

Oponentský posudek disertační práce „Mechanismy invazivity a transkripční regulace nádorových buněk“

Autor práce: Mgr. Ondřej Tolde

Autor posudku: Mgr. Tomáš Brdička, Ph.D.

Základem předkládané práce je soubor pěti publikací, z toho tří prvoautorských, zabývajících se zejména různými aspekty molekulární biologie invazivity nádorových buněk. Tento soubor je doplněn podrobným a kvalitně zpracovaným literárním úvodem, který přehledným a přiměřeným způsobem shrnuje dosavadní poznatky z této oblasti. Hlavním přístupem uplatněným v prvních třech publikacích bylo porovnávání buněčných linií s různým invazivním a metastatickým potenciálem a studium molekulárních mechanismů, které jsou za rozdíly v invazivitě zodpovědné. Podařilo se nalézt odlišnosti v expresi protein kináz ROCK-1, LIMK1, PAK1 nebo membránové metaloproteázy MT1-MMP, doprovázené rozdíly v aktivitě G-proteinů z rodiny Rho, dynamice aktinového cytoskeletu, pevnosti fokálních adhezí a dalších parametrech. V menším rozsahu byla též testována přímá korelace mezi aktivitou konkrétních rozdílně exprimovaných molekul a invazivitou používaných nádorových buněk. Výsledky byly uvedeny do souvislosti s převažujícími způsoby migrace a invazivitou jednotlivých linií. Hlavním přínosem čtvrté publikace je zavedení nového modelu pro studium invazivity nádorových buněk v trojrozměrném prostředí využívajícím bezbuněčnou prasečí dermis. Tento model je fyziologicky relevantnější než většina dosud používaných systémů a práce má tak značný praktický dopad. Soubor je dále rozšířen o nepublikovanou prvoautorskou práci na téma regulace exprese cílových genů p53 proteinem SNW1, která s invazivitou nádorů souvisí spíše okrajově. Na druhé straně však spolu s hlavním tématem práce velmi dobře zapadá do širšího tematického okruhu molekulární biologie nádorové transformace a demonstruje univerzalitu a široký metodický záběr uchazeče, a proto se domnívám, že její zařazení do souboru je plně ospravedlnitelné.

Vědeckou kvalitu těchto prací nejlépe dokládá fakt, že většina z nich již byla publikována v kvalitních impaktovaných časopisech a úspěšně tak prošla nezávislým recenzním řízením. Práce též demonstrují zavedení a zvládnutí řady špičkových a náročných metod a připravenost uchazeče pro případnou další samostatnou vědeckou dráhu. Též po formální stránce je práce velmi dobře zpracována s minimem pravopisných či gramatických chyb a velmi přehledně členěna. Práci tedy považuji po všech stránkách za velmi zdařilou.

Má jediná kritika se týká dle mého názoru nevyužitého potenciálu pro důkladnější prozkoumání korelací mezi změnami v expresi jednotlivých proteinů a aktivitou signálních drah, cytoskeletu, fokálních adhezí nebo s tím související invazivitou. Zde by bylo např. velmi informativní ve větším měřítku využívat metod snižování exprese individuálních genů pomocí RNA interference ke stanovení role jednotlivých diferencially exprimovaných molekul. Zbývající nedostatky jsou již spíše formálního charakteru, jako např. poněkud nepřehledná diskuse na téma regulace fosforylace lehkého řetězce myosinu na str. 25. Také by bylo vhodné doplnit popis dynamiky aktinového skeletu v lamelipodiích na

stranách 31-32 nějakým přehledným schematem, protože jde o dosti komplikovaný proces a ze stávajícího popisu nejsou funkce a pohyby aktinového skeletu v lamelipodiu zcela jasné. Ve všech zmíněných případech jde však o relativně drobné nedostatky, které zásadně neovlivňují význam ani kvalitu předložené práce.

Celkově tedy považuji tuto práci za velmi dobře a na odpovídající úrovni zpracovanou a vyhovující požadavkům kladeným na disertační práce a doporučuji ji k přijetí.

Následují dotazy a podněty pro diskusi:

- 1) Základem pro výsledky první publikace byla analýza pomocí proteinové array, která porovnávala expresi vybraných proteinů mezi invazivní a neinvazivní variantou téhož nádoru. Studovaná nádorová linie využívala k invazi zejména améboidní způsob migrace, který je závislý zejména na aktivitě GTPázy Rho. Mezi proteiny s expresí výrazně zvýšenou u invazivní formy byly však i GTPázy Rac/cdc42, které dle literárního úvodu řídí hlavně mezenchymální typ migrace a mohou inhibovat i funkce proteinů Rho. Analyzovali jste případnou funkci Rac/cdc42 v migraci sledovaných linií nebo máte nějakou, třeba i spekulativní hypotézu o funkci těchto proteinů v daném procesu?
- 2) Zajímavé bylo také pozorování zvýšené fosforylace Ser370 fosfatasy PTEN. Tato fosforylace by mohla snižovat stabilitu proteinu PTEN. Pozorovali jste změny v celkovém množství PTEN ve sledovaných buňkách? Je možné, že regulace PTEN se nějakým způsobem podílí na změně invazivity použitých linií?
- 3) Byly podniknuty jakékoli pokusy o přímé testování korelace mezi vlastnostmi jednotlivých buněčných linií analyzovaných v prvních třech publikacích a expresí konkrétních proteinů (ROCK, LIMK, PAK1, Rho, MT1-MMP) např. s využitím RNA interference či transfekce a uměle zvýšené exprese v příslušných invazivních a neinvazivních liniích? S tím souvisí i otázka, zda existuje šance na využití inhibitorů takových proteinů jako je ROCK, LIMK nebo MT1-MMP v klinické praxi? Lze očekávat nějaké zásadní vedlejší účinky?
- 4) V úvodu práce autor zmiňuje tzv. "inside-out" integrinovou signalizaci. Ta je dobře popsána zejména u leukocytů, kde se kromě jiného uplatňuje při zachycování na stěně cévní před následnou extravazací a migrací např. do místa probíhajícího zánětu. Je něco známo o mechanismech "inside-out" signalizace u epitelálních buněk či fibroblastů nebo nádorů od nich odvozených? Může se uplatňovat i při extravazaci nádorů neleukocytárního původu?
- 5) Poslední práce se zabývá regulací genové exprese proteinem SNW1. Tento protein může regulovat i expresi genů důležitých pro invazivitu nádorů. Byl tento protein zařazen do proteinové array použité v první publikaci? Lze na základě výsledků tohoto experimentu spekulovat o jeho možné účasti na mechanismech způsobujících rozdílnou expresi proteinů v použitých nádorových liniích?