

Posudek na doktorandskou disertační práci Mgr. Martina Košaře nazvanou

Mechanisms of replicative, drug- and oncogene-induced cellular senescence
(Mechanismy replikativní, chemicky a onkogeny indukované buněčné senescence)

Předkládaná disertační práce Mgr. Košaře zabývající se mechanismy buněčné senescence byla vypracována na základě výsledků práce získaných v průběhu jeho doktorandského studia Molekulární a Buněčné Biologie, Genetiky a Virologie na Oddělení Integrity Genomu, Institutu Molekulární Genetiky AVČR, Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze pod vedením Prof. MUDr. Jiřího Bárta, C.Sc. Dr.h.c.

Práce se v obecné rovině zabývá trvalou zástavou buněčné proliferace v důsledku nejrůznějších stresových stimulů, tedy buněčným stavem označovaným jako buněčná senescence, která je považována za důležitou bariéru vzniku nádorových onemocnění. Ve svých cílech se Mgr. Košář zaměřuje na několik problematik úzce související se vznikem a udržováním senescenční buněčné odpovědi. Jednalo se například o detailní charakterizaci času aktivace dvou paralelních drah vedoucí ke stabilizaci proteinu p53 po různých senescenci-indukujících stimulech a také v různých stádiích tkáňové transformace provázející vznik tumoru. Mgr. Košář ve spolupráci s několika vědeckými týmy zjistil, že aktivace buněčné odpovědi na DNA poškození (tzv. DNA Damage Response dráha) předchází aktivaci dráhy podmiňované expresí a aktivitou důležitého inhibitoru MDM2 a známého tumor-supresoru p14ARF a zcela nově definoval roli p14ARF aktivace jako tumor-supresivní pojistku k jejíž aktivaci je nutná až poměrně vysoká míra onkogenního stresu. Tato zjištění s důležitým přesahem ke vzniku a léčbě maligní transformace se týmu podařilo opublikovat ve velmi dobře citovaném časopise Cell Death and Differentiation (IF 8.371) kde byl Mgr. Košář spoluautorem.

V další práci se Mgr. Košář věnoval problematice chromatinových změn, jež provází senescenční buněčný stav a které jsou obecně považovány za důležitý marker trvale zastavené proliferace. V práci publikované v časopise Cell Cycle (IF = 5.2) kde byl prvoautorem učinil některá zásadní zjištění o tzv. SAHF tělíscích. Tato tělíška se snadno detekují některými DNA barvivy, protože představují hyperkondezovaný chromatin a často se tak uvádějí jako snadný marker senescence. Ve své práci Mgr. Košář učinil některá závažná zjištění o SAHF jako například, že se nejedná o univerzální senescenční marker, že výskyt těchto tělíšek je závislý na typu induktoru senescence a taky typu

buněčné linie. Navíc se SAHF tělíška nepodařilo detekovat v parafinových řezech nejrůznějších tumorů, třebaže technicky je tato detekce možná, jak prokázal na parafinovém vzorku pelety tvořené SAHF pozitivními buňkami a jedná se tak tedy nejspíše o artefakt některých linií pěstovaných v podmínkách *in-vitro*.

Jako spoluautor se Mgr. Košář podílel také na publikaci v časopise *Oncogene* (IF = 7.357), která si dala za cíl zmapovat důležitou dráhu JAK/STAT zapojenou do senescenční odpovědi a to po indukci senescence pomocí vybraných chemických látek. Ukázalo se, že buněčná senescenční odpověď vyvolaná pomocí látek jako jsou BrDU a Dystamycin A aktivuje JAK/STAT dráhu interleukiny, které jsou součástí specifického sekretomu těchto buněk (příklad autokrinní/parakrinní aktivace). Autoři rovněž prokázali zvýšenou expresi vybraných genů, jejichž exprese je interleukiny stimulována a dále si dali za cíl prozkoumat vliv této dráhy na samotný vznik a udržení senescenčního stavu. Překvapivě se ukázalo, že na rozdíl od publikovaných prací s některými onkogeny (například BRAF) tato dráha nemá v případě chemicky indukované senescence příčinnou souvislost. Prokázání a následné studium specifických rozdílů mezi onkogenně a chemicky indukovanou senescencí má důležitou souvislost s léčbou nádorových onemocnění, protože mezi chemickými induktory senescence je celá řada protinádorových léků.

Poslední přiloženou prací je spoluautorská publikace, která vyšla v časopise *Cell Cycle* (IF = 5.2) a je majoritně věnovaná regulaci exprese důležitého tumor-supresorového proteinu a zároveň pozitivního regulátoru senescenční buněčné odpovědi proteinu PML. Tým, jehož byl Mgr. Košář součástí, zjistil, že za zvýšenou expresí PML provázející vznik buněčné senescenční odpovědi v důsledku aplikace vybraných chemických induktorů stojí aktivovaná JAK/STAT dráha a poprvé v této práci popsal autokrinní/parakrinní regulaci této dráhy skrze cytokiny produkované senescenčními buňkami (toto zjištění pak dále rozvedl v práci popsané výše). V neposlední řadě ukázal metodami imunofluorescence, že perzistující DNA poškození vyvolané chemickými induktory senescence ko-lokalizuje s PML tělísky stejně jako bylo publikováno pro perzistující DNA poškození indukované ionizujícím zářením. Toto zjištění naznačuje možnou univerzální roli PML ve správě perzistujících DNA lézí jedná se o další atraktivní směr výzkumu tohoto proteinu.

Z formálního hlediska neshledávám v textu disertace žádný zásadní problém. Text disertace je standartně členěn a psán moderním způsobem kdy stručný, ale dostatečně výstižný úvod psaný dobrou angličtinou, je kombinován s přiloženou publikační aktivitou Mgr. Košáře.

Literární přehled poskytuje pro pochopení a odůvodnění relevantnosti cílů práce dostatečný a aktuální souhrn informací. Úvod je zpracován logicky a přehledně, chybí mi však obrázky, které by, dle mého názoru, případnému čtenáři pomohly s pochopením některých složitějších buněčných drah. Za úvodem následuje kapitola, již je výčet použitých metod. Ta si zasloužila podrobnější rozpracování, protože kapitoly Material and Methods v jednotlivých publikacích, na které v souvislosti s metodami autor odkazuje, bývají poměrně stručné a neumožňují popsat některé důležité metodické triky, které se pak snadno zapomenou. Následuje souhrn publikací a pak hned důležitá kapitola, která propojuje přiložené publikace s cíli disertační práce. Následuje dobře zpracovaná a dostatečně rozsáhlá diskuse dosažených výsledků.

Z věcného hlediska mám pouze jedinou drobnou výtku a to k nedostatečnému vysvětlení zkratky ARF v abstraktu práce. Pro neznalého čtenáře totiž text evokuje dojem, že jednou z tumor-supresivních drah provázející (či podmiňující) senescenci je jakási globální aktivace alternativních čtecích rámců v buňce. Není nijak vysvětleno, že se jedná o alternativní čtecí rámec konkrétního lokusu CDKN2A jehož produktem je protein p14-ARF. Stejný problém je pak i v kapitole zkratk, kde je opět napsáno jen ARF a vysvětlení Alternative Reading Frame odkazující tak na obecný biologický proces provázející přepis celé řady lokusů a nikoliv na konkrétní ARF protein jak bylo nejspíše autorem zamýšleno. Jedná se jen o detail, považuji však za důležité na něj upozornit, protože například biolog z trochu odlišného oboru si jen těžko představí pod pojmem ARF konkrétní tumor-supresorový savčí protein.

Autoreferát je zpracován standardním způsobem a zcela výstižně charakterizuje obsah předložené disertační práce.

Otázky pro diskuzi:

- 1.) Ve své práci se Mgr. Košar zabývá poměrně detailně jak senescencí indukovanou chemicky tak onkogenně. V současné době je pro-senescenční efekt aktivovaných onkogenů spojován především s fenoménem hyper-replikace jak popisuje např. (Di Micco et al., 2006) a fenoménem replikačního stresu v důsledku nedostatku dNTP jak popisuje například (Bester et al., 2011) případně efekt obojího. Pokud jde o chemické induktory senescence, mohl by autor dle své dosavadní zkušenosti jmenovat ty, které mají fenotypovou odpověď nejpodobnější onkogennímu stresu?

Dále, je fenotyp hyper-replikace vůbec nějak vyvolatelný chemicky? A nejedná se nakonec o nejzásadnější zdroj fenotypových rozdílů mezi onkogenní a chemicky indukovanou senescenční odpovědí?

- 2.) V práci o DDR, p16 a p14-ARF autor pracuje pouze s onkogenně indukovaným stresem. Má autor i nějaká data o aktivaci těchto drah po chemicky indukované senescenci?
- 3.) Je nějaká souvislost mezi přítomností/absencí SAHF a snadností s jakou lze v daných buňkách zvrátit senescenční odpověď (například pomocí knockdownu p53, p21 či některých checkpointových genů)?
- 4.) Má autor nějaké vysvětlení proč onkogenně indukovaná senescence je výrazně potentnější induktor SAHF v buněčných liniích než ta chemicky indukovaná?
- 5.) Testoval autor formování SAHF v myších xenograftech lidských linií schopných formovat SAHF v podmínkách *in-vitro*?
- 6.) Autor cituje publikaci, kde se podařilo zvrátit BRAF indukovanou senescenci potlačením exprese IL6 viz (Kuilman et al., 2008). Stejný přístup však selhal u senescence indukované chemicky. Jak to vypadá u senescence indukované jinými onkogeny než BRAF? Opakoval tým BRAF experiment coby pozitivní kontrolu u některých z jejich buněčných modelů a naopak chemickou indukci senescence u buněčného modelu co použil Kuilman?
- 7.) Je asociace PML tělísek s DNA lézemi vždy až opožděná buněčná odpověď (v horizontu dní) nebo existují typy poškození rekrutující PML bezprostředně (v horizontu minut až hodin)? Jinými slovy, je to specifický typ DNA poškození (viz například „clustered DNA damage“) nebo až časová perzistence co způsobuje asociaci DNA léze s PML tělískem?

Závěrem shrnuji, že mi bylo velkým potěšením posuzovat předloženou disertační práci pro její vysokou odbornou úroveň a přínos zcela nových a velmi zajímavých poznatků. Jsem přesvědčen, že disertační práce Mgr. Košaře je významným příspěvkem na poli výzkumu buněčné senescence, jak bylo ostatně potvrzeno úspěšným opublikováním získaných dat v zahraničních periodících s velmi dobrým impakt faktorem.

Práce splňuje všechny požadavky kladené na doktorandskou disertační práci. Na základě toho navrhuji, aby Mgr. Košařovi byl po úspěšném obhájení jeho disertační práce udělen akademický titul „philosophiae doctor“ (PhD).

V Olomouci 13. 3. 2014



Mgr. Martin Mistrík, PhD.



**INSTITUTE OF MOLECULAR AND
TRANSLATIONAL MEDICINE**
Laboratory of Genome Integrity
Faculty of Medicine and Dentistry
Palacky University Olomouc
Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc
Czech Republic

Reference List

Bester,A.C., Roniger,M., Oren,Y.S., Im,M.M., Sarni,D., Chaoat,M., Bensimon,A., Zamir,G., Shewach,D.S., and Kerem,B. (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* 145, 435-446.

Di,M.R., Fumagalli,M., Cicalese,A., Piccinin,S., Gasparini,P., Luise,C., Schurra,C., Garre',M., Nuciforo,P.G., Bensimon,A., Maestro,R., Pelicci,P.G., and d'Adda di,F.F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.

Kuilman,T., Michaloglou,C., Vredeveld,L.C., Douma,S., van,D.R., Desmet,C.J., Aarden,L.A., Mooi,W.J., and Peeper,D.S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133, 1019-1031.