

Oponentský posudek na magisterskou práci:

**Bc. Lenka Vágnerová „Využití testu CAM pro charakterizaci a studium invazivních vlastností rakovinných buněk“.**

### Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Práce je zaměřena na vypracování metodiky pro testování invazivních vlastností nádorových buněk na chorioalantoidní membráně kuřecích embryí (CAM test). Autorka ale pojala tento úkol z širšího hlediska, takže ze zdánlivě jednoduché metodické práce vznikla zajímavá a přínosná studie mechanismů metastázování nádorových buněk s využitím originálního experimentálního modelu kuřecích buněk transformovaných onkogenem *v-src*. Autorka prokázala vynikající manuální zručnost, protože bezpečně zvládla náročné manipulace s kuřecím embryem, ale i stejně vynikající tvůrčí schopnosti návrhem vhodných experimentů a interpretací získaných dat. Metodicky plně etablovala CAM test pro rutinní testování nádorových buněk v podmínkách školící laboratoře a na modelu nádorových linií, neinvazivní linie 1259 a její invazivní varianty 5967, jednoznačně prokázala úlohu genů ISL1, PROM1, ARNT2 v potenciaci metastazovací kapacity buněk. Důležité je, že její práce vytvořila předpoklady pro úspěšné funkční testování dalších kandidátních genů uplatňujících se v procesu malignizace nádorové buňky. Kvalita této diplomové práce samozřejmě odráží vynikající myšlenkové a metodické zázemí školící laboratoře, ale je především dokladem péle, tvůrčí aktivity a hlubokého zájmu autorky o studovanou problematiku.

### Formální kvalita předloženého spisu

Po formální stránce odpovídá rozsah, členění, dokumentace provedených experimentů požadovaným standartům.

### Hodnocení částí předkládaného spisu

#### 1. Literární přehled

Autorka uvádí studovanou problematiku fundovaným přehledem současných znalostí jak v oblasti metodických přístupů k využití CAM testu v nádorovém výzkumu, tak i v oblasti mechanismů nádorového zvratu buňky, zejména pak molekulárních mechanismů uplatňujících se v regulaci buněčné homeostázy, které mohou vést ke vzniku nádoru. Z obrovského množství literatury, která je v tomto oboru v současné době dostupná, si dokázala vybrat podstatné práce a napsat čtivý informativní literární přehled. Vycházela ze studia asi 140 experimentálních prací, přehled je doplněn dvěma názornými schématy.

#### 2. Materiál a metodika

Metodicky je práce velmi náročná, předpokládala zvládnutí metodik na úrovni manipulace s kuřecím embryem, přes tkáňové kultivace po molekulární techniky od izolace DNA, RNA, klonování genů, PCR technik po sekvenování DNA. Metody jsou detailně popsány, stejně tak původ experimentálního materiálu jako jsou buněčné linie, ptačí linie, až po používané chemikálie, protilátky a klonovací vektory, je uvedeno i schematické vyobrazení použitých vektorů.

#### 3. Výsledky

Výsledky jsou dokumentovány 3 schématy, 46 fotografiemi a 5 grafy. Z tohoto množství obrazové dokumentace si lze také udělat představu o rozsahu vykonané práce. Veškerá obrazová dokumentace je pečlivě zpracována a může být použita i pro publikaci. Výsledky jsou jasně a přehledně komentovány, obrazová dokumentace potvrzuje vyvozované závěry.

## 4. Diskuse

V diskusi se autorka zaměřila na oblasti, které jsou zásadní pro studium nádorových buněk, tj. výsledky CAM testu a zejména pak na úlohu vytipovaných genů v modulaci maligních vlastností buněk. Prokázala, že je schopna kriticky posuzovat získaná data a v konfrontaci s literárními údaji formulovat pracovní hypotézy. Prokázala, že úspěšně pronikla do studované problematiky a bude schopna se tvůrčím způsobem podílet na dalším výzkumu v této oblasti.

### Dílčí připomínky a otázky do diskuse

1) připomínky k formální stránce práce:

- místo termínu „zaklonování“ (např. na str. 24, 31, 36, ale i na jiných místech), byl doporučoval používat klonování
- místo „retrovirálním“ (str. 37) je lépe použít retrovirovým
- místo „100x ředěné antibiotikum G 418“ (str. 38), je lépe udat koncentraci v  $\mu\text{g/ml}$  média
- mluvíme-li o virových proteinech gag, pol, env, používá se velkých písmen Gag, Pol, Env (str. 37)
- pokud je v textu citována práce, je nutno dodržovat jednotné schéma a uvádět kromě jména také rok, nikoliv pouze (Cermak et al.) – str. 25, (Plachy et al.) – str. 37, ale i jinde v textu
- na str. 53, v prvním odstavci pod Obr.14 je uvedeno... buňky 1259-ARNT2-FLAG...proliferují pomaleji než 1259-ARNT2-FLAG, má být asi 1259-ARNT2 (bez FLAG)
- v diskusi na str. 71, zřejmě při přepisování zůstal odstavec „Podobně 1259-HOXA11..“ (5. odstavec odshora), který měl být vypuštěn, protože nezapadá do kontextu a navíc je znovu uveden na další straně (72) jako první odstavec odshora

2) Odstavec 5.5.2 Počítání buněk a sestavení růstové křivky (str. 44). Je zde uvedeno, že buňky byly počítány každý 3. den a opět znovu vysévány ve stejné denzitě. Uvedený postup je nejasný, obvykle se vysévá na sérii misek (jamek) standardní množství buněk a jejich nárůst je počítán v pravidelných intervalech – aniž by buňky v průběhu pokusu byly znovu vysévány. Grafy uvedené na str 52 a 53 by takovémuto postupu odpovídaly. Může autorka upřesnit použitou metodiku?

3) V grafu č. 14 na str. 53 by bylo vhodné uvádět také kontrolní buňky transfekované GFP nebo prázdným vektorem pSVCF, přesto, že dynamika růstu takovýchto buněk je uvedena v předcházejícím grafu. Jedná se o nový experiment a zásluhou možných změněných kultivačních podmínek může být změněna i dynamika růstu buněk, ne možná zásadně, ale zvýší to věrohodnost i názornost presentovaných výsledků.

4) V prvním odstavci na str. 52 je uvedeno, že „...u buněk 5967 došlo k výraznému zpomalení růstu buněk...což bylo pravděpodobně způsobeno spontánní selekcí pomaleji rostoucích klonů“. Lze si představit spontánní selekci rychleji rostoucích buněčných klonů, které přerostou výchozí populaci. Zde uvedený mechanismus selekce se nezdá pravděpodobný, má autorka nějaké alternativní vysvětlení pro zpomalení růst 5967 buněk?

5) U Obr. č. 15 a Obr. č. 16 (str 54 a 56) jsou výsledky genové exprese u studovaných buněčných linií uvedeny vždy v paralele. Může autorka upřesnit proč tomu tak je?

6) „Toxicita“ FLAG v konstruktech s HOXA11, ARNT2, PROM11, ISL1 je překvapivá. Je možné, že je to specifické jenom pro testovanou linii 1259. Zkoušela autorka vnášet jiné konstrukty s FLAG epitopem do těchto buněk? Uvažuje o eventuálním použití jiných epitopů, pakliže ano, kterých.