



UNIVERZITA KARLOVA

1. lékařská fakulta

Ústav BIOCEV

Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Česká republika

Posudek magisterské práce Bc. Kláry Kořínkové

Magisterská práce Kláry Kořínkové **Role of PIM oncogenes in the biology and chemoresistance of aggressive lymphomas** je zaměřena na potvrzení efektu a studium mechanismu účinku jednoho z inhibitorů PIM kináz na buněčných liniích odvozených od difuzního velkobuněčného lymfomu (DLBCL) a lymfomu z pláštěvých buněk (MCL).

Práce je vypracována v anglickém jazyce s adekvátním literárním úvodem, přiměřeně bohatou experimentální částí a dostatečnou diskuzí. Anglický jazyk práce je na vysoké úrovni, typografické chyby jsou přítomny v zanedbatelném množství. Fyzická „štihlost“ tištěné verze práce je způsobena oboustranným tiskem a úsporným řádkováním, po obsahové stránce je práce naprosto dostačující.

Práce usiluje o zhodnocení potenciálu experimentálního pan-inhibitoru PIM kináz AZD1208 pro terapii difuzního velkobuněčného lymfomu (DLBCL) a lymfomu z pláštěvých buněk (MCL). Potvrzuje negativní efekt AZD1208 na viabilitu několika odvozených buněčných linií, zkoumá korelaci jeho toxicity s buněčnými hladinami všech tří PIM kináz a vztahy s expresí či modifikací proteinů, které by se měly na aktivitě PIM kináz podílet nebo jsou jejich předpokládanými cíli. Dále se práce zabývá možným synergickým efektem AZD1208 s dalšími protinádorovými látkami, jmenovitě s venetoclaxem a ibrutinibem. Závěrem se práce zaměřuje na studium úlohy variantní krátké formy PIM2 (formou overexprese v buněčné línii).

Jak vyplývá z předchozího odstavce, představená práce je metodicky bohatá, a zahrnuje *in vitro* práci s nádorovými buňkami, průtokovou cytometrii ke určení míry apoptózy, stanovení exprese bílkovin v buněčných lysátech wetern blotem, až po veškeré práce spojené se zmíněnou over-expresí jedné z variant PIM2, od přípravy konstruktů přes transfekci, selekci až po ověření exprese.

Rozsah experimentální práce je značný a výsledky představují položení základů pro detailní evaluaci potenciálu AZD1208 pro léčbu některých typů lymfomů a pro detailní popis mechanismů účinku těchto inhibitorů a také popis vlastní funkce PIM kináz a proteinů.

Hodnocení jednotlivých částí práce:

Literární úvod: Zcela dostatečný, věcně zacílený na aspekty bezprostředně související s prací. Reference jsou adekvátní a svědčí o značném přehledu autorky v této oblasti. Měl bych však drobnou výhradu, kterou lze shrnout známým rčením, že jeden obrázek vydá 1000 slov. Zde mám na mysli především kapitolu 2.6, která se zabývá funkcí PIM kináz a jejich zapojení do signálních drah a interakci s dalšími bílkoviny. Zde by nějaká schematická obrazová dokumentace zásadně pomohla čtenáři v orientaci. Na závěr úvodu bylo možné přidat i krátký odstavec shrnující informaci o AZD1208 (historie, struktura, vlastnosti, odlišnosti od jiných inhibitorů a proč byl vybrán právě tento inhibitor).

Materiál a metody: Zcela adekvátní s dostačujícími detaily. Velmi oceňuji uvádění katalogových čísel protilátek, které je bohužel často opomíjeno, a to bohužel i v renomovaných časopisech. Popis přípravy SDS gelu považuji za zbytečně detailní, v takové podobě se v odborných publikacích neuvádí.

Výsledky: Výsledky práce jsou kromě textu dokumentovány dostatečným obrazovým materiálem, po grafické i formální stránce velmi dobře zpracovaným. Nelze neocenit množství práce skryté například za vysokým počtem imunoblotů. Grafické zpracování a statistické zhodnocení viability buněk a apoptózy je v pořádku. Výsledková část by pravděpodobně obstála i při recenzním řízení v kvalitním časopise.

Diskuze jasně demonstruje schopnost autorky integrovat získaná data a dívat se na ně v kontextu dříve publikovaných poznatků. Vysoce oceňuji schopnost autorky zamyslet se nad těmi výsledky, které byly (spíše) neočekávané nebo v přímém rozporu s jinými pracemi, a generovat relevantní hypotézy.

Otázky pro kandidátku

Z textu práce nevyplývá zcela jasně smysl některých metodických detailů:

- Proč byly pro westernbloty použity gely se stacking gelem? Bylo to nezbytné? Jaká byla obvyklá koncentrace získaných buněčných lysátů?
- Jaký byl smysl sonikace supernatantů při přípravě proteinových vzorků (4.4.1)?
- Viabilitu buněk jste měřili pomocí techniky založené na konverzi WST-8 mitochondriálním dehydrogenázami. Je viabilita (měřená jako aktivita mitochondrií) buněk nejlepším indikátorem buněčné proliferace?
- Figura 4) - Expres PIM kináz se mezi jednotlivými buněčnými liniemi odvozenými od lymfomů stejného typu lišily, často i mnohonásobně (u PIM2 a jednotlivých linií ABC-DLBCL nejméně 10x). Je při takovém rozptylu hodnot a nestejném počtu testovaných buněčných linií vhodné generalizovat a tvrdit, že exprese PIM2 je u ABC-DLBL buněk zvýšena v porovnání s GCB-DLBCL (str. 52 a zopakováno v diskuzi)?
- V metodické části uvádíte, že hodnoty získané denzitometrickou analýzou (western blotů) byly normalizovány na beta actin (ACTB?). Ve figuře 4 je však uveden alpha actin (ACTA?). Můžete to uvést na pravou míru?
- Na základě čeho předpokládáte stejnou expresi aktinu v různých buněčných liniích? Stačí pro takový předpoklad to, že jsou odvozeny ze stejného typu nádou? Testovali jste nějak expresi aktinu v jednotlivých liniích?

Shrnutí:

Předkládanou práci bych po formální i obsahové stránce označil jako výbornou. Práce možná zdánlivě vygenerovala více otázek, než jasných odpovědí, to je však realita základního výzkumu. Některé části předkládané práce budou, alespoň dle mého soudu, v brzké době podkladem pro velmi dobrou publikaci v kvalitním odborném časopise. Blahopřeji kandidátce i školiteli.