

## **Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Adély Kábelové “Úloha autofágie a vybraných izotypů $\beta$ -tubulinu v rezistenci k taxanům u nádorových linií prsu” v rámci magisterského studia na Přírodovědecké fakultě UK**

Diplomová práce Bc. Adély Kábelové se zabývá molekulárními mechanismy, které způsobují rezistenci buněk rakoviny prsu k taxanům. Práce se zaměřuje na úlohu autofágie a specifických izoform  $\beta$ -tubulinu v rezistenci k paclitaxelu a k novým taxanovým derivátům. Téma je to aktuální a zajímavé, neboť vznik rezistence je zásadním problémem onkologické léčby. Role autofágie v karcinogenezi je ne zcela jasná neboť může být prospěšná, kdy s může podílet na smrti nádorových buněk jako jedna z forem ne-apoptotické smrti, ale na druhé straně může autofágie naopak podporovat rezistenci neboť pomáhá odstraňovat poškozené a nefunkční organely v buňce.

### **Formální kvalita předložené práce**

Práce je po formální stránce velmi dobře zpracována a nemám ke zpracování žádné závažné připomínky.

### **Jazyk**

Práce je psána v češtině a překlepů a chyb je v práci minimum. V práci se objevilo několik neobvyklých výrazů typu „ledovaná zkumavka“, „izolační houbičky“ v metodě western blot nebo antagonistická místo antagonistická. Objevují se zde i nějaké anglickizmy typu „progres“ či „sekvestrace“. Zcela určitě ovšem uvedené chyby nesnižují vědeckou a formální kvalitu práce a práce je napsána srozumitelně a čtivě.

### **Hodnocení jednotlivých částí diplomové práce**

#### *1) Literární úvod*

V první části diplomové práce jsou velmi zdařile shrnuty poznatky o molekulárních mechanismech apoptózy, autofágie a působení taxanů. Dle mého názoru je rozsah literárního úvodu zcela adekvátní a vyvážený a přečetl jsem si ho s chutí a zájmem.

#### *2) Cíle práce*

Cíle práce jsou shrnuty v abstraktu a dále podrobněji na straně 12, ale vlastní kapitola cíle práce zde definována není, což považuji za ne zcela obvyklé. Cíl práce je jasně definován jako objasnění role autofágie a beta tubulinových izotypů v rezistenci k nádorových buněk k taxanům.

#### *3) Metody*

Metody zahrnují stanovení hladin proteinů pomocí western blotu, konfokální mikroskopie, průtokové cytometrie, dále pak stanovení buněčné viability, transientní transfekce a v neposlední řadě aplikaci modulátorů autofágie. Autorka zde ukazuje, že použila relativně širokou škálu metodických přístupů, které se vzájemně doplňují.

#### *4) Výsledky*

Vlastní výsledky mají 52 stran, což je samo o sobě úctyhodné a svědčí o velkém úsilí autorky. Vlastní kvalita prezentovaný výsledků je velmi dobrá a svědčí o dobrém zvládnutí metod a velmi dobrém zpracování. Obrázky jsou prezentovány velmi pěkně a přehledně a data jsou přesvědčivá. Musím také pozitivně zhodnotit snahu ověřit daná pozorování a výsledky na více liniích a na dalších modelech, kdy byly také používány modulátory autofágie pro potvrzení výsledků nalezených na PAC/REZ buňkách. Bohužel výsledky nasvědčují tomu, že efekt autofágie je spíše limitovaný, závislý na buněčném typu a v rezistentních liniích příliš velkou roli nehraje. Podobně pokusy s beta II a beta III tubulinem jsou zajímavé, a vzhledem k pozorovanému efektu ektopické exprese beta III izoformy nadějně, ale měly by být potvrzeny na stabilních liniích, jak autorka ostatně sama v práci píše.

### 5) *Diskuse*

V diskusi autorka předkládá svou představu o úloze autofágie v rezistenci zkoumaných nádorových buněk prsu a dochází k závěru, že až na výjimky (vliv rapamycinu na rezistenci SKBR3/PAC/REZ buněk) autofágie není s rezistencí k taxanům spojena. Naopak je možné, že exprese jiných forem tubulinu (tubulin II a tubulin III)) by k rezistenci přispívat mohla, i když toto tvrzení bude třeba dále ověřit.

#### **Další připomínky a otázky:**

- 1) Číslování obrázků. Obrázky jsou číslovány poněkud nezvykle stejně jako kapitoly, tj. třemi čísly místo jednoho, proč byl zvolen zrovna tento systém?
- 2) V několika nemnoha případech (obr 4.1.1.) v prezentovaném grafu chybí odchylky, což sice nemění informační hodnotu, protože vliv taxanů je jasně patrný, ale měly by být uvedeny.
- 3) V grafu dokumentujícím G2/M blok po aplikaci taxanu u T47D buněk (obr.4,.1.2) si dovoluji nesouhlasit s tvrzením, že tento blok je vidět až po 72h, neboť je vidět jasně i po 24h. Nemůže to ukazovat na to, že buňky T47D rostou výrazně pomaleji a proto je efekt oddálen?
- 4) Autorka popisuje fakt, že po aplikaci taxanů u buněk T47D vzniká populace polyploidních buněk, které pravděpodobně proliferují, což dokumentuje na přiloženém histogramu 4.1.2. Z čeho autorka usuzuje, že proliferují? Nemůže jít jen o shluky buněk?
- 5) Na straně 60 se uvádí, že na přípravu lyzátů pro stanovení autofágie bylo použito 5 milionů buněk na petriho misku (jaké velikosti?). Jelikož se buňky inkubují řádově po 36-120 hodin, nemůže pak docházet k tomu, že buňky budou konfluentní, což může ovlivnit autofagickou signalizaci?
- 6) Vliv paclitaxelu a syntetického taxanu SB-T-12854 na autofagické proteiny byla v mnoha případech opačná. Má proto autorka nějaké vysvětlení?

#### **Celkové hodnocení diplomové práce**

Práci hodnotím jako zdařilou a doporučuji ji k obhajobě, autorka prokázala, že se orientuje ve vědecké literatuře, je schopna o dané problematice přemýšlet, provést velmi pěkně vlastní experimenty a na jejich základě vyvodit závěry. Přeji autorce úspěšnou obhajobu a mnoho dalších úspěchů.