



POSUDEK NA DIZERTAČNÍ PRÁCI Dmitry Stakheeva, M.D.

Wnt/beta-catenin and mTOR signaling in regulation of T-cell phenotype and cytotoxic activity for adoptive cellular immunotherapy of cancer.

Předložená dizertační práce je zaměřena na velice aktuální téma protinádorových imunoterapií v kontextu obecných signalizačních drah. Originálním tématem školící laboratoře je studium a modulace aktivity a fenotypu imunocytů izolovaných přímo z nádorů, předložená dizertační práce v této oblasti přináší originální pozorování, publikovaná v kvalitních biomedicínálních časopisech. Oblast výzkumu buněk imunitního systému, které v kontextu struktury nádoru realizují imunitní odpověď, včetně té adaptivní, je jednou z možností, jak využít přirozeného „biologického“ know-how konkrétního pacienta pro efektivní a vysoce personalizovanou léčbu. Mimořádnou možností je zde i možnost expanse antigeně specifických klonů cytotoxických T-lymfocytů in vitro, včetně jejich ovlivnění např. modulátory obecných signalizačních drah, což provedeno systémově v pacientovi hrozí širokou škálou interakcí a vedlejších účinků.

Předložená práce je solidním příkladem snahy pochopit mechanismy fungování tak složitého fenoménu, jakým je interakce imunitního systému s nádorem – i když v práci ve zjednodušeném modelu využívajícím nádorové buněčné linie. Je svým způsobem překvapivé, jak zásadní otázky v tomto zde zůstávají nezodpovězeny.

Předložená dizertační práce sepsaná dobrou angličtinou bez formálních nedostatků je založena na 2 publikacích, jedné věnované Wnt/beta-kateninové signalizaci již publikované v Scientific Reports (Dmitry Stakheev, M.D. je zde prvním autorem) a druhé ve formě manuskriptu (téma mTOR signalizace – sdílené první autorství). Kromě těchto prací, které tvoří kostru dizertační práce je Dmitry Stakheev spoluautorem ještě tří dalších publikací věnující se tématu v širším slova smyslu vzniklé na školitelském pracovišti (jednoznačně součástí a výsledkem vědecké přípravy během doktorského studia), dalších tří publikací věnovaných imunomodulační/nádorové problematice (spolupráce s L. Vannucci) a dále i čtyř prací věnovaných signalizaci v srdečním svalu. Kvantitativní i kvalitativní požadavky kladené na studenty doktorského studia programu Imunologie jsou zde tedy splněny/překročeny. Je zřejmé, že předložená práce je originálním autorským dílem. *U příslušných publikací jsem nenalezl jasně formulovaný autorský podíl, který by bylo vhodné během obhajoby zmínit – s důrazem na autorem ovládnuté metodické přístupy*

Na závěr bych měl jen několik dotazů, někdy obecnější povahy (vesměs tematizující prvouatorskou již publikovanou práci):

1. *V práci píšete: “In the last decade, it was shown that only a small subpopulation of cancer cells is responsible for tumor-initiating capability, metastasis, and tumor recurrence. This subpopulation received a name of cancer stem cells (CSCs)“. Má toto konstatování obecnou platnost pro všechny typy nádorových kontextů?*

2. *V práci využíváte LNCaP a PC3 nádorové buněčné linie. Mohl byste je blíže charakterizovat? Jaké by mohly vykazovat rozdíly oproti buňkám izolovaným přímo z nádoru, popř. buňkám v in situ nádorovém prostředí?*
3. *Proč jste zvolili 5μM koncentraci inhibitoru XAV939 pro většinu funkčních testů? Jaké vedlejší účinky byste očekávali při aplikaci tohoto inhibitoru (a obdobné koncentrace) nikoliv in vitro (ex vivo), do těla pacienta?*
4. *Jak si představujete na buněčné a molekulární úrovni vysvětlení toho, že „modulace Wnt/β-kateninové signální dráhy zvyšuje citlivost nádorových buněk k buňkám imunitním a propůjčuje lymfocytům BRPCa pacientů schopnost eliminovat nádorové buňky“? Co je v těchto buňkách po působení 5μM XAV939 funkčně změněno?*
5. *Zajímala by mne identita CD4-CD8- buněk např. v obrázku 2 publikace v SciRep, mohly by tyto buňky vykazovat cytotoxicitu (popř. endocytovat fluorescenčně značený buněčný materiál pocházející z nádorových buněk), obecně tedy přispívat pozorovaným jevům?*
6. *Pro experimenty s kokultivací jste použili populaci lentivirově transformované selektované adherentní nádorové linie s 90% pozitivitou pro fluorescenci TagFP635. Takové experimentální uspořádání přímo vybízí k použití videomikroskopie pro pochopení dynamiky celého systému, mechanismů cytotoxicity, popř. vizualizaci možných změn v imunocytech po ovlivnění XAV939. Bylo něco takového použito?*
7. *V celé řadě kvantifikací využíváte MFI jako ten údaj, kterým hodnotíte množství adherentních nádorových buněk v různých experimentálních uspořádáních. Kontrolovali jste též supernatant (tedy možné viabilní buňky, které mohly z různých důvodů ztratit schopnost adheze?“*

Na závěr bych chtěl konstatovat, že předložená dizertační práce **Dmitry Stakheeva** prokazuje nejen autorovu vědeckou erudici, ale i schopnost srozumitelným způsobem formulovat vědecká fakta a hypotézy. Dizertační práce „Wnt/beta-catenin and mTOR signaling in regulation of T-cell phenotype and cytotoxic activity for adoptive cellular immunotherapy of cancer.“ splňuje požadavky kladené na Univerzitě Karlově, 2. lékařské fakultě na kvalifikační práce doktorského studia programu Imunologie a doporučuji ji k obhajobě.

v *Jakubinné* 25.8.2020

prof. RNDr. Jan Černý, Ph.D.