



OPONENTSKÝ POSUDEK

Na disertační práci **Mgr. Miroslava Hájka**

Modulation of human telomerase activity by nucleoside and nucleotide analogues.

Předkládaná disertační práce zpracovává dva úzce propojené cíle: i. posoudit inhibiční účinky vybraných acyklických nukleosidfosfonátových (ANP) sloučenin na aktivitu lidské telomerázy a ii. srovnat efekt vybraných nukleosidových inhibitorů DNA methyltransferáz (DNMT) na transkripci *hTERT*, proteinové složky lidské telomerázy. Práce vznikla pod vedením Dr. Votruby v laboratoři s fenomenální tradicí výzkumu nukleotidových a nukleosidových inhibitorů retrovirových reversních transkriptáz. Inhibice telomerázy je logicky dalším cílem tohoto týmu, protože se jedná o specifickou reversní transkriptázu, jejíž exprese je typickým znakem většiny nádorových buněk.

O aktuálnosti zvoleného tématu a jeho potenciální návaznosti na klinickou praxi není třeba dlouze psát. Některé inhibitory, většinou nukleotidové analogy včetně klasického AZT, jsou již využívány jako cytostatika s doloženým účinkem na aktivitu buněčných DNA polymeráz. Inhibice telomerázy může být vedlejším účinkem těchto cytostatik a specifická inhibice telomerázy může vést k cytostatikům zcela novým. S ohledem na očekávaný vznik resistencí je zásadním požadavkem dostatečný přísun nových cytostatik a racionální kombinace různě zacílených preparátů. Je zřejmé, že podobné cíle jsou paralelně v centru snažení mnoha jiných pracovišť v zahraničí a svědčí o tom i bohatá literatura. Zařazení vlastních nově připravených inhibitorů však práci dodává též značnou originalitu.

Vytýčených cílů práce dosáhla. V buněčném extraktu s přidavkem vybraných inhibitorů byla stanovována telomerázová aktivita na exogenním substrátovém primeru a byl sledován inhibiční efekt u většiny difosforylovaných forem ANP purinové řady, zejména u guaninových derivátů a R-enantiomerů. Nejsilnějším inhibitorem je 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]guanin. Dva adeninové deriváty ANP aktivitu telomerázy naopak mírně potencují. S užším výběrem inhibitorů byly poté cytometricky sledovány změny v relativní délce telomer u kultivovaných buněk. Zde se naopak jako nejúčinnější inhibitor ukázal 2,6-diamino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin. Ve druhé části disertace byl kvantitativně sledován pokles transkripce *hTERT* pod vlivem definovaných inhibitorů DNMT a SAH-hydrolázy a putativního inhibitoru methylace DNA. Ve vyšších koncentracích všechny inhibitory snižují transkripci *hTERT*, většinou ale až po přechodném zvýšení transkripce při nižších koncentracích, které lze vysvětlit zvýšenou hladinou transkriptu *c-myc*.

Disertační práce je klasicky členěna a nesmírně pečlivě vypracována. Přes značné úsilí jsem nenašel žádné nedostatky formálního rázu. V neposlední řadě musím pochválit vyspělou jazykovou



Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

úroveň a odborný styl celé disertace. Úvod popisuje kompendiálním způsobem a s požitím 629 (!) citací všechny aspekty složení telomer a jejich udržování pomocí telomerázy i netelomerázovými mechanismy. Jsou probrány biologické důsledky erose telomer a překonání replikační senescence buněk při onkogenní transformaci. Velmi cenná je kapitola shrnující metody zkoumání telomerázové aktivity. Podrobně je probrána regulace exprese *hTERT*, zejména epigenetická regulace na úrovni transkripce, která je velmi kontroverzní a netriviální. Úvod končí zdařilou kapitolou o strategiích inhibice telomerázy v léčbě nádorových onemocnění se zvláštním zřetelem na nukleotidové a nukleosidové analogy. Hutná část o použitých materiálech a metodách přesvědčivě ukazuje, že všechny popisované výsledky byly získány relevantními metodami zcela v souladu s pokrokem soudobé molekulární biologie a biochemie. Spektrum metod, které disertant použil, je sice úzké, jde však o metody náročné na optimalisaci a standardisaci.

K výsledkové části mám několik připomínek a dotazů:

1. Rozdíly mezi působením jednotlivých inhibitorů na telomerázovou aktivitu v buněčném extraktu a na zkracování telomer v buněčné kultuře mohou být způsobeny použitím různých buněčných typů (linie HL-60 derivovaná z akutní promyelocytické leukemie a CCRF-CEM z akutní lymfoblastické leukemie). Optimální by bylo použít několik transformovaných buněčných linií derivovaných z lidských nádorů a leukemií pro všechna vyšetření, tak aby bylo možno vyloučit různou citlivost ke specifickým i všeobecně toxickým účinkům jednotlivých inhibitorů.
2. Zejména v případě sledování poklesu transkripce *hTERT* je srovnání s jinou buněčnou linií velmi žádoucí: zvýšení transkripce *hTERT* při nízkých koncentracích inhibitorů je věrohodně diskutováno jako efekt zvýšené hladiny protoonkogenu *c-myc*. Použitá linie HL-60 má ovšem tento protoonkogen silně amplifikován a použití jiné linie bez amplifikace *c-myc* by mohlo ukázat efekt inhibitorů bez počátečního vzestupu hladiny *hTERT*.
3. Při cytometrickém sledování zkracování telomer pod vlivem ANP by bylo vhodné měřit pro srovnání též spontánní zkracování telomer u primárních buněk, byť by toto sledování nemohlo být dlouhodobé jako v případě transformovaných buněčných linií.
4. Autor konstatuje, že prolongovaná kultivace buněk CCRF-CEM za přítomnosti ANP inhibitorů zpomaluje proliferaci buněk. Protože počet replikačních cyklů určuje maximální možné zkrácení telomer, je srovnání rychlosti proliferace buněčné populace velmi důležité. Jakou metodou bylo prováděno? Byla proliferace měřena kontinuálně? Byla po dlouhodobé kultivaci s 2,6-diamino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purinem pozorována počínající replikativní senescence?
5. Mgr. Hájek ukazuje přesvědčivě, že inhibitory methylace DNA moduluji expresi *hTERT*. Tato část citelně postrádá (a autor to sám připouští) analýzu CpG methylace promotoru a regulačních oblastí



Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

hTERT. Aby byla dokumentována demethylační aktivita použitých inhibitorů, bylo by třeba měřit též celkovou úroveň methylace genomové DNA, resp. snížení methylace oproti kontrole. Nabízí se použití ^mCpG-specifické protilátky nebo tzv. methylaccepting assay. Rovněž vyšetření histonových modifikací chromatinovou imunoprecipitací (ChIP) bývá již rutinní součástí podobných studií. Konečně, protože epigenetická regulace *hTERT* je mimořádná a kontraintuitivní (methylace zde znamená aktivaci), doporučoval bych do budoucna verifikovat vazbu CTCF, insulačního faktoru a represoru transkripce *hTERT*.

Závěrečná diskuse je zdařilá a relevantní. Cením si odstavců diskutujících možné výklady zvyšování procesivity telomerázy některými ANP a posuzujících možné strategie normalisace výsledků kvantitativní RT PCR. Mám jedinou připomínku: u farmakologicky orientované práce bych očekával širší diskusi o možném výskytu resistance vůči zkoumaným inhibitorům. Reparace zkrácených telomer, která byla pozorována od 10. týdne kultivace buněk s inhibitorem 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]guaninem (obr. 15) by mohla být případem takové resistance. Navrhoval bych (6.) kultivovat tyto "resistentní" buňky s účinným inhibitorem 2,6-diamino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purinem, aby se prokázalo, zda nejde např. o aktivaci mechanismů reparujících telomery nezávisle na telomeráze.

Ačkoli jsem uvedl řadu dotazů a připomínek, jedná se o marginální kritiku a můj celkový dojem z předložené disertační práce je velmi dobrý. Mgr. Hájek předložil kvalitní výsledky, řádně je interpretoval a publikoval. Jak vlastní práce tak autoreferát jsou vypracovány s nesmírnou pečlivostí a obsahují všechny požadované náležitosti. Protože disertant v předkládané práci prokázal své schopnosti samostatně vědecky pracovat a protože jeho výsledky prošly též mezinárodní oponenturou v časopise *Biochemical Pharmacology*, doporučuji, aby tato práce byla kladně přijata jako podklad k udělení titulu PhD.

V Praze, 29. srpna 2008

RNDr. Jiří Hejnar, CSc.