

OPONENTSKÝ POSUDEK
disertační práce MUDr. Kamila Rudolfa
s názvem

„Mechanismy indukce buněčné smrti v modelu lidského maligního melanomu *in vitro*“

Předkládaná disertační práce se zabývá studiem mechanismů buněčné smrti indukované inhibitory topoisomeras, kamptotecinem a etoposidem, u vybraných modelových linií melanomu. Autor pro své experimenty použil celkem 4 buněčné linie s vesměs nemutovanými alelami genu *tp53*, jedna linie exprimovala mutovaný gen *tp53*. Použití kamptotecinu a etoposidu pro indukci a studium mechanismů buněčné smrti u nádorových buněk je sice už značně probádané téma, nicméně přístup zaměřený na komplexní studium různých signálních drah, které se účastní regulace tohoto procesu u maligního melanomu *in vitro*, představuje autorův originální vklad pro posunutí našeho poznání v dané oblasti. Práce se opírá o velmi široké spektrum základních i pokročilých biochemických a molekulárně biologických metod, které byly velmi dobře zvládnuty a jejich použití umožnilo pochopit i řadu detailních aspektů studovaného procesu. Předkládaná práce představuje širokou záběru spíše úkol pro kolektiv a nikoli pro jednoho člověka. Práce takto zaměřené mají velký význam nejen z hlediska obecně poznávacího, ale jsou zejména cenné svým eventuálním přínosem pro využití v klinické praxi.

Po formální stránce je práce rozdělena v souladu se závaznými doporučeními. Práce je psaná česky na dobré jazykové úrovni, bohužel autor zbytečně často používá anglické výrazy i tam, kde je lze nahradit českými. Rozsah práce je přiměřený.

Cíle práce jsou formulovány jasně. Je jich však neobvykle mnoho a jsou velmi náročné.

Teoretická část práce je zpracovaná přehledně a svědčí o tom, že se autor ve studované problematice velmi dobře orientuje. MUDr. Rudolf se zde hodně zaměřil na popis různých forem zhoubných nádorů kůže z medicínského hlediska. Kapitola zaměřená na biologii melanomu je zpracována velmi dobře. Je škoda, že autor v teoretické části neshrnl známé mechanismy buněčné smrti indukované kamptotecinem (a jeho deriváty) a etoposidem, kterých je v literatuře dostatek, i když v souvislosti s jinými nádorovými buňkami.

Metodická část práce je velmi obsáhlá, což odpovídá velkému počtu použitých metod. Zpracování této kapitoly je však při podrobnějším rozboru nedostatečné a patří k slabší části předložené disertace. Jednoduché metody jsou popisovány vesměs úplně, například: kap. 4.5., kap. 4.15. a kap. 4.16. Naproti tomu, popis méně obvyklých nebo náročnějších metod je neúplný, například: kap. 4.6. (není zřejmé zda anti-BrdU je přímo konjugovaný s enzymem nebo zda se jedná o klasický systém se sekundární protilátkou); kap. 4.7. (chybí patrně detergent pro permeabilizaci?); kap. 4.8. (chybí složení alk. a neutral. pufru a dále způsob hodnocení testu); kap. 4.10. (není zřejmé, jak se vlastně měření provádí); kap. 4.11. (není zřejmé, jak se postupuje a co se vlastně měří); kap. 4.12. (jedná se skutečně o měření aktivity p38 a JNK kinasy nebo o stanovení podílu jejich fosforylované formy?); kap. 4.19.2. (chybí údaje o použitých koncentracích substrátů a zejména inhibitorů). Autor sice zvládl velmi dobře velké množství metod, avšak díky neúplnosti nebo nesrozumitelnosti jejich popisu předložená práce může být stěží spolehlivým zdrojem informací pro eventuálního pokračovatele. V některých případech nedostatek údajů neumožňuje ani posoudit správnost postupu.

Kapitola „Výsledky“ je zpracována srozumitelně s dostatečnou grafickou dokumentací. Předkládaná práce obsahuje velké množství výsledků, které se snaží postihnout různé aspekty studované problematiky. Autor studoval velmi podrobně zapojení několika signálních drah procesu indukce buněčné smrti po působení inhibitorů topoisomeras, což mu umožnilo identifikovat geny, jejichž produkty sehrávají klíčovou úlohu při tomto procesu (p53, p73, kaspasa-2, někteří členové rodiny Bcl-2 proteinů, Chk1 kinasa, ATM kinasa, atd). Práce se rovněž zabývala aspekty fungování mitochondrií po působení etoposidu, kde byla učiněna řada pozoruhodných zjištění. Mezi nejcennější výsledky zřejmě patří objasnění mechanismů buněčné smrti po kombinovaném působení kamptotecinu a etoposidu u buněk Bowes (s nemutovaným genem *tp53*) a buněk SK-Mel-28 (s mutovaným genem *tp53*). Naopak mi zde chybí použití obecné metody pro detekci mrtvých buněk bez ohledu na formu

buněčné smrti. Rovněž by bylo vhodné, kdyby autor proliferaci buněk prezentoval ve formě normalizovaných hodnot tak, aby bylo možné provádět vzájemné srovnání.

Kapitola „Diskuse“ je zpracována velmi dobře. MUDr. Rudolf zde diskutuje dosažené výsledky do hloubky v různých souvislostech, a to nejen vzhledem ke svým výsledkům, ale také v širším kontextu. Diskuse je vedena náročným způsobem v několika rovinách, což nebývá u mladých autorů samozřejmé. V diskusi mi chybí komentování vztahu mezi citlivostí buněk a jejich proliferací. Dále jsem zde nenašel, co autor soudí o úloze kaspasy-8 v procesu indukce apoptózy oběma inhibitory topoisomeras obecně, a jaký je význam její aktivace v případě linie SK-Mel-28, jež exprimuje mutovaný p53. Autor zřejmě ani teoreticky nepřipouští jinou formu buněčné smrti než apoptózu, aniž by to jakkoli komentoval.

Formulace závěrů je jasná a výstižná. Pouze u závěru č.4 autor opomenul komentovat úlohu kaspasy-8 v procesu apoptózy u buněčné linie SK-Mel-28. Ze závěrů vyplývá, že se autorovi podařilo splnit náročné cíle.

Publikační činnost autora je výborná, neboť se mu podařilo zveřejnit své výsledky v mezinárodních vědeckých časopisech s velmi dobrým „impakt“ faktorem. MUDr. Rudolf je spoluautorem tří prací, které volně souvisí se studovanou tématikou, a dále prvním autorem dvou publikací, které se přímo zabývají zvoleným tématem.

Dále bych rád položil autorovi následující dotazy:

1. Proč autor nevyjádřil množství použitých inhibitorů topoisomeras v molárních jednotkách?
2. Může autor opravdu provést srovnání exprese dvou různých proteinů na základě analýzy prostého westernova přenosu tak, jak je to uděláno pro případ topoisomerasy I a II α na straně 34?
3. Může autor uvést detaily postupu, jak měřil aktivitu jednotlivých kaspas v buněčných extraktech s ohledem na použité koncentrace substrátů a inhibitorů?
4. Citlivost buněk vůči cytotoxickým účinkům inhibitorů topoisomeras mimo jiné závisí i na jejich proliferaci zvláště pak na relativním počtu buněk v S-fázi buněčného cyklu. Má autor k dispozici relevantní data, aby mohl srovnat citlivost studovaných buněčných linií vzhledem k těmto parametrům? Proč se autor tomuto aspektu nevěnoval, když používal průtokovou cytometrii pro detekci apoptotických buněk?
5. Při posuzování vlivu různých specifických inhibitorů na buněčnou smrt autor vzal do úvahy pouze apoptózu. Z literatury je ale například známo, že inhibitory kaspas mají schopnost potlačit jen morfologické a biochemické znaky apoptózy, buňka nicméně umírá alternativními formami buněčné smrti obvykle nekrotickou. Jak autor vyloučil tuto možnost v případě experimentu prezentovaného na Obr. 5-9F?
6. Na Obr. 5-11A je prezentováno poškození DNA stanovené pomocí tzv. „Comet assay“ v intervalu 2-24h po působení kamptotecinu v kombinaci s etoposidem. Jakým způsobem autor odlišil zlomy DNA indukované inhibitory topoisomeras od zlomů, které vznikly v důsledku apoptózy (viz. Obr. 5-10D).

Závěrem bych chtěl konstatovat, že předložená disertační práce MUDr. Kamila Rudolfa, i přes výše uvedené nedostatky, představuje široký soubor zajímavých a kvalitních experimentálních výsledků, které jsou v mnoha aspektech zcela nové. Autor zde rovněž jednoznačně prokazuje, že má dobré předpoklady pro samostatnou vědeckou práci. Na základě uvedených faktů doporučuji disertační práci k obhajobě.