



OPONENTSKÝ POSUDEK K DISERTAČNÍ PRÁCI

Autor práce: Mgr. Zuzana Nahácka, Univerzita Karlova Praha
Přírodovědecká fakulta

Téma práce: Kanonické a nekanonické signální dráhy aktivované
receptory pro ligand TRAIL v lidských buňkách
(Canonical and non-canonical signaling triggered by
activated TRAIL receptors in human cells)

Školitel: RNDr. Ladislav Anděra, Ph.D.

Předkládaná práce představuje soubor experimentálních přístupů *in vitro* studia kanonických a nekanonických signálních drah aktivovaných receptory pro ligand TRAIL u lidských buněčných linií nádorového (kolorektální karcinom, adenokarcinom pankreatu) i nenádorového průvodu (embryonální a indukované pluripotentní buňky). Hlavní část práce předkladatelky (deklarovaná dle jejího podílu na vlastní experimentální části práce) byla zaměřena na mechanistické porovnání účinků předkladatelkou nově připravených rekombinanterních agonistů receptoru TRAIL (DR4 a DR5) v porovnání s jeho přirozenou (divokou) formou na aktivaci vnější dráhy buněčné smrti – apoptózy a/či programované nekrózy (nekroptózy). V další kolaterální části práce předkladatelka zdokumentovala TRAIL-aktivovanou apoptickou dráhu a proces apoptózy u normálních lidských kmenových buněk a následně prokázala, že je tato dráha negativně regulována proteinem cFLIP. Poslední část práce je věnována sensitizujícím účinkům antibiotika Manumycinu A na TRAIL-indukovanou apoptózu u vybraných linií resistentního kolorektálního karcinomu, kde je na základě zjištěných dat předložena hypotéza mechanizmu této sensitizace, tj. zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku mitochondriemi. Tyto výsledky jsou shrnutы v celkem dvou publikacích uveřejněných v zahraničních impaktovaných časopisech, kde je předkladatelka 1x na prvním místě a 1x mezi spoluautory.

Hlavní téžitstě a největší význam recenzované práce spočívá v jejím mechanistickém záběru, a to zejména v detailních analýzách jednotlivých molekul (komponent) konkrétních proapoptických/nekroptotických drah či drah s těmito smrticími procesy souvisejících. Autorka práce přesvědčivě zvládla velkou šíři metodik a vědeckých postupů využívajících moderních i tradičních molekulárně biologických a chemických nástrojů a výpočetních analýz. V tomto ohledu nemá recenzent k prezentovaným metodikám a dosaženým výsledkům zásadní připomínky, i když je poněkud škoda, že některé všeobecné analýzy (např. ty, které se týkaly celkové úrovně navození apoptózy/nekroptózy) nebyly více komplementární, tj. nezahrnovaly např. morfologická pozorování. Ta jsou totiž v dnešní "molekulární" době stále zlatým standardem při celkové determinaci chování buněčných populací, a to zejména heterogenních populací nádorových buněk. Další připomínka se týká rozsahu použitých biologických modelů (dvou nádorových linií PANC-1 a HT-29 v případě havního záměru práce), jejichž počet a molekulární subtyp představují významnější omezení při obecnější interpretaci získaných

výsledků, i když tento aspekt nebyl jistě hlavním cílem prezentované práce. Lze též diskutovat o tom, nakolik lze výsledky získané ze stabilizovaných linií maligních buněk přenést do *in vivo* podmínek při vědomí toho, jak významně jsou lidské malignity heterogenní, a to nejenom svoji vlastní skladbou, ale také interakcemi a dalšími molekulárními pochody.

Dalším jistě pozitivním aspektem práce je její přesah do biologie kmenových buněk, kdy získané výsledky jistě přispějí k lepšímu porozumění regulace buněčné smrti u těchto specifických buněčných populací, a to i v souvislosti s široce studovanou otázkou existence fenotypické plasticity či kmenovosti některých buněk u solidních nádorů.

To, že jednotlivé signální dráhy (včetně smrtících) lze pozitivně i negativně ovlivnit je známo již velmi dlouhou dobu a důkazů o plasticitě signalizace buněk metazoí je ve vědecké literatuře velmi mnoho. Proto asi nepřekvapi, že použití antibiotika Manumycinu ovlivnilo TRAILem navozenou apoptózu i u obecně rezistentních nádorových buněk. Tady kromě vlivu na mitochondrie ve smyslu oxidativního stresu by připadaly v úvahu i další mechanizmy publikované na jiných modelech, které mohla autorka více ve svých komentářích a příslušné diskuzi rozvést.

Formální stránka práce je standardní a odpovídá svým rozsahem i členěním na jednotlivé části (sekce) daným požadavkům. Na druhé straně je však nutno předkladatelce vytknout některé až zbytečné nestandardnosti v textu práce, které v konečném důsledku její kvalitu snížují. Jedná se zejména o grafickou podobu vybrané grafické dokumentace, které byla upravována dle odkazů, ale ne vždy stejně kvalitně. Nejvýrazněji se to však odráží v uváděných grafech, které jsou jak barevně tak svým fontem zbytečně různorodé. Také vlastní jazyková stránka práce i přes standardně dobrou úroveň anglického jazyka vykazuje místa základní gramatické a v některých případech i typografické chyby. Zde by si práce byla zasloužila stylistickou korekci nejlépe rodilým mluvčím.

Z dalších formálních výtek bych uvedl:

- Nesourodý seznam zkratek – ne všechny jsou konzistentně zařazeny
- Nepřítomnost denzitometrické analýzy blotů
- Jistá nekonzistence při uvádění výsledků – některé představují dvojí či trojí opakování pokusů bez vysvětlení přičiny
- Nedeklarované využití statistických nástrojů a vyznačení statistické významnosti u všech prezentovaných grafů

Kromě těchto komentářů mám k práci následující dotazy:

1. Autorka opakovaně uvádí odlišnou sensitivitu či rezistenci k TRAILu u kolorektálního karcinomu (adenokarcinomu pankreatu). Jedná se o fenomén, který je nezávislý na stádiu vývoje nádoru či se mění s nádorovou progresí? Všechny použité linie představují jisté stádium nádorové progrese a tak se lze dotazovat, zda se jedná o univerzální či tranzientní fenomén.
2. Lze se domnívat, že molekula c-FLIP bude stejně významnou pro ovlivnění TRAILEM-navozené smrti i u nádorových kmenových buněk příslušných typů solidních nádorů?
3. Mechanismus senzitzace TRAILEM navozené apoptózy prostřednictvím Manumycinu může být dle autorky spojen s tvorbou mitochondriálních ROS. Manumycin je dle publikovaných prací však samostatně schopen navodit smrt i jinými mechanizmy. Mohly by se uplatnit i v případě autorčina studijního modelu?

Závěrem lze konstatovat, že prezentovaná disertační práce splňuje požadavky kladené na disertační práci v oboru Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie. Uchazečka prokázala samostatné tvůrčí schopnosti i ochotu a schopnost spolupracovat v rámci širšího vědeckého kolektivu, což je patrné nejenom z práce samotné, ale i z jeho publikační aktivity. Uvedenou práci doporučují k obhajobě a zároveň doporučují uchazečku Mgr. Zuzanu Naháckou k dalšímu řízení k získání titulu Ph.D.

v Hradci Králové 4.4. 2019

prof. PharmDr. Emil Rudolf, Ph.D.