

## **Posudek diplomové práce Kateřiny Prokopové „Role onkogenu erbB-2 v biologii rakovinných kmenových buněk“**

Ve své diplomové práci se Kateřina Prokopová na příkladu dvou nádorových linií odvozených od karcinomu prsu zabývá problematikou přípravy a charakterizace v poslední době velmi diskutovaných nádorových kmenových buněk, čili frakce nádorových buněk se stigmatem kmenovosti (buď odvozeným od somatických kmenových buněk či získaným vlivem vnějšího prostředí). Úvod do problematiky nádorové transformace a nádorových kmenových buněk (CSC) je velmi kvalitně zpracován a seznámí čtenáře i s ko-receptorem ErbB-2(HER2), proto-onkogenem často amplifikovaným v nádorech prsu. Analýza vlivu exprese ErbB-2 na vlastnosti (zejména ty související s „kmenovostí“ MCF-7 buněk je také jedním z cílů této diplomové práce. Také Materiál a metody jsou přehledně a srozumitelně zpracovány. Kapitola obsahující vlastní výsledky diplomové práce je sice pojata poněkud netradičně – značná část výsledků je již popsána v textech k obrázkům, ale i tak poskytuje dostatek prostoru k porozumění výsledkům. Stručnost ve výsledkové části je pak kompenzována v části diskuze, kde autorka rekapituluje a interpretuje výsledky a konfrontuje je s publikovanými daty a hypotézami. Dalo by se hraničně říct, že se spíše jedná o souhrnnou kapitolu výsledky a diskuze. Z výsledků diplomové práce proztím vyplývá několik zajímavých pozorování mezi než určitě patří zvýšení exprese některých znaků prsních CSC v buněčných sférách jako např. CD44, ABCG2, EMT markeru vimentinu či transienční zvýšení exprese CD133 či Sox2. Zajímavým je pak zvýšení exprese CD24 (částečný rozpor s některými publikovanými daty) a zejména pak erbB-2 mRNA (pro tento receptor trochu postrádám i ověření zvýšení jeho exprese in na proteinové úrovni např. pomocí průtokové cytometrie). Druhá část diplomové práce pak analyzuje vlastnosti (mRNA expresi některých znaků CSC a tumorigenicitu v nu/nu myších) MCF-7 buněk s pomocí shRNA potlačenou expresí erbB-2. Data z jednoho analyzovaného klonu jedné z testovaných shRNA naznačují, že exprese ABCG2, CD44 či Sox2 by mohla být závislá na změně exprese erbB-2. In vivo pokusy představují zajímavou a neinvazivní metodu analýzy nádorové proliferace v myších modelech, avšak jsou doopravdy jen předběžné a tudíž neinterpretovatelné.

K diplomové práci mám několik spíše upřesňujících dotazů a připomínek:

1. Dalšími publikovanými možnými znaky CSC odvozených z prsních nádorů jsou zvýšená exprese/aktivita enzymu ALDH1 a exprese CD61, čili bylo by možná vhodné do analýzy CSC sfér zahrnout i tyto dva markery.
2. ESA/Epcam je také z jedním z popsáných znaků CSC – v úvodu o něm ale není nic uvedeno.
3. K pokusům s shRNA. Vždy je žádoucí pro komparativní analýzu použít a/ alespoň dvě různé shRNA proti danému genu – např. erbB-2 a b/ při klonální selekci pak analyzovat vlastnosti alespoň dvou či třech klonů a to zejména z důvodů možného off-target efektu (k bodu a/ ) a klonogenní variability (k bodu b/ ).
4. U klonů s shRNA potlačenou expresí erbB-2 by bylo vhodné analyzovat nejen expresní, ale i funkční potlačení exprese tohoto receptoru – např. pomocí analýzy fosforylace kinázy Akt.

Závěrem bych chtěl konstatovat, že předkládaná diplomová práce slečny Kateřiny Prokopové je zajímavá a kvalitní a jednoznačně doporučuji její přijetí k obhajobě.