

OPONENTSKÝ POSUDEK

Diplomová práce: “The Role of Tyrosine Kinase Activity of Mitochondrial ERBB2/HER2 in Breast Cancer“

Autor: Bc. Eliška Novotná, PŘF UK, Praha 2019

Předkládaná diplomová práce „**Role tyrosinkinázové aktivity mitochondriálního ERBB2/HER2 v rakovině prsu**“ tematicky vychází z problematiky dlouhodobě a úspěšně řešené na pracovišti školitele dr. Rohleny a prof. Neužila, konkrétně v oblasti role proteinové kinázy HER2 v patogenezi rakoviny prsu. Diplomantka jasně naformulovala cíle práce, kterými je studium mitochondriálně lokalizovaného HER2 proteinu vzhledem k jeho kinázové aktivitě a též k případné senzitivizaci buněk ke klinicky testovanému terapeutiku MitoTam.

Práce sleduje klasické členění magisterských diplomových prací, má rozsah 55+14 stran a je napsána čtivou angličtinou. Veškeré části jsou vyvážené a po zevrubném úvodu následuje detailní popis mnoha použitých metod a bohatá výsledková část, která sestává z 9 vícepanelových obrázků na 13 stranách. Autorka na skoro 7 stranách diskuse kriticky hodnotí dosažené výsledky a dává je do kontextu již publikovaných a v některých případech i stále probíhajících experimentů. Metodický aparát, který si diplomantka osvojila, je rozsáhlý a dle detailního seznamu i většinu metod sama prováděla.

Klíčové pro celou práci bylo naklonování mutantních konstruktů HER2 proteinu, které byly cíleny do mitochondrií a u nichž byla inhibována a nebo naopak aktivována tyrosin kinázová aktivita. Konstrukty byly následně využity k experimentům na hojně využívané modelové buněčné linii prsního karcinomu MDA MB 231, která je tzv. „triple negative“ a neobsahuje endogenní HER2. Po biochemických funkčních experimentech zaměřených zejména na mitochondrie byly provedeny studie tumorigenního potenciálu v klasickém 2D provedení a následně i v 3D a též *in vivo* v myším modelu. Získané unikátní výsledky budou nepochybně brzy publikovány.

K práci mám jen několik drobných **připomínek**:

U prezentace blotů/elektroforéz se sluší ukázat standard a údaje o příslušných molekulových hmotnostech (viz modrá nativní elektroforéza Obr. 4.7, str. 34).

Některé grafy (např. panely A, C, D, Obr. 4.9, str. 39) by se daly graficky sjednotit.

Mezi číselnou hodnotu a jednotku se vkládá mezera.

Na straně 13 v části „The most potent ROS...“ je zmíněn superoxid a peroxid vodíku. Nicméně ještě více reaktivní je sekundárně vzniklý hydroxyl radikál.

V metodické sekci mi chybí podrobný popis přípravy digitoninového lyzátu (doba solubilizace, podmínky centrifugace).

Autorky bych se rád **zeptal** na následující:

- 1) Co je známo o mitochondriálním fosfoproteomu (vč. mitochondriálních kináz a fosfatáz) a zda můžete spekulovat o případném substrátu mitochondriálně lokalizovaného HER2 (v diskusi je zmíněn protein NDUFA13)?
- 2) Vzhledem k prokázanému rozdílu v produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) lze předpokládat i změny antioxidačního aparátu. Byly provedeny nějaké pilotní kvantifikace? (částečně zodpovězeno v diskusi na str. 42)
- 3) Jak by se nejlépe provedlo ověření lokalizace HER2 do mitochondrií a kvantifikace distribuce plazmatická membrána vs. mitochondriální membrána?
- 4) Jaké mutace HER2 byly u pacientek nalezeny a případně jak jsou časté?

Závěrem mohu konstatovat, že Bc. Eliška Novotná přispěla k řešení zajímavé problematiky z oblasti nádorové biologie karcinomu prsu a prokázala, že je schopná o své práci úspěšně a kriticky referovat. Předkládanou práci **doporučuji** postoupit k obhajobě za účelem udělení titulu Mgr.

V Praze, dne 15.9.2019

RNDr. Marek Vrbacký, Ph.D.

Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.

Vídeňská 1083

142 20 Praha 4