

**Posudek diplomové práce Petera Holíčka
„ Activation and regulation of cell death in senescent cancer cells “**

Peter Holíček se ve své poměrně rozsáhlé diplomové práci soustředil na analýzu vlivu středně a dlouhodobé inducibilní exprese dvou kanonických inhibitorů cyklin dependentních kináz (CDKi) – proteinů p16 a p21 jednak na vlastní buňku a některé její procesy, jednak na indukci apoptózy vybranými apoptogeny. Oba CDKis byly individuálně pomocí doxycylinem indukovatelné exprese produkovány v klonálně selektovaných buňkách H28 odvozených od nádoru mesothelia exprimujícím wt p53 protein. Klonální selekce byla vzhledem k heterogeneitě exprese obou CDKis zcela esenciální. Exprese p16 či p21 navodila v H28 klonech (semi)zástavu buněčného cyklu a posléze i kvazisenescentní stav (buňky po odebrání doxycylinu, t.j. snížení/potlačení exprese CDKis začaly opět proliferovat). Buňky exprimující p16 a p21 se od sebe jak morfologicky, tak buněčně biologicky značně odlišovaly. Exprese p21 způsobila v H28 buňkách dlouhodobou stabilní zástavu růstu, presentaci znaků buněčné senescence (výrazné zvětšení objemu buněk, aktivace se senescencí asociovanou b-galaktosidázou - SA-bGal, gH2Ax histonové foci v cca 1/3 buněk) a i změny v energo-metabolickém systému (výrazný nárůst mitochondriální masy, produkce ROS a i OXPHOS/glykolýzy). Naproti tomu p16 exprimující buňky třebaže vykazovaly některé znaky buněčné senescence (např. zvýšenou aktivitu SA-bGal), tak nepřestaly proliferovat a rovněž jejich změny v energo-metabolickém systému byly výrazně nižší.

Kupodivu se ale tyto rozdíly mezi p21 a p16 exprimujícími buňkami výrazněji neodrazilo v jejich reakci na vybrané apoptogeny. Jak p21, tak i p16 exprimující kvazisenescentní buňky byly výrazně rezistentnější vůči apoptóze indukované jak ligandem TRAIL (v kombinaci s homoharringtoninem) tak i látkou mitoVES - mitokanem indukujícím zvýšenou produkci mitochondriálních ROS. Tato zvýšená rezistence těchto kvazisenescentních buněk může být zapříčiněna zvýšenou expresí anti-apoptotických Bcl-2 proteinů a některých anti-oxidačních enzymů v kvazisenescentních p16 či p21 exprimujících H28 buňkách.

V průběhu řešení své diplomové práce se Peter seznámil s a zvládl řadu buněčně biologických a biochemických metod – kultivaci a selekci H28 buněk, průtokovou cytometrii, fluorescenční mikroskopii, imunocytochemii, analýzu buněčného cyklu, měření mitochondriální respirace a glykolýzy pomocí Seahorse analyzátoru, Western blotting a mnohé další. Vedle experimentální práce si také průběžně rozšiřoval své teoretické vědomosti a znalosti. Ke svým experimentům Peter přistupoval velmi zodpovědně a byl pečlivý jak v jejich realizaci, tak i v jejich interpretaci.

V souhrnu hodnotím přístup Petera Holíčka jak k řešení své diplomové práce, tak i k zpracování a interpretaci výsledků a jejich zapracování do předkládané a obhajované diplomové práce vysoce pozitivně a doporučuji jeho práci k úspěšné obhajobě a k co nejvyššímu následnému ohodnocení.



Vestec, 29.8.2018

RNDr. Ladislav Anděra, CSc.