Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie, PřF UK

Oddělení fyziologie a biochemie buňky

Bakalářská práce na téma:

Dipeptidylpeptidáze-IV aktivitou a/nebo strukturou homologní (DASH) molekuly v nádorech neuroektodermu

Jana Němečková

Ústav biochemie a experimentální onkologie, UK 1. LF

Laboratoř biologie nádorové buňky, společné pracoviště

UK 1.LF a FgU AV ČR

2006

Abstrakt

„Dipeptidylpeptidáze-IV aktivitou a/nebo strukturou homologní“ (DASH) molekuly představují nově definovanou skupinu multifunkčních molekul, z nichž většina nese hydrolytickou aktivitu podobnou dipeptidylpeptidáze-IV (DPP-IV, 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 struktur v procesech vzniku a rozvoje nádorových onemocnění. Výsledky mnoha pracovišť prokazují, že během buněčné transformace se mění expresní vzorec DASH molekul. To vede ke kvantitativním i kvalitativním změnám opracování biologicky aktivních peptidů-substrátů DPP-IV, které se podílejí na regulaci řady růstových vlastností buněk. Důsledkem je změněná receptorová afinita a preference a tím i signální význam těchto regulačních molekul.

Cílem bakalářské práce je přehled věnovaný expresi DASH molekul v nádorových buňkách, zejména v buňkách neuroektodermu.

Vedoucí bakalářské práce:
prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.
Ústav biochemie a experimentální onkologie UK 1. LF
Laboratoř biologie nádorové buňky, společné pracoviště
UK 1.LF a FgU AV ČR

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

1. Obsah

Abstrakt **2**

1. Obsah **4**

2. Úvod **5**

3. DASH molekuly v nádorových onemocněních **6**

3.1. Dipeptidylpeptidáza-IV (DPP-IV, CD26) 6

3.2. Fibroblastový aktivační protein alfa (FAP-α, seprase) 8

3.3. Atraktin 9

3.4. „Quiescent cell“ prolinová dipeptidáza (QPP, DPP-II) 9

3.5. Další DASH molekuly 9

3.5.1. Dipeptidylpeptidáza 6 (DPP6) *10*
3.5.2. Dipeptidylpeptidáza 8 (DPP8) *10*
3.5.3. Dipeptidylpeptidáza 9 (DPP9) *10*
3.5.4. Dipeptidylpeptidáza 10 (DPP10) *10*
3.5.5. Dipeptidylpeptidáza IV-β (DPPIV-β) *10*
3.5.6. N-acetylovaná-alfa-vázaná kyselá dipeptidáza (NAALADase, prostate specific membrane antigen, PSMA) *11*

4. Regulační peptidy – DASH substráty v nádorech **12**

4.1. Neuropeptid Y (NPY) a peptid-YY (PYY) 13

4.2. Substance P (SP) 13

4.3. Chemokiny 13

4.4. Gastrin releasing peptide (GRP) 15

4.5. Growth hormone releasing hormone (GHRH) 15

5. Cíle další práce **16**

6. Závěr **17**

7. Seznam zkratek **18**

8. Seznam použité literatury **19**

2. Úvod

Proteolytická posttranslační úprava patří mezi základní mechanismy kontrolující funkci biologicky aktivních peptidů, včetně těch, které se podílejí na regulacích komplexních mechanismů buněčné transformace a nádorové progrese. Tím se řada proteáz významně podílí na kontrole proliferace, angiogeneze, migrace nádorových buněk 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 proteázami. Řada biologicky aktivních peptidů obsahuje prolinový zbytek jako vývojově konzervovaný regulační prvek a pouze omezený počet peptidáz je schopen hydrolyzovat tuto vazbu [Vanhoof et al.,1995].

Dipeptidylpeptidáza-IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5, identická s diferenciačním antigenem lymfocytů CD26) byla po mnoho let považována za jedinou membránově vázanou proteázu, schopnou odštěpovat X-Pro dipeptidy od N-konce peptidů a bílkovin. V současné době byla ovšem popsána celá skupina “Dipeptidylpeptidáze-IV aktivitou a/nebo strukturou homologních” (DASH) molekul. Kromě DPP-IV zahrnuje několik dalších molekul nesoucích podobnou enzymatickou aktivitu, dále i několik DPP-IV/CD26 strukturou podobných, ale hydrolyticky neaktivních molekul [Šedo et al., 2001]. Tato skupina obsahuje například seprasu, fibroblastový aktivační protein alfa, dipeptidylpeptidázy 6, 8, 9, atraktin, N-acetylovanou-alfa-vázanou kyselou dipeptidázu I, II a L, "Quiescent cell" prolinovou dipeptidázu, thymus-specifickou serinovou proteázu, a DPP IV-β. 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 skupin 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 patogenezi jsou dosud nedostatečné. Jejich výsledky zůstávají zatím v mnoha případech spekulativní.

Tato práce přináší 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.

3. 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].

3.1. Dipeptidylpeptidáza-IV (DPP-IV, CD26)

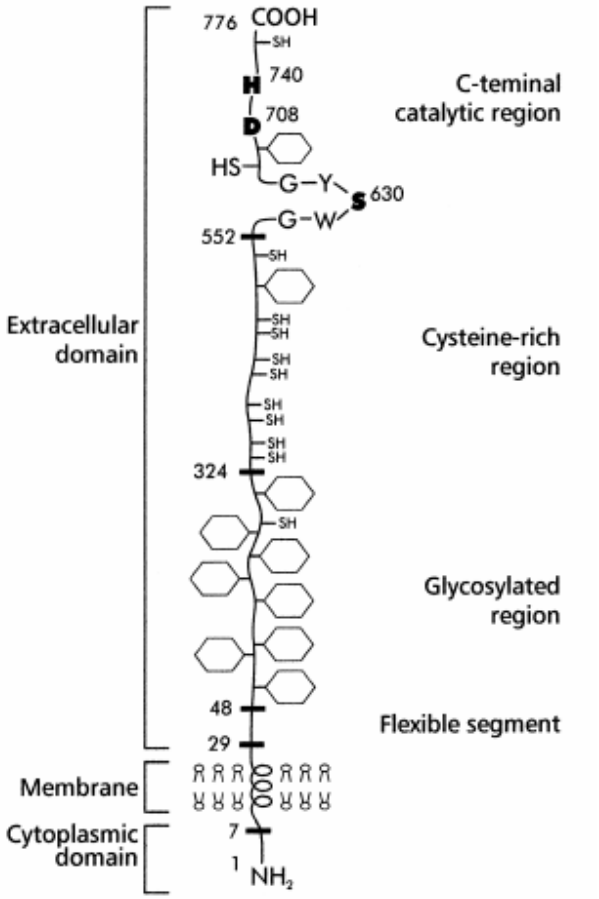
DPP-IV (obrázek 1) je zřejmě dosud nejvíce prozkoumanou molekulou ze skupiny DASH. DPP-IV je vysoce glykosylovaná serinová proteáza se širokou tkáňovou distribucí. Svojí dipeptidylpeptidázovou (DPP) aktivitou vykonává řadu imunoregulačních funkcí. Neméně důležitá je i její role v metabolismu živin a v patogenezi diabetu mellitu [Aytac et al., 2004; De Meester et al., 2000; Van Damme et al., 1999]. Zprostředkovává kontakt buňka – buňka, buňka – extracelulární matrix (ECM) a působí rovněž jako koreceptor pro HIV. Dále se podílí na některých mechanismech signální transdukce. Cestou řady z výše zmíněných mechanismů se DPP-IV uplatňuje v procesech buněčné proliferace, diferenciace, nádorové transformace a apoptózy [Šedo et al., 2001]. V krevní plazmě a seminální tekutině můžeme najít její solubilní formu, která nemá intracelulární a transmembránový segment [De Meester et al., 2000].

V případě řady transmembránových dipeptidylpeptidáz je glykosylace podmínkou jejich enzymatické aktivity a správného proteinového sbalení. Krystalografické studie DPP-IV 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 adenosindeaminázu (ADA), zůstává nadále ne zcela objasněna [Aertgeerts et al., 2003]. Aertgeerts se spolupracovníky provedl bodové mutace - Asn → Ala na devíti glykosylačních místech v extracelulární doméně DPP-IV bez významného vlivu na hydrolytickou aktivitu. Zároveň mutace nepoškodily schopnost tvořit homodimery ani vázat ADA [Aertgeerts et al., 2003].

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

V práci autorů Dang & Morimoto [2002] je přehledně popsána též řada úloh DPP-IV nezávislých na její enzymatické aktivitě. Lidská DPP-IV fyzicky interaguje s ADA, což je významné pro některé imunoregulace. Sekvence šesti aminokyselin intracelulární domény DPP-IV může být příliš krátká pro přímé funkční spojení s dalším intracelulárním signálním partnerem. Jedním z možných

mechanismů je proto předpokládána interakce DPP-IV s membránově vázanou protein-tyrozin fosfatázou CD45 nebo již zmíněnou ADA [Tanaka et al., 1994; Aytac et al., 2004.].



Obrázek 1: DPP-IV je transmembránový protein II, skládající se ze šestiaminokyselinové intracelulární domény, extracelulární doménou s krátkým flexibilním segmentem a C-koncovým regionem se serin-proteázovým typem katalytického centra. Serin[630] tvoří katalytickou triádu s aspartátem[708] a histidinem[740]. Převzato z Mentlein, 1999.

Změna exprese DPP-IV byla dosud popsána v bioptickém materiálu z řady 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 DPP-IV dosud studována zejména v maligním melanomu a v transformovaných nervových a gliálních buňkách. Během diferenciace melanocytů je regulována exprese řady antigenů s pravděpodobným diagnostickým významem. DPP-IV je exprimována buňkami melanocytů, ale nikoliv jejich maligně transformovanou formou. DPP-IV může hrát roli v regulaci růstu melanocytů/melanomových buněk snad pomocí limitované proteolýzy rozhodujících růstových faktorů [Houghton et al., 1988, Morrison et al., 1993].

Wesley et al. [1999] popsal restauraci nemaligního fenotypu buněk lidského melanomu po experimentálně navozené re-expresi DPP-IV v mezích srovnatelných s normálními melanocyty. Důsledkem bylo potlačení schopnosti tumorigeneze, navození diferenciace a normalizace závislosti na exogenních růstových faktorech. Ačkoliv enzymatická aktivita je v případě melanocytů nezbytná pro řadu biologických funkcí DPP-IV, bodovou mutací aktivního centra nebylo ovlivněno vlastní přežití buňky [Wesley et al., 1999].

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

Schopnost DPP-IV snížit invazivitu maligních melanomových buněk není provázena ztrátou schopnosti tvořit nádory. DPP-IV 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 DPP-IV v pokročilém stádiu tumoru s vysokým potenciálem pro tvorbu metastáz již nesnižuje buněčnou invazi a nemá ani jiný zjevný protinádorový efekt.

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

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

FAP-α je 170 kDa integrální membránová kolagenáza/gelatináza. Svou orientací v plazmatické membráně patří mezi transmembránové proteiny typu II. Je tvořena intracelulární šestiaminokyselinovou 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 k DPP-IV [Goldstein et al., 1997].

Stejně jako u DPP-IV, homodimerizace FAP-α je podmínkou její hydrolytické aktivity, přičemž existuje předpoklad možné heterodimerizace DPP-IV/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. Tato molekula může být možným markerem pro tumorovou invazivitu některých typů nádorů, neboť je lokalizována v invadopodiích maligních buněk [Montagut et al., 2004; Šedo et al., 2001]. Exprese FAP-α je v takových buňkách součástí jejich invazivního fenotypu, v němž spolu s dalšími secernovanými proteázami hraje roli v degradaci složek ECM [Monsky et al., 1994]. Ghersi a kolegové [2002] popisují formaci proteázových komplexů složených z membránově vázaných FAP-α a DPP-IV 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 DPP-IV, 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-supresová aktivita je nezávislá na vlastní enzymatické aktivitě FAP-α [Montagut et al., 2004]. Experimentálně navozená re-exprese DPP-IV vede ne zcela jasným mechanismem k sekundární up-regulaci povrchové exprese FAP-α [Wesley et al., 1999]. Koregulaci DPP-IV a lidské, nikoliv myší, FAP-α potvrzuje rovněž Montagut et al. [2004].

3.3. Atraktin

Atraktin je identický s myším „mahogany" proteinem. Podle některých autorů nese DPP-IV-like enzymatickou aktivitu [Friedrich et al., 2003; Bušek et al. 2004]. Sekvence atraktinu je zcela odlišná od DPP-IV. Atraktin byl původně popsán jako protein exprimovaný a secernovaný aktivovanými T buňkami. Další experimenty prokázaly jeho širokou expresi v řadě buněčných populací včetně buněk neuroektodermu. Některá pozorování nasvědčují potenciální roli atraktinu v tumorové progresi gliomových buněk různého stupně transformace. Atraktin v gliomových buňkách může být patrně přítomen v enzymaticky aktivní i neaktivní formě, nejvyšší enzymatická aktivita byla pozorována u buněk s nejvyšším stupněm malignity [Malík et al., 2001].

3.4. „Quiescent cell" prolinová dipeptidáza (QPP, DPP-II)

DPP-II je homodimer složený z 60 kDa podjednotek. pH optimum se nachází v rozmezí 5 – 5,5, kompletní ztráta aktivity nastává při pH 8,0.

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

3.5. Další DASH molekuly

Funkční studie dalších DASH molekul jsou dosud nedostatečné, tudíž jejich interpretace zůstávají převážně spekulativní.

3.5.1. Dipeptidylpeptidáza 6 (DPP6)

DPP6 obsahuje jen dva ze tří 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 32 aminokyselinovou sekvencí. Funkční důsledky tohoto rozdílu nejsou známy. DPP6 sdílí 33 % aminokyselinovou identitu s DPP-IV [Chen et al., 2003].

3.5.2. Dipeptidylpeptidáza 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 DPP-IV [Qi et al., 2003]. Enzymová aktivita DPP8 je podobná s molekulami DPP-IV a FAP, avšak DPP8 je cytoplazmatický neglykosylovaný protein, katalyticky aktivní v monomerní podobě. pH optimum se nachází v mírně alkalické oblasti, tudíž není aktivní v lysozomálním a endozomálním kompartmentu. Podobnost mezi DPP8 a DPP-IV v tkáňovém expresním vzorci a substrátech vedla k předpokladu jejího významu pro aktivaci T buněk a v dalších imunoregulačních funkcích [Abbott et al., 2000].

3.5.3. Dipeptidylpeptidáza 9 (DPP9)

DPP9 sdílí DPP aktivitu, podobnou pH specifitu a inhibitorovou senzitivitu jako DPP-IV a DPP8. Protein je 863 aminokyselin dlouhý, 19 % identický a 31% podobný s DPP-IV [Qi et al., 2003].

3.5.4. Dipeptidylpeptidáza 10 (DPP10)

DPP10 sekvence obsahuje 796 aminokyselinových zbytků a je ze 32 % identická s DPP-IV a z 51 % s DPP6. Aktivní místo serinového zbytku je zaměněno glycinovým reziduem, což vede, obdobně jako u DPP6, ke ztrátě hydrolytické aktivity. Exprese DPP10 byla dosud pozorována zejména v mozku a slinivce břišní [Qi et al., 2003].

3.5.5. Dipeptidylpeptidáza IV-β (DPPIV-β)

DPPIV-β je glykosylovaná monomerní molekula s velmi podobnými enzymatickými parametry jako DPP-IV, není však schopna vazby s adenosin deaminázou [Šedo et al., 2001].

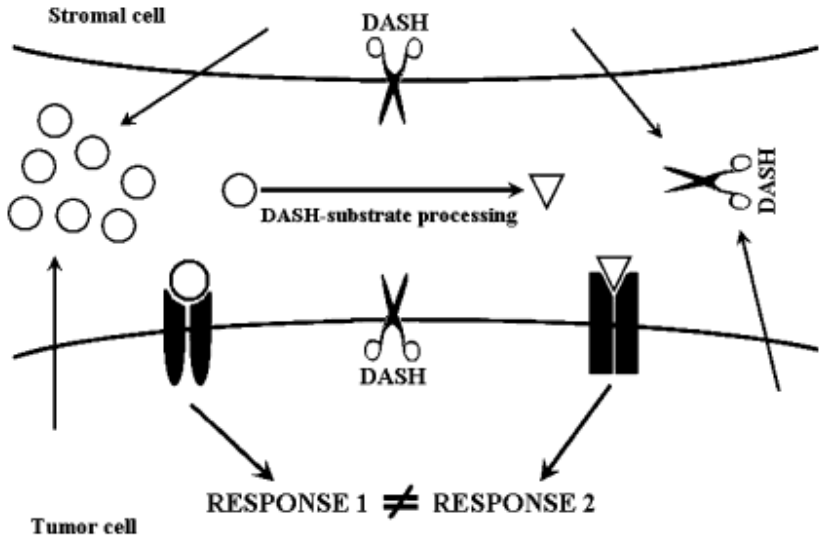
3.5.6. N-acetylovaná-alfa-vázaná kyselá dipeptidáza (NAALADase, prostate specific membrane antigen, PSMA)

Dalším členem rodiny DASH molekul je NAALADase. Vyskytuje se ve třech izoformách (NAALADase I, NAALADase II, NAALADase Like). Všechny z nich mají charakter integrálního membránového glykoproteinu typu II. NAALADase I má glutamát-karboxypeptidázovou aktivitu, jejíž porucha je pravděpodobně patogeneticky významná v mnoha neurodegenerativních onemocněních. Podle některých autorů mají všechny tři formy rovněž DPP aktivitu [Pangalos et al., 1999]. Tyto molekuly, vysoce exprimovány v nádorech prostaty, mohou být možným diagnostickým i terapeutickým cílem [Yao et al., 2006]. Fyziologická role enzymatické DPP aktivity těchto molekul není zcela objasněna, ale i zde se předpokládá význam v regulaci biologicky aktivních peptidů a dále i v tumorové supresi.

4. Regulační peptidy – DASH substráty v nádorech

Definice nádorové proliferace zdůrazňuje autonomní a nekoordinovanou proliferaci, která uniká centrálním i lokálním regulačním mechanismům. Maligní nádory obvykle invadují do okolní tkáně, stimulují angiogenezi, působí na funkce imunitního systému 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 et al., 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 proteázových 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 et al., 2003b].



Obrázek 2: Funkce DASH molekul jakožto hypotetického „molekulárního přepínače" buněčné odpovědi regulované biologicky aktivními peptidy. Převzato z 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.

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

Mezi členy pankreatické polypeptidové rodiny patří neuropeptid Y a peptidy YY. Tvoří důležitou skupinu substrátů pro DPP-IV [Chen et al., 2003]. Jejich terciární struktura, charakteristická pro celou pankreatickou polypeptidovou rodinu, jim umožňuje vazbu do stejné sady receptorů (Y1 – Y5).

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 et al., 2001].

NPY se hojně vyskytuje v centrálním i periferním nervovém systému. DPP-IV 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-vazokonstrikční 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].

4.2. 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 et al., 2001; Palma et al., 1999].

DPP-IV 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].

4.3. 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 DPP-IV [Mentlein, 1999], přičemž nejenom přítomnost „consensus-sequence“, ale i jejich velikost nebo strukturní konformace je rozhodující, zda jsou DPP-IV opravdu štěpeny.

Mezi prokázané substráty patří stromal cell-derived factor 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; Salmaggie 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 [Kakinuma et al., 2006, Luker et al., 2005]. 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.

Po štěpení DPP-IV ztrácí SDF-1 chemotaktickou aktivitu, přičemž tento štěpný produkt je dokonce schopen účinkovat jako receptorový antagonista CXCR4 [Van Damme et al., 1999]. 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]. Hlavním 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 proteinkináz. SDF-1 indukuje fosforylaci Akt (proteinkinázy A), což je kináza asociovaná s přežíváním a blokuje apoptózu gliomových buněk [Zhou et al., 2002]. Stimuluje syntézu VEGF maligními gliomovými buňkami. 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 dipeptidylpeptidázou-IV u nádorových onemocnění, nebyl dostatečně studován. Výsledky mnoha autorů ovšem naznačují významný potenciál v této oblasti [Bušek et al., 2004; Herrera et al., 2001; Khin et al., 2003].

4.4. Gastrin releasing peptide (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 DPP-IV, fyziologický význam jeho N-koncového zkrácení není znám.

4.5. Growth hormone releasing hormone (GHRH)

GHRH se vyskytuje v několika molekulových formách (40 – 44 aminokyselin) v řadě tkání. Jeho uvolnění v adenohypofýze stimuluje sekreci růstového hormonu. Hraje ovšem významnou roli i v patogenezi nádorů, například plic, mozku, prostaty a prsu [Schally et al., 2001], přičemž jeho N-koncová sekvence je kritická pro vazbu do receptoru v mnoha typech nádorů [Schally et al., 1999].

DPP-IV 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.

5. Cíle další práce

Na našem pracovišti bylo připraveno několik transfekovaných neuroektodermálních buněčných linií s regulovatelnou expresí (GeneSwitch systém) DPP-IV a atraktinu. Pro další analytickou práci je nezbytná purifikace tímto systémem produkovaných rekombinantních HisTag DASH proteinů.

Nedílnou součástí následující výzkumné práce bude biochemická analytika a charakteristika enzymaticky aktivních DASH exprimovaných v biopsiích nádorových tkání lidských mozkových nádorů, zaměřená na pochopení vztahu expresních vzorců DASH molekul a jeho biologických důsledků. Pro tyto účely budou použity zejména metody chromatografické (gelová a afinitní chromatografie), elektroforetické (nativní a denaturační elektroforéza), izoelektrická fokusace a imunodetekční metody (Dot blot, Western blot).

6. 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.

Přes všechna úskalí se modulace enzymatické aktivity některých DASH molekul stala v několika případech léčebným přístupem v humánní medicíně a řadou autorů je považována za perspektivní přístup rovněž v onkologické léčbě.

7. Seznam zkratek

ADA – adenosin deamináza

DASH – Dipeptidylpeptidáze-IV aktivitou a/nebo strukturou homologní molekuly

DPP – dipeptidylpeptidázová

DPP10 – dipeptidylpeptidáza 10

DPP8 – dipeptidylpeptidáza 8

DPP9 – dipeptidylpeptidáza 9

DPP-IV – dipeptidylpeptidáza IV

ECM – extracelulární matrix

FAP-α – fibroblastový aktivační protein alfa

NPY – neuropeptid Y

PYY – peptid-YY

RANTES – „regulated on activation normal T-cell expressed and secreted“

SDF-1 – stromal cell-derived factor 1

SP – substance P

8. 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.

Adams S., Miller G. T., Jesson M. I., Watanabe T., Jones B., Wallner B. (2004). PT-100, a small molecule dipeptidyl peptidase inhibitor, has potent antitumor effects and augments antibody-mediated cytotoxicity via a novel immune mechanism. *Cancer research,* 64, 5471 – 5480.

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, 145 – 154.

Aytac U., Dang N. H. (2004). CD26/Dipeptidyl Peptidase IV: A regulator of immune function and a potential molecular target for therapy. *Immune, Endocrine & Metabolic Disorders,* 4, 11 – 18.

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 1α stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinasese1/2 and Akt. *Cancer research,* 63. 1969 – 1974.

Bušek P., Malík, R., Šedo A. (2004). Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer. *Int. J. Biochem. Cell. Biol,* 36, 408 – 421.

Carl-McGrath S., Lendeckel U., Ebert M., Wolter A., Roessner A., Röcken Ch. (2004). The ectopeptidases CD10, CD13, CD26, and CD143 are upregulated in gastric cancer. *Int. J. of Oncology,* 25, 1223 – 1232.

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. (2003b). Seprase complex in cellular invasiveness. *Cancer and Metastasis Reviews,* 22, 259 – 269.

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. *The Journal of Immunology,* 165, 5695 – 5702.

Dang N. H., Morimoto C. (2002). CD26: An expanding role in immune regulation and cancer. *Histology Histopathology,* 17, 1213 – 1226.

De Meester I., Durinx Ch., 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.

Friedrich D., Kuhn-Wache K., Hoffmann T., Demuth H. U. (2003). Isolation and characterization of Attractin-2. *Adv Exp Med Biol.,* 524, 109 – 113.

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. *Journal of Clinical Investigation,* 83, 1533 – 1540.

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. *The Journal of biological chemistry,* 277, 29231 – 29241.

Goldstein L. A., Ghersi G., Pineiro – Sanchez 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, 11 – 19.

Goldstein, L. A., Chen, W. T. (2000). Identification of an alternative spliced seprase mRNA that encodes a novel intracellular isoform. *Journal of Biological Chemistry,* 275, 2554 – 2559.

Herrera C., Morimoto Ch., Blanco J., Mallol J., Arenzana F., Lluis C., Franco R. (2001). Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry,* 276, 19532 – 19539.

Houghton A. N., Albino A. P., Gordon – Cardo C., Davis L. J., Eisinger M. (1988). Cell surface antigens of human melanocytes and melanoma. *J. Exp. Med.,* 167, 197 – 212.

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

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

Kakinuma T., Hwang S. (2006). Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *Journal of Leukocyte Biology,* 79, 1 – 13.

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, 670 – 676.

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, 779 – 783.

Kikkawa F., Kajiyama H., Shibata K., Ino K., Nomura S., Mizutani S. (2005). Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1751, 45 – 51.

Kitlinska J., Lee E. W., Li L., Pons J., Estes L., Zukowska Z. (2003). Dual role of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) in angiogenesis and vascular remodeling. *Adv Exp Med Biol.,* 524, 215 – 222.

Kucia M., Jankowski K., Reca R., Wysoczynski M., Bandura L., Allendorf D. J., Zhang J., Ratajczak J., Ratajczak M. Z. (2004). CXCR4-SDF-1 signaling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *Journal of Molecular Histology,* 35, 233 – 245.

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

Luker K. E., Luker G. D. (2005). Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Letters,* 20, 1 – 12.

Maes M. B., Lambeir A. M., Gilany K., Senten K., Van der Veken P., Leiting B., Augustyns K., Scharpé S., De Meester I. (2005). Kinetic investigation of human dipeptidyl peptidase II (DPPII)-mediated hydrolysis of dipeptide derivates and its identification as quiescent cell proline dipeptidase (QPP)/dipeptidyl peptidase 7 (DPP7). *Biochem. J.,* 386, 315 – 324.

Malík R., Mareš V., Kleibl Z., Pohlreich P., Vlašicová K., Šedo A. (2001). Expression of attractin and its differential enzyme activity in glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 284, 289 – 294.

Mentlein R. (2004). Cell-surface peptidases. *International Review of Cytology,* 235, 165 – 212.

Mentlein R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory Peptides,* 85, 9 – 24.

Mentlein R., von Kolszynski M., Sprang R., Lucius R. (1990). Proline-specific proteases in cultivated neuronal and glial cells. *Brain Research,* 527, 159 – 162.

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, 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, 1135 – 1143.

Nakahara H., Nomizu M., Akiyama S. K., Yamada Yoshihiko, Yeh Y., Chen W. T. (1996). A mechanism for regulation of melanoma invasion. *The Journal of biological chemistry,* 271, 27221 – 27224.

Ostrow L. W., Sachs F. (2005). Mechanosensation and endothelin in astrocytes – hypothetical roles in CNS pathophysiology. *Brain research reviews,* 48, 488 – 508.

Palma C., Nardelli F., Manzini S. (1999). Correlation between binding characteristics and functional antagonism in human glioma cells by tachykinin NK_1 receptor antagonists. *European Journal of Pharmacology,* 374, 435 – 443.

Pangalos M. N., Neefs J. M., Somers M., Verhasselt P., Bekkers M., van der Helm L., Fraiponts E., Ashton D., Gordon R. D. (1999). Isolation and expression of novel human glutamate carboxypeptidases with N-acetyled alpha-linked acidic dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity. *Journal of Biological Chemistry,* 274, 8470 – 8483.

Pethiyagoda C. L., Welch D. R., Fleming T. P. (2001). Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) inhibits cellular invasion of melanoma cells. *Clinical & Exp. Metastasis,* 18, 391 – 400.

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., Hougton A. N. (2004). FAPα, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor. *Oncogene,* 23, 5435 – 5446.

Robledo M. M., Bartolomé A., Longo N., Rodríguez-Frade J. M., Mellado M., Longo I., van Muijen G. N. P., Sánchez-Mateos P., Teixidó J. (2001). Expression of functional chemokine receptors

CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *The Journal of Biological Chemistry,* 276, 45098 – 45105.

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. *Journal of Neuro-Oncology,*, 67, 305 – 317.

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 Neuroendocrinology,* 22, 248 – 291.

Schally A. V., Varga J. L. (1999). Antagonistic analogs of growth hormone-releasing hormone: new potential antitumor agents. *TEM,* 10 , 383 – 391.

Šedo A., Bušek P., Scholzová E., Malík R., Vlašicová K., Janáčková S., Mareš V. (2004). "Dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologs" (DASH) in growth-modulated glioma cells lines. *Biol. Chem.*, 385, 557 – 559.

Šedo, A., Malík, R. (2001). Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: Homologous proteins or homologous activities? *Biochimica Biophysica Acta,* 1550, 107 – 116.

Tanaka T., Duke-Cohan J. S., Kameoka J., Yaron A., Lee I., Schlossman S. F., Morimoto Ch. (1994). Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 91, 3082 – 3086.

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, 326 – 331.

Tseng W. W., Liu C. D. (2003). Peptide YY and cancer: current findings and potential clinical applications. *Peptides,* 23, 389 – 395.

Underwood R., Chiravuri M., Lee H., Schmitz T., Kabcenell A. K., Yardley K., Hubert B. T. (1999). Sequence, purification, and cloning of an intracellular serine protease, quiescent cell proline dipeptidase. *The Journal of Biological Chemistry,* 274, 34053 – 34058.

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/DPPIV 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. *The FASEB Journal,* 9, 736 – 744.

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. *Journal of Experimental Medicine*, 190, 311 – 322.

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 PKCδ. *Cancer Chemother Pharmacol,* 56, 585 – 593.

Yang S., Chen J., Jiang X., Wang Q., Chen Z., Zhao W., Feng Y., Xin R., Shi J., Bian X. (2005). Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 335, 523 – 528.

Yao V., Bacich D. J. (2006). Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression gives prostate cancer cells a growth advantage in a physiologically relevant folate environment in vitro. *The Prostate,* article in press.

Zhou Y., Larsen H., Hao Ch., Yong V. W. (2002). CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *The Journal of Biological Chemistry,* 277, 49481 – 49487.

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 Science,* 48, PL7 – PL11.