

Vážený děkan Doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc

Posudek oponenta na disertační práci

Autor práce: Mgr. Ondřej Ženata

Název práce: Studium regulace transkripční aktivity androgenního receptoru

Předkládaná práce je vypracovaná na aktuální téma, má 87 stran (plus přílohy), je strukturována jako klasická dizertační práce. Obsahuje cca 30-ti stránkový úvod, detailní popis metod, poměrně rozsáhlou experimentální část a diskusi. Publikace autora týkající se této práce jsou přiloženy jako samostatné přílohy.

Cíle dizertační práce jsou jasně formulovány a vlastní dizertace dokumentuje jejich naplnění. Teoretická část poskytuje detailní úvod do problematiky androgenního receptoru (AR), jeho signalizace, posttranslačních modifikací a alternativního sestřihu. Krátká část úvodu je věnována popisu látek, které byly použity v experimentální práci autora.

Práce je psána poměrně strohou češtinou, místy je výčet informací opravdu rozsáhlý a oponent by ocenil vyšší míru empatie autora vůči čtenáři. Lepší orientaci v textu a porozumění by jistě pomohl větší počet grafických příloh (např. schéma a tabulka postranslačních modifikací AR). Dovolím si drobnou výtku k některým použitým formulacím např. „Tohle snížení proliferace ...“, str. 23 autoreferátu), „Tyhle výsledky ...“ str. 71, „Tyto data ...“ str. 68. Formální korektura jazykové stránky textu by zvedla kvalitu a čtivost práce. Oponent by ocenil i detailnější popis testovaných látek podporující celkovou motivaci pro jejich testování v kontextu funkce AR.

Metody použité v předkládané práci odpovídají současnému standardu ve výzkumu v oblasti buněčné a molekulární biologie.

Experimentální část obsahuje data pocházející ze čtyř prvoautorských prací kandidáta, z nichž tři již vyšly v impaktovaných časopisech (Journal of Cancer, Q2, Translational Cancer Research, Q4, Toxicology Letters, Q2) a jedna je v recenzním řízení. Celkem je Mgr. Ženata autorem nebo spoluautorem sedmi opublikovaných prací (Scopus) se 30-ti citacemi.

V první části práce se autor věnoval studiu účinku mykofenolátu (MYC) na signalizaci AR. Autor prokázal, že MYC ovlivňuje signalizaci zprostředkovanou AR. Výsledky práce byly publikovány v časopise *Journal of Cancer*, Q2, v roce 2018.

Druhá část je zaměřena na analýzy vlivu látky Bisfenol S (BPS), kde autor prokázal pouze omezené účinky na aktivitu AR. Získané výsledky jsou součástí článku, který byl publikován v časopise *Toxicology Letters*, Q2, v roce 2017.

Další část experimentální práce analyzovala farmakologicky relevantní koncentrace berberinu s ohledem na aktivitu AR. Autor prokázal efekt na proliferaci prostatických nádorových linií bez vazby na regulaci aktivity AR. Práce vyšla v časopise *Translational Cancer Research*, Q4.

V poslední části práce byl sledován vliv grafen oxidu (GO) na signalizaci AR. Rukopis práce je momentálně v recenzním řízení.

Závěr práce je věnován diskusi získaných výsledků na necelých osmi stranách. Ta je relativně detailní a jedná se o relevantní diskusi získaných výsledků v kontextu známé literatury.

Schopnosti dizertanta ilustruje též jeho odborný životopis dokládající jeho krátkodobou stáž v zahraničí (Jena University Hospital, Německo) a účast na dvou grantových projektech. Z pohledu oponenta je překvapivá pouze jedna účast kandidáta na vědecké konferenci (v roce 2016) za celou dobu doktorského studia.

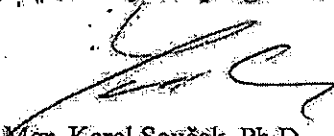
Dotazy:

- Autor ve své práci použil dvě buněčné linie odvozené od karcinomu prostaty, 22Rv1 a LNCaP. Linie 22Rv1 je derivována z xenograftu po relapsu parentální linie indukovaného kastrací. LNCaP je linie získaná z metastáze v lymfatické uzlině a nese bodovou mutaci v AR. Jak jsou tyto dva experimentální modely relevantní s ohledem na obecné cíle práce a translaci získaných výsledků do oblasti toxikologie a kliniky?
- Autor ve své práci označuje linii LNCaP jako androgen dependentní, v práci v *Toxicology Letters* ale hovoří o LNCaP jako o „androgen-sensitive“. Jak to tedy je?
- V úvodu své práce autor na různých místech zmiňuje úlohu AR v rozvoji a terapii nádoru prostaty. Ucelená část textu na toto téma v práci chybí. Mohl by autor stručně představit princip hormonální léčby nádorů prostaty a mechanismy vzniku rezistence. Jak si autor představuje další kroky základního a preklinického výzkumu, které by vedly k praktickému využití MYC v protinádorové terapii.
- V práci publikované v *Journal of Cancer* autoři diskutují možné mechanismy vysvětlující vliv MYC na proliferaci u testovaných buněk. Byly výsledky získané pomocí BrdU kitu podpořeny celkovou analýzou změny buněčného cyklu? Může autor detailněji spekulovat a možném mechanismu působení MYC na regulační mašinerii buněčného cyklu (CDK, CDKi)?

- V práci publikované v Translational Cancer Research ve obrázku 3. autor interpretuje výsledek jako zvýšení počtu časně apoptických buněk po působení berberinu. Kolikrát byl experiment nezávisle zopakován? Použil autor při optimalizaci metody pozitivní kontrolu na této konkrétní buněčné linii? Jaký je princip metody Annexin V/PI a jejího vyhodnocení?
- V části práce získané s GO byly získány rozporuplné výsledky mezi 22Rv1 a LNCaP (str. 73). Jakou sérii experimentů by autor navrhl (v případě neomezené limitace zdrojů), aby tyto rozpory do detailu objasnil.
- Jaký byl autorský podíl doktoranda při sepisování rukopisů a designu experimentů?
- V jaké fázi recenzního řízení se nachází rukopis „The effect of graphene oxide on signaling of androgen receptor“?

Práci doporučuji k obhajobě (dle § 47 VŠ zákona 111/98 Sb.). Mgr. Ondřej Ženata v předkládané práci prokazuje své samostatné tvůrčí schopnosti a dokládá, že jeho dizertační práce splňuje požadavky pro udělení titulu Ph.D. v doktorském studijním programu P1527 Biologie, obor Molekulární a buněčná biologie.

V Brně 17. září 2019


Mgr. Karel Souček, Ph.D.

Oddělení cytokinetiky,

Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.

Královopolská 135, 612 65 Brno

Tel. 541 517 166

E-mail: ksoucek@ibp.cz

Posudek disertační práce

Doktorská práce Mgr. Ondřeje Ženaty s názvem Studium regulace transkripční aktivity androgenního receptoru byla vypracována na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci ve studijním programu Biologie, studijní obor Molekulární a buněčná biologie pod odborným vedením Doc. Ing. Radima Vrzala, PhD. Práce je soubor 4 tematicky velmi podobných dílčích studií týkající se ovlivnění androgenního receptoru ligandy. Každá studie je podložena prvoautorskou recenzovanou publikací s impaktním faktorem, 3 z nich jsou již přijaté, poslední je v recenzním řízení.

Práce je napsána 37 stranách, obecná část odkazující na 173 referencí vhodně a přehledně uvádí čtenáře do problematiky androgenního receptoru. Další část doktorské disertační práce zmiňuje cíle a metody použité pro splnění cílů této práce a pro přípravu publikací. Následují přílohy, každá příloha se zabývá dílčí studií. Disertační práci uzavírá diskuze vhodně začleňující výsledky disertační práce do současného pochopení androgenního receptoru.

Práce přináší následující poznatky:

Imunosupresivní léčivo mykofenolát mofetil stimuluje aktivaci androgenního receptoru aktivovaného ligandem dihydrotestosteronem. Současně aktivuje c-Jun-N-terminální kinázovou signalizaci v buňkách 22Rv1.

Bisfenol S má synergistický efekt na dihydrotestosteronem aktivovaný androgenní receptor, i když tento efekt se odehrává ve vysokých koncentracích. Další testované nukleární receptory nebyly významněji ovlivněny; naopak autor sledoval antagonistickou aktivitu na glukokortikoidní a pregnanový X receptor.

Berberin potencuje androgenní aktivaci skrze dihydrotestosteron, i když cílový gen KLK3 nebyl významně ovlivněn.

Grafen oxid potlačuje indukovanou expresi cílového genu KLK3 na úrovni mRNA po aktivaci dihydrotestosteronem. Mechanismem je nejspíše inhibice translokace tohoto nukleárního receptoru.

Všechny práce začleněné do této disertační práce tvoří ucelený monotematický soubor studující potenciální ligandy různých struktur z různých pohledů aktivace androgenního receptoru. Autor prokázal výborné znalosti molekulární biologie androgenního receptoru, nadprůměrné experimentální dovednosti za použití velké škály buněčných i molekulárně-biologických metod i schopnost finalizovat a publikovat získaná data.

Práce je napsaná čtivě bez významnějších chyb a překlepů.

Občas bych doporučil v práci použít českou formu léčiv – např. niklosamid namísto niclosamid atd.

K práci mám následující otázky:

1. Jaké další endokrinní disruptory ovlivňují androgenní receptor, případně jiné hormonální receptory?
2. Je možno studovat proliferační vliv na zvolených testovaných buněčných liniích v delších intervalech? Šlo by takto prokázat citlivěji efekt na proliferaci? Šlo by použít kultivační média bez séra v těchto experimentech pro potlačení proliferační aktivity a vazebnosti testovaných látek?
3. Nebyly by efekty (především antagonistické) testovaných látek výraznější v kombinaci s testosteronem, který je slabší ligand androgenního receptoru?
4. Jaký je mechanismus interakcí vámi testovaných látek s androgenním receptorem? Je kompetitivní či alosterický? Šlo by tento aspekt nějak studovat?

Práce Mgr. Ženaty je kvalitní kvalifikační disertační práci po formální i obsahové stránce. Po zodpovězení otázek doporučuji komisi studijního programu i komisi pro obhajobu této práce přijetí práce k doktorskému řízení.

Prof. PharmDr. Petr Pávek, PhD
Katedra farmakologie a toxikologie
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Karlova Univerzita