



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc

V Olomouci 1. listopadu 2023

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Pediatrie

RNDr. Lenka Hrubá, asistentka Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP,
studentka prezenční formy doktorského studijního programu na LF UP v Olomouci

Téma práce: „Anticancer and Neuroprotective Activity of Nucleosides, Microtubule-Targeting”

Obhajoba se konala v Olomouci dne 27. listopadu 2023 v 14:30 hod.

Komise:

předsedkyně: prof. MUDr. Dagmar Pospíšilová, Ph.D. ✓
místopředseda: prof. MUDr. Vladimír Mihál, Ph.D. ✓
členové: prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D. ✓
prof. MUDr. František Kopřiva, Ph.D. ✓
Mgr. Jiří Kohoutek, Ph.D. ✓
doc. Ing. Milan Jakoubek, Ph.D. ✓

Oponenti:

Mgr. Jiří Kohoutek, Ph.D. ✓
Oddělení genetiky a molekulární biologie PřF MU
doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D. ✓
Ústav molekulární a translační medicíny LF UP

Školitel: MUDr. Petr Džubák, Ph.D. ✓

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo ⁶..... členů komise. Kladně hlasovalo ⁶..... členů, záporně ⁰..... členů, neplatných lístků bylo odevzdáno ⁰.....

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **RNDr. Lenka Hrubá** obhájila/~~neobhájila~~* disertační práci a doporučili/~~nedoporučili~~* udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....
prof. MUDr. Dagmar Pospíšilová, Ph.D.
předsedkyně komise

* nehodící se škrtně

Příloha k obhajobě disertační práce

RNDr. Lenka Hrubá

Studijní obor: Pediatrie

Datum obhajoby: 27.11.2023

Otázky oponentů:

Mgr. Jiří Kohoutek, Ph.D.

1. **Velice mě zaujalo, že ABC transportéry jsou schopné transportovat chemicky velmi odlišné endogenní i exogenní substráty. Jak je této schopnosti rozpoznat a aktivně transportovat různorodé látky, do a z buněk dosaženo?**

➤ *Přesný mechanismus, jakým je zajištěna tato variabilita, není znám. U Pgp byla popsána vazba substrátů uvnitř cytoplazmatické membrány s preferencí lipofilních látek, přičemž docházelo k vazbě pomocí slabých vazebných interakcí, zejména vodíkových můstků. BCRP protein naopak preferenčně váže silně hydrofilní látky. Substráty jednotlivých ABC transportérů byly ověřovány experimentálně.*

2. **Jak získané poznatky o fosforylačním stavu mTOR dráhy korelují se získanou rezistencí proti danému inhibitoru? Má některá z testovaných látek rozdílný vliv na ustanovenou rezistentní linii, a pokud ano, má pro to autorka vysvětlení?**

➤ *Zapojení ribozomálního S6 proteinu do rozvoje lékové rezistence bylo v literatuře již několikrát popsáno. Ovšem vždy se jednalo o jeho zvýšenou fosforylaci a s ní související podporu translace a buněčné proliferace. Inhibice, kterou jsme detekovali v rámci našeho projektu, je novým mechanismem, který bude dále studován. Inhibice mTOR dráhy byla popsána v souvislosti s rezistencí na 6-merkaptopurina a metotrexát, ovšem v tomto případě se jednalo o ovlivnění „upstreamových“ proteinů, konkrétně ABL kinázy, která je součástí ABL/Akt/mTOR dráhy.*

➤ *Ano, celá řada látek překonávala vzniklý rezistentní fenotyp. Velmi pravděpodobně díky odlišnému metabolismu, který nebyl u těchto rezistentních klonů ovlivněn.*

3. **Jaká další kombinovaná léčba, kromě inhibitorů transportérů a aktivujících enzymů, by mohla být benefiční pro pacienty s léčbou nukleosidy?**

➤ *Inhibice aktivačních enzymů je spíše mechanismem rezistence vůči danému cytostatiku. A právě znalost těchto mechanismů nám dává možnost využívat v rámci kombinované léčby cytostatika např. právě s jinými aktivačními enzymy, nebo jinými buněčnými cíli. Benefiční může určitě být i konjugovaná forma léčiv a to jak ve formě konjugátů s monoklonálními protilátkami, tak ve formě aptamerů, které se konjugují s nukleovými kyselinami. V obou případech je možné specifické cílení na danou nádorovou tkáň a zesílení efektivity léčby.*

➤ *Samozřejmě je možné kombinovat léčbu nukleosidovými cytostatiky také s chirurgickým odstraněním nádorové masy a radioterapií (zde je možné využít monoklonální protilátky konjugované s radionuklidy).*

4. Je skutečně Ser2 primárním místem fosforylace a následné aktivace rpS6?

- *Ne není. Omlouvám se, zde se jedná o chybu v textu. Hlavním fosforylačním a aktivačním místem ribozomálního S6 proteinu je Serin 235/236.*

5. Jaký byl důvod, že se v testování inhibičního účinku sledovaných látek použil CHKtide co by substrát pro MARK4 kinázu a v následných kinázových esejích Tau peptidy?

- *CHKtide peptid je komerční peptidový substrát, který je doporučován dodavatelem MARK4 enzymu. Proto jsme jen zvolili pro vývoj a optimalizaci metody, stejně jako pro screeningy potenciálních inhibitorů. Jakmile jsme měli vybrány nejzajímavější kandidáty, chtěli jsme se co nejvíce přiblížit reálnému Tau proteinu. Práce s proteiny je ovšem pro potřeby hmotnostní spektrometrie komplikovaná z důvodu vysoké molekulové hmotnosti a horší ionizovatelnosti. Z toho důvodu se volí spíše menší molekuly, konkrétně peptidy náležící danému proteinu.*
- *Inhibici fosforylace kompletního Tau proteinu jsme následně provedli v buněčném modelu.*

Doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

1. Většina mechanismů vzniku rezistence proti nukleosidovým cytostatikům je analogická s mechanismy již popsány v literatuře, nově je popsán vztah k dráze mTOR a inhibici proteinu rpS6 nalezli jste v literatuře nějaké indicie, jak by to mohlo fungovat, nebo bude tento vztah muset být prozkoumán zcela nově a od základů? Máte vlastní hypotézu, jak by to mohlo fungovat?

- *V literatuře jsme nenašli souvislost mezi poklesem fosforylace/ aktivity ribozomálního S6 proteinu a rozvojem rezistence. Publikace popisují zvýšenou míru exprese rpS6, která podporuje translaci a buněčnou proliferaci nádorových buněk. I přes inhibici aktivity rpS6 se ovšem naše buňky dělí a vykazují viabilitu srovnatelnou s kontrolní senzitivní linií. Translace tedy určitě není potlačena.*
- *Plánujeme otestovat míru exprese proteinové fosfatázy 1 (PP1), která defosforyluje rpS6, případně ribozomálních proteinů rpL34, který bývá nadexprimován u AML a rpL5 a L10 detekovaných ve zvýšené míře u ALL. Je možné, že dochází k poklesu aktivity rpS6 proteinu, ale zároveň může docházet ke zvýšení exprese jiného z ribozomálních proteinů.*
- *Obecnější informaci o stavu proteosyntézy a ovlivnění jednotlivých drah by nám mohla poskytnout SILAC analýza.*

2. Jak vidíte další vývoj sloučeniny LEM11152? Pokusili jste se o SAR studii, která by spolupracujícímu pracovišti doporučila změny ve struktuře, které by mohly vést k lepším vlastnostem nové molekuly? V případě, že struktura musí být utajena, prosím alespoň o obecný slovní komentář.

- *Ano, struktura látky LEM11152 byla dále modifikována a podařilo se připravit derivát s lepší inhibiční aktivitou vůči MARK4 kináze. Doposud nemáme data z testování farmakokinetických parametrů a ADME, ale vzhledem k dobré aktivitě jsme se rozhodli tyto struktury patentovat. Proto není prozatím možné jejich zveřejnění.*

Otázky členů komise:

Prof. MUDr. Dagmar Pospíšilová, Ph.D.

Defekty ribozomálních proteinů vidíme i v klinické praxi u pacientů např. s Diamond-Blackfanovou anémií. Plánujete sledovat/ sledovali jste vliv například proteinu p53, který bývá u těchto pacientů disregulovaný?

- *V současné době jsme teprve na začátku zkoumání mechanismu, jakým se může snížení aktivity některého z ribozomálních proteinů podílet na rozvoji lékové rezistence a spolu s tím na rozvoji patologických stavů, které lze pozorovat v klinické praxi. Protein p53 je určitě jedním z cílů, které budou testovány, stejně jako proteiny apoptotických drah.*
- *Komplexní přehled o proteomu těchto rezistentních buněk nám může poskytnout SILAC analýza.*

Prof. MUDr. Vladimír Mihál, Ph.D.

Jsou k dispozici centrální banky tkáňových kultur? Jaký byl důvod vlastní přípravy rezistentních linií?

- *K dispozici jsou komerčně dostupné nádorové linie. Nicméně rezistentní linie si obvykle selektuje každá laboratoř. V rámci mezi-laboratorní spolupráce by bylo možné tyto linie získat, ovšem některé linie poměrně rychle reagují na nepřítomnost cytostatika poklesem míry rezistence, navíc nemusíme mít kompletní informaci o počtu buněčných cyklů, které buňky prodělaly v rámci selekce (tj. nemusíme znát přesně jejich stáří). Navíc každá laboratoř používá různé typy nádorových/ nenádorových linií a různá cytostatika. Je tedy možné, že by námi vybraná kombinace nebyla dostupná.*

Doc. Ing. Milan Jakoubek, Ph.D.

Jaký je detekční limit MALDI-TOF metody pro stanovení aktivity MARK4 kinázy?

- *V rámci optimalizace metodiky jsme testovali rozmezí koncentrace peptidového substrátu 0,02 – 0,267 mg/ml a i při nejnižší koncentraci jsme byli schopni detekovat přítomnost substrátu. V naší metodice využíváme koncentraci 0,13 mg/ml, která byla vybrána na základě reakční rychlosti.*