

Oponentský posudek

Dizertační práce: **Mgr. Tomáš Groh**

na téma: **Mechanismus působení protinádorových léčiv v neuroblastomech**

Předkládaná práce si klade za cíl charakterizaci molekulárního účinku vybraných protinádorových léčiv v neuroblastomových nádorech. Důraz je také kladen na využití těchto znalostí pro dosažení vyšší efektivity protinádorové terapie neuroblastomů. Jednu skupinu studovaných látek tvoří konvenční chemoterapeutika, jejichž účinek je částečně založen na poškození DNA nádorových buněk a následné buněčné smrti. Mezi látky zahrnuté do této studie patří cisplatina, etoposid a ellipticin, jejichž nevýhodou zůstává zvýšená toxicita vůči zdravým tkáním a častý vznik rezistence. Podpoření jejich účinku kombinací s jinými protinádorovými léčivy může výrazně snížit jejich toxicitu a současně zvýšit jejich efektivitu při zabíjení nádorových buněk. Jako podpůrné látky byly použity inhibitory histonových deacetylas (HDAC proteinů), konkrétně valproát a trichostatin A.

Předkládaná práce má klasické členění zahrnující stručné shrnutí studie, které je následováno teoretickým úvodem. Teoretický úvod poskytuje čtenáři základní informace důležité k pochopení celé studie a je podložen dostatečným množstvím citací. V úvodu jsem postrádal pouze informace osvětlující základní mechanismy autofagie, které by ulehčily pochopení přílohy č. 5 týkající se role autofagie a lysosomů při vzniku rezistence vůči ellipticinu. Také chybí charakteristika látek použitých jako inhibitory autofagie a V-ATPasy. Po úvodu následuje přehled použitých metod a reagensů. Rozsah použitých metod je adekvátní a dostačující pro studované téma. Zde bych měl jen pár drobných otázek týkajících se jednotlivých metodických postupů:

1. Jaká konkrétní matematická metoda byla použita pro výpočet hodnoty IC₅₀ pomocí MTT testu?
2. Jaký je obecný mechanismus detekce laktátu pomocí kitu Lactate Gen.2?

Následuje kapitola výsledky a diskuze podpořená seznamem publikací. Konkrétně se jedná o tři publikace přijaté do časopisů s impaktním faktorem. Na dvou z těchto publikací figuruje Mgr. Groh jako první autor, na jedné potom jako spoluautor. Součástí výsledků je také spoluautorský článek, který bude brzy odeslán do některého z časopisů a nepublikované výsledky týkající se exprese proteinu CD133. V neposlední řadě je součástí výsledků



přehledný článek shrnující problematiku buněčných kultur. Tento počet publikací je zajisté dobrým předpokladem k úspěšnému obhájení dizertační práce.

Celkově se jedná o zajímavé téma dizertační práce a samotná práce obsahuje několik důležitých výsledků s potencionálním využitím v klinice. Já osobně považuji za nejzajímavější podporu účinku etoposidu inhibitory HDAC v závislosti na časové posloupnosti podání. Velmi zajímavé je také zjištění úlohy lysosomů během účinku protinádorového léčiva ellipticinu. Taktéž objasnění vztahu mezi aktivitou N-MYC proteinu a expresí CD133 proteinu může do budoucna přispět k detailnějšímu pochopení mechanismu vzniku rezistencí u neuroblastomů. Z těchto důvodů plně doporučuji předkládanou práci k úspěšnému obhájení. Na závěr bych si dovolil několik otázek na Mgr. Groha.

Příloha 3.

1. Kontrolní buňky UKF-NB-3 nemají na obrázku z “western blotu” žádnou viditelnou hladinu N-MYC proteinu, přestože mají mít amplifikovaný N-MYC gen. Jaká může být příčina?
2. Jakým mechanismem může docházet ke zvýšené acetylaci histonů H3 a H4 během hypoxie, když aktivita HAT ani HDAC není zásadně ovlivněna?
3. Na závěr článku zmiňujete, že acetylace histonů umožní vazbu N-MYC proteinu na DNA a transkripci genů nutných pro proliferaci, více buněk se ale během hypoxie nachází v G1 fázi. Co může být příčinou tohoto jevu? Je známa korelace mezi pozicemi vazebných míst pro N-MYC v genomu a acetylací histonů (např. na úrovni celogenomových dat)?

Příloha 4.

1. Jakým mechanismem mohou HDAC inhibitory aktivovat kaspázu 3 v nádorové buňce?

Příloha 5.

1. Jaký je molekulární mechanismus aktivace LC3 proteinu během iniciace autofagie? Proč během podání inhibitorů autofagie dochází ke kumulaci procesované formy LC3 proteinu?

V Praze dne 9.6.2015

Mgr. Karel Vališ, Ph.D.