

## Oponentský posudek doktorské dizertační práce Mgr. Terezie Imrichové

### Buněčná odpověď na protinádorové terapie založené na genotoxickém stresu

Předložená dizertace zpracovává velice aktuální a důležité téma možných reakcí rakovinných buněk na další genotoxický stres, který je aplikován jako protinádorová terapie, ale současně může stimulovat procesy, které buňku činí resistantnější vůči smrti a vedou k jejímu nekontrolovanému růstu. Práce se navíc zabývá i dalšími aspekty senescence, včetně analýzy jednoho z mechanismů pronádorového vlivu senescentních buněk a hledání nových markerů senescentních buněk. Největší důraz je pak kladen na analýzu interakcí PML proteinu s jadérkem, tedy zatím málo známým ale potenciálně fundamentálním jevům spojeným se senescencí vyvolanou genotoxickým a jiným stresem. Jedná se tak o práci vědecky i společensky důležitou nejen s ohledem na základní výzkum, ale i pro vývoj nových léčebných postupů, které by zvyšovaly šance na kompletní eliminaci rakovinných buněk z těla.

Práce je založená na 4 původních publikacích a jednom manuskriptu připraveného k publikaci, přičemž Mgr. Terezie Imrichová je prvním autorkou dvou prací. Již publikované práce jsou uveřejněny ve velmi kvalitních časopisech s vysokým IF. Práce je předkládána v angličtině, jejíž úroveň je vysoká, což ukazuje na výborné předpoklady pro další publikační aktivitu v mezinárodních časopisech. Práce dle mého názoru vyhovuje i formálním požadavkům kladeným na dizertační práci.

Rozsáhlý literární úvod seznamuje čtenáře přehledným způsobem se současnými genotoxickými přístupy léčby rakoviny a dosavadními znalostmi významu a projevům senescence buněk v tumorech, včetně popisu úlohy jadérka a PML proteinu v buněčném stárnutí. Úvod je pro lepší pochopení řady pochodů doplněn přehlednými schématy a tabulkami. Úvod se četl dobře a osvěžil a rozšířil mé dosavadní znalosti. Následuje definice hlavního cíle práce, který je rozdělen do 4 více specifických bodů. Mezi ně byla zařazena charakterizace specifické subpopulace buněk rezistentních k iradiaci a anoikis, analýza efektu in vitro připravených senescentních buněk na růst tumoru v modelovém organizmu, hledání nového specifického markeru senescentních buněk a popis interakcí mezi PML proteinem a jadérkem za podmínek genotoxického stresu.

Při řešení cílů byla využita řada in vitro modelů rakovinných buněk, v kombinaci s modely zvířecími, a celé spektrum molekulárně biologických metodik. Příprava modelů in vitro navozené senescence je obvykle časově náročná, v tomto případě považuji design experimentů (zejména experimentu vedoucího k získání anoikis rezistentních buněk) za vyžadující nadprůměrnou trpělivost a pečlivost. Je tedy nutné získané výsledky ocenit, protože věřím, že řada experimentátorů by byla podobným designem rovnou odrazena. Práce věnované PML proteinu zase zahrnují velké množství náročných mikroskopických analýz, které, jak dokáží posoudit z vlastní zkušenosti, znamenají trávit nekonečné hodiny v temné a hlučné místnosti s okem neustále ve střehu s cílem zachytit nepříliš běžné struktury.

Cíle byly splněny na základě výsledků uváděných v původních publikacích a jednom manuskriptu, které jsou komentovány (nicméně nepříliš diskutovány) v kapitole IV a stručně shrnuty v kapitole V. Výsledky publikovaných studií dokládají, že a) běžné, v klinice používané dávky radiace mohou vyvolat tvorbu specifické anoikis rezistentní populace rakovinných buněk, která může být podkladem metastazujících buněk; b) senescentní buňky (vzniklé v reakci na chemoterapii) jsou schopny podporovat růst tumorů in vivo částečně skrze sekreci cytokinů; c) mezi nové markery senescentních buněk může být zařazen protein L1CAM, d) PML protein dynamicky interaguje s DNA lezemi na rDNA a tato interakce je regulována kasein kinázou 2. Předložené výsledky nejenže rozvíjejí dosavadní úroveň poznání v dané problematice, ale jsou též důležitým základem pro nové strategie vedoucí k novým léčebným postupům při léčbě rakoviny, zejména pak rakoviny prostaty.

Autorka jasně deklaruje podíl své práce zahrnující převážně analýzu vybraných buněčných populací pomocí průtokové cytometrie a proliferačních esejí, ve dvou studiích, kde je první autorkou, prováděla většinu experimentální práce a následnou analýzu. V těchto studiích byly využity metody příprava rekombinantních plazmidů, nepřímá imunofluorescence, FISH a speciální mikroskopické techniky včetně následné analýzy

obrazu, i techniky k analýze exprese na úrovni mRNA a proteinů. Množství a komplexnost metod zvládnutých autorkou tak považuji za nadprůměrné.

K disertační práci nemám zásadních připomínek, i když nadbytečné rozdělení textu do bodů v některých kapitolách (4.3.3., 5.2.1.1, 5.2.2.) dle mého názoru nepřispívá k přehlednosti ale spíše naopak. Též jsem postrádala shrnující diskuzi výsledků.

K práci mám několik dotazů:

1. V 1. práci se autorka zabývá populací buněk, které ztrácí kontakt s podložkou, a přesto nepodléhají buněčné smrti a naopak jsou schopny obnovit dělení. Tato populace je jistě nesmírně důležitá pro pochopení vzniku metastáz. Nicméně populace buněk, které jsou k ozařování rezistentní a vykazují jasné markery senescence, je co do rozsahu větší a pokud je po ukončení iradiace schopna opět obnovit proliferaci, též představuje značné riziko pro opětovný růst primárního nádoru. Zajímá mě komentář, jakým způsobem mohou tyto senescentní buňky obnovit dělení.
2. V úvodu je zmiňována senescence vyvolaná SASP. SASP je přitom velmi podobný profilu vyvolanému metabolickým stresem. Existují cytokiny nebo jejich poměry, které by poměrně jednoznačně odlišily sekretom senescentních buněk a buněk metabolicky stresovaných, nebo lze mezi oba sekretomy víceméně položit rovnítko?
3. V úvodu je uvedeno, že aktivace AMPK vede k inhibici transkripce ribozomální DNA. AMPK je též aktivována metforminem, hlavním současným lékem pro léčbu T2DM, který začíná být využíván i v protinádorové léčbě. Mohlo by se tedy hypotetizovat, že jedním z mechanismů, kterým metformin ovlivňuje rakovinné bujení popř. zlepšení insulinové sensitivity, je i jeho potenciální vliv na jadéřkový metabolismus?

Závěr:

Předložená práce řeší aktuální a významnou problematiku. Přinesla řadu originálních výsledků, které mohou být v budoucnu pravděpodobně využity i na poli léčby rakoviny u lidí. Mgr. Imrichová jasně prokázala, že se orientuje v problematice a že zvládla náročné molekulárně biologické a buněčné techniky, které byly nutné ke splnění cílů práce.

**Práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci. Její úroveň je výborná, a proto ji doporučuji k obhajobě a navrhuji udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.**

Lenka Rossmeislová, PhD.

V Praze 20.11.2019

Ústav patofyziologie

3. LF UK v Praze