

OPONENTSKÝ POSUDEK DIZERTAČNÍ PRÁCE MGR. ADAMA FRTÚSE

MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ FAKULTA, Univerzita Karlova

Doktorský studijní program: P4f-4 Biofyzika, chemická a makromolekulární fyzika

Název dizertační práce: Mechanotransduction of Hepatic Cancer Cells cultured in a 3D collagen scaffold

Autor dizertační práce. Mgr. Adam Frtús

Oponent: Mgr. Elena Filová, Ph.D., Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Dizertační práce Mgr. Adama Frtúse s názvem „Mechanotransduction of Hepatic Cancer Cells cultured in a 3D collagen scaffold“ řeší problematiku vlivu tuhosti substrátu/scaffoldu na chování nádorových buněk jater, expresi proteinů podílejících se na mechanotransdukci, studium molekulárních mechanismů mechanotransdukce, metabolismus, funkci a dynamiku mitochondrií a autofagii. Tematika je zajímavá a aktuální z důvodu stoupající incidence nádorů jater, potřeby studia vlastností nádorových buněk a tkání a hledání nových účinných terapeutických postupů. Další možné využití výsledků práce je v 3D kultivace modelech a jaterních organoidech pro hodnocení léčiv.

Autor práce si vytyčil 9 konkrétních cílů, které řešil následujícími metodami:

1. *Příprava a charakterizace kolagenní matrice:* viskoelastické vlastnosti reologickým měřením, morfologii pomocí fluorescenčního barvení a mikroskopickou analýzou
2. *Vytvořit geneticky validovanou kulturu HepG2 a Alexander buněk ve 3D kolagenní matrici-* genetickou validaci provedla externí firma, kultura obou typů buněk byla vytvořena
3. *Odhalit rozdíly chování HepG2 a Alexander buněk na 2D a v měkké kolagenní matrici –* uvedeno v bodě 4
4. *Podrobně analyzovat chování HepG2 a Alexander buněk - velikost, adhezi, dynamiku proliferace, organizaci cytoskeletálních proteinů vlivem kolagenní matrice:* velikost buněk a jader, růstové křivky, stanovení PCNA imunoblotem, Ki-67 labelling index, reorganizace cytoskeletu pomocí konfokální mikroskopie, kvantifikace délky filament F-aktinu a β -tubulinu, morfologie a buněčná distribuce vinkulinu, analýza fokálních adhezí, kvantifikace exprese β -aktinu, β -tubulinu a YAP proteinu (Yes-associated protein) imunoblotem- u obou typů nádorových linií
5. *Odhalit biochemickou signalizaci mechanotransdukce a klíčové molekuly zapojené v buněčné odpovědi na měkkou 3D-extracelulární matrix, jako jsou YAP a mTOR:* buněčná lokalizace YAP proteinu - konfokální mikroskopie, imunodetekce fosforylovaného pmTOR a jeho subcelulární lokalizace, detekce autofagosomů, imunodetekce markeru autofagie LC3 - konfokální mikroskopie, si-RNA transfekce buněk pro downregulaci YAP proteinu,

6. *Zkoumat mitochondriální dynamiku pomocí chemických látek a měřením potenciálu mitochondriální membrány: morfologie mitochondrií, kvantifikací reaktivních kyslíkových radikálů a měřením membránového potenciálu mitochondrií: hodnocení dynamiky morfologie mitochondrií, hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu po podání depolarizujících látek (ionomycin, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazon a kyanid draselný), stanovení exprese Cytochom C oxidase subunit 1, (MTCO1) imunoblotem a pomocí RT-PCR.*
7. *Zhodnotit, jakým způsobem fyzikální podněty 3D matrice ovlivňují metabolismus, včetně glykolýzy, energetického metabolismu a autofágie: stanovení pyruvátu a laktátu, vizualizace F-aktinu- konfokální mikroskopie.*
8. *Zhodnotit účinek fotobiomodulačního působení světla červeného laseru na buňky v 3D matrici a mechanistické podklady pro buněčnou odpověď v 3D kultuře – ozáření high-fluence low-power (HFLP) laserem při 649 nm, analýza viability buněk – barvení calceinem, ethidium bromidem a konfokální mikroskopie, stanovení BCL- 2 Western blotem.*

Dizertační práce má 101 stran, je psaná v anglickém jazyce, obsahuje všechny podstatné části: abstrakt, úvod v rozsahu 16 stran, cíle, experimentální metody, experimentální výsledky (obsahují 32 obrázků, 2 tabulky), diskuzi, závěry, bibliografii, seznam obrázků, tabulek, seznam publikací autora a 2 publikace v plném znění. Nechybí ani seznam zkratk.

Výsledky jsou přehledně zpracované v grafech, obrázcích, závěry jsou správně a srozumitelně presentovány. Bibliografie obsahuje 217 citací, 51 z nich ne starších jako 5 let, některé reference byly neúplně citovány (73, 113, 116, 124, 134, 141).

Publikační aktivita: Mgr. Adam Frtús je autorem 9 publikací vydaných v kvalitních odborných časopisech s impakt faktorem, z toho u 4 publikací je prvním autorem. 2 tematicky nejbližší publikace jsou v příloze a jsou to rovněž prvoautorské publikace Mgr. Adama Frtúse.

Dizertační práce přinesla nové poznatky o chování nádorových buněk vlivem mechanických vlastností kultivační podložky/matrice na buněčné, subcelulární i molekulární úrovni. Důležitý je i mezioborový přístup k hledání molekulárních mechanismů mechanostrndukce použitím metod biochemických, fyzikálních a genetické manipulace.

Dizertační práce prokazuje předpoklady autora k samostatné vědecké práci, proto doporučuji dizertační práci Mgr. Adama Frtúse k obhajobě.

Otázky na doplnění:

1. Tuhost kolagenového scaffoldu se zdá být velmi nízká, dost vzdálená fyziologickým i patologickým podmínkám. Cíleně jste ji určili pro experimenty? Jsou známé z literatury hodnoty tuhosti pro různé nádory? Nemůže přílišná měkkost substrátu nepříznivě ovlivňovat chování buněk?

2. Tuhost podkladu ovlivňuje organizaci cytoskeletu buňky. Projeví se to na tuhosti samotné buňky? Dá se tuhost buňky změřit/matematicky vypočítat a korelovat s tuhostí podkladu?
3. V metodice se uvádí, že byly analyzovány vzorky od pacientů. Co v nich bylo hodnoceno a jaké jsou výsledky?

Mgr. Elena Filová, Ph.D.

V Praze 2.2.2024

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha