

V Praze dne 2. 9. 2018

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Michala Jelínka „Molekulární mechanismy indukce apoptózy taxany u buněk nádoru prsu“

Disertační práce Mgr. Jelínka je zaměřena na analýzy mechanismů apoptózy indukované taxany, včetně některých nových derivátů, na buněčných modelech pro lidské nádory prsu. Cíle práce byly dva, (i) přispět k objasnění molekulárních mechanismů indukce apoptózy taxany u nádoru prsu a (ii) přispět k objasnění molekulárních mechanismů zodpovědných za rezistenci nádorových buněk k taxanům. I když to nebylo deklarováno, cílem bylo také charakterizovat účinky nových derivátů taxanů, které by mohly mít terapeutický potenciál. Metodickým přístupem byly *in vitro* experimenty, ve kterých byly sledovány vlivy paklitaxelu jako modelového taxanu a dalších nově syntetizovaných derivátů na lidské buněčné linie odvozené z nádorů prsu. Práce přinesla nové poznatky a potvrdila některá známá fakta o taxany indukované apoptóze i navození rezistence k taxanům. Získaná data jsou klinicky relevantní a mohou mít význam pro další optimalizaci chemoterapie taxany a vývoj nových účinnějších derivátů.

Základem disertační práce jsou čtyři publikace, u všech je Mgr. Jelínek prvním autorem. Data postupně publikovaná v těchto článcích na sebe logicky navazují, ukazují na promyšlený postup v řešení projektu a výsledkem je velmi konsistentní disertační práce. Tři publikace řeší problematiku úlohy jednotlivých kaspáz a vybraných proteinů z rodiny Bcl-2. Výsledky týkající se rezistence k taxanům byly publikované v jedné recentní publikaci.

Práce je doplněna kvalitním úvodem, který přináší stručné, ale více než dostačující informace přesně zaměřené ke studované tématice. Následuje Komentář k publikacím, kde jsou popsány a diskutovány jednotlivé publikované experimenty. Ve dvou publikacích byly jako nádorové modely zvoleny linie SK-BR-3 (s nefunkčním p53 a funkční kaspázou 3) a MCF-7 (s funkčním p53, nefunkční kaspázou-3). Testované látky byly paklitaxel a derivát SB-T-1216. Tyto dvě studie jsou doplněny analýzou účinku fluorovaného derivátu taxanu SB-T-12854 na výše uvedené linie a dále na linii T47D (bez funkčního p53, duktálního původu). Dále byla soustředěna pozornost na roli proteinů z rodiny Bcl-2. Z experimentů byly celkově vyvozeny závěry, že větší rozdíly než mezi použitými

deriváty taxanů byly mezi jednotlivými liniemi, kde výsledky ukazují, že u linií SK-BR-3 a MCF-7 hraje kaspáza 2 klíčovou úlohu jako apikální kaspáza, zatímco v liniích T47D odvozených z dukta nemusí být aktivována a apoptóza je indukována jinou cestou. U této linie byl zajímavý výsledek, že jedinou aktivovanou iniciační kaspázou byla kaspáza 8. Z těchto výsledků bylo navrženo, že rozdíly v roli kaspázy 2 a obecně rozdíly v mechanismech apoptózy by mohly být dány původem nádorových linií. Vzhledem k tomu, že celkem byly testovány pouze tři buněčné linie, myslím, že není možné tento závěr udělat bez dalšího testování více linií. Další výsledky jsou, že v testovaných liniích není kruciální dráha p53 a k aktivaci kaspázy 2 nemusí docházet v PIDDosomu. Možné alternativní mechanismy jsou diskutovány, ale v této práci plně definovány nebyly.

Druhá část práce, studie různých derivátů taxanů vzhledem k jejich schopnostem navodit resistenci vazbou na ABCB1 transportér, přinesla prioritní výsledky s potenciálním klinickým významem pro vývoj nových derivátů taxanů, případně i inhibitorů ABCB1 transportéru.

Celkem lze říct, že práce přináší nová, i když ještě nekompletní data o úloze jednotlivých kaspáz a také proteinů z rodiny Bcl-1 v procesu apoptózy indukované taxany a hlavně o rozdílech v jednotlivých buněčných liniích, což je věc, která by měla být dále studována na více liniích. Dále přinesla vedle základních analýz *in vitro* účinků nových derivátů taxanů důležité poznatky pro vývoj nových derivátů, které by nebyly eliminovány ABC transportéry. Nicméně zde budou velmi důležité další experimenty *in vivo*.

Práce je ještě stručně doplněna o některé nepublikované výsledky a plány na další práci a končí Závěrem stručně a výstižně shrnujícím obsah práce. Seznam publikací zahrnuje více než 250 citací, což dokumentuje velmi pečlivé zpracování Úvodu a Komentáře k publikacím.

Z formálního hlediska není práci příliš co vytknout, je dobře členěná, napsaná a pečlivě vypracovaná, výsledky jsou prezentovány v logických souvislostech a práce je podstatě bez formálních chyb a překlepů. V Komentáři k publikacím se někdy objevují trochu neurčité formulace typu „jedna linie“, případně nejsou specifikovány deriváty taxanů, které byly použity v experimentech a přesné specifikace je tak nutno vyhledat v originálních pracích. Někdy také není hned zcela jasné, co jsou literární data a co odkazy na vlastní publikace. Práce zjevně vznikala ve spolupráci s pracovištěm na State University of New York, Stony Brook, i podle spoluautorů v publikacích. Nikde však tato spolupráce diskutována není. Asi by měla být zmíněna přinejmenším v Poděkování.

Závěrem lze říci, že Mgr. Jelínek plně prokázal schopnost samostatné vědecké práce, získal prioritní výsledky, které publikoval jako první autor ve čtyřech publikacích v kvalitních časopisech a

které mohou být základem pro další studie. Doporučuji proto, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

Dotazy k diskusi:

1. Byly rozdíly v aktivaci kaspázy 2 a obecně role kaspázy 2 mezi liniemi odvozenými z nádorů prsu různého původu při indukci jinými agens než taxany popsány v literatuře?
2. Taxany mohou při nižších koncentracích indukovat p21 a následně nikoliv apoptózu, ale pouze proliferační arest/buněčnou senescenci. Máte tuto zkušenost z testování různých derivátů na různých liniích?
3. Jak byly vybrány nové deriváty taxanů použité ve vašich experimentech, byly již testovány jejich terapeutické schopnosti v preklinických experimentech či plánují se klinické studie?
4. Vaše výsledky testování různých derivátů taxanů ukazovaly důležitost aromatických skupin v pozicích C3' a C3'N pro vazbu na ABCB1 transportér, což je předpokladem vzniku rezistence způsobené transportem taxanů z buňky. Jinou možnou strategií zabránění rezistence je inhibice přímo ABCB1 transportéru. Vývoj inhibitorů však nepřinesl zatím příliš optimistické výsledky. Jaká je v současnosti situace na tomto poli a mohou vaše výsledky přispět k vývoji těchto inhibitorů?



RNDr. Milan Reiniš, CSc.

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.
Václavská 1083, 142 20 Praha 4