

## Školitelský posudek na diplomovou práci

Jméno školitele: RNDr. **Jan Brábek**, PhD.

Datum: 3.9.2008

Autor: Kristýna Bicanová

### Název práce: **Funkční charakterizace mechanismů invazivity v sarkomových buňkách s rozdílným metastatickým potenciálem**

Kristýna Bicanová se zapojila do práce v naší laboratoři v roce 2006. Při svých prvních experimentech pomáhala analyzovat úlohu signalizace přes mTOR pro růst nezávislý na podkladu u fibroblastů transformovaných onkogenem *src*. Již od počátku prokazovala vysokou laboratorní zručnost. Následně byla zapojena do studia mechanismů invazivity sarkomových buněk s rozdílným metastatickým potenciálem. Cílem Kristýniny diplomové práce bylo objasnit některé molekulární a buněčné mechanismy invazivity vybraných sarkomových linií. V pilotní sérii experimentů analyzovala přítomnost a aktivitu matrixových metalloproteináz v kondicionovaném médiu jednotlivých sarkomových linií. Výsledky Kristýniných experimentů nás přivedly k hypotéze, že mezenchymální sarkomové buňky používají nedávno objevený na extracelulárních proteázách nezávislý améboidní způsob invazivity. Améboidní způsob invazivity byl do té doby známý jako primární mechanismus invazivity pouze u buněk karcinomů. V následujících experimentech, na kterých se podílelo několik studentů naší laboratoře včetně Kristýny byla améboidní invazivita sarkomových buněk potvrzena. Ve spolupráci s laboratoří prof. Fabryho na Universitě v Erlangenu jsme rovněž jako první potvrdili předpoklad závislosti améboidní invazivity na zvýšené schopnosti buněk generovat trakční síly. Výsledky uvedených výzkumů byly v loňském roce prezentovány na několika mezinárodních konferencích a publikovány v časopise *Molecular Cancer Research*. Abstrakty z konferencí i publikace v *MCR* jsou přiloženy k diplomové práci.

V návaznosti na uvedené objevy jsme se rozhodli detailně analyzovat úlohu signalizace přes dráhu Rho/ROCK/MLC v améboidní invazivitě sarkomových buněk. Pro tento účel Kristýna připravila stabilní transgenní linie, odvozené od nemetastatických sarkomových buněk linie K2 i od vysoce metastatických buněk A3, nesoucí expresní vektor s variantami genů pro RhoA a MLC. S použitím těchto linií sledovala vliv exprese jednotlivých variant Rho a MLC na invazivitu sarkomových buněk v invazivních komůrkách potažených Matrigelem. Snížení invazivity buněk vysoce metastatické sarkomové linie A3 prokázala v případě inhibice kinázy ROCK, exprese dominantně negativní varianty RhoA a nefosforylovatelné varianty MLC. Tyto výsledky pomohly potvrdit závislost invazivity buněk A3 na dráze Rho/ROCK/MLC úrovni

jednotlivých komponent a mohou přispět i k odhadu relativní důležitosti komponent. Zmíněné výsledky byly rovněž presentovány na mezinárodních konferencích, abstrakty jsou přiloženy k diplomové práci.

Ve spolupráci s doktorandským studentem Ondřejem Toldem Kristýna analyzovala vliv dráhy Rho/ROCK/MLC na morfologii sarkomových linií s rozdílným metastatickým potenciálem ve 2D i 3D prostředí. S pomocí konfokální mikroskopie ve 2D ukázala ovlivnění uspořádání filamentárního aktinu ve variantách buněk A3, exprimujících dominantně negativní i konstitutivně aktivní varianty RhoA. V A3 buňkách nesoucích expresní vektor s dominantně negativní variantou RhoA bylo pozorována výrazně zvýšená tvorba aktinových stresových vláken. Stresová vlákna jsou typická pro nemetastatickou buněčnou linii K2. Toto zjištění vedlo k hypotéze o náběhu k améboidně-mesenchymálnímu přechodu u améboidně invadujících buněk linie A3 po ovlivnění dráhy Rho/ROCK/MLC.

Při morfologické analýze v 3D kolagenu bylo zjištěno zvýšené zastoupení buněk s kulatou morfologií u buněk K2 exprimujících MLC. Morfologická změna může svědčit o náběhu k mesenchymálně-améboidnímu přechodu v nemetastické linii K2 při zvýšené expresi MLC.

Výsledky prezentované v této práci přispěly k objevu améboidní invazivity u sarkomových buněk a pomohly objasnit vliv regulace vybraných komponent dráhy Rho/ROCK/MLC na invazivní potenciál sarkomových buněk.

V rámci své diplomové práce se Kristýna naučila a využila velké množství metod molekulární a buněčné biologie. Prokázala laboratorní zručnost, schopnost samostatně provádět experimenty, kriticky je hodnotit a výsledky uvádět do širších souvislostí. Pro doktorské studium bych Kristýně doporučil mírně zvýšit pracovní nasazení, zejména posunout trochu časovou tendenci úsilí od nárazového k pravidelnému.

**Práce podle mě jednoznačně splňuje požadavky na diplomovou práci a navrhuji její přijetí.**

---

Podpis školitele: