



INSTITUTE OF BIOPHYSICS  
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, v.v.i.  
KRALOVOPOLSKA 135, BRNO 612 65, CZECH REPUBLIC  
RNDr. Alena Hyršlová Vaculová, Ph.D.; Phone: +420 541 517 169, E-mail: vaculova@ibp.cz

## **Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Kataríny Kľučkové**

**s názvem:**

### **„Mitochondria as a target for anticancer therapy by vitamin E analogues“**

Předkládaná disertační práce Mgr. Kataríny Kľučkové se zabývá velmi aktuální problematikou studia protinádorových účinků analogů vitamínu E,  $\alpha$ -tokoferyl sukcinátu ( $\alpha$ -TOS) a zejména jeho mitochondriálně cíleného derivátu MitoVES. Práce přináší řadu nových poznatků o molekulárním mechanismu působení MitoVES, včetně identifikace jeho cíle v nádorových buňkách (mitochondriální CII) a způsobu specifické interakce s ním, objasnění funkční souvislosti mezi účinností inhibice CII, produkce ROS (včetně mechanismu) a indukce apoptózy. Pozornost je rovněž věnována objasnění přenosu apoptotického signálu indukovaného MitoVES s ohledem na mechanismus a funkční důležitost aktivace proteinu Bak, významu změn mitochondriálního membránového potenciálu, permeabilizace mitochondriální membrány a následného vylití proapoptotických mediátorů. Získané originální poznatky jsou unikátním vědeckým příspěvkem v daném oboru, s velkým potenciálem jejich využití v léčbě nádorového onemocnění.

Disertační práce je psaná v angličtině, čtivou a srozumitelnou formou, na vysoké jazykové úrovni. První část tvoří teoretický úvod, který velmi dobře vystihuje podstatu disertační práce a poskytuje komplexní pohled na studovanou problematiku. Podává přehlednou charakteristiku mitochondrií a vybraných relevantních dějů a molekul na úrovni těchto organel a shrnuje poznatky o jejich úloze ve vývoji a léčbě nádorového onemocnění. Důležitá pozornost je také věnována „mitokanům“, zejména analogům vitamínu E, jejichž účinky jsou předmětem studia v této práci. Zmíněný text je přehledně zpracovaný, logicky členěný, vhodně prokládaný citacemi včetně řady recentních prací vztahujících se k danému tématu. Celkově text práce čerpá ze 150 literárních odkazů. Cíle práce jsou jasně formulované, aktuální, pečlivě naplánované a beze zbytku splněné.

V části Diskuse autorka jasně a srozumitelně popsala získaná data v kontextu s recentními literárními poznatky v daném oboru a nakonec stručně a výstižně formulovala závěry. Diskuse je velmi zdařilá, na vysoké odborné úrovni, kdy autorka prokázala schopnost logicky členit, správně

interpretovat a kriticky hodnotit výsledky, vystihnout a vysvětlit podstatu a důležitost nových poznatků.

Autorka ve své práci využívá i zavádí řadu buněčných modelů a metod buněčné a molekulární biologie a biochemie a moderních technologií, které jsou precizně a podrobně popsány v příložených publikacích. Použité metody odpovídají současnému „state-of-the-art“ v daném oboru, jsou vhodně zvolené a jejich důkladné osvojení a správná aplikace umožnila získat autorce adekvátní odpovědi na otázky vytyčené v této práci. Důležitou úlohu jistě hraje i velmi kvalitní odborné vedení školitelem. Použité experimentální přístupy a následně kvalita dosažených výsledků také ukazují na vyspělost týmu, ve kterém doktorandka pracovala. Prof. Jiří Neužil a jeho výzkumný tým jako první prokázali selektivní protinádorové účinky analogů vitamínu E, včetně nově syntetizovaných, a jejich práce vedla k objasnění řady důležitých molekulárních mechanismů jejich působení.

Publikační činnost autorky související s tématem disertace je reprezentována 8 odbornými články, které se nacházejí v přílohách, z nich 7 bylo publikováno v časopisech s IF. Jako příklad uvádím časopisy *Antioxidants and Redox Signaling* (IF 7,67), *Cell Death and Disease* (5,17; prvoautorská publikace), *Free Radical Biology and Medicine* (IF 5,71) nebo *Journal of Biological Chemistry* (IF 4,6). Katarína Klučková je rovněž první autorkou odborného review v časopise *Biochimica et Biophysica Acta* (IF 4,83). Kromě výše uvedených je Katarína Klučková též spoluautorkou dalších dvou prací v impaktovaných (IF 7,6; 16,7) časopisech, které se přímo nevztahují k tématu disertace. Celkově se jedná o velmi úspěšnou publikační aktivitu, která svědčí o vědecké vyspělosti autorky a její schopnosti efektivně pracovat jak samostatně, tak v týmu.

K práci si dovoluji položit následující otázky:

- Vaše práce demonstruje funkční úlohu kinázy Mst1 v apoptóze indukované MitoVES u buněk MCF7 a následně důležitost Mst1-FoxO1-Noxa pro formaci kanálů tvořených proteinem Bak v membráně mitochondrií. Jaký je detailní molekulární mechanismus zodpovědný za aktivaci kinázy Mst1 indukované MitoVES v tomto modelu?
- Ve Vaší práci poukazujete na důležitost upregulovaného proteinu Noxa pro stimulaci aktivace proapoptického proteinu Bak u nádorových buněk vystavených působení MitoVES. Hraje podle Vás protein Noxa exkluzivní úlohu, nebo je možné, že i některé další „BH3 only“ proteiny částečně přispívají k aktivaci mitochondriální apoptotické dráhy indukované MitoVES?

- Je zajímavé, že buňky H1299 rezistentní k apoptotickému působení  $\alpha$ -TOS (H1299<sup>res</sup>) jsou více citlivé k apoptóze indukované MitoVES než původní linie reagující na treatment s  $\alpha$ -TOS (H1299<sup>par</sup>). Vaše výsledky zároveň poukazují na rozdíly v  $\Delta\psi$  mezi buňkami H1299<sup>res</sup> a H1299<sup>par</sup>, což může být významným faktorem ovlivňujícím výše uvedené rozdíly v odpovědi. Jaký by podle Vás mohl být konkrétní molekulární mechanismus zodpovědný za tyto efekty?
- Vaše výsledky popisují schopnost MitoVES ovlivňovat biogenezi mitochondrií a jejich morfologii. Je možné, že tato látka rovněž ovlivňuje procesy jako „mitochondrial fission“ and „fusion“ a jaký by to mohlo mít funkční dopad na buňku?
- Ve své práci zmiňujete možný přímý efekt MitoVES na cytochrom c, když pozorujete indukci buněčné smrti u modelu B9 buněk deficientních pro CII. Co je dosud známo o interakci MitoVES a cytochromu c a jaké to může mít funkční důsledky?
- $\alpha$ -TOS je známý pro své proapoptotické působení, nebo jako účinný sensitizátor k účinkům některých jiných induktorů apoptózy. V teoretickém úvodu práce také zmiňujete úlohu  $\alpha$ -TOS jako látky, která může snižovat citlivost nádorových buněk k cytotoxickému působení některých chemoterapeutických látek na bázi platiny (cisplatina). Jak si toto rozdílné chování  $\alpha$ -TOS vysvětlujete? Setkala jste se s možným podobným protektivním působením  $\alpha$ -TOS i v kombinaci s jinými induktory apoptózy?

Celkově lze shrnout, že autorka prokázala velmi dobré tvůrčí schopnosti a předpoklady k samostatné vědecké práci, plánování experimentů, aplikace řady moderních metod buněčné a molekulární biologie a biochemie a interpretace získaných výsledků. Výsledkem je velmi zdařilá práce, která nadstandardně splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru a kterou jednoznačně doporučuji k obhajobě. V případě jejího úspěšného obhájení rovněž doporučuji udělení titulu Ph.D. Kataríně Křučkové přeji hodně úspěchů v další vědecké kariéře.

RNDr. Alena Hyršlová Vaculová, Ph.D.

V Brně dne 30.5.2015