

Oponentura disertační práce Mgr. Daniela

Oponent: MUDr. Libor Macůrek, PhD (ÚMG AV ČR)

Krátké shrnutí

Předmětem předkládané disertační práce Mgr. Daniela je studium rezistence buněk nádorů prsu k taxolu a jeho derivátům. Práce je vypracována jako soubor čtyř publikací doplněných komentářem. Na dvou pracích je Mgr. Daniel prvním autorem na dalších dvou jako spoluautor. Hlavním přínosem práce je průkaz účasti ABC transportérů na rezistenci k taxanům. Pokud by byly dostupné inhibitory ABC transportérů, mohl by být tento poznatek využitelný pro prevenci rozvoje rezistence nádorových buněk. Práce dále popisuje změnu exprese několika dalších proteinů bez zřejmého vztahu k rezistenci k taxanům, nicméně i tato negativní data byla úspěšně publikována. V této části práce byly získány nové poznatky především o způsobu regulace exprese genu TRIP6 prostřednictvím cyklického AMP.

Formální náležitosti práce

Práce je psána v angličtině. Literární úvod v rozsahu přibližně 30 stran poskytuje ucelený přehled o klasifikaci nádorů prsu, popis mechanismu účinku taxanů a včetně příčin rozvoje rezistence v průběhu léčby. Výsledky jsou prezentovány jako krátké komentáře k přiloženým publikacím. Překvapivě však zcela chybí diskuze a je nahrazena jen velmi minimalistickým shrnutím. Uvítal bych spíše hlubší diskuzi, která by související publikace zasadila do širšího kontextu, analyzovala případné technické limitace studie a navrhla možná řešení. Seznam citací v sekci 7 je rozsáhlý, nicméně neodpovídá zcela citačním odkazům uvedeným v textu. Namátkou například postrádám odkaz na Hofman et al., 2021 (strana 43) nebo Kinnaird et al., 2016 (strana 51), ale pravděpodobně se to týká většího množství odkazů. Po formální stránce bych vytknul i nesprávné členění úvodní strany doktorské práce, kdy je uvedeno pracoviště, na kterém byla experimentální práce vykonána, nikoliv však název studijního doktorského programu.

Metody

Hlavní použitou metodikou je analýza proteinů pomocí 2D-PAGE na vzorcích nádorových buněčných linií citlivých a rezistentních k různým formám taxanů. Tato analýza vedla k nalezení rozdílné exprese proteinů CPS1 a TRIP6 v rezistentních buňkách. Následné experimenty nicméně nepotvrdily úlohu těchto proteinů v potlačení citlivosti k taxanům. Tato klasická biochemická metodika měla jistě historicky význam pro odhalení posttranslačních modifikací proteinů, nicméně je otázkou, zda je dostatečně senzitivní pro určení rozdílů exprese proteinů mezi dvěma použitými buněčnými typy. Pro kvantitativní vyhodnocení míry exprese vysokého množství transkriptů bych jako vhodnější metodiku považoval analýzy na úrovni RNA transkriptu. Vzhledem k tomu, že v rezistentních liniích docházelo i k chromosomálním přestavbám, bylo by vhodné zařadit též analýzu na úrovni genomové DNA. Pro proteomickou analýzu by se pak nabízela SILAC metodika metabolického značení pomocí stabilních izotopů, která by umožnila přesné srovnání hladin proteinů v komplexní směsi.

Doplňující otázky

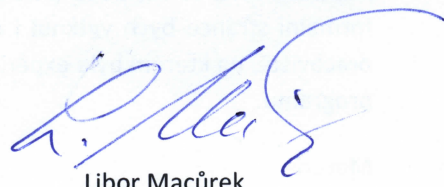
1. Zdůvodněte prosím výběr buněčného modelu pro studium rezistence k taxanům. MCF7 buňky jsou odvozeny z lobulárního typu BC, přičemž taxany se používají především k léčbě TNBC. MCF7 buňky mají zachovaný ER a jsou tedy citlivé k estrogenu. Nakolik odráží *in vitro* kultivace MCF7 buněk bez přítomnosti estrogenu podmínky v nádoru? Může estrogen případně další hormony ovlivnit sensitivitu buněk k léčbě? MCF7 buňky postrádají kaspázu

CASP3, proto lze předpokládat, že indukce buněčné smrti u nich bude probíhat odlišným způsobem než u jiných nádorů.

2. Hlavním zjištěním této práce je odhalení funkce ABCB1 a dalších ABC transportérů v rezistenci k taxolu. Zajímalo by mě, zda jsou změny v expresi ABC transportérů v rezistentních buňkách detekovatelné pomocí 2D-PAGE. Liší se pouze míra exprese těchto transportérů, nebo jsou detekovány i odlišné posttranslační modifikace? Jakým způsobem je regulována exprese ABCB1 v rezistentních nádorech? Deplece ABCB1 snížila viabilitu rezistentních MCF7 buněk, nicméně část buněk přežila v přítomnosti paclitaxelu. Je možné citlivost buněk dále zvýšit kombinací deplece několika ABC transportérů?
3. Vazba taxanů na tubulin vedoucí ke stabilizaci mikrotubulů je prezentována jako jediný způsob jejich účinku v potlačení buněčné proliferace. Existují nějaké další buněčné děje, které taxany ovlivňují nezávisle na mikrotubulech? Je vstup buňky do mitózy (respektive následná „mitotic slippage“) nezbytnou podmínkou pro cytotoxický efekt taxanů? Jak vypadá morfologie mitózy v rezistentních buňkách?
4. Podstatná část práce je věnována proteinu TRIP6. Pozorovali jste nějaký fenotyp po depleci TRIP6 (nad rámec případného vlivu na citlivost k taxanům)? Jaká je předpokládaná funkce TRIP6 s ohledem na jeho funkční domény a interakční partnery?

Závěrem lze shrnout, že předkládaná práce přináší nové poznatky o rozvoji rezistence nádorových buněk k taxanům a v budoucnu může přispět k předpovědi citlivosti nádorů k léčbě. Při vypracování práce byly použity klasické i moderní metodiky molekulární biologie a student prokázal schopnost kritického vyhodnocení výsledků. Přes formální nedostatky, které jsem podrobně zmínil výše, se domnívám, že práce splňuje všechny požadavky a doporučuji ji proto k obhajobě a k udělení titulu PhD.

V Praze 17.5.2023



Libor Macůrek