

Oponentský posudek na disertační práci

Jméno oponenta: doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D.

Datum: 5. 4. 2016

Autor: Mgr. Eva Řezníčková

Název práce: Charakterizace nových inhibitorů kinas v modelových systémech in vitro

Práce Mgr. Evy Řezníčkové byla vytvořena v rámci doktorského studijního programu Biochemie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci pod vedením Doc. RNDr. Vladimíra Kryštofa, Ph.D.. Práce je zaměřena na charakterizaci protinádorových a antiparazitických účinků nových sérií nízkomolekulárních inhibitorů cyklin-dependentních kináz. Práce vytváří dobrý základ pro možný vývoj nových látek, inhibujících proliferaci nádorových buněk nebo viabilitu protozoálních parazitů. Laboratoř Doc. Strnady patří k významným pracovištím orientovaným na uvedenou problematiku a je zárukou kvalitní vědecké přípravy doktorandů.

První část práce je tvořena úvodem, zahrnujícím cíle práce a dobře napsaným a informativním přehledem problematiky, v němž jsou shrnuty základní informace o cyklin-dependentních kinázách a jejich hlavních funkcích. Hlavní část přehledu je potom věnována možnostem využití cílené inhibice cyklin-dependentních kináz v protinádorové a antiprotozoální terapii. Následuje kapitola Metodika, ve které jsou stručně, ale přehledně a výstižně popsány autorkou používané metody.

Na kapitolu Metodika navazuje nejdůležitější část práce nazvaná Komentované výsledky a diskuse. Úvodní podkapitola je věnována studiu biologické aktivity nových derivátů roskovitinu. Důraz byl kladen na zlepšení CDK-inhibičních a antiproliferačních vlastností, ale i na zdokonalení metabolické aktivity inhibitorů. Nejúčinnější látka ze série 3r vykazovala oproti roskovitinu výrazné zlepšení inhibice CDK2 i nižší průměrnou hodnotu IC₅₀ stanovenou na panelu 6 nádorových linií. U buněk nádorových linií HCT-116 a K562 došlo působením inhibitoru v nízkých mikromolárních koncentracích k zablokování buněčného cyklu i replikace DNA a také k indukci apoptózy. Nejúčinnější molekula ze série 6b vykazovala CDK-inhibiční i antiproliferační aktivitu již v nízkých nanomolárních koncentracích. U melanomových buněk linie G361 indukovala apoptózu, blokovala replikaci i průchod buněčným cyklem. V navazující podkapitole je popsáno testování dvou nových derivátů roskovitinu (BA-12 a BP-14) v modelech hepatocelulárního karcinomu. Obě látky účinně inhibovaly proliferaci HCC linií již v submikromolárních koncentracích. Na modelu diethylnitrosaminem-indukovaného karcinomu jater bylo prokázáno, že obě látky snižují velikost nádorových ložisek na povrchu jater, což naznačuje terapeutický potenciál CDK inhibitorů pro léčbu hepatocelulárního karcinomu. Třetí podkapitola se věnuje popisu studia biologické aktivity pyrazolo[4,3-d]pyrimidinových inhibitorů CDK. Testovaná látka 2i blokovala průchod buněčným cyklem, inhibovala replikaci i transkripci a indukovala v nádorových buňkách apoptózu. Navíc inhibovala angiogenezi na úrovni inhibice migrace endoteliálních buněk i tvorby tubulů. Poslední podkapitola se věnuje popisu studia antileishmaniální aktivity trisubstituovaných purinů. Látka s označením 10i v nízkých

mikromolárních koncentracích účinně inhibovala proliferaci všech testovaných druhů leishmanií včetně lidských patogenů *L. major* a *L. donovani*, aniž by ovlivnila viabilitu neproliferujících lidských fibroblastů, což naznačuje možný terapeutický potenciál látky 10i.

Ve všech podkapitolách jsou dosažené výsledky uváděné do kontextu nejnovějších poznatků v oboru. Zároveň je diskutován význam výsledků pro biomedicínu a zvláště nádorovou a infekční biologii. Kapitola Závěr obsahuje stručné a přehledné shrnutí výsledků práce a jejich významu.

V disertační práci je zahrnuto 5 publikací, kde je Eva Řezníčková spoluautorkou, z toho u dvou je první autorkou. Jedná se o kvalitní publikace, včetně publikace v časopisech *Journal of Medicinal Chemistry* a *Molecular Cancer Therapy*. Autorka byla v rámci doktorského studia ještě spoluautorkou dvou dalších publikací, patentové přihlášky a celé řady konferenčních příspěvků.

Práce je napsaná dobrou češtinou. I z hlediska literárního a grafického zpracování je velmi dobrá. To dokumentuje autorčinu snahu a schopnost prezentovat výsledky na úrovni. Drobné formální nedostatky (občasné použití „laboratorního slangu“) její úroveň nesnižují.

Podle mého názoru předložená práce jednoznačně prokazuje způsobilost Evy Řezníčkové k tvůrčí vědecké práci a odpovídá požadavkům kladeným na doktorandskou disertační práci.
Proto doporučuji, aby práce byla přijata jako základ pro řízení o udělení vědecké hodnosti Ph.D.

K práci mám následující otázky:

Na straně 47 píšete: „...působením vyšších koncentrací 2i (40 μ M) (proapoptotický účinek) téměř vymizel a výrazně převažoval cytostatický účinek látky 2i nad cytotoxickým. To může být patrně důsledkem odlišného inhibičního profilu cílových kinas při působení různých koncentrací látky 2i.“ Máte o tom nějakou konkrétnější představu, případně – máte něco podobného konkrétněji doloženo doloženo pro jinou látku?

Jakými v současné době známými mechanismy ovlivňují CDK (např. CDK5 a 7) buněčnou migraci?

Podpis oponenta:



Doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D.



Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty UK v Praze

Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.
Hlavova 2030
127 43 Praha 2

Tel +420 220183 218

3.6. 2016

Oponentský posudek na práci

“Charakterizace nových inhibitorů kinas v modelových systémech in vitro”

(disertační práce)

Mgr. Eva Řezníčková

Paní *Mgr. Eva Řezníčková* předkládá disertační práci, vypracovanou v Laboratoři růstových regulátorů při Přírodovědecké fakultě University Palackého v Olomouci pod vedením Doc. Vladimíra Kryštofa. Práce je vypracována jako shrnutí o 81 stránkách s pěti přílohami, které obsahují odborné práce autorky.

Autorka ve své disertační práci nejprve v teoretickém úvodu shrnuje současný stav řešené problematiky, kde se soustředí na úlohu cyklin-dependentních kinas v regulaci buněčného cyklu i dalších procesů. Brzo pak přechází na shrnutí literárních údajů o známých inhibitech CDK a jejich SAR. Teoretická část práce je zakončena stručným přehledem literatury o hepatocelulárním antigenu a o CDK jako potenciálním cíli antiparasitární terapie. Úvod je tak nutně poněkud heterogenní. Přehlednosti výkladu by velmi prospělo více obrázků nebo schémat, zejména výklad o vztahu mezi strukturou a aktivitou inhibitorů CDK nebo o alosterických inhibitech těchto kinas je bez zobrazení struktury proteinu s vyznačením vazebného modu inhibitorů těžko srozumitelný.

V experimentální části se stručně popisují metody, použité při práci na disertaci, které zahrnují zejména práci s buněčnými kulturami nádorových buněk, fluorometrická stanovení aktivit kaspas a analýsu buněčného cyklu a transkripce. Autorka se zřejmě během svých zahraničních pobytů zabývala i testováním některých sloučenin na zvířecích modelech.

V další části (Výsledky a Diskuse), autorka potvrzuje schopnost těchto metod využívat, racionálně experimenty analyzovat a střizlivě zhodnotit jejich výsledky. Disertantka zde popisuje biologickou aktivitu nových derivátů roskovitinu připravených modifikací výchozího purinového skeletu v polohách 2, 6 a 9 a výsledky jejich testování na nádorových liniích. Z výsledků plyne, že se podařilo připravit některé z nejúčinnějších známých inhibitorů CDK založených na purinovém skeletu. Dva vybrané inhibitory byly dále testovány na modelech hepatocelulárního karcinomu (jak *ex vivo*, tak i na zvířecím modelu) s povzbuzujícími výsledky.

Dále se shrnují výsledky získané studiem bioisosterů purinového skeletu, látek s pyrazolo [4,3-*d*]pyrimidinovým skeletem. Touto modifikací byly připraveny látky s novou specitou vůči některým CDK a tím i novou aktivitou (inhibice angiogeneze), která může mít zajímavý terapeutický potenciál.

Velmi bych ocenil skutečnost, že v laboratoři disertantky nezůstali u testování protinádorových aktivit nově připravených látek, ale velmi předvídavě rozšířili spektrum testovaných cílů i na antiparazitární účinky. U některých látek byla prokázána jejich antileishmaniální aktivita, a mohou se tak stát základem dalšího velmi slibného medicíně-chemického výzkumu.

Z formálního hlediska je práce v pořádku, byť mne trochu zklamal takřka chybějící obrazový materiál. Práce má málo překlepů a čeština je celkem v pořádku. Jen na důkaz toho, že jsem práci opravdu četl, uvádím chybějící název časopisu v odkazu Shu *et al.* na str. 71.

Předkládaná disertace popisuje experimentální výsledky na téma vztahu mezi strukturou a aktivitou inhibitorů CDK, které autorka zveřejnila v sedmi odborných publikacích ve špičkových nebo velmi dobrých mezinárodních časopisech (J. Med. Chem., Eur. J. Med. Chem., Bioorg. Med. Chem. nebo Mol. Cancer Ther.). Pohledem do Web of Science zjišťujeme, že její práce k dnešnímu dni nasbíraly už 37 citací, což jistě svědčí o jejich kvalitě, stejně jako o aktualitě tématu a renomé školitelské laboratoře.

Rád bych autorce v rámci diskuse položil několik otázek:

1/ Co je známo o farmakokinetických vlastnostech testovaných sloučenin, např. derivátu roskovitinu 6b (Příloha II)?

2/ Při vší úctě ke Karlu Berkovi a škole Pavla Hobzy, molekulární modelování nemůže „prokázat rozdíl v účinnosti“ žádných dvou látek (str. 47 disertace), modelování může přispět k predikci nebo interpretaci experimentálních dat, nemůže je nahradit. Nicméně, je trochu překvapivé, že po letech úspěšného medicínálně chemického výzkumu inhibitorů CDK nejsou k dispozici struktury jejich komplexů s cílovými proteiny. Pokusila se disertantka o podobnou strukturně biologickou studii a v čem spočívají případné technické obtíže?

3/ Prostorová struktura by byla velmi zajímavá i při studiu aktivity inhibitorů CDK účinných proti leishmaniím. Zkoušely se tyto nebo podobné deriváty proti jiným parazitům, případně proti virům? Jsou v laboratoři kandidátky, případně v literatuře data o případném zniku resistance proti inhibitorům CDK u parazitů? Lze vznik resistance očekávat a jaký by mohl být jeho mechanismus?

Na závěr s potěšením konstatuji, že předložená práce Mgr. Evy Řezníčkové zcela naplňuje i velmi náročné požadavky kladené na disertační práci v oboru biochemie a plně ji proto doporučuji k obhajobě.

V Praze, 3.6. 2016

Jan Konvalinka