanovena po přídavku Tritonu X-100 (f.c. 1%). Čísla značí hodnotu up regulace indukovaných buněk k neindukovaným buňkám.

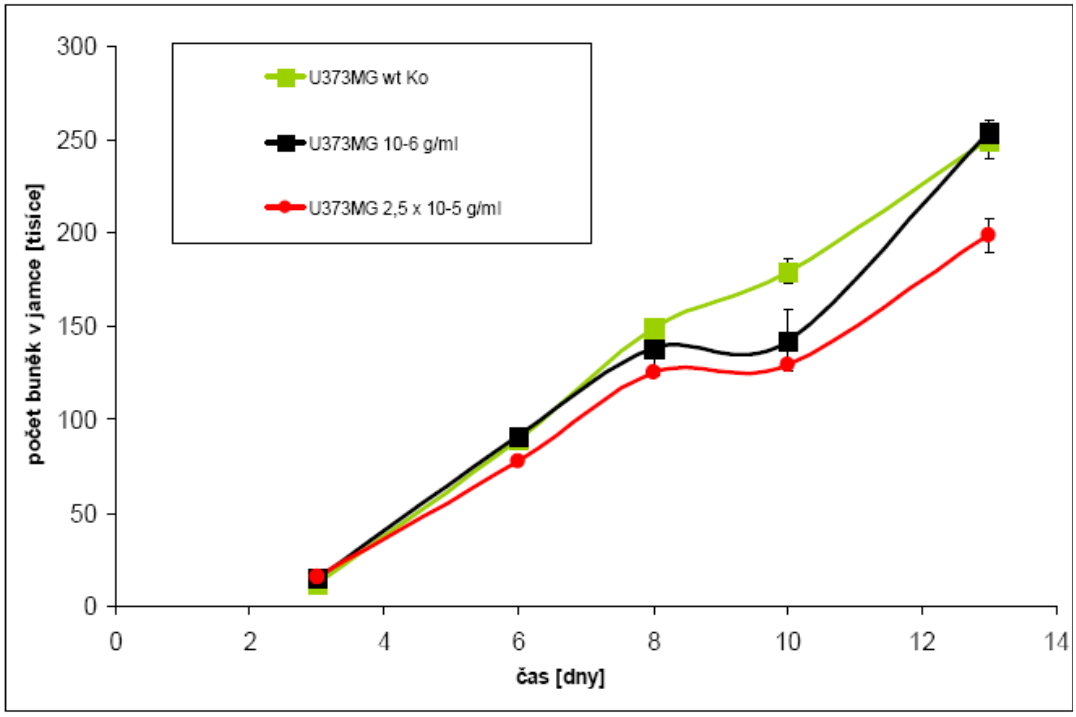


Obrázek 10: **FACS histogram buněk U373MG** (A), **U373OnDPPIV kl. 23** (B), **U373OnDPPIV NF** (C), **U373OnDPPIV PF** (D). Červená linie značí kontrolu barvení, modrá je pro kontrolní buňky a zelená linie je pro buňky exprimující DPPIV po indukci doxycyklinem, 48 hodin (f.c. 10^{-6} g/ml). Uváděná hodnota MFI je pro DPPIV exprimující buňky.

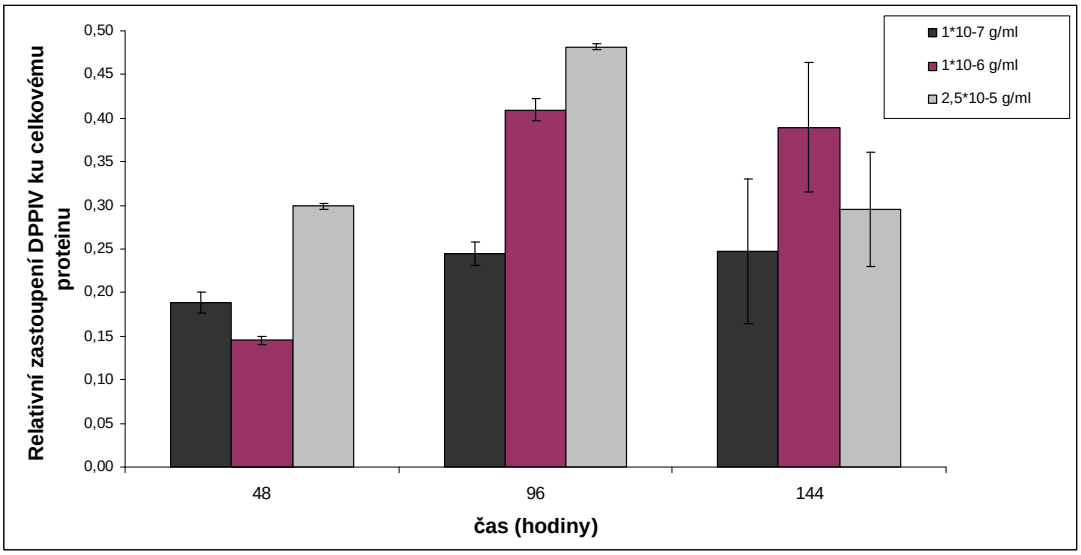
7.4. Vliv doxycyklinu na U373MG a exprese DPPIV proteinu v U373MUT PF

Působení doxycyklinu bylo hodnoceno pro wt U373MG. Dvě různé koncentrace (f.c. 1 x 10^{-6} a 2,5 x 10^{-5} g/ml Dox) společně s kontrolou (čerstvé kompletní médium) bylo hodnoceno po dobu 13-ti dnů. Žádný výrazný rozdíl v růstu buněk po působení různými koncentracemi doxycyklinu nebyl prokázán (graf 5).

Zjištění vlivu různých koncentrací doxycyklinu a doby indukce na výsledné navýšení exprese proteinu DPPIV byl hodnocen u buněk U373MUT PF. Již velmi nízké koncentrace (f.c. 10^{-7} g/ml) doxycyklinu aktivují transkripci genu mDPPIV (graf 6). Výsledná koncentrace 10^{-6} g/ml byla určena jako dostatečná pro vysokou a dlouhotrvající indukci exprese proteinu mDPPIV



Graf 5: Růstové křivky buněčné linie U373MG. Jednotlivé křivky odpovídají různým koncentracím doxycyklinu (viz legenda). Buňky byly počítány na přístroji Coulter Counter Z2.



Graf 6: **Relativní zastoupení exprese DPPIV k celkovému proteinu v buňkách U373MUT PF**. Buňky byly indukovány rozdílnou koncentrací doxycyklinu (f.c. $1x10^{-7}$ až $2,5x10^{-5}$ g/ml) a buněčný lyzát byl připraven v různých časových intervalech. Data představují průměr ze dvou nezávislých analýz.

8. Diskuze

V průběhu let byly vytvořeny metody vnesení genetické informace do genomu pro různé buněčné typy, tkáně a celé organismy. Transgenní buněčné linie slouží pro studium proteinových funkcí a současné využití systému s indukovatelnou genovou expresí nabízí využití nejen v modelech *in vitro*, ale i *in vivo*. Příprava stabilně transfekovaných buněčných linií, které exprimují specifický protein, je často pracná a časově náročná záležitost.

Systémy, které zajišťují specifickou indukci genové exprese, nabízejí jedinečné výhody pro studium rozmanitých biologických otázek. Techniky genové regulace umožňují rychlou, silnou, precizní a reverzibilní indukci genové aktivity. Ideální systém dodržuje následující požadavky proteinové exprese: specifitu účinku, neinterferuje s hostitelskou buňkou, vysokou indukovatelnost, stravitelnost indukčního činidla, reverzibilitu a závislost na dávce indukčního činidla [Saez et al, 1997].

Během transfekce buněk jsme konfrontováni s vysokou variabilitou v hodnotách exprese transgenů a v mnoha případech nastává i postupné snížení až vymizení proteinové exprese, které může být zapříčiněno z několika níže uvedených důvodů [Pikaart et al, 1998].

V průběhu transfekce a příprav stabilních buněčných linií se vektor nesoucí gen zájmu musí dostat do buněčného jádra. Konkrétní metoda přenosu DNA molekuly, prostředí chromatinu a specifické regulační elementy asociované společně s transgenem jsou kritické při získávání vhodného expresního vzorce (přehledně popsáno v Recillas-Targa, 2006). Nejen sám proces transfekce *in vitro*, ale i jeho funkční důsledek, exprese daného proteinu, může ovlivnit celý průběh přípravy a přežití transfekovaných buněk [Mielke et al, 2000].

Pozorování buněk v průběhu transfekce a při selekci pozitivních klonů je nezbytné k vytvoření protokolu s optimálními transfekčními podmínkami, mezi které patří hustota buněk při transfekci a dále v případě lipofekce poměr plazmidové DNA s transfekčním činidlem Lipofectamine™2000, kde nadbytek kladně nabitých liposomů může být toxický pro určité buněčné linie. Příprava všech stabilně transfekovaných buněčných linií v této práci, využívající regulovatelné genové exprese, po optimalizaci podmínek trvala zhruba čtyři měsíce. Nejprve bylo nutné

získat buněčné linie stabilně exprimující regulační rtTA protein, a poté následovala transfekce vektorem nesoucí gen pro wtDPPIV nebo mDPPIV, kde byla opět nutná optimalizace transfekčních podmínek vzhledem k jiné velikosti vnášeného vektoru.

Topologie celého komplexu DNA s kladně nabitými lipidy nebo polymery je zásadně významná pro úspěch transfekce a celkového výtěžku. Byla provedena řada topologických studií vektorů s transgenní DNA [např. Cherng et al, 1999]. Rozdílná geometrie formovaných komplexů vede při vnášení lineární formy DNA liposomem-zprostředkovanou transfekcí k nižším výtěžkům v porovnání s transferem cirkulárního DNA plazmidu. Cirkulární forma plazmidů utváří kompaktní komplex s transfekčním činidlem, který je snáze vnesen do cytoplazmy buněčnou endocytózou, zatímco lineární forma je více náchylná k degradaci [von Groll et al, 2006]. Pří transfekci velkých plazmidů se však v některých případech může jevit lineární forma vektoru více vhodná. U linie U373MG se osvědčila cirkulární forma všech použitých plazmidů. U linie T98G se nepodařilo získat stabilně transfekovaný klon nesoucí regulační protein rtTA. Vektor pTetOn-Advanced nesoucí gen pro tento protein je 7,1 kb dlouhý plazmid. V rámci optimalizace transfekčních podmínek bude testována transfekce lineární formou tohoto vektoru.

Dalším významným faktorem určujícím funkční důsledky provedené transfekce buněk je integrace rekombinantních genů. Námi použitá transfekční metoda lipofekce pro zajištění integrace rekombinantních genů do hostitelského genomu je na základě náhodné inzerce do chromozomu. Bohužel tento postup má obecně velmi nízké výtěžky [Gorman & Bullock, 2000]. Přesné místo inzerce do hostitelského chromozomu, počet vnesených kopií genu (copy number) a výsledná hladina produkce proteinu nemůže být předem určena. Vedlejší účinky transfekce představují další limit úspěšnosti expresních experimentů. Transientní exprese pTRE-Tight cirkulárních plazmidů s genem pro luciferázu nebo mDPPIV ověřila funkčnost expresních plazmidů a celého systému před zahájením přípravy stabilních transfekovaných buněk obou gliomových linií.

Jedním z velmi důležitých kritérií úspěšné proteinové produkce v rekombinantních buňkách je udržení stability exprese. V buňkách běžně dochází k modulacím exprese proteinu na molekulární úrovni počínaje množstvím kopií vnesené DNA do hostitelského genomu a dále v procesech transkripce, posttranskripčních úprav, translace, posttranslačních modifikací, v sekreci a stabilitě

proteinového produktu. Jedná se o komplexní procesy zahrnující množství kroků, jejichž molekulární mechanismy nejsou mnohdy řádně objasněny a důsledek jejich souběhu nelze bez experimentu odhadnout.

Jako součást selektivní buněčné odpovědi na vnesený gen může dojít k potlačení exprese, která není spojena se ztrátou transgenu v hostitelském genomu. Remodelace chromatinu a další modulace, jako například methylace genu, acetylace histonů, fosforylace a ubiquitinace proteinů, jsou zodpovědné za snížení transkripce a následné translace proteinu [Mielke et al, 2000, Pikaart et al, 1998]. Pro zajištění stability mRNA je potřeba několika proteinů, stejně tak jako pro posttranslační modifikace. Pro zaručení správnosti všech kroků je kritický bod exprese rekombinantních proteinů. Buněčná linie T98G po transfekci vektorem pTetOn-Advanced a následné selekci dále proliferovala až do šesté pasáže, kdy náhle došlo k vymření celé populace, což může svědčit pro uplatnění nežádoucích mechanismů regulace transgenu a nebo jeho negativního vlivu na exprimující buňku.

Ztráta transgenu z hostitelského genomu je dalším z nedostatečně popsaných fenoménů. Transkripce je považována za dominantní bod kontroly proteinové exprese. Tet on vektory využité v této práci byly připraveny pro buněčně nezávislou kontrolu. Transkripce vneseného genu je pod kontrolou indukčního činidla a navýšení proteinové exprese by mělo zajišťovat vysoké výtěžky nezávislé na ostatních pochodech buňky [Gossen & Bujard, 1992].

Po transfekci je nutná izolace klonů, které vzešly z jedné unikátní transfekované buňky. Pokud se jedná o směs netransfekovaných/neexprimujících buněk, které mohou mít výhodu v rychlosti proliferace oproti exprimujícím buňkám, může dojít ke snížení procenta exprimující subpopulace, a tím k poklesu proteinové produkce. Během práce s U373MG a T98G a jejich transfekovanými analogy, byla zjištěna minimální hustota buněk při nasazení do kultivační nádoby. Pokud byla hustota buněk příliš nízká, buňky neproliferovaly a později vymřely. Postupy při vybírání klonů individuálních buněk mají u těchto buněčných linií své limity a během práce s transfekovanými buňkami se ukázalo velmi složité získat unikátní buněčný klon, který neobsahuje buňky jiných rezistentních klonů z původní transfekované populace.

Metody obohacení a izolace transgen-pozitivních buněk se jeví jako výhodné pro zisk stabilní a homogenní genové exprese v rámci celé populace. Buněčné populace izolované metodami FACS nebo MACS vykazují nižší mezibuněčnou

variabilitu a stálou hladinu exprese transgenního proteinu ve srovnání s buňkami selektovanými jen na základě antibiotické rezistence [Kaufman et al, 2008]. Pro zajištění stability proteinové produkce DPPIV byla využita metoda magnetické separace buněk specifickou protilátkou u buněčných linií U373MUT a U373OnDPPIV. Získaná exprimující subpopulace (pozitivní frakce) byla izolována a kultivována pro další studium. FACS histogramy prokázaly kapacitu U373MUT PF linie exprimovat mDPPIV protein v rámci celé populace. Data pro U373OnDPPIV PF poukázala na 40-ti procentní subpopulaci exprimujících buněk. U buněk U373MUT PF byla provedena druhá magnetická separace, ale získané buňky nevykazovaly lepší vlastnosti exprese než již získaná linie U373MUT PF.

Tet regulační systémy, původně vytvořeny a popsány autory Gossen a Bujard [1992], zajišťují silnou a tkáňově specifickou kontrolu individuálních genů ve vyšších organismech. Možnost indukce genové exprese vede oproti ostatním systémům k zamezení dlouhodobé a nekontrolované expresi, a tím i případným nežádoucím účinkům na buňku.

Doxycyklin nebo některý z jeho derivátů, je schopen snadno procházet buněčnou membránou a má vysokou afinitu k rtTA proteinu. Jeho užití v systému regulované exprese je vhodné nejen na úrovni buněčných populací *in vitro*, ale i ve zvířecích modelech, zvláště v myších, *in vivo*. Koncentrace doxycyklinu potřebná k zajištění regulované genové exprese v savčích buňkách se pohybuje v řádech, které nezpůsobují žádné vedlejší účinky [Böcker et al, 1981; Sprengel & Hasan, 2007]. Tet on systém zaručuje přesnou kontrolu genové exprese v modelech *in vitro*, ale hlavně, genová exprese zůstává regulována i v modelech *in vivo*, kdy je doxycyklin podáván orálně po transplantaci buněk do zvířecích modelů. [Xia et al, 2008], kde je schopen překonat krevní mozkovou bariéru a indukovat genovou expresi [Yamamoto et al, 2003]. V buněčných liniích používaných pro přípravu transgenu byl testován vliv různých koncentrací doxycyklinu na růstové vlastnosti buněk. Pro všechny testované koncentrace doxycyklinu užívané v experimentech nebyly pozorovány změny oproti kontrolním buňkám. Morfologie buněk vystavených doxycyklinu se výrazně neodlišovala od kontrolních buněk. Výsledná koncentrace doxycyklinu 10^{-6} g/ml vedla po 48 hodinách indukce k zajištění dostatečného navýšení exprese proteinu, což bylo v souladu s informacemi uváděnými výrobcem.

Van Craenenbroeck a její kolegové [2001] demonstrovali využití Tet on systému pro regulovanou expresi reportérového proteinu. Ačkoliv prezentovali rozdíly v transfekci a výtěžku exprimovaného proteinu u dvou různých buněčných linií transfekovaných stejným vektorem, výsledkem jejich práce byly stabilně transfekované buňky s vysokou mírou proteinové produkce. Jedna z jejich buněčných linií se jevila jako těžko transfekovatelná a míra indukce buněk byla velmi rozdílná v rámci jednotlivých klonů. Z výše uvedených skutečností vyplývá, že úspěšnost daného expresního systému velmi závisí na genetickém pozadí použité buněčné linie a částečně na produkovaném proteinu.

Meyer-Ficca a její kolegové provedli srovnávací analýzu čtyř indukovatelných expresních systémů. Tet On systém byl vyhodnocen jako vysoce cenný nástroj k dosažení zvýšené exprese netoxického proteinu. Ze všech jimi studovaných systémů, Tet On systém dosahoval nejvyšší exprese s vysokou specifitou indukce [2004]. Ve své práci zvažovali případný výskyt tetracyklinových zbytků v komerčně dostupných fetálních hovězích sérech. Jejich porovnání proteinové exprese u buněk kultivovaných ve specificky testovaném séru na přítomnost tetracyklinu, prokázalo nižší bazální expresi proteinu u neindukovaných transfekovaných buněk a celkově vyšší maximální expresi proteinu. Výsledky naší studie neprokázaly rozdíl exprese proteinu při kultivaci v přítomnosti běžně užívaným komerčním fetálním hovězím sérem a sérem s deklarovanou absencí tetracyklinu a jeho derivátů. Exprese daného proteinu nebyla detekována v kontrolních neindukovaných vzorcích, hodnoty se pohybovaly na úrovni mateřských – netransfekovaných buněk. Během celé studie bylo používáno fetální hovězí sérum jedné šarže od stejného výrobce.

V rámci této diplomové práce se podařilo připravit experimentální model lidských gliomových buněčných linií s regulovatelnou expresí genu DPPIV a jeho mutované, enzymaticky neaktivní, varianty. Vzniklé buněčné linie budou tedy použity jako nástroj studia jak „autokrinního“ významu DPPIV pro vlastní exprimující transformované buňky, tak i jejího „parakrinního“ působení na úrovni nádorového mikroprostředí.

9. Závěr

DASH představují novou funkčně definovanou skupinu molekul. Řada z nich je typickými představiteli takzvaných „moonlighting molecules“ [Jeffery, 1999 a 2003], vyznačujících se mnohočetnými, orgánově a buněčně specifickými biologickými a fyziologickými rolemi. Na základě podobné, avšak neidentické enzymatické specifity jednotlivých DASH je třeba předpokládat možnost jejich vzájemného funkčního doplňování, nahrazování, ale případně i nežádoucích interferencí.

Dysregulace některých členů DASH rodiny, stejně tak jako jejich biologicky aktivních substrátů, byla pozorována u mnoha transformovaných buněk a v nádorových tkáních. Proteolytické štěpení substrátů DASH vede v některých případech ke změně jejich receptorové preference, a tím následně i ke změně jejich „informačního obsahu“. Tímto se dynamika expresního vzorce DASH molekul stává potenciálním regulátorem řady (pato)fyziologických funkcí. Koexprese regulačních peptidů - DASH substrátů s jejich receptory a DASH molekulami v mikroprostředí nádoru, v některých případech přímo na úrovni transformované buňky, podporuje možný význam autokrinních/parakrinních signálních smyček v patogenezi a progresi nádorů, například ovlivněním procesů adheze, apoptózy, proliferace, diferenciace a buněčné transformace.

Význam složení expresního vzorce DASH molekul a jeho změn není zatím plně objasněn a lze předpokládat, že závisí na konkrétním buněčném typu a přítomnosti katalytických partnerů v bezprostředním okolí jednotlivých buněk. Jednotlivé enzymaticky aktivní DASH molekuly by proto měly být studovány v souvislosti s ostatními členy této skupiny, jejich dostupnými biologicky aktivními substráty a odpovídajícími receptory.

Pro účely této práce byly připraveny originální vektory kódující enzymaticky aktivní a enzymaticky neaktivní lidskou DPPIV, které byly transfekovány do lidské gliomové linie U373MG. Tet On systém regulovatelné genové exprese bude sloužit pro další studium biologických funkcí DPPIV a jejich mechanismů *in vitro* v populacích transformovaných gliálních buněk, tak i v procesech tumorigenese v modelu homotopní implantace těchto buněk do mozku imunodeficientních myší *in vivo*.

10. Seznam použité literatury

ABBOTT C. A., YU D. M. T., SUTHERLAND G. R., MCCAUGHAN G. W., GORRELL M. D. (2000). Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *Eur. J. Biochem.*, 267: 6140 – 6150.

AERTGEERTS K., YE S., SHI L., PRASAD S. G., WITMER D., CHI E., SANG B. C., WIJNANDS R.A., WEBB D. R., SWANSON R. V. (2004). N-linked glycosylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26): effects on enzyme activity, homodimer formation, and adenosine deaminase binding. *Protein Sci*, 13(1):145-54.

AERTGEERTS K., LEVIN I., SHI L., SNELL G. P., JENNINGS A., PRASAT G. S., ZHANG Y., KRAUS M. L., SALAKIAN S., SRIDHAR V., WIJNANDS R., TENNANT M. G. (2005). Structural and Kinetic Analysis of the Substrate Specificity of Human Fibroblast Activation Protein. *J. Biol. Chem*, 280 (20): 19441-19444.

AJAMI K., ABBOTT C. A., MCCAUGHAN G. W., GORRELL M. D. (2004). Dipeptidyl peptidase 9 has two forms, a broad tissue distribution, cytoplasmic localization and DPIV-like peptidase activity. *BBA - Gene Structure and Expression*, 1679 (1): 18-28.

ARSCOTT W. T., LABAUVE A. E., MAY V., WESLEY U. V. (2009). Suppression of neuroblastoma growth by dipeptidyl peptidase IV: relevance of chemokine regulation and caspase activation. *Oncogene*, 28(4):479-91.

AYTAC U., DANG N. H. (2004). CD26/dipeptidyl peptidase IV: a regulator of immune function and a potential molecular target for therapy. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 4(1):11-8.

BARBERO S., BONAVIA R., BAJETTO A., PORCILE C., PIRANI P., RAVETTI J. L., ZONA G. L., SPAZIANTE R., FLORIO T., SCHETTINI G. (2003). Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res*, 63(8):1969-74.

BEN-BARUCH A. (2008). Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors. *Clin Exp Metastasis*, 25(4):345-56.

BJELKE J. R., CHRISTENSEN J., NIELSEN P. F., BRANNER S., KANSTRUP A. B., WAGTMANN N., RASMUSSEN H. B. (2006). Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. *Biochem J*, 396(2):391-9.

BÖCKER R., ESTLER C. J., MAYWALD M., WEBER D. (1981). Comparison of distribution of doxycycline in mice after oral and intravenous application measured by a high-performance liquid chromatographic method. *Arzneimittelforschung*, 31(12):2116-7.

BONETTA L. (2005). The inside scoop - evaluating gene delivery methods. *Nat Methods*, 2, 875 – 883.

BUSEK P., MALÍK R., SEDO A. (2004). Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer. *Int J Biochem Cell Biol,* 36(3):408-21.

BUSEK P., STREMENOVA J., KREPELA E., SEDO A. (2008a). Modulation of substance P signaling by dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity in human glioma cell lines. *Physiol Res,* 57(3):443-9.

BUSEK P., STREMENOVÁ J., SEDO A. (2008b). Dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity bearing molecules in human brain tumours – good or evil? *Front Biosci*, 13: 2319-2326.

CARL-MCGRATH S., LENDECKEL U., EBERT M., WOLTER A. B., ROESSNER A., RÖCKEN C. (2004). The ectopeptidases CD10, CD13, CD26, and CD143 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol,* 25(5):1223-32.

CLARK B. D., KWON E., MAFFIE J., JEONG H. Y., NADAL M., STROP P., RUDY B. (2008). DPP6 Localization in Brain Supports Function as a Kv4 Channel Associated Protein. *Front Mol Neurosci,* 1(8): 1-11.

CHEN T., AJAMI K., MCCAUGHAN G. W., GORRELL M. D., ABBOTT C. A. (2003). Dipeptidyl peptidase IV gene family. *Adv Exp Med Biol,* 524: 79 – 86.

CHEN W. T., KELLY T. (2003). Seprase complexes in cellular invasiveness. *Cancer Metastasis Rev,* 22(2-3):259-69.

CHERNG J. Y., SCHUURMANS-NIEUWENBROEK N. M., JISKOOT W., TALSMA H., ZUIDAM N. J., HENNINK W. E., CROMMELIN D. J. (1999). Effect of DNA topology on the transfection efficiency of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid complexes. *J Control Release*, 60(2-3):343-53.

CHIRAVURI M., AGARRABERES F., MATHIEU S. L., LEE H., HUBER B. T. (2000). Vesicular localization and characterization of a novel post-proline-cleaving aminodipeptidase, Quiescent cell proline dipeptidase. *J Immunol,* 165: 5695 – 5702.

DE MEESTER I., DURINX C., BAL G., PROOST P., STRUYF S., GOOSSENS F., AUGUSTYNS K., SCHARPÉ S. (2000) Natural substrates of dipeptidyl peptidase IV. *Adv Exp Med Biol*, 477:67-87.

DANG N. H., MORIMOTO C. (2002). CD26: An expanding role in immune regulation and cancer. *Histol Histopathol,* 17(4), 1213 – 1226.

DAVID F., BARICAULT L., SAPIN C., GALLET X., MARGUET D., THOMAS-SOUMARMON A., TRUGNAN G. (1999). Reduced cell surface expression of a mutated dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) correlates with the generation

of a beta strand in its C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun,* 222(3):833-838.

DEMUTH H. U., MCINTOSH C. H., PEDERSON R.A. (2005). Type 2 diabetes--therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Biochim Biophys Acta,* 1751(1):33-44.

DOBERS J., GRAMS S., REUTTER W., FAN H. (2000). Roles of cysteines in rat dipeptidyl peptidase IV/CD26 in processing and proteolytic activity. *Eur J Biochem,* 267(16):5093-100.

EHTESHAM M., MAPARA K. Y., STEVENSON C. B., THOMPSON R. C. (2009). CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer Lett,* 274(2):305-12.

FELGNER P. L., GADEK T. R., HOLM M., ROMAN R., CHAN H. W., WENZ M., NORTHROP J. P., RINGOLD G. M., DANIELSEN M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA,* 84(21):7413-7.

FRESHNEY R. I.: Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique. Wiley-Liss, Canada. 2000 - Fourth edition.

FROHMAN L. A., DOWNS T. R., HEIMER E. P., FELIX A. M. (1989). Dipeptidylpeptidase IV and trypsin-like enzymatic degradation of human growth hormone-releasing hormone in plasma. *J Clin Invest,* 83(5):1533-40.

GHERSI G., DONG H., GOLDSTEIN L. A., YEH Y., HAKKINEN L., LARJAVA H. S., CHEN W. T. (2002).Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptides complex. *J Biol Chem,* 277(32): 29231 – 29241.

GOLDSTEIN L. A., GHERSI G., PIÑEIRO-SÁNCHEZ M. L., SALAMONE M., YEH Y., FLESSATE D., CHEN W. T. (1997). Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma. *Biochim Biophys Acta,* 1361(1):11-9.

GORMAN C., BULLOCK C. (2000). Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol,* 11(5):455-460.

GOSSEN M., BUJARD H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 89(12):5547-51.

GRAHAM F. L., VAN DER EB A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology,* 52(2):456-67.

GREEN B. D., FLATT P.R. (2007). Incretin hormone mimetics and analogues in diabetes therapeutics. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab,* 21(4):497-516.

HARRISON S., GEPPETTI P. (2001). Substance p. *Int J Biochem Cell Biol,* 33(6):555-76.

HERRERA C., MORIMOTO C., BLANCO J., MALLOL J., ARENZANA F., LLUIS C., FRANCO R. (2001). Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes. *J Biol Chem,* 276(22):19532-9.

HOUGHTON A. N., ALBINO A. P., CORDON-CARDO C., DAVIS L. J., EISINGER M. (1988). Cell surface antigens of human melanocytes and melanoma. Expression of adenosine deaminase binding protein is extinguished with melanocyte transformation. *J Exp Med,* 167(1):197-212.

JEFFERY C. J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci,* 24(1):8 – 11.

JEFFERY C. J. (2003). Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends in Genetics,* 19(8): 415 – 417.

KAKINUMA T., HWANG S. T. (2006). Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol,* 79(4):639-51.

KAUFMAN R. J. (2000). Overview of vector design for mammalian gene expression. *Mol Biotechnol,* 16(2):151-60.

KAUFMAN W. L., KOCMAN I., AGRAWAL V., RAHN H. P., BESSER D., GOSSEN M. (2008) Homogeneity and persistence of transgene expression by omitting antibiotic selection in cell line isolation. *Nucleic Acids Res,* 36(17):e111.

KENNEDY A., DONG H., CHEN D., CHEN W. T. (2009). Elevation of seprase expression and promotion of an invasive phenotype by collagenous matrices in ovarian tumor cells. *Int J Cancer,* 124(1):27-35.

KIKKAWA F., KAJIYAMA H., INO K., SHIBATA K., 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.

KIKKAWA F., KAJIYAMA H., SHIBATA K., INO K., NOMURA S., MIZUTANI S. (2005). Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression. *Biochim Biophys,* 1751(1), 45 – 51.

KITLINSKA J., LEE E. W., LI L., PONS J., ESTES L., ZUKOWSKA Z. (2003) Dual role of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) in angiogenesis and vascular remodeling. *Adv Exp Med Biol,* 524:215-22.

KHIN E. E., KIKKAWA F., INO K., KAJIYAMA H., SUZUKI T., SHIBATA K., TAMAKOSHI K., NAGASAKA T., MIZUTANI S. (2003). Dipeptidyl peptidase IV expression in endometrial endometrioid adenocarcinoma and its inverse correlation with tumor grade. *Am J Obstet Gynecol,* 188(3):670-6.

KUCIA M., JANKOWSKI K., RECA R., WYSOCZYNSKI M., BANDURA L., ALLENDORF D. J., ZHANG J., RATAJCZAK J., RATAJCZAK M. Z. (2004). CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol,* 35(3):233-45.

LEITING B., PRIOR. K.D., WU J.K., MARSILIO F., PATEL R.A, CRAIK C. C., ELLMAN J. A., CUMMINGS R. T., THORNBERRY N. A. (2003). Catalytic properties and inhibition of proline-specific dipeptidyl peptidases II, IV and VII. *Biochem J,* 371, 525-535.

LIVAK K. J., SCHMITTGEN T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods,* 25(4):402-8.

LOUIS D. N., GUSELLA J. F. (1995). A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *TIG,* 11: 412 – 415.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem,* 193(1):265-75.

LUKER K. E., LUKER G. D. (2006). Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett,* 238(1):30-41.

MA Y. H., MENTLEIN R., KNERLICH F., KRUSE M. L., MEHDORN H. M., HELD-FEINDT J. (2007). Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol,* 86(1):31-45.

MAES M. B., SCHARPE S., DE MEESTER I. (2007). Dipeptidyl peptidase II (DPPII), a review. *Clin Chim Acta,* 380 (1-2): 31-49.

MCINTOSH C. H. (2008). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors and diabetes therapy. *Front Biosci,* 13:1753-73.

MIELKE C., TÜMMLER M., SCHÜBELER D., VON HOEGEN I., HAUSER H. (2000). Stabilized, long-term expression of heterodimeric proteins from tricistronic mRNA. *Gene,* 254(1-2):1-8.

MENTLEIN R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept,* 85(1):9-24.

MEYER-FICCA M. L., MEYER R. G., KAISER H., BRACK A. R., KANDOLF R., KÜPPER J. H. (2004). Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies. *Anal Biochem,* 334(1):9-19.

MONSKY W. L., LIN C. Y., AOYAMA A., KELLY T., AKIYAMA S. K., MUELLER S. C., CHEN W. T. (1994). A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res,* 54 (21); 5702 – 5710.

MORRISON M. E., VIJAYASARADHI S., ENGELSTEIN D., ALBINO A. P., HOUGHTON A. N. (1993) A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J Exp Med,* 177(4):1135-43.

NAKAHARA H., NOMIZU M., AKIYAMA S. K., YAMADA YOSHIHIKO, YEH Y., CHEN W. T. (1996). A mechanism for regulation of melanoma invasion. *J Biol Chem*, 271(44); 27221– 27224.

O'BRIEN P., O'CONNOR B. F. (2008). Seprase: an overview of an important matrix serine protease. *Biochim Biophys Acta*, 1784(9):1130-45.

OGATA S., MISUMI Y., TSUJI E., TAKAMI N., ODA K., IKEHARA Y. (1992). Identification of the active site residues in dipeptidyl peptidase IV by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 31(9):2582-7.

OHGAKI H., KLEIHUES P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, 109(1): 93-10.

PALMA C., NARDELLI F., MANZINI S. (1999). Correlation between binding characteristics and functional antagonism in human glioma cells by tachykinin NK1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*, 374(3):435-43.

PARSONS D. W., JONES S., ZHANG X., LIN J. C., LEARY R. J., ANGENENDT P., MANKOO P., CARTER H., SIU I. M., GALLIA G. L., OLIVI A., MCLENDON R., RASHEED B. A., KEIR S., NIKOLSKAYA T., NIKOLSKY Y., BUSAM D. A., TEKLEAB H., DIAZ L. A. JR, HARTIGAN J., SMITH D. R., STRAUSBERG R. L., MARIE S. K., SHINJO S. M., YAN H., RIGGINS G. J., BIGNER D. D., KARCHIN R., PAPADOPOULOS N., PARMIGIANI G., VOGELSTEIN B., VELCULESCU V. E., KINZLER K. W. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*,321(5897):1807-1812.

PETHIYAGODA C. L., WELCH D. R., FLEMING T.P. (2000). Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) inhibits cellular invasion of melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*,18(5):391-400.

PIKAART M. J., RECILLAS-TARGA F., FELSENFELD G. (1998). Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev*, 12(18):2852-62.

QI S. Y., RIVIERE R. J., TROJNAR J., JUNIEN J. L., AKINSANYA K. O. (2003). Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochem. J*, 373: 179 – 189.

RAMIREZ-MONTAGUT T., BLACHERE N. E., SVIDERSKAYA E. V., BENNETT D. C., RETTIG W. J., GARIN-CHESA P., HOUGHTON A. N. (2004). FAP-α, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor. *Oncogene*, 23(32):5435-46.

RAO J. S. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer*, 3(7):489-501.

RECILLAS-TARGA F. (2006). Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol Biotechnik*,34(3):337-354.

ROBLEDO M. M., BARTOLOME R. A., LONGO N., RODRÍGUEZ-FRADE J. M., MELLADO M., LONGO I., VAN MUIJEN G. N., SÁNCHEZ-MATEOS P., TEIXIDÓ J. (2001). Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *J Biol Chem,* 276(48):45098-105.

SAEZ E., NO D., WEST A., EVANS R. M. (1997). Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol,* 8(5):608-16.

SALMAGGI A., GELATI M., POLLO B., FRIGERIO S., EOLI M., SILVANI A., BROGGI G., CIUSANI E., CROCI D., BOIARDI A., DE ROSSI M. (2004). CXCL12 in malignant glial tumors: a possible role in angiogenesis and cross-talk between endothelial and tumoral cells. *J Neurooncol,* 67(3):305-17.

SCHALLY A. V., COMARU-SCHALLY A. M., NAGY A., KOVACS M., SZEPESHAZI K., PLONOWSKI A., VARGA J. L., HALMOS G. (2001). Hypothalamic hormones and cancer. *Front Neuroendocrinol,* 22(4):248-91.

SCHALLY A. V., VARGA J. L. (1999). Antagonistic Analogs of Growth Hormone-releasing Hormone: New Potential Antitumor Agents. *Trends Endocrinol Metab,* 10(10):383-391.

ŠEDO A., MALÍK R. (2001). Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: Homologous proteins or homologous activities? *Biochim Biophys Acta,* 1550(2);107 – 116.

ŠEDO A., STREMENOVÁ J., BUŠEK P., DUKE-COHAN J. S. (2008). Dipeptidyl peptidase-IV and related molecules: markers of malignancy. *Exp Opinion on Med Res,* 2 (6): 677-689.

SONI D., KING J. A., KAYE A. H., HOVENS C. M. (2005) Genetics of glioblastoma multiforme: mitogenic signaling and cell cycle pathways converge. *J Clin Neurosci,* 12(1):1-5.

SPRENGEL R., HASAN M. T. (2007). Tetracycline-controlled genetic switches. *Handb Exp Pharmaco,*(178):49-72.

STREMENOVA J., KREPELA E., MARES V., TRIM J., DBALY V., MAREK J., VANICKOVA Z., LISA V., YEA C., 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.

TABU K., OHNISHI A., SUNDEN Y., SUZUKI T., TSUDA M., TANAKA S., SAKAI T., NAGASHIMA K., SAWA H. (2006). A novel function of OLIG2 to suppress human glial tumor cell growth via p27Kip1 transactivation. *J Cell Sci,* 119(Pt 7):1433-41.

TANAKA T., DUKE-COHAN J. S., KAMEOKA J., YARON A., LEE I., SCHLOSSMAN S. F., MORIMOTO C. (1994). Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV. *Proc Natl Acad Sci USA,* 91(8):3082-6.

TANAKA T., UMEKI K., YAMAMOTO I., SAKAMOTO F., NOGUCHI S., OHTAKI S. (1995). CD26 (dipeptidyl peptidase IV/DPP IV) as a novel molecular marker for differentiated thyroid carcinoma. *Int J Cancer*, 64(5):326-31.

TSENG W. W., LIU C. D. (2002). Peptide YY and cancer: current findings and potential clinical applications. *Peptides*, 23(2):389-95.

VAN CRAENENBROECK K., VANHOENACKER P., LEYSEN J. E., HAEGEMAN G. (2001). Evaluation of the tetracycline- and ecdysone-inducible systems for expression of neurotransmitter receptors in mammalian cells. *Eur J Neurosci*, 14(6):968-76.

VAN DAMME J., STRUYF S., WUYTS A., VAN COILLIE E., MENTEN P., SCHOLS D., SOZZANI S., DE MEESTER I., PROOST P. (1999). The role of CD26/DPP IV in chemokine processing. *Chem Immunol*, 72:42-56.

VANHOOF G., GOOSSENS F., DE MEESTER I., HENDRIKS D., SCHARPÉ S. (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J*, 9(9):736-44.

VOGEL T. W., ZHUANG Z., LI J., OKAMOTO H., FURUTA M., LEE Y. S., ZENG W., OLDFIELD E. H., VORTMEYER A. O., WEIL R. J. (2005). Proteins and protein pattern differences between glioma cell lines and glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*, 11(10):3624-32.

VON GROLL A., LEVIN Y., BARBOSA M. C., RAVAZZOLO A. P. (2006). Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. *Biotechnol Prog*, 22(4):1220-4.

WEN P. Y., KESARI S. (2008). Malignant Gliomas in Adult. *N Engl J Med*, 358: 492-507.

WESLEY U. V., ALBINO P., TIWARI S., 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.

XIA X., AYALA M., THIEDE B. R., ZHANG S. C. (2008). In vitro- and in vivo-induced transgene expression in human embryonic stem cells and derivatives. *Stem Cells*, 26(2):525-33.

YAMAGUCHI K., RICHARDSON M. D., BIGNER D. D., KWATRA M. M. (2005). Signal transduction through substance P receptor in human glioblastoma cells: roles for Src and PKCdelta. *Cancer Chemother Pharmacol*, 56(6):585-93.

YAMAMOTO M., WADA N., KITABATAKE Y., WATANABE D., ANZAI M., YOKOYAMA M., TERANISHI Y., NAKANISHI S. (2003). Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain. *J Neurosci*, 23(17):6759-67.

YANG S. X., CHEN J. H., JIANG X. F., WANG Q. L., CHEN Z. Q., ZHAO W., FENG Y. H., XIN R., SHI J. Q., BIAN X. W. (2005) Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 335(2):523-8.

YU D. M., WANG X. M., MCCAUGHAN G. W., GORRELL M. D. (2006). Extraenzymatic functions of the dipeptidyl peptidase IV-related proteins DP8 and DP9 in cell adhesion, migration and apoptosis. *FEBS J*, 273(11): 2447-60.

ZHOU Y., LARSEN P. H., HAO C., YONG V. W. (2002). CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem*, 277(51):49481-7.

ZICHE M., MORBIDELLI L., GEPPETTI P., MAGGI C. A., DOLARA P. (1991). Substance P induces migration of capillary endothelial cells: a novel NK-1 selective receptor mediated activity. *Life Sci*, 48(2):PL7-11.