

---

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DISERTAČNÍ PRÁCI MGR. MILOSLAVY MANINOVÉ

**SIGNALING MECHANISM IN NUCLEAR REORIENTATION AND ITS FUNCTIONAL SIGNIFICANCE IN CELL MIGRATION**

Předložená disertační práce Mgr. Miloslavy Maninové zabývající se mechanismy buněčné lokomoce byla vypracována na základě experimentálních výsledků získaných v průběhu jejího doktorandského studia v Laboratoři buněčné signalizace Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky v rámci studijního programu molekulární a buněčné biologie, genetiky a virologie Univerzity Karlovy v Praze pod vedením Ing. Tomáše Vomastka, PhD.

Lokomoce buněk je jednou za základních vlastností života. Schopnost pohybu jednobuněčných eukaryont si zachovaly i buňky mnohobuněčných organismů, kde pohyb buněk je složkou vývojových procesů, regenerace tkání, výkonu funkcí imunitního systému a za patologických situací je například spojený s rozsevem nádorových buněk. Detailní pochopení molekulárních mechanismů pohybu buněk je tedy jednou ze základních biologických otázek s aplikačním přesahem do medicíny.

Dizertační práce Miloslavy Maninové řeší dílčí, ale zásadně důležitý aspekt spojený s pohybem buněk, a to je pohyb buněčného jádra, který je koordinován s pohybem celé buňky. Práce se snaží najít odpověď na jednu z dosud nezodpovězených otázek, jak je řízen rotační pohyb jádra během polarizace buněk, s využitím buněčné kultury potkaních fibroblastů RAT2. Práce se zabývá jak otázkami mechanismu rotace jádra při změně směru pohybu buněk, tak signálními drahami tuto rotaci regulujícími.

Práce si kladla za cíl zodpovězení těchto specifických otázek: a) objasnit signální dráhy podílející se na reorientaci jádra během buněčné polarizace, b) odhalit komponentu buněčného cytoskeletu odpovědnou za generování síly reorientující jádro a konečně c) funkční význam jaderné reorientace při buněčné migraci a úlohu perinukleárních aktinových vláken v těchto procesech.

Práce je psána klasickým stylem zkrácené verze v anglickém jazyce v obvyklém členění na úvod obsahující literární přehled, cíle práce, shrnutí výsledků, seznam použitých metod a publikací a je zakončena diskuzí výsledků, jejich shrnutím a seznamem literatury. K textu je přiřazen dodatek obsahující kopie tří publikací a dvou rukopisů v recenzním řízení, které obsahují převážnou část výsledků disertační práce. Rukopisy byly v mezičase od odevzdání dizertační práce rovněž přijaty (práce je tedy založena na pěti publikacích). Nelze opomenout zdůraznit, že práce je napsána velmi srozumitelně dobrou angličtinou s mimořádně pečlivým grafickým zpracováním, bez formálních nedostatků a minimem překlepů.

Literární přehled je velmi podrobným a logicky členěným uvedením do problematiky buněčné migrace a odpovědných regulačních procesů, obsahuje současný stav poznání této oblasti nejen v

míře nezbytné pro pochopení aktuálnosti vytyčených otázek, ale i pro vhléd do procesů přímo nestudovaných, nicméně souvisejících s problematikou buněčné migrace. Text je čtivý a velmi poučný, doprovazený impresivním množstvím více než 250 literárních odkazů. Autorka tím prokázala rozsáhlý přehled v dané problematice.

Seznam použitých metodik dokumentuje, že autorka zvládla široké spektrum molekulárně- a buněčně-biologických metod včetně časově velmi náročné kvantitativní analýzy obrazu.

Výsledková část a přiložené publikace bez pochyb dokumentují, že cíle dizertační práce byly naplněny. Výsledky experimentů byly publikovány v kvalitních recenzovaných časopisech (FEBS J., IF 4,2; BBA-MCR, IF 5,1; J. Mol. Biol., IF 4,5; Cell Adh. Migr., IF 3,3 a Histochem. Cell Biol., IF 2,8) a prošly tedy nezávislým recenzním řízením. Mgr. M. Maninová je první autorkou na třech publikacích. V práci bylo dosaženo celé řady zcela nových výsledků, za nejvýznamnější z nich považují objasnění úlohy aktivace GTPázy Rho lysofosfatidylovou kyselinou a integrinové signalizace FAK/Src v regulaci reorientace jádra a dále nález, že pro reorientaci jádra je nutné fyzické spojení mezi jádrem a cytoskeletem prostřednictvím komplexu LINC a vytvoření struktury perinukleárního aktinu, jejíž přítomnost či absence má vliv na typ (modus) migrace buněk.

V kapitole "Discussion", kde jsou získané výsledky interpretovány vzhledem k současným poznatkům, je zajímavá část diskutující experimentální nálezy vzhledem k fyziologickým podmínkám trojrozměrného prostoru tkání.

V celé práci neshledávám žádné podstatné formální nedostatky, naopak text je vypracován velmi pečlivě a k textu mám jen minimum drobných připomínek:

- V literárním úvodu na straně 15 by byl vhodný odkaz na schéma definující jednotlivé typy uspořádání aktinových vláken (tj. Fig. 2.3).

- Na straně 16 by bylo informativní uvést schéma k regulaci GTPáz.

- U Fig. 4.10. E a 4.11. chybí údaj o typu jednotek na ose "y".

Otázky:

1) Úvod poskytuje velmi dobrý přehled informací nutných k pochopení buněčné migrace. Fokální adheze představují místa fyzického kontaktu integrinů s proteiny extracelulární matrice. Mojí otázkou, na jejíž odpověď jsem v úvodu nikde nenašel, je, jaká je povaha těchto interakcí a jak je tato fyzikálně-chemická interakce regulována? Související otázkou je, zda se dá pohyb buněk v klasické buněčné kultuře zpětně "vystopovat" podle nějakých značek, které zanechaly na substrátu?

2) Používaný termín "reorientace jádra" předpokládá, že i jádro má svou polaritu a že synchronizace polarit jádra s polaritou buňky má funkční význam (viz oddíl 7.3.3). Tuto představu podporuje "reorientační checkpoint" uvedený v kapitole 4.3. "Nuclear reorientation facilitates the establishment of cellular polarity", který naznačuje aktivní příspěvek jaderné orientace k buněčné repolarizaci (a rovněž předchází práci z jiných laboratoří demonstrující pohyb celého jádra včetně obsahu, viz

strana 30). Jak lze polaritu jádra experimentálně určit a jaký molekulární mechanismus by stál v pozadí "rozpoznání" jaderné polarity nutné pro fyzikální natočení jádra s ohledem na směr migrace, a tedy který by potvrdil existenci "reorientačního checkpointu"? Je reorientovaná poloha jádra nutná pro zahájení migrace? Může být jádro orientováno během migrace i jinak než v podélném, tj. příčném postavení ke směru migrace? Pokud tomu tak je, jak je např. popsáno u nádorových buněk U2OS (oddíl 4.11, strana 59), jde o výlučně anomální stav typický pro nádorové buňky způsobený absencí perinukleárního aktinu? I přes vše výše uvedené mojí otázkou je, zda není možné výsledky interpretovat tak, že "reorientace jádra" ("posunutí" os elipsoidu ke směru migrace) je způsobena pasivní elastickou deformací jádra (a tedy nikoliv jeho otočením) v důsledku působení vnějších sil (např. tlakových sil generovaných perinukleárním aktinem a s ním asociovaných složek cytoskeletu)? Lze tuto představu zcela vyloučit?

3) K experimentu uvedenému na Fig. 4.10 (strana 52) - je náhlá změna směru pohybu buňky směrem k "ráně" spojena v disrupcí perinukleárního aktinu? Byla pozorována disrupce perinukleárního aktinu ve všech buňkách nezávisle na pozici jádra vůči ráně? Nebo zde byla závislost na poloze jádra?

4) Autorka v literárním přehledu uvádí (strana 34), že jaderná lamina prostřednictvím komplexu LINC hraje úlohu v pohybech jádra. Senescentní buňky (tj. buňky se setrvalou zástavou buněčného cyklu) jsou nově považovány za prekursory nádorových buněk. Jednou z charakteristik senescentních buněk je výrazné snížení hladiny laminu B1. Je možné, že snížená hladina laminu B1 ovlivňuje organizaci perinukleárního aktinu a tím i polaritu a migraci senescentních buněk? Je snížená hladina laminu B1 charakteristická i pro některé typy nádorových buněk?

Závěrem shrnuji, že dosažené výsledky dizertační práce Mgr. Miloslavy Maninové jsou významným příspěvkem k našemu porozumění molekulární podstaty procesů reorientace jádra během ustanovení buněčné polarity a migrace. Bylo mi potěšením tuto práci posuzovat pro její vynikající kvalitu jak po stránce experimentální, tak interpretační a formální.

Předložená práce nepochybně prokazuje způsobilost Mgr. Miloslavy Maninové k vědecké práci a odpovídá požadavkům kladeným na doktorandskou disertační práci. Proto doporučuji, aby práce byla přijata jako základ pro řízení o udělení vědecké hodnosti *Philosophiae doctor*.

V Praze 25. srpna 2016

MUDr. Zdeněk Hodný, CSc.

Oddělení integrity genomu

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.