

## Oponentský posudek na disertační práci *Mechanismus účinku L-asparaginázy u dětské akutní lymfoblastické leukémie* Mgr. Ivany Heřmanové

K obhajobě byla předložena disertační práce, jež zásadním způsobem přispívá k poznání biologické účinnosti klíčové složky kombinačních protokolů pro léčbu akutní lymfoblastové leukémie dětského i dospělého věku – asparaginázy (ASP).

V úvodní části práce se autorka věnuje popisu biosyntézy ASP, známých příčin rezistence a nežádoucích účinků, snaží se definovat místo, které má ASP v protokolech léčby dětské ALL a podává přehled o metabolických a signálních drahách nádorových buněk, které jsou účinkem ASP ovlivňovány.

Následuje centrální část práce, v níž diplomantka systematicky popisuje a diskutuje výsledky vlastní experimentální práce, které dělí do šesti samostatných kapitol. K zásadním poznatkům, k nimž během studia dospěla, patří:

1. Studium korelace exprese genu pro asparagin syntetázu (ASNS) s citlivostí k ASP: Definuje hraniční hodnotu bazální exprese genu pro ASNS, při jejímž podkročení již obě veličiny spolu nekorelují. Přináší původní zjištění, že exprese genu pro ASNS koreluje s citlivostí s ASP pouze na modelu buněčných linií, zatímco patientské blasty mají výrazně nižší expresi tohoto genu, která s citlivostí k ASP již nekoreluje. Konstatuje, že citlivost k ASP tudíž nelze na základě měření bazální exprese genu pro ASNS predikovat.
2. Srovnání expresního profilu parentálních a odvozených k ASP rezistentních buněčných linií: Identifikuje signální a metabolické dráhy, jejichž aktivita může být pro citlivost na podání ASP zásadní.
3. Detailní popis účinku ASP na metabolismus leukemických buněk, konkrétně na metabolismus aminokyselin (deplece asparaginu a glutaminu), oxidaci mastných kyselin (zvýšení  $\beta$ -oxidace), glykolýzu (snížená exprese regulátoru glykolýzy c-Myc) a respirační kapacitu (ovlivněna specificky pouze v leukemických buňkách).
4. Popis regulace metabolického účinku ASP na příkladu ovlivnění cílů signální dráhy mTOR: Podání ASP působí na tuto dráhu inhibičně. Důsledkem je inhibice *de novo* syntézy pyrimidinů (zodpovědná je glutaminázová aktivita ASP – dosud jí byly přisuzovány jen nežádoucí účinky), aktivace autofagie (jeden z mechanismů rezistence), zvýšená oxidace mastných kyselin (další obranný mechanismus), inhibice glykolýzy.
5. Studium důsledků farmakologické inhibice oxidace mastných kyselin: Dokazuje, že ireverzibilní blokáda tohoto procesu etomoxirem vede ke zvýšení cytotoxického účinku ASP v buněčných liniích i patientských vzorcích.
6. Popis metabolických změn zapříčiněných deplecí anebo přidáním asparaginu a glutaminu k leukemickým buněčným liniím.

Práce odkazuje na 150 literárních pramenů, vesměs vysoce aktuálních (nejmladší práce byla publikována v dubnu 2015). Seznam literatury představuje prakticky úplný souhrn relevantních zdrojů publikovaných ke studované problematice.

Studium mechanismů účinku ASP je pojato mnohostranně a detailně. Výčet aplikovaných laboratorních metodik je v kontextu postgraduálního studia vysoce nadstandardní. Diplomantka je výsledky vlastní experimentální práce schopna precizně formulovat i je interpretovat v kontextu komplexních metabolických vztahů. Tyto skutečnosti spolu s prestižními publikačními výstupy, jimiž diplomantka své studium završuje, odrážejí dynamickou a tvůrčí atmosféru laboratoře CLIP vedené prof. MUDr. Janem Trkou, Ph.D., stejně jako inspirativní a angažované vedení školitelkou Mgr. Júlií Starkovou, Ph.D.

K tématu disertační práce diplomantka publikovala 2 práce v časopisech s impact faktorem (úhrnný IF = 12,906), v obou je první autorkou. Další práci publikovala v českém písemnictví (recenzovaný časopis bez IF). Celkem je autorkou či spoluautorkou pěti impaktovaných publikací s úhrnným IF = 30,252). Citační ohlas na Web of Science čítá k dnešnímu dni 20 citací. K problematice účinku asparaginázy se vyjádřila na řadě domácích i zahraničních fórech, včetně ústní prezentace na prestižním kongresu Americké hematologické společnosti (ASH).

K předložené práci nemám věcných výhrad. Pouze procento remisí dětské ALL uváděné na str. 7 (90 %) je třeba považovat za podhodnocené – viz např. publikované výsledky léčby dle protokolu BFM 2002 z let 2002–2007, kde míra kompletních remisí dosahovala 97 % (Starý J. et al., JCO 2014). Disertace je psána běžnou češtinou s minimem překlepů.

Otázky k obhajobě:

1. Identifikovali jste expresním profilováním leukemických buněk se známou citlivostí k ASP rozdíly v expresi genů regulujících apoptózu?
2. Popište synergický antileukemický účinek ASP a inhibitorů dráhy mTOR užívaných v experimentální terapii akutní lymfoblastové leukémie.

Práci jako celek hodnotím jako výjimečně zdařilou. Přináší původní poznatky, které zásadním způsobem přispívají k objasnění mechanismu účinku ASP u akutní lymfoblastové leukémie a mají i potenciální terapeutické implikace. Krom toho koriguje v literatuře opakovaný mýtus dávající do souvislosti rezistenci k ASP s vysokou expresí genu pro ASNS *in vivo*. Diplomantka prokázala ovládnutí široké škály relevantních laboratorních metod i samostatný tvůrčí přístup k řešení problémů. Předloženou disertační práci proto doporučuji oborové radě k obhajobě. Dále doporučuji, aby po řádném vykonání obhajoby byl Mgr. Ivaně Heřmanové udělen titul Ph.D.

V Praze 31. srpna 2015



MUDr. Mgr. Cyril Šálek, Ph.D.

Ústav hematologie a krevní transfuze

U Nemocnice 1

128 20 Praha 2