

Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.  
Přírodovědecká fakulta UK  
Viničná 1965/5  
Praha

**Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Lenky Kyjacové nazvané „Radiation-induced plasticity of prostate cancer cells“.**

Disertační práce Mgr. Lenky Kyjacové byla vypracována pod vedením MUDr. Zdeňka Hodného, CSc. v Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Praze. Disertační práce je prezentována v plné, nezkrácené verzi. Mgr. Kyjacová je prvním autorem na článku publikovaném v časopise *Cell Death and Differentiation*, jako spoluautorka je uvedena na manuscriptu publikovaném v *Oncogene* a dále na dvou článcích v různých fázích rozpracovanosti.

V předložené disertační práci Mgr. Kyjacová studovala vliv opakujících se dávek ionizujícího záření na přežívání nádorových buněk, především pak buněčných linií odvozených z nádorů prostaty. Uvedené výsledky ukazují, že frakcionované ionizující záření indukuje vznik specifické, neproliferující populace buněk, která je dlouhodobě schopna přežít bez kontaktu s extracelulárním prostředím. Těžiště práce pak spočívá v podrobné charakterizaci této neadherentní, anoikis rezistentní buněčné populace. Autorka ukazuje, že pro tyto buňky je typická epiteliální-mesenchymální tranzice, exprese znaků typických pro kmenové i senescentní buňky a exprese širokého spektra zánětlivých cytokinů. Klíčovou úlohu v tomto procesu hrají signální dráhy ERK a Akt, jejichž aktivita umožňuje vznik a přežívání neadherentní buněčné populace.

Tato práce přináší nové poznatky, které podstatně a netriviálním způsobem rozšiřují naše znalosti o přežívání nádorových buněk. Frakcionované ionizující záření je běžně používáno při léčbě nádorových onemocnění, nicméně výsledky prezentované a diskutované v této práci poukazují na možnost, že tento režim může způsobit vznik k radiaci rezistentní, dormantní populace nádorových buněk s pro-metastatickými vlastnostmi. Pokud budou tyto výsledky potvrzené také v *in vivo* modelech, lze předpokládat, že léčebný režim na bázi radioterapie kombinované s inhibicí ERK a Akt by mohl zabránit vzniku radiorezistence a metastatickému rozsevu rekurentních nádorů.

Předkládaná disertační práce je psána v anglickém jazyce a drží se zavedeného členění, tzn. obsahuje kapitoly Abstract, Introduction, Results, Material and Methods, Discussion, Conclusions a Significance of results and future prospects. Závěrečná část pak obsahuje přehled literatury. Po jazykové stránce je disertační práce jako celek opravdu nadstandardně zpracována a v textu je minimální množství překlepů a ojedinělé stylistické neobratnosti (např. věta na straně 64 „*Considering that the non-adherent irradiated cells restarted proliferation shortly after readhesion, the non-adherent survivors represent a pool of transiently non-proliferating cells capable of proliferation after reestablishment of the adherent phenotype*“). Jejich přehled je uveden na konci tohoto posudku, společně s dalšími komentáři k textu. Díky pečlivému zpracování a širokému tématickému záběru je práce čtivá a poučná, i když v některých pasážích je autorka stručná a někdy příliš generalizuje. Například na straně 24 je uvedeno, že melanomové nádory vznikají z nádorových

kmenových buněk. Nicméně tato situace není jednoznačná, neboť některé studie (např. Quintana *et al.*, Nature 456: 593–598 (2008)) ukazují, že v případě melanomu mohou nádory vzniknout z jednotlivých buněk, které nemají markery typické pro kmenové buňky.

K disertační práci mám následující otázky:

1. Autorka v kapitole introduction uvádí, že „*IR can cause also heritable epigenetic change*“, že „*DUI45 cells represent one of the most radioresistant cancer cell lines*“ a také, že „*IR-surviving cells exhibit so called radiation-induced genomic instability which can be transmitted through the progeny*“. V této práci autorka také prokázala, že buňky přeživší fIR vykazují vyšší odolnost vůči dalšímu ozařování. Bylo testováno jak dlouho těmto buňkám radiorezistence vydrží? A související otázka – pocházejí buněčné linie použité v této práci z pacientů, kteří podstoupili radioterapii? Pokud ano a pokud je získaná radiorezistence opravdu dlouhodobá, tak by to mohlo znamenat, že výsledky by nemusely nutně korelovat se skutečnou odpovědí nádorových buněk během léčby.

2. V kapitole „Introduction“ (str.41) autorka uvádí, že „*secretome of senescent cells can alter surrounding microenvironment in the way that supports the tumor growth via persistent inflammation, DNA damage, and angiogenesis*“. Shodou okolností bylo nedávno publikováno (Obenauf *et al.*, Nature 520:368-72 (2015)), že sekretom melanomových buněk rezistentních vůči vemurafenibu má také protektivní vlastnosti na buňky nerezistentní. Jsou mezi sekretomem melanomových buněk a sekretomem neadherentních buněk nějaké společné rysy (např. podobný profil exprimovaných cytokinů, snížení exprese FRA1 apod)? Související otázka: bylo testováno, zda-li má sekretom neadherentních buněk protektivní účinek na buňky adherentní?

3. Prosil bych o vysvětlení kapitoly 4.2.1. a s ní spojeného Fig. 4.6. Název této kapitoly je „*Fractionated ionizing radiation induces EMT/MET-related changes in prostate cancer cells.*“ Autorka tvrdí, že „*fIR induces EMT/MET in prostate cancer cells*“. Nicméně, EMT nelze z mikroskopických fotografií odvodit (alespoň v mé kopii této disertační práce). Naopak morfologie a kompaktnost kolonií vytvořených z readherentních buněk naznačují spíše epiteliální fenotyp (např. PC3 buňky v Obr. 4.1.b, 4.1.c), nebo mezi buňkami jsou rozdíly minimální (Fig. 4.6a). Navíc podle imunofluorescenčního značení exprimuje parentální linie velice málo E-Cadherinu, jehož exprese je zvýšena v populaci „*surviving adherent*“, ale dle blotu se jeho exprese nezvyšuje (Obr. 4.6b a 4.8c). Wound healing assay ukazuje, že tyto buňky migrují pomaleji než parentální linie - což naznačuje zvýšení epiteliálního charakteru, ale není uvedeno kolikátá pasáž readherentních buněk byla použita. Předpokládám, že tato kapitola spíše popisuje reaktivaci epiteliálního fenotypu, ale v tomto případě by spíše měla umístěna za kapitolu 4.2.2. Navíc u Fig. 4.6d chybí popiska nad jednotlivými obrázky, i když se dá odvodit, že na levém obrázku je uvedena linie parentální.

4. V experimentech ukázaných na Fig. 4.14 byly testovány ERK a AKT inhibitory za obvykle používaných koncentrací s výsledkem, že tyto inhibitory mají aditivní efekt na vznik a přežívání nonadherentní populace. Zkoušela autorka použít nižších koncentrací těchto inhibitorů, zda-li mohou mít synergistický efekt?

Závěr:

Přes uvedené připomínky týkající se nedostatků formálního charakteru, považuji metodickou a odbornou úroveň předložené práce za vynikající. Z uvedených výsledků je zřejmé, že cílů této práce bylo dosaženo a výsledky této práce byly publikovány v respektovaném vědeckém časopise. Tato práce také ukazuje, že autorka zvládla pokročilé metody molekulární a buněčná biologie. Na základě kvality disertační práce Lenky Kyjacové doporučuji, aby tato práce byla přijata pro řízení o udělení vědecké hodnosti *Philosophiae doctor*.

V Praze 7. 9. 2015

Tomáš Vomastek

Mikrobiologický ústav AV ČR  
Vídeňská 1083  
Praha-4

---

### **Příloha k posudku na disertační práci Lenky Kyjacové „Radiation-induced plasticity of prostate cancer cells“.**

Str. 40: Uvedeno „SISP“, spávně má být „SIPS“

Str. 48: V textu je uvedeno „...*the ability to grow as spheres* (Fig. 4.1c).“, v legendě k obrázku se ale tvrdí, že „*are non-adherent cells starting to attach to the layer of adherent cells.*“

Str. 53: V textu je odkaz „...(see Fig. 4.1c for day 18 and 25 after the last dose), ale obrázek 4.1c ukazuje dny 25 a 32 po poslední dávce IR.

Str. 56: Nejasná věta, pravděpodobně přebývající slovo including: „*As the loss of adhesion was accompanied by resistance to anoikis and long-term nonadherent survival indicating the cell reprogramming including, we compared...*“

Str. 64: Ve větě „...*cell cycle regulators Plk1, Cdc25c, cyclin B1, and cyclin A* (Fig. 4.11c).“ má být odkaz na Fig. 4.11e.

Str. 66 a Fig.4.12g: Bylo by vhodné ukázat také účinnost knockdownu ERK1 a ERK2.

Str. 67, legenda k Fig.4.12b a 4.12c: Překlep, phosphothreonine ERK je fosforylován v pozici 202 místo uváděné pozice 204. Navíc jsou přehozené legendy k Fig. 4.12 a-c.

Str. 74: Věta „*Next, compared expression patterns of fIR-surviving populations and parental cells plotted resulting significantly up or downregulated genes (p<0.05, |LFC (log2 fold change)|>1)*“ je poměrně nejasná.

Str. 98: Překlep „*p53-defective PCa cells shoud be further investigated.*“