

Oponentský posudek diplomové práce Kristýny Bicanové

“Funkční charakterizace mechanismů invazivity sarkomových linií s rozdílnou metastatickou kapacitou”

V předkládané diplomové práci se Kristýna Bicanová zaměřila na popsání rozdílných mechanismů invazivity dvou příbuzných buněčných linií. Jako modelový systém byly použity vysoce metastatická sarkomová linie A3 a nemetastázující parentální linie K2. Podařilo se zjistit, že parentální linie exprimuje aktivní proteázu MMP2 v souladu s předpokládaným mesenchymálním způsobem migrace v 3D podmínkách. Překvapivě se ukázalo, že metastatická linie A3 MMP2 neprodukuje. V dalších pokusech se vycházelo z poznatků, že linie A3 vykazuje pozitivně regulovanou signální dráhu Rho-ROCK, což naznačovalo, že linie A3 by mohla primárně vyžít améboidní způsob migrace. Pro ověření této hypotézy byly vytvořeny buněčné linie stabilně exprimující konstitutivně aktivní či dominantně negativní formy malé GTPázy Rho a také divoký typ a nefosforylovatelnou formu lehkého řetězce myosinu. Podařilo se prokázat, že inhibice Rho, inhibice protein kinázy ROCK a exprese nefosforylovatelné formy MLC vede k poklesu invazivity u linie A3, ale nemá negativní vliv na linii K2. Dále bylo zjištěno, že exprese různých variant MLC nemá vliv na morfologii buněk A3.

Předložená diplomová práce splňuje po formální stránce všechna nutná kritéria. Jednotlivé kapitoly jsou vyvážené co do obsahu. V literárním úvodu autorka v dostatečné míře zpracovala dosavadní poznatky týkající se mesenchymálního a améboidního způsobu migrace a základní regulační mechanismy těchto dějů. Nicméně bych uvítal, kdyby byl literární přehled doplněn schématickým obrázkem/obrázky signálních drah regulujících kontraktilitu, což by umožnilo lepší orientaci v textu. Interpretace výsledků a jejich diskuse je korektní, byť poněkud kusá, a odpovídá nárokům kladeným diplomovému zadání.

Předložená diplomová práce přináší celou řadu nových a zajímavých výsledků, nicméně v následující části budou zmíněny hlavně nedostatky. Dle mého názoru hlavní nedostatek spočívá v prezentaci získaných dat. Autorka ve Výsledcích i Diskuzi zvolila formu, kdy v textu nejsou uvedeny přímé odkazy na dosažené výsledky. Tato forma vede k řadě nejasností a neumožňuje kontrolu některých závěrů. Jako příklad bych uvedl tvrzení ze str. 71, kde autorka píše, že (zkráceně) „v A3 buňkách s variantou konstitutivně aktivního Rho jsme... v 2D pozorovali změnu tvaru, která se nám ve 3D nepotvrdila“. Toto tvrzení není možno ověřit, jelikož výsledková část obsahuje morfologickou analýzu pouze buněčných linií exprimující varianty MLC, nikoliv Rho a není jasné, jaký je základ tohoto tvrzení. Chtěl bych se tedy zeptat, zdali byly pro morfologickou analýzu použity také buněčné linie exprimující varianty Rho, a pokud ano, tak s jakým výsledkem.

Změny tvaru buněk se týká i můj druhý, velice obecný dotaz. Autorka v textu uvádí že „blokace pericelulární proteolýzy může vyvolat přechod z mesenchymální invazivity na améboidní“. Je možné spekulovat, zda změna tvaru u A3 buněk a přechodu z améboidního na mesenchymální způsob migrace by mohla vyžadovat nejen inhibici Rho-ROCK dráhy, ale také expresi MMP2 nebo jiné matrixové metaloproteázy?

Můj poslední dotaz se týká zymografické analýzy exprese matrixových proteáz. Zajímalo by mě, zdali použitá metoda umožňuje detekovat všechny matrixové proteázy. Pokud ne, nebylo by lepší použít např. RT-RT-PCR pro stanovení exprese jednotlivých proteáz a jejich inhibitorů?

Po ediční stránce je diplomová práce jako celek poněkud nedůsledně zpracována a v textu je množství stylistických neobratností, gramatických chyb a překlepů typických pro diplomové práce. Domnívám se, že tyto chyby byly patrně způsobeny časovou tísňí při

editaci. V následujících řádcích posudku uvádím formální nedostatky a výhrady, které jsou určeny pro autorčinu informaci a reflexi. Nepovažuji za nutné, aby byly zodpovězeny během obhajoby.

Str.11: Není uvedeno, co je TIMP-2. Termín je vysvětlen až později v textu.

Str.12: Autorka nesprávně uvádí pikomoly místo pikonewtonů.

Str. 18: Nesprávná citace Gadea et al.

Str.19: Překlep „Zvýšená proteolýzy“.

Str. 21: Věta „*Místo rozšiřování pericelulárního prostoru a proteolýzy složek extracelulární matrix buňky mění mesenchymální typ invazivity na améboidní se schopností protáhnout se užšími prostory, v souvislosti s améboidním fenotypem je distribuce integrinu $\beta 1$ a filamentárního aktinu difúzní kortikální.*“ je poměrně nesrozumitelná.

Str. 25: Je uvedeno složení směsi fenolu a chloroformu, ale tyto reagencie nejsou nikde použity.

Str. 28: Popis protilátky p-MYPT1 (Thr 853) je nejasný.

Str. 28: Bylo by vhodné v textu sjednotit označování fosforylovaných proteinů (p-MYPT, pMLC, ppaxillin).

Str. 28: Popis sekundárních protilátek – např. "kozí polyklonální králičí IgG" je nejasný, patrně bylo míněno „kozí polyklonální proti-králičí IgG“.

Str. 30: ŽAMP médium není běžné laboratorní médium a tak je nutné popsat složení.

Str. 31: Patrně špatně uvedený objem – 100ml místo 100 ul.

Str. 42: Překlep „zamrazíme při 70⁰C“

Str. 42: anglický termín „gelatin“

Str. 44: Chybí uvedení jednotek (na 24 do termostatu, 750 1xPBS)

Str. 50: chybí slovo (rozdíl u 83 mezi K2 a A3 buňkami)

Str. 52, Obr. 3: Bez bližšího vysvětlení je nemožné zjistit co obrázek ukazuje.

Str. 62: Protilátkou proti F-aktinu je zřejmě myšlen Phalloidin.

Str. 62: Je uvedeno, že buňky byly obarveny protilátkami proti p-MLC a p-Paxillinu, ale výsledky ukazují barvení aktinu a GFP.

Str. 70. Tvrzení: „*Funkční inaktivace složek Rho/ROCK dráhy vede k snížení invazivity buněk mesenchymálního původu.*“ je nepřesné, neboť jak K2 tak A3 buňky jsou mesenchymálního původu.

Přes uvedené připomínky týkající se nedostatků formálního charakteru považuji metodickou a odbornou úroveň předložené práce za **nadstandardní**. Konstatuji, že autorka dokázala pomocí molekulárně biologických, biochemických a mikroskopických metod charakterizovat základní rozdíly v invazivní strategii blízkce příbuzných linií s rozdílným metastatickým potenciálem. Také bych zdůraznil, že některé výsledky byly použity i v příložené publikaci, kde je Kristýna Bicanová uvedena jako spoluautor, což není zdaleka běžné. Domnívám se, že Kristýna Bicanová splnila beze zbytku všechna požadovaná kritéria pro diplomovou práci a doporučuji, aby jí byl udělen titul ^{Mgr.}

V Praze 14.9. 2009

Tomáš Vomastek, PhD.
Mikrobiologický ústav AV ČR