

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: RNDr. Pavel Rössner, PhD.

Datum: 27. 8. 2021

Autor: Bc. Dominika Vallušová

Název práce: Studium vlivu DNA reparačních drah na odpověď na chemoterapeutickou léčbu u karcinomu vaječníků

### Cíle práce

1. Definovat vliv mirinu, inhibitoru proteínu MRE 11, na buněčnou linii karcinomu vaječníků OVCAR3, a to z hlediska působení na buněčnou proliferaci a růst a vlivu inhibice reparační dráhy homologní rekombinace (HR) na akumulaci poškození DNA
2. Definovat vliv mirinu na citlivost buněčné linie OVCAR3 vůči karboplatině, a to z hlediska buněčné proliferace a růstu, vlivu inhibice HR na citlivost vůči karboplatině a akumulaci poškození DNA a její reparace
3. Definovat vliv inhibice HR indukované mirinem na buněčnou linii karcinomu vaječníků se získanou rezistencí vůči karboplatině s cílem provést charakterizaci linie a určit vliv inhibice HR na citlivost vůči karboplatině

### Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 94

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

### Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? 7 klíčových metod zahrnujících funkční analýzy, dále metody buněčných kultivací a pasážování buněk a bioinformatická analýza

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

### Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?  
ANO

### Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

**Formální úroveň práce** (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Po formální stránce nemá práce žádné zásadní nedostatky. Grafické zpracování výsledků je na kvalitní úrovni, stejně jako jazyková úroveň. V textu se občas objevují drobné stylistické nedostatky, např. opakování slov ve dvou sousedních větách (př.: kapitola Chemoprevencia, str. 9, opakování výrazu „orálna antikoncepcia“), neobratné formulace („odpoveď na DNA poškodení“ místo „odpoveď na poškodení DNA“ – klíčová slova), nebo anglikanismy tam, kde by mohl být využitý slovenský výraz (...dráhu, ktorá utilizuje..., str. 17). Práci by bylo vhodnější psát v 1. os. jednotného čísla, nebo v trpném rodě, namísto 1. os. mn. č., které je většinou využívané. Jde však o drobné nedostatky jinak kvalitní práce.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Předkládaná diplomová práce se věnuje problematice inhibice homologní rekombinace (HR), reparační dráhy, která se podílí za vzniku rezistence buněk karcinomu vaječnicků vůči léčbě platinovými deriváty. Předpokladem práce je, že inhibicí HR by mělo dojít ke zvýšení citlivosti nádorových buněk k působení karboplatiny. Pro tyto účely bylo testováno působení mirinu, inhibitoru proteinu MRE11, který je součástí komplexu MRN podílejícího se na opravě dvouřetězcových zlomů.

Práce obsahuje detailní teoretický úvod věnující se výskytu a léčbě karcinomu vaječnicků, včetně popisu molekulární podstaty terapie onemocnění a vzniku rezistence na léčbu. V praktické části byla pro řešení cílů práce využita celá řada metod, včetně základních postupů buněčných kultivací a funkčních analýz, které zahrnují hodnocení buněčné proliferace a růstu, tvorbu kolonií, analýzu genové exprese pomocí qRT-PCR, exprese proteinů s využitím western blottingu, poškození DNA (kometový test) a buněčného cyklu průtokovou cytometrií. Praktické laboratorní části předcházela bioinformatická analýza asociace exprese genu MRE11 a přežití osob s karcinomem vaječnicků.

Z práce je zjevné, že autorka dobře zvládla jak zpracování odborné literatury, tak řadu laboratorních metod, které umožnily otestovat formulované hypotézy. Cíle diplomové práce byly splněny – jejich přehled je uveden v Závěru na str. 66. Kromě vlastního komentáře k jednotlivým cílům je uvedeno i přehledné shrnutí výsledků a jejich případné využití při terapii karcinomu vaječnicků. První uváděný cíl – bioinformatická analýza asociace mezi expresí MRE11 a přežitím osob s karcinomem vaječnicků – není však v úvodu práce uveden a, kromě abstraktu, se poprvé objevuje až v popisu metod na str. 44 a dále v Diskusi na str. 59. I když provedení této analýzy je z hlediska náplně diplomové práce logické a důležité, měla by být uvedena mezi cíli na str. 26-27. V aktuálním provedení působí uvedení této analýzy vytržené z kontextu a čtenáři zhoršuje orientaci v textu. To však nemění nic na faktu, že jde o velmi kvalitní práci, v níž bylo dosaženo všech plánovaných cílů a jejíž výsledky mají potenciál být dále využity pro řešení problematiky mechanismů chemoresistence při léčbě karcinomu vaječnicků.

**Otázky a připomínky oponenta:**

Otázky k teoretickému úvodu:

Na straně 14 autorka diskutuje využití inhibitoru PARP jako protinádorového léčiva a uvádí, že PARP hraje klíčovou roli v bázové excizní reparaci (BER). Dále píše: „PARP inhibitor blokuje enzym PARP1. Inhibícia enzymu PARP1 vedie zablokovaniu opravy SSBs, následnému zablokovaniu replikačnej vidličky a konečnému vzniku DSBs“. Jaký je vztah inhibitoru PARP k opravám jednovláknových zlomů DNA, když inhibitor hraje roli v BER?

V návaznosti na tuto otázku je na str. 15 je uvedeno: „Modifikované bázy, abázické miesta a

SSBs sú najčastejšou formou DNA poškodenia a sú opravované pomocou dráhy BER“. Jak se BER podílí na opravách SSB?

Na str. 22 autorka uvádí: „Spomedzi inhibítorov MRN komplexu sa najčastejšie používa mirín, ktorý inhibuje MRE11 asociovanú exonukleázovú aktivitu, zabráňuje MRN dependentnej ATM aktivácii a ruší kontrolný v G2/M a proces HR v cicavčích bunkách“. Pritom však na str. 20 píše: „Možný cieľ protinádorovej terapie by teda mohol predstavovať G2/M kontrolný bod, kedy by inhibícia určitých proteínov zapojených v tomto kontrolnom bode mohla viesť k apoptóze nádorových buniek.“ Z uvedeného vyplýva, že mirín môže zrušením kontrolného bodu G2/M zablockovať apoptózu. Není tedy využití mirinu pro protinádorovou terapii potenciálně kontraproduktivní?

Na str. 24 autorka píše: „Ďalšími mechanizmami vedúcimi k obnove funkcie proteínov BRCA a rezistencii je strata promótoru génu BRCA1 metyláciou alebo funkčná obnova mutovaného proteínu BRCA1 prostredníctvom interakcie s HSP90, čo vedie k podpore vedenia rekombinázy RAD51 k DNA a následnému DNA poškodeniu“. Jak souvisí obnova funkce proteinů BRCA se vznikem rezistence?

Otázky a komentáře k metodice a výsledkům:

Str. 29: Nádorové bunkové linie – z textu nejprve vyplýva, že bylo použito linií více, následně je uváděna jen jedna buněčná linie.

Str. 31: Experimenty byly provedeny v triplikátech, byla však prováděna též opakovaná nezávislá stanovení?

Str. 32: Časové schéma experimentu, obr. 10: Lze toto schéma porovnat s případnou klinickou aplikací léčiv?

Str. 33: „Do buniek vopred nanosených do 96-jamkovej doštičky a ovplyvnených roztokmi mirínu a CbPt sme pridali objem 12  $\mu$ l, ktorý zodpovedal 1/10 celkového objemu. Do jamiek určených pre kontrolu sme pridávali 10  $\mu$ l.“ Proč nebyly objemy u ovlivněných a kontrolních vzorků stejné?

Str. 34: „Pripravená bunková línia bola následne zmrazená na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .“ Byl při zamražení použit roztok stabilizující RNA?

Str. 35, Tabulka 3: „Celkový objem reakcie (s RNA)“ – je uváděn objem 10  $\mu$ l, což neodpovídá součtu objemů jednotlivých položek v tabulce. Obdobně u tabulky 5 na str. 36.

Str. 37: Proč byly pro analýzu zvoleny právě proteiny MRE11,  $\gamma$ H2AX, p53 a RAD51? Při zpracování vzorků je uváděna práce na suchém ledu. Nedošlo při tom ke zmrznutí vzorků?

Str. 45: „Po 48h bola proliferácia znížená o 40, 55 a 60% pri koncentrácii 120, respektíve 60 a 30  $\mu$ M ( $p = 0,05$ ) (Obr. 16 B).“ Jak lze vysvětlit větší snížení proliferace při nižší koncentraci mirinu?

Str. 48: Byla ověřena toxicita mirinu při dávce 100  $\mu$ M a době inkubace 1 hodina?

Obr. 20 a 21: Byly poklesy v proliferaci buněk a počtu kolonií u ovlivněných vzorků signifikantně nižší vzhledem ke kontrole?

Analýza exprese vybraných genů pomocí qRT-PCR: Proč nejsou uvedeny směrodatné odchylky a příp. signifikance? Na str. 55 je uvedeno: „Po analýze exprese genů zúčastňujících sa dráhy NER (Obr.28) sme zistili, že vplyvom samotného roztoku mirinu dochádza k zníženiu exprese génov *CSA*, *DDB1*, *LIG1*, *RAD23B*...“. Z obr. 28 však vyplývá, že u *DDB1* nedochází k poklesu, ale ke zvýšení exprese.

Výsledky western blottingu: semikvantitativní vyhodnocení výsledků denzitometricky by usnadnilo interpretaci dat.

Pro buněčnou linii rezistentní k účinku karboplatiny byly provedeny jen některé experimenty (analýza buněčného růstu v přítomnosti karboplatiny, mirinu a jejich kombinace). Je do budoucna plánováno rozšíření analýz i o další testy popsané u linie OVCAR3?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: