

Oponentský posudek na disertační práci

MUDr. Jana Molinského

s názvem:

„Resensitization of leukemia and lymphoma cells to TRAIL-induced apoptosis“

Disertační práce autora MUDr. Jana Molinského se věnuje aktuální problematice regulace apoptózy indukované cytokinem TRAIL u lidských nádorových buněk. Konkrétně se zaměřuje na nové možnosti zcitlivění buněk leukemie a lymfomu k apoptóze indukované TRAIlem prostřednictvím inhibitoru cyklin dependentních kináz, roscovitinu. Autor demonstroval účinné cytotoxické působení kombinace uvedených látek jak s využitím značného počtu lidských buněčných linií odvozených od leukemií a lymfomů nebo primárních vzorků získaných od pacientů s hematologickým maligním onemocněním, tak i na myším modelu lidského lymfomu. Navrhl také některé možné molekulární mechanismy zodpovědné za kooperativní proapoptotické účinky cytokinu TRAIL a roscovitinu. Tímto splnil vytýčené cíle práce, jejíž výsledky mohou přispět k lepšímu pochopení molekulární podstaty interakcí signálních drah indukovaných působením uvedených látek.

První část práce tvoří teoretický úvod, který shrnuje obecně známé poznatky o významu a regulaci apoptózy v organismu a hlavních molekulách, které se této regulace účastní. Značná část teoretického úvodu je rovněž věnována popisu signálních drah indukovaných cytokinem TRAIL přes povrchové receptory smrti, biologickému významu TRAILu a jeho využití v protinádorové terapii. Autor zde klade důraz zejména na mechanismy zodpovědné za rezistenci řady nádorových buněk k cytotoxickým účinkům TRAILu na různých úrovních jeho signálních drah. Zmíněný text je přehledně a srozumitelně zpracovaný, vhodně prokládaný četnými citacemi včetně řady recentních prací vztahujících se k danému tématu. V některých kapitolách jsou místy rozepisovány známé učebnicové poznatky, nebo se informace opakují, na úkor detailnějšího popisu diskutovaných mechanismů. Ve vybraných úsecích by text mohl být podpořen citováním originálních původních prací (ne pouze reviews, např. v části textů popisující mechanismy zodpovědné za regulaci aktivace členů rodiny Bcl-2, str. 20). V úvodní části by též mohlo být vhodným obohacením zahrnout kapitolu věnovanou roscovitinu, jedné z hlavních látek využívaných v této práci, detailnějším popisu mechanismů jeho působení a terapeutického využití. Zmíněné informace zde chybí a jen velmi skromně se vyskytují v části „Hypotheses and aims of the study“.

V části Materiál a metody poskytuje autor ucelený popis experimentálních postupů a modelů použitých v jeho práci, včetně experimentálních podmínek a způsobů analýzy dat. Výsledková část je přehledně zpracovaná a v podstatě kopíruje data publikovaná autorem a kolektivem v časopise *Leukemia and Lymphoma* v roce 2013, které již prošly oponentním řízením. Totéž se týká i Diskuse. Po formální stránce je práce logicky a přehledně členěna, což podporuje snadnou orientaci v ní. S ohledem na grafickou část práce by prospělo zvýšit kvalitu některých obrázků (např. rozlišení u Figure 1, 2). Celkově je práce po jazykové, stylistické i odborné stránce na velmi dobré úrovni a splňuje požadovaná formální i vědecká kritéria.

MUDr. Jan Molinský je autorem/spoluautorem 5 vědeckých článků publikovaných v impaktovaných časopisech. Prvoautorský článek v časopise *Leukemia and Lymphoma* (2013; IF 2,58) je podkladem jeho disertační práce. K obohacení práce by přispělo, kdyby autor zařadil komentář nebo více odkazů na výsledky, které společně publikoval v dalších 4 časopisech.

Celkově lze říct, že autor prokázal velmi dobré tvůrčí a vědecké schopnosti a předpoklady k samostatné práci, výsledkem je předkládaná práce, kterou doporučuji k obhajobě. V případě jejího úspěšného obhájení rovněž doporučuji udělení titulu Ph.D.

K práci mám tyto dotazy:

- Autor v práci používá k hodnocení apoptózy metodu detekce externalizovaného fosfatidyl serinu pomocí značeného annexinu V. Apoptotické buňky pak hodnotí jako ty, které jsou pozitivní na vazbu tohoto annexinu. Používal autor v rámci tohoto hodnocení také současné barvení např. pomocí propidium jodidu nebo 7-AAD atd. k odlišení buněk s porušenou integritou plazmatické membrány (např. tzv. sekundárně nekrotických buněk)? V metodách toto není uvedeno a je to důležité pro správné pochopení celkového kontextu buněčné smrti.
- Podobná otázka se týká i detekce povrchových receptorů smrti s využitím specifických protilátek a průtokové cytometrie. Byla tato analýza provedena pouze na subpopulaci buněk s neporušenou integritou plazmatické membrány, aby tím bylo zajištěno, že se jedná výlučně o detekci receptorů přítomných na povrchu buněk, ne intracelulárně? V části Materiál a metody tento komentář postrádám.
- Autor ukázal, že roscovitin indukuje nárůst procenta buněk (K562, RAMOS) v G2/M fázi buněčného cyklu ve srovnání s neovlivněnou kontrolou. Pozoroval autor, že by buňky ovlivněné kombinací roscovitinu a TRAILu přednostně umíraly v této fázi cyklu?
- Autor demonstroval účinnost studované kombinace roscovitinu a TRAILu in vivo, konkrétně inhibici růstu subkutánně injikovaného xenograftu (lymfom) u myší. V části 4.8 práce stručně popisuje získané výsledky. Zaměřil se autor nebo v budoucnu plánuje také hodnocení jiných parametrů (kromě základních, velikosti a hmotnosti nádoru), např. na úrovni detailní analýzy xenograftů s ohledem na změny množství/aktivace některých regulátorů apoptózy v těchto nádorech po působení výše uvedených látek?
- Jaký byl důvod použití relativně vysoké koncentrace inhibitoru z-VAD-fmk (100 μ M)? Standardně se používá v dávkách mnohem nižších (pod 20 μ M), což je obecně plně dostačující.
- Autor ve své práci demonstruje, že buňky K562 ovlivněné roscovitinem byly více citlivé k ABT-737, který inhibuje proteiny Bcl-2, Bcl-XL a Bcl-W. Lze říct, který z těchto tří proteinů by se mohl nejvíce uplatnit v regulaci apoptózy indukované kombinací roscovitinu a TRAILu?

Autorovi přeji hodně úspěchů v jeho další práci.

V Brně dne 30.

RNDr. Alena F

