



Expression of *DPP4* gene in papillary thyroid carcinoma

Joanna Ożóg¹, Michał Jarząb², Agnieszka Pawlaczek¹, Małgorzata Oczko-Wojciechowska¹,
Jan Włoch³, Józef Roskosz¹, Elżbieta Gubała¹

¹Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,

²Department of Tumor Biology,

³Department of Oncological Surgery,

MSC Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

Abstract

Introduction: *DPP4* gene (dipeptidyl peptidase IV) is expressed in epithelial cells of many organs and cells of immune system. There is no expression of *DPP4* in normal healthy thyroid, while it is highly expressed in papillary thyroid carcinoma (PTC), as shown by gene expression profiling. In this study we validated expression of *DPP4* in papillary thyroid cancer and normal thyroid tissue and evaluated its usefulness for diagnostic purposes.

Material and methods: The analysis was carried out on total RNA extracted from 102 PTCs and 77 normal thyroid fragments with use of Q-PCR reaction. β -glucuronidase was the reference gene.

Results: We confirmed the distinct increase of *DPP4* expression in papillary thyroid carcinoma. However, the ROC (relative operating characteristic) analysis revealed that the diagnostic efficiency of *DPP4* estimation is limited.

Conclusions: *DPP4* is increased in papillary thyroid cancer, however, its diagnostic usefulness as a single PTC marker is doubtful.

(*Pol J Endocrinol* 2006; 57 (supl. A): A12–A18)

Key words: dipeptidyl peptidase IV, *DPP4*, papillary thyroid carcinoma, PTC, molecular markers, Q-PCR



Elżbieta Gubała, M.D., Ph.D.

Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,
MSC Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch
Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice, Poland
phone: 032 278 93 03, fax: 032 278 93 25
e-mail: egubala@io.gliwice.pl



Ekspresja genu *DPP4* w raku brodawkowym tarczycy

Joanna Ożóg¹, Michał Jarzab², Agnieszka Pawlaczek¹, Małgorzata Oczko-Wojciechowska¹,
Jan Włoch³, Józef Roskosz¹, Elżbieta Gubała¹

¹Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej,

²Zakład Biologii Nowotworów,

³Klinika Chirurgii Onkologicznej,

Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Wstęp: Ekspresja genu *DPP4* (*dipeptydylopeptydazy IV*) zachodzi w komórkach nabłonkowych wielu niezmiennych nowotworowo narządów oraz w komórkach układu immunologicznego. W normalnej, zdrowej tarczycy nie stwierdza się obecności *DPP4*, ale gen ten ulega silnej ekspresji w brodawkowym raku tarczycy, co wykazano w badaniach mikromacierzowych.

W przedstawionej pracy przeprowadzono analizę ekspresji genu *DPP4* w raku brodawkowym tarczycy (PTC, *papillary thyroid carcinoma*) i utkaniu zdrowej tarczycy pod kątem jego wartości jako markera molekularnego.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiło całkowite RNA wyizolowane ze 102 guzów raka brodawkowego i z 77 fragmentów zdrowej tkanki tarczycy. Ekspresję genu *DPP4* badano, wykorzystując reakcję Q-PCR, równocześnie z pomiarem β -glukuronidazy jako genu odniesienia.

Wyniki: Otrzymane metodą Q-PCR wyniki wskazują wyraźny wzrost ekspresji *DPP4* w raku tarczycy i silnie znaczącą statystycznie różnicę między ekspresją w PTC a tarczycą niezmienną nowotworowo. Niemniej analiza krzywych ROC (*relative operating characteristic*) wykazała

ograniczoną przydatność diagnostyczną tego markera molekularnego.

Wnioski: Gen *DPP4* wykazuje większą ekspresję w raku brodawkowym tarczycy w porównaniu z tarczycą prawidłową, ale jako pojedynczy marker molekularny ma niewielką wartość diagnostyczną.

(*Endokrynol Pol* 2006; 57 (supl. A): A12–A18)

Słowa kluczowe: *dipeptydylopeptydaza IV*, *DPP4*, rak brodawkowy tarczycy, PTC, markery molekularne, Q-PCR



Dr med. Elżbieta Gubała

Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej
Centrum Onkologii — Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie
Oddział w Gliwicach

ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice

tel.: 032 278 97 20, faks: 032 278 93 25

e-mail: egubala@io.gliwice.pl

Grant KBN 040/P04/2001

Wstęp

Wstępne rozpoznanie typu nowotworu pozwala zaplanować przebieg leczenia przedoperacyjnego, zabieg chirurgiczny i późniejszą terapię. Oznaczenie markerów w utkaniu raka lub we krwi umożliwia monitorowanie przebiegu choroby oraz wczesne wykrycie nawrotu. Markerami biochemicznymi mogą być różne substancje wielocząsteczkowe, w tym: hormony, enzymy, antygeny czy immunoglobuliny. Markery te mogą być produktami swoistymi dla komórek rakowych, jednak nie zawsze są charakterystyczne dla jednego typu nowotworu. Ich znaczenie diagnostyczne wynika ze znacznie intensywniejszej produkcji przez nowotwór i wydzielania ich do krwi, gdzie oznaczane są za pomocą przeciwciał mono- lub poliklonalnych. Markery molekularne oznacza się najczęściej w utkaniu guza w celu różnicowania guzów łagodnych i złośliwych lub w celu wyboru terapii (markery predykcyjne).

DPP4 (*dipeptydylopeptydaza IV*) to powierzchniowe białko, proteinaza serynowa o wielkości częstości 110 kD, o pojedynczym łańcuchu polipeptydowym utworzonym z 766 aminokwasów, należąca do glikoprotein błonowych typu II [1]. Jest zbudowana z dwóch domen: N-końcowej charakteryzującej się ośmioskrzydłową strukturą śmigłową (*eight-bladed β -propeller*), zakotwiczoną w błonie przez pojedynczą (22-aminokwasową) helisę, z krótkim N-końcem przechodzącym do cytoplazmy, oraz C-końcowej o charakterze α/β hydrolazy, która odgrywa zasadniczą rolę w tworzeniu homodimerów [2]. Struktura śmigłowa zakrywa aktywną część enzymu, czego skutkiem jest ograniczony dostęp dla substratów. Przechodzą one przez otwór między I a II śmigłem i przez tunel struktury, gdzie następuje cięcie na dwa produkty, które opuszczają aktywne centrum enzymu [3].

Aktywność enzymatyczna *DPP4* polega na odcinaniu NH_2 -końcowych dipeptydów z białek, w których występuje prolina bądź alanina w przedostatniej pozycji (Xaa-Pro lub Xaa-Ala) [4]. Gen *DPP4* wykazuje tę aktywność tylko jako homodimer, natomiast monomery nie mają właściwości enzymatycznych [5].

W normalnej, zdrowej tarczycy nie stwierdza się obecności *DPP4*, ale w zmienionych nowotworowo tyreocytach gen ten ulega ekspresji, szczególnie silnej w przypadku brodawkowatego raka tarczycy. W raku pęcherzykowym ekspresja *DPP4* jest znacznie słabsza, a w raku rdzeniastym nie stwierdzono jej we wcześniejszych badaniach [6–8]. Łagodne nowotwory tarczycy i inne zmiany patologiczne wykazywały aktywność genu *DPP4* w pojedynczych przypadkach. Wzmocniona ekspresja genu *DPP4* w raku brodawkowatym tarczycy została potwierdzona metodą mikromacierzy [9, 10].

Cel pracy

1. Zbadanie i porównanie ekspresji genu *DPP4* w raku brodawkowatym tarczycy (PTC, *papillary thyroid carcinoma*) oraz w utkaniu prawidłowej tarczycy za pomocą ilościowej reakcji Q-PCR.
2. Ocena przydatności tego markera molekularnego metodą krzywych ROC (*relative operating characteristic*).

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły fragmenty guzów i fragmenty zdrowej tarczycy pobrane od pacjentów operowanych z powodu raka brodawkowatego w Klinice Chirurgii Onkologicznej Instytutu Onkologii w Gliwicach. Za ich świadomą zgodą badaniom poddano 179 próbek tkankowych, w tym 142 pobranych u kobiet w przedziale wiekowym 6–89 lat i 37 pobranych u mężczyzn w wieku 11–89 lat, 77 fragmentów tarczycy zdrowych i 102 guzy nowotworowe.

RNA całkowicie wyizolowano za pomocą zestawu RNeasy Midi Kit firmy QIAGEN oraz metodą Chomczyńskiego i Sacchiego. Metody te różnią się ilością materiału potrzebną do uzyskania wymaganej ilości RNA. RNA uzyskane za pomocą każdej z metod oczyszczano z użyciem zestawu RNeasy Mini Kit firmy QIAGEN i trawiono DN-azą I.

RNA oceniono ilościowo z zastosowaniem spektrofotometru i jakościowo, zarówno w żelu agarozowym, jak i za pomocą bioanalyzera. Stężenie RNA oznaczono metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar absorpcji światła w nadfiolecie przy długości fali 260 nm (A_{260}). Stężenie RNA dla każdej próbki oznaczano dwukrotnie, bezpośrednio po oczyszczeniu na dużych kolumnach oraz po oczyszczeniu i trawieniu DN-azą I na małych kolumnach. Spektrofotometrycznie sprawdza-

no również czystość RNA. Wartość współczynnika A_{260}/A_{280} mieściła się w granicach 1,8–2,1, co świadczyło o czystości preparatu (preparat był wolny od zanieczyszczeń białkami). Ocenę jakościową preparatu RNA przeprowadzono zarówno za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, jak i za pomocą bioanalyzera. Elektroforezę prowadzono w 1-procentowym żelu, przy napięciu 70 V (tj. 5–7 V/cm długości żelu). Jako wzorzec wielkości zastosowano marker pUCMix oraz marker RNA I. Wynik oceniano w transiluminatorze Gel Doc 2000 firmy BIORAD, emitującym światło o długości fali 312 nm. Analizę bioanalityczną przeprowadzono przy użyciu zestawu RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies). Pomiar wykonano na bioanalyzerze (Agilent 2100), jako wynik otrzymując elektroforogram określający jakość i czystość badanych próbek.

Syntezę cDNA przeprowadzono na matrycy całkowitego RNA przy zastosowaniu zestawu Sensiscript firmy QIAGEN.

Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym (Q-PCR) opiera się na pomiarze liczby kopii jednego lub kilku badanych genów w próbce na bieżąco podczas trwania reakcji PCR. Pomiar fluorescencji odbywa się w czasie reakcji. Do analizy Q-PCR wykorzystuje się sondy genowo swoiste, za pomocą których określa się ilość powstałego produktu, oraz sondy nieswoiste genowo, informujące o ilości dwuniciowego DNA występującego w analizowanej próbce. W celu otrzymania wiarygodnych wyników konieczna jest dobra optymalizacja i normalizacja warunków reakcji.

Analizę uzyskanych danych przeprowadza się za pomocą odpowiedniego programu komputerowego.

Reakcję Q-PCR przeprowadzono na aparacie ABI PRISM 7700 Sequence Detection System firmy Applied Biosystem na 96-dółkowych płytkach. Do sondy genu *DPP4* przyłączony był barwnik reporterowy (FAM) i wygaszacz (*non-fluorescent quencher*). Otrzymane wyniki ekspresji *DPP4* poddano normalizacji względem genu *GUS* — jako genu odniesienia. Sonda dla kontroli endogennej *GUS* zawierała barwnik reporterowy VIC i wygaszacz TAMRA. Pomiar obu genów odbywał się jednocześnie.

Do sprawdzenia znamienności statystycznej analizowanych grup wykorzystano test Manna-Whitneya. Normalność rozkładu sprawdzono przy użyciu testu Kołmogorowa-Smirnowa oraz testu Shapiro-Wilka.

Do analizy użyto również krzywych ROC (*relative operating characteristic*). Krzywa ROC przedstawia wykres czułości do swoistości (1-swoistość) badanego markera.

Wyniki

Badanie przeprowadzono najpierw w grupie 35 chorych, od których pobrano zarówno fragmenty guza, jak

i fragmenty zdrowej tarczycy, a następnie rozszerzono na próbki niepowiązane.

Analiza wyjściowa sparowanych próbek pobranych śródoperacyjnie

Do analizy wykorzystano grupę 70 próbek (raki brodawkowate i fragmenty nienowotworowej tarczycy) pochodzących od 35 chorych i stanowiących pary: rak brodawkowaty–tkanka tarczycy z płata po przeciwnej stronie do guza. Stwierdzono, że nienormalizowana ekspresja *DPP4* w tkankach raka różni się: obserwowana w tkankach raka ekspresja genu jest około 10-krotnie wyższa niż w tkankach normalnych (ryc. 1. A).

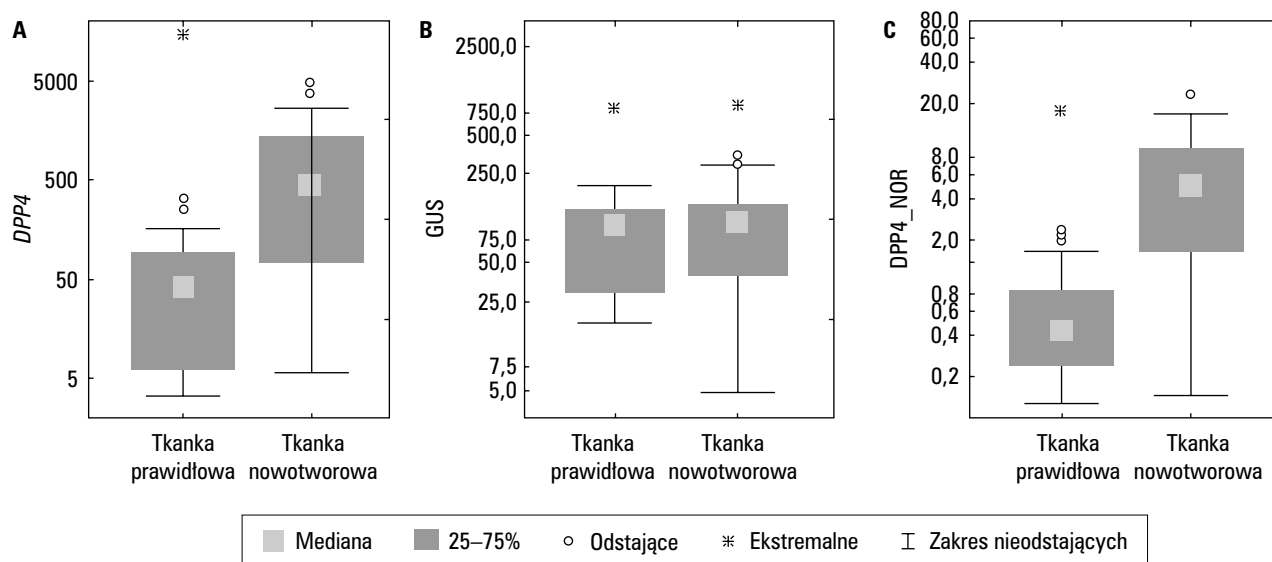
Analiza ekspresji genu odniesienia, jaki w niniejszej pracy stanowiła β -glukuronidaza (*GUS*), wykazała, że jej ekspresja nie różni się wyraźnie między tkankami raka a tkankami nienowotworowymi, spełnia więc kryteria genu normalizującego. W tkankach raka zaobserwowano większy zakres wartości nieodstających (ryc. 1. B). Po normalizacji wartości ekspresji *DPP4* względem *GUS* stwierdzono, że mediana ekspresji genu *DPP4* wynosi 0,43 jednostki, podczas gdy w raku brodawkowatym jest około 10-krotnie większa i wynosi 4,27 jednostek. Mimo że zakres ekspresji *DPP4* w rakach i tkankach łagodnych był podobny (0,15–23,1 oraz 0,13–17,2), porównanie zakresu, na jaki przypada 80% wyników (10.–90. centyl), prowadziło do wniosku, że znaczna większość próbek raka wykazuje większą ekspresję (ryc. 1. C). Ekspresję genu *DPP4* w każdej z par guz–utkanie zdrowej tarczycy przedstawiono na rycinie 2. Stwierdzono,

że w większości analizowanych par (2 z 35; 5,7%) ekspresja w utkaniu raka jest wyższa niż w tarczycy nienowotworowej, a krotność różnicy mieści się w zakresie 0,48–48,71. W dwóch próbkach o krotności zmiany poniżej 1 ekspresja *DPP4* w utkaniu raka jest nieznacznie (około 2-krotnie) niższa niż w tarczycy nienowotworowej. W jednym przypadku ekspresja genu *DPP4* w raku brodawkowatym jest niespotykanie niska w porównaniu z pozostałymi próbkami, a w drugim przypadku ekspresja tego genu w tarczycy prawidłowej jest niespotykanie wysoka.

Za pomocą analiz statystycznych potwierdzono, że *DPP4* różni się ekspresją między badaną grupą raków brodawkowatych a tkankami tarczycy niewykazującymi cech złośliwości (test Manna-Whitneya, $p = 0,000$).

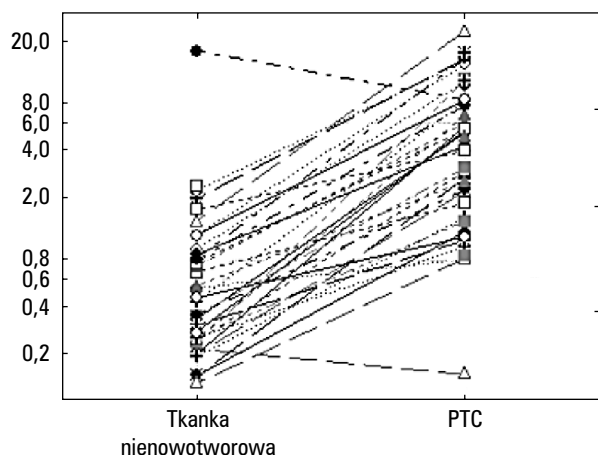
Analiza sprawdzająca w dużym materiale klinicznym

U blisko 180 chorych badano albo fragment raka brodawkowatego, albo utkanie nienowotworowe tarczycy z płata po przeciwnej stronie do guza. Normalizowane wyniki badania ekspresji *DPP4* wskazują, że raki brodawkowate charakteryzują się bardzo wysoką ekspresją badanego genu (mediana 13,8) przy jednoczesnym bardzo szerokim zakresie tejże ekspresji (0,02–274442,9). W analizowanych fragmentach tarczycy prawidłowej ekspresja *DPP4* jest stosunkowo niska (mediana 0,5) przy dziesięciokrotnie niższym zakresie (0,01–32992,3). Wartość 5% średniej obciętej różni te dwie grupy niemalże dwukrotnie: dla tarczycy prawidłowej wartość ta wynosi 19 j.,



Rycina 1. A. Porównanie ekspresji genu *DPP IV* w tarczycy zdrowej i w raku brodawkowatym tarczycy ($p = 0,000$); **B.** Porównanie ekspresji genu *GUS* w tarczycy zdrowej i w raku brodawkowatym tarczycy (pary guz–tkanka zdrowa; $p = 0,000$); **C.** Ekspresja genu *DPP4* normalizowana względem genu *GUS* dla zdrowej tarczycy i raka brodawkowatego tarczycy (pary guz–tkanka zdrowa; $p = 0,000$)

Figure 1. A. Expression of *DPPIV* gene in normal thyroid tissue and papillary thyroid carcinoma ($p = 0.000$); **B.** Expression of *GUS* gene in normal thyroid tissue and papillary thyroid carcinoma (paired samples; $p = 0.000$); **C.** Expression of *DPP4* gene after normalization by *GUS* gene in normal thyroid tissue and papillary thyroid carcinoma (paired samples; $p = 0.000$)

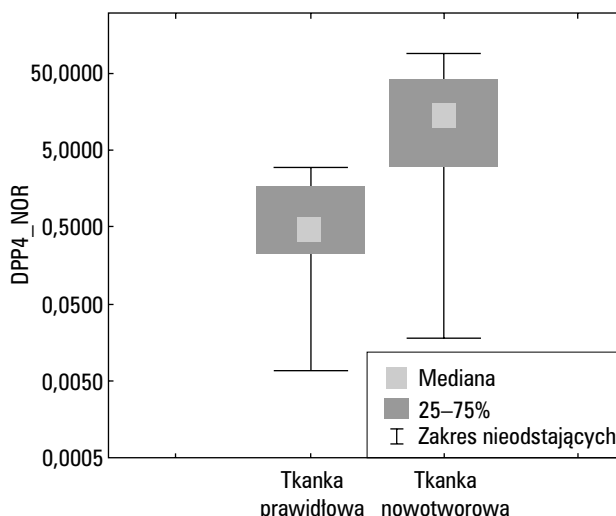


Rycina 2. Porównanie ekspresji genu DPP4 w układzie par guz-nienowotworowa tarczycy ($p = 0,000$)

Figure 2. Comparison of DPP4 expression in tumor vs. normal thyroid tissue ($p = 0.000$)

dla raka — 34,1 j. Po przeprowadzeniu normalizacji otrzymanych wyników ekspresji badanego genu uzyskano wielkości znacznie się różniące (mediana dla tkanki prawidłowej wynosi 0,5, a dla PTC — 35) (ryc. 3).

Wykreślono również krzywe ROC dla ekspresji genu DPP4 normalizowanego względem genu GUS oraz dla genu DPP4 nienormalizowanego. Na podstawie danych z 35 par guz-tkanka zdrowa stwierdzono, że obydwa pomiary dają wynik wartościowy pod kątem diagnostycznym (krzywa znajduje się znacznie powyżej przekątnej), a wartości normalizowane charakteryzują się wyższą przydatnością diagnostyczną (pole pod krzywą dla danych nienormalizowanych

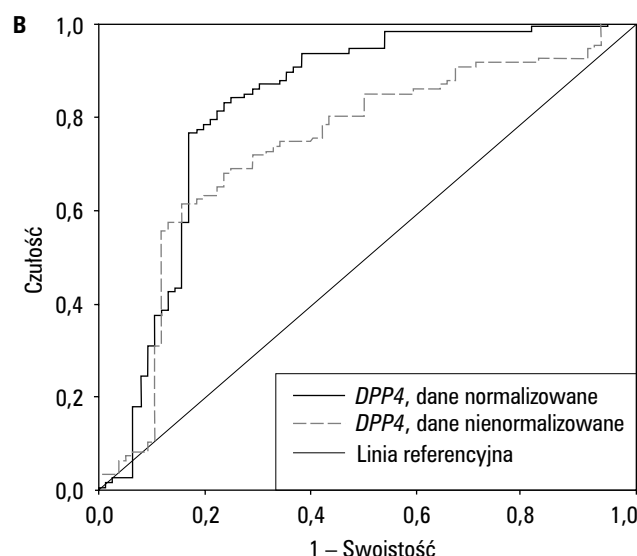
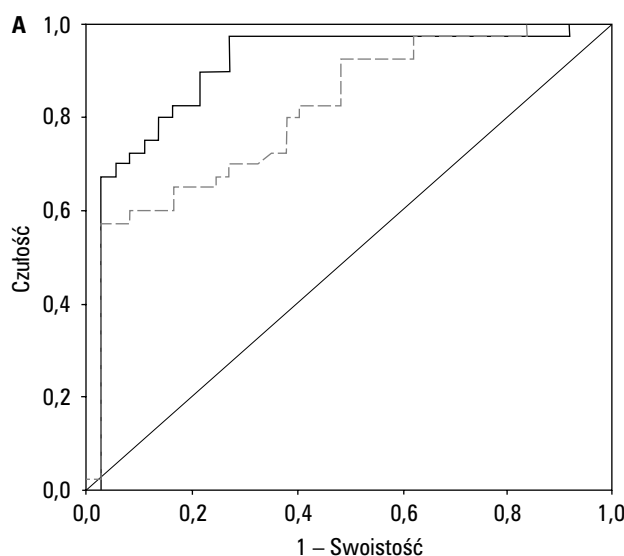


Rycina 3. Ekspresja genu DPP4 po normalizacji względem genu GUS w zdrowej tarczycy i w raku brodawkowatym tarczycy (materiał rutynowy; $p = 0,000$)

Figure 3. Expression of DPP4 gene after normalization in respect of GUS gene in normal thyroid tissue and papillary thyroid carcinoma (routine material; $p = 0.000$)

wynosi $0,8 \pm 0,05$, dla danych normalizowanych $0,9 \pm 0,04$) (ryc. 4 A). Dla danych normalizowanych czułość rzędu 0,8 osiąga się przy podobnej swoistości.

Analiza krzywych ROC uzyskanych z większego materiału, lepiej naśladującego rzeczywistość praktykę kliniczną (ryc. 4 B), daje mniej korzystny przebieg krzywej, szczególnie jeżeli przyjmuje się kryterium wysokiej swoistości. Dla swoistości rzędu 0,9 czułość jest niska, wręcz niższa dla danych normalizowanych, a przy swoistości 0,8 czułość jest niższa od 0,8.



Rycina 4. Krzywe ROC (relative operating characteristic) dla oceny wartości diagnostycznej genu DPP4 w różnicowaniu guzów tarczycy; **A.** dla próbek sparowanych; **B.** dla próbek rutynowych

Figure 4. ROC analysis for evaluation of DPP4 as a molecular marker of thyroid cancer; **A.** for paired samples; **B.** for unpaired samples

Dyskusja

Podstawową funkcją *DPP4* jest jej udział w odpowiedzi immunologicznej. Funkcje białka *DPP4* poza układem odpornościowym są mniej poznane. Bierze ono udział w regulacji stężenia hormonów, chemokin i neuropeptydów [11], może uczestniczyć w metabolizmie glukozy [12], odgrywa także rolę w procesach komunikacji komórek, być może przez współdziałanie z cząsteczkami kolagenu czy fibronektyny w regulacji rozrastania, adhezji i migracji komórek [11]. Wszystkie te procesy prowadzą do ekspansji nowotworowej [13].

W analizach mikromacierzowych, w których badano ekspresję genów w raku brodawkowatym tarczycy, wykazano wzrost ekspresji genu *DPP4* [9]. Gen ten charakteryzował się największą różnicą ekspresji pomiędzy rakiem brodawkowatym oraz tkanką zdrową i był już wcześniej proponowany jako marker molekularny dla zróżnicowanych nowotworów tarczycy [14]. Zespół Kholovej badał ekspresję genu *DPP4* w komórkach raka i w zdrowej tarczycy. Analizę przeprowadzono, wykorzystując metody cytochemiczne, histochemiczne oraz immunohistochemiczne. Materiał stanowiły raki złośliwe tarczycy (brodawkowaty i pęcherzykowy), zmiany łagodne (hiperplazje, gruczolaki pęcherzykowe, choroba Hashimoto) oraz utkanie zdrowej tarczycy. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono ekspresję *DPP4* zarówno w zmianach złośliwych, jak i w łagodnych, przy czym różnica w poziomie ekspresji była znaczna. W normalnych komórkach pęcherzykowych (tyreocytach) tarczycy stwierdzono wręcz brak ekspresji genu *DPP4* [6–8]. Wczesniejsze doniesienia japońskich badaczy także pokazywały, że ekspresja *DPP4* nie zachodzi w zdrowych tyreocytach, natomiast wysoki poziom *DPP4* jest obserwowany w komórkach zróżnicowanych nowotworów tarczycy, przy czym w raku rdzeniastym i w niezróżnicowanych rakach tarczycy nie stwierdzono obecności *DPP4* [14].

W niniejszej pracy przebadano poziom ekspresji genu *DPP4* w raku brodawkowatym tarczycy i utkaniu zdrowej tarczycy. W obrębie większości par tkanka zdrowa-guz zauważono wyraźną różnicę w ekspresji badanego genu, jednak z pewnymi wyjątkami: w analizowanym zbiorze tkanek są również pary o podobnej ekspresji *DPP4* w obu typach komórek. Zatem różnica w ekspresji, uderzająco wysoka w badaniu mikromacierzowym [10], w badaniu Q-PCR nie okazała się tak duża, chociaż była oczywiście znamieną statystycznie. Można wymienić kilka przyczyn zaobserwowanych rozbieżności. Przede wszystkim należy uwzględnić problem normalizacji: w metodzie mikromacierzowej ekspresja badanego genu jest porównywana z tysiącami genów jednocześnie, podczas gdy w przypadku Q-PCR w tej pracy odnoszono wyniki ekspresji *DPP4* tylko

w stosunku do jednego genu (*GUS*), chociaż trzeba podkreślić, że β -glukuronidaza została wybrana na podstawie analizy porównawczej kilku genów.

Mniejsza od oczekiwanej różnica w pomiarze ekspresji *DPP4* między rakiem brodawkowatym tarczycy a utkaniem nienowotworowym znalazła swoje odzwierciedlenie w analizie metodą krzywych ROC. Jakkolwiek w wybranych, sprawdzonych próbkach można było uzyskać jednocześnie co najmniej 80% czułości i swoistości jednocześnie (ryc. 4 A), to analiza próbek rutynowych nie dała zadowalających wyników (ryc. 4 B). Przemawia to przeciwko rutynowemu wykorzystaniu analizy molekularnej *DPP4* we wspomaganiu diagnostyki różnicowej guzów tarczycy.

Wnioski

Uzyskane wyniki potwierdzają wzrost ekspresji *DPP4* w raku brodawkowatym tarczycy. Wyniki analizy ROC przemawiają jednak przeciwko zastosowaniu tego genu jako markera raka brodawkowatego tarczycy, który mógłby być wykorzystywany w diagnostyce rutynowej.

Piśmiennictwo

- Hiramatsu H, Kyono K, Higashiyama Y i wsp. The structure and function of human dipeptidyl peptidase IV possessing a unique eight-bladed β -propeller fold. *Bioch Biophys Res Comm* 2003; 302: 849–854.
- Ajami K, Abbott CA, Obradovic M i wsp. Structural requirements for catalysis, expression, and dimerization in the CD26/DPIV gene family. *Biochemistry* 2002; 42 (3): 694–701.
- Engel M, Hoffmann T, Wagner L i wsp. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Biochemistry* 2003; 100 (9): 5063–5068.
- Khin EE, Kikkawa F, Ino K i wsp. Dipeptidyl peptidase IV expression in endometrial endometrioid adenocarcinoma and its inverse correlation with tumor grade. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 670–676.
- Aertgeerts K, Ye S, Shi L i wsp. N-linked glycosylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26): Effects on enzyme activity, homodimer formation, and adenosine deaminase binding. *Protein Science* 2004; 13: 145–154.
- Kholova I, Ludvikova M, Ryska A i wsp. Immunohistochemical detection of dipeptidyl peptidase IV (CD26) in thyroid neoplasia using biotinylated tyramine amplification. *Neoplasma* 2003; 50: 3.
- Kholova I, Ryska A, Ludvikova M i wsp. Dipeptidyl peptidase IV expression in thyroid cytology: retrospective histologically confirmed study. *Cytopathology* 2003; 14: 27–31.
- Kholova I, Ludvikova M, Ryska A i wsp. Diagnostic role of markers dipeptidyl peptidase IV and thyroid peroxidase in thyroid tumors. *Anti-cancer Research* 2003; 23: 871–876.
- Huang Y, Prasad M, Lemon WJ i wsp. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 (26): 15044–15049.
- Jarząb B, Wiench M, Fajarewicz K i wsp. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Res* 2005; 65 (4): 1587–1597.
- Karl T, Chwalisz WT, Wedekind D i wsp. Localization, transmission, spontaneous mutations, and variation of function of the *Dpp4* (Dipeptidyl-peptidase IV; CD26) gene in rats. *Regulatory Peptides* 2003; 115: 81–90.
- Leiting B, Pryor KAD, Wu JK i wsp. Catalytic properties and inhibition of proline — specific dipeptidyl peptidase II, IV and VII. *Biochem J* 2003; 371: 525–532.
- Tan EY, Mujoomdar M, Blay J. Adenosine down-regulates the surface expression of dipeptidyl peptidase IV on HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Am J Pathol* 2004; 165.
- Tanaka T, Umeki K, Yamamoto I i wsp. CD26 (dipeptidyl peptidase IV/DPP IV) as a novel molecular marker for differentiated thyroid carcinoma. *J Cancer* 1995; 64: 326–331.