

Oponentský posudek

doktorské disertační práce Mgr. Michalely Frýbortové, vypracované na téma „Molekulární biofyzika a farmakologie nových protinádorově účinných metalofarmak“

Předložená disertační práce se zabývá studiem mechanismu účinku nových sloučenin platiny s biologickou aktivitou, především nového komplexu $\text{trans-[Pt(NH}_2\text{CH}_2\text{)Cl}_2\text{]}$. Dále jsou v práci také zahrnuty výsledky získané při přípravě a studiu transkripčního faktoru STAT3 a studiu jeho role v mechanismu protinádorového účinku komplexů platiny. Jde o práci, která řeší problematiku zajímavou a aktuální, především z hlediska základního výzkumu.

Práce je členěna obvyklým způsobem na teoretickou a praktickou část, rozsah obou částí je vyvážený. V teoretické části autorka shrnuje dosavadní znalosti o dané problematice. Po obsahové stránce je tato kapitola zpracována dobře a svědčí o autorčině dobré orientaci v odborné literatuře. Bohužel dojem z teoretické části poněkud snižuje řada formálních nedostatků, především překlepů a chybných formulací (např. N7 guanin, Watson-Crikové hybridizace, Watson-Crikového párování, mezi deoxyriboguanosinem a komplementárním deoxyribocytosinem, oxaloplatin, protein-DNA interakce uvedená ve výčtu hlavních aduktů tvořených cisplatinou na DNA - popis k obr.3 atd). V některých případech tyto nedostatky bohužel znesnadňují pochopení textu. Např. na str. 13 „... při koncentraci vyšší buňky zůstaly v G2 fázi následujícím spuštěním apoptózy“; na str. 20 „Iminoetherové ligandy představují alifatické a aromatické aminy ...“; „ASO se po proniknutí do vnitrobuněčného prostoru buňky musí střezit endozomálními organelám“; poslední věta na str. 20 a na ni navazující věta na další straně se vzájemně vylučují atd. Také obr. 16 vypadá poněkud neobvykle, alespoň co se týče nábojů.

Kromě toho bych autorce vytkla nejednotnost v používání českého chemického názvosloví - názvy kapitol 1.2.2.1-1.2.2.5 obsahují slovo „platnaté“ komplexy, což odkazuje na fakt, že tyto sloučeniny obsahují Pt v oxidačním stupni II. Poté následuje kapitola 1.2.2.6 s názvem „Trans –platičité komplexy“, což napovídá, že popisované komplexy obsahují čtyřmocnou platínu. Bezprostředně pak následují další dvě kapitoly nazvané „platinové komplexy“. Má si snad čtenář myslet, že tyto komplexy obsahují Pt atom v oxidačním stupni VI, jak by se podle zvoleného názvu a pravidel chemického názvosloví použitého v předchozích kapitolách dalo předpokládat?

V kapitolách týkajících se proteinu STAT3 a jeho funkcí chybí řada základních údajů. Například, i když je podrobně popsána funkce celá řada domén, doména zodpovědná za vazbu na DNA je zcela opominuta (její existenci si čtenář odvodí pouze z obrázku), což je vzhledem k tomu, že autorka v práci studovala právě vazbu na DNA, poněkud překvapující.

V praktické části autorka jednak popisuje metody, které v rámci své práce použila (kapitola 3 Materiál a metody) a dále popisuje a diskutuje výsledky, které v rámci svého doktorského studia dosáhla (kapitola 4 Výsledky a diskuze).

Výsledky jsou rozčleneny do tří hlavních celků, odpovídajícím příslušnému studovanému tématu. Obecně je z předložené práce patrný kvalitativní rozdíl mezi kapitolami, obsahujícími již publikované výsledky (kapitoly 4.1 a 4.2) a kapitolou, která obsahuje výsledky, které nejsou zahrnuty v přiložených publikacích (kapitola 4.3). V kapitoly 4.1 a 4.2. jsou velmi dobře zpracovány a lze jim jen obtížně cokoli vytknout, což je patrné i z toho, že výsledky i jejich zpracování prošly náročným recenzním řízením v renomovaných odborných časopisech. Naproti tomu v kapitole 4.3. jsou výsledky, i když bezpochyby zajímavé a kvalitní, popsány poněkud chaoticky. Není zde zmíněna řada důležitých údajů, např. jaká byla zvolená konsenzuální sekvence (informaci o tom, že vazba STAT3 je sekvenčně závislá, může čtenář najít jen „mezi řádky“, explicitně toto nikde zmíněno není), jak byla DNA modifikována, jak byla modifikace ověřena apod. I když se jedná o zatím nepublikované, z větší části patrně předběžné výsledky, domnívám se, že tyto údaje měly být uvedeny.

K práci mám následující připomínky a dotazy.

- i) Na str. 20 v kapitole 1.2.2.2 se píše „Tyto komplexy jsou převážně monofukční s rychlostí vazby podobné transplatině“. Mohla by autorka toto tvrzení objasnit? Obecný vzorec komplexů uvedený pro tyto sloučeniny obsahuje Cl ligandy, které by mohly být považovány za snadno hydrolyzovatelné – proč tomu tak není?
- ii) Kapitola 1.2.2.3. nese název „Trans-karboxylato platnaté komplexy“, všechny komplexy v ní zmiňované jsou však v konfiguraci cis. Mohla by autorka uvést nějaký příklad trans-karboxylato platnatého komplexu?

- iii) Na str. 18 je uvedeno "Po vytvoření monofunkčního aduktu musí tento adukt rotovat okolo glykosidové vazby a přejít z konformace anti do konformace syn, aby mohlo reagovat s komplementárním cytozinem". Mohla by autorka vysvětlit, co si představuje pod pojmem rotace aduktu?
- iv) V kapitole materiál a metody je uvedeno, že pro značení T4PNK bylo využito [γ - 32 P]dATP. Je to opravdu tak?
- v) Při měření kinetiky vazby Pt-sloučenin na DNA použila autorka metodu DPP s Pt-drátkem jako pomocnou elektrodou. Nemůže přítomnost platiny ponořené do měřeného roztoku (s H_2SO_4 a hydrazinem) vadit při přesném stanovení koncentrace platiny v tomto roztoku?
- vi) Jak souvisí obrázek na str. 44 s textem, u něhož je uveden? Proč autorka soudí, že metoda v textu popisovaná slouží ke studiu excisní nukleotidové opravy?
- vii) V kapitole 3.10 je u popisu stanovení cytotoxicity uvedeno: „Procento cytotoxicity se vypočítá jako podíl absorbance buněk s daným komplexem a absorbance kontroly s rozpouštědlem x 100“. Mohla by autorka stručně popsat, na čem je metoda MTT založena, co je příčinou zbarvení, jehož intenzita se stanovuje a jak je tato intenzita ovlivněna cytotoxickým působením chemických látek. Kdyby autorka opravdu počítala podle uvedeného postupu, naměřila by s rostoucí koncentrací cytotoxické látky rostoucí cytotoxicitu?
- viii) V kapitole 3.11 se uvádí: „Monofunkční adukty syntézu RNA nezastavují“, nicméně v kapitole 1.2.2. je uvedeno, komplexy tam zmiňované tvořící převážně monofunkční adukty RNA polymerázu zastavují. Jak tomu tedy je?
- ix) V závěru práce (kapitola 5) je uvedeno, že vazebná místa pro cisplatinu v oligonukleotidu byla modifikována, zjištěna inhibice vazby STAT 3 a že podobné výsledky byly také získány pro fragment DNA modifikovaný globálně. Bohužel z popisu výsledků není patrné, který výsledek byl získán s globálně modifikovanou DNA a který se specifickou modifikací, jak se tato specifická modifikace prováděla apod. Mohla by autorka uvést konkrétnější informace?

Předložená disertační práce, i přes všechny zmíněné připomínky, obsahuje velmi kvalitní výsledky, publikované v renomovaných časopisech. Vysoká kvalita předložených výsledků, a to i s ohledem na mezinárodní úroveň oboru, je tedy zřejmá. Práce splňuje podle mého soudu všechny předpoklady, které jsou na díla tohoto typu kladeny, a proto ji **doporučuji** k obhajobě.

V Olomouci 13. 8. 2014

prof. RNDr. Jana Kašpárková, PhD.

Oponentský posudek disertační práce

Mgr. Michaela Frýbortová

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Molekulární biofyzika a farmakologie nových protinádorově účinných metalofarmak

Disertační práce Mgr. Michaely Frýbortové shrnuje výsledky, které uchazečka získala při studiu mechanismu působení nového, potenciálně protinádorově účinného platinového komplexu a při analýze stability vnitřetězcového můstku mezi dvěma guaniny oddělenými libovolnou bází, který představuje hlavní adukt po vazbě studovaného komplexu na dvouřetězcovou DNA. Práce je dále doplněna dosud nepublikovanými výsledky získanými při zkoumání role proteinu STAT3 v mechanismu biologického působení vybraných komplexů platiny. Studovaný platnatý komplex vykazuje slibnou protinádorovou aktivitu *in vitro* a to i v buňkách rezistentních k cisplatině. Je zajímavý tím, že patří do skupiny komplexů s *trans*-geometrií odstupujících ligandů, které byly po dlouhou dobu považovány za protinádorově neaktivní a jejich vývoj byl proto opomíjen. Zvýšená reaktivita komplexu a rychlá izomerizace hlavního aduktu, vnitřetězcového můstku, na meziřetězcový, nabízí možnost dalšího využití komplexu v „antisense“ nebo „antigene“ terapii.

Předložená práce má rozsah 71 stran a je strukturována obvyklým způsobem. Teoretická část shrnuje současný stav znalostí o mechanismu působení platinových cytostatik a poskytuje přehled o nových protinádorově aktivních komplexech s *trans*-geometrií odstupujících ligandů, odvozených od protinádorově neaktivní transplatiny. V následující kapitole autorka vysvětluje možnosti použití platinových komplexů v „antisense“ a „antigene“ technologiích. Závěr teoretické části patří popisu funkce proteinu STAT3 a jeho účasti v klíčových procesech vývoje malignit. Následují cíle práce, které jsou stručně a srozumitelně formulovány a popis použitých experimentálních technik. V kapitole „Výsledky a diskuze“ jsou popsány a podrobně diskutovány získané výsledky, které jsou následně přehledně shrnuty v kapitole „Závěr“. Práce je doplněna přílohou s kopiemi dvou publikací, které vyšly nebo byly přijaty do tisku v kvalitních impaktovaných časopisech a uchazečka je jejich hlavní autorkou.

Text práce má kolísavou úroveň. Některé kapitoly, např. „Výsledky a diskuze“ a „Závěr“, podobně jako abstrakty v českém i anglickém jazyce nebo autoreferát mají poměrně slušnou jazykovou úroveň a obsahují jen omezené množství chyb či překlepů. Na druhé straně, úroveň kapitol „Úvod“ a „Materiál a metody“ je nižší. Namátkou bych uvedl střídavé používání „resistentní“ a „rezistentní“ nebo „baze“ a „báze“, výskyt slangového výrazu „kroslink“ místo „můstek“ (str. 28 a autoreferát str. 39) či chybné skloňování Watson-Crickova a Hoogsteenova párování (str. 24 a 25 a autoreferát str. 20). Také formulace některých vět je, mírně řečeno, kostrbatá. Autorka se dopustila i některých nepřesností, k nimž bych měl následující otázky:

Na str. 17, na konci prvního odstavce je uvedeno, že RNA polymerázy dokáží poměrně snadno překonat vnitřetězcové můstky tvořené transplatinou. Je tomu skutečně tak? Jak obtížné je pro RNA polymerázy překonávat bifunkční adukty?

Na str. 17, ve druhém odstavci se uvádí, že transplatina tvoří monoadukty, které jsou velmi účinně opravovány. Jaká je účinnost opravy těchto aduktů ve srovnání s bifunkčními adukty?

Na str. 20, v posledním odstavci se píše, že popisované *trans*-platnaté komplexy jsou převážně monofunkční. Opravdu?

Na str. 28, v prvním odstavci se uvádí, že transplatina vytváří 1,3-vnitřetězcové můstky v sekvenci GNG a ANG (kde N je libovolný nukleotid, kromě guaninu). Je opravdu nezbytné, aby prostřední nukleotid neobsahoval guanin?

Ke kapitole „Materiál a výsledky“ mám následující připomínky:

Tvrzení na str. 40 v prvním odstavci, že teplota tání DNA modifikované platinovými komplexy silně závisí na koncentraci kationtů v médiu, je poněkud nešikovné či neúplné, jelikož totéž platí i pro nemoifikovanou DNA.

Na str. 42 v předposledním odstavci je nepřesně uvedeno, že ethanol byl po přesrážení DNA odstraněn odpařením v exikátoru, i když se to zřejmě týká jen zbytkového ethanolu po odstranění supernatantu.

K získaným výsledkům bych měl ještě jednu otázku:

Dokázala by autorka vyslovit nějakou hypotézu, která by mohla vysvětlit přítomnost 67 % vnitřetězcových můstků vytvořených studovaným komplexem na plasmidové DNA po 24h inkubaci, přestože stejný typ aduktu na krátkých oligonukleotidech je stabilní pouze na jednořetězcové DNA a po hybridizaci s komplementárním řetězcem rychle izomerizuje na meziřetězcový můstek?

Přes veškeré výše uvedené výhrady, zejména k teoretické části, se domnívám, že autorka dosáhla kvalitních výsledků a že předložená práce spolu s vědeckými publikacemi, které jsou její součástí, splňuje požadavky kladené na disertační práci ve studijním oboru Biofyzika, a proto ji **doporučuji** k obhajobě.

V Brně dne 29. července 2014


Mgr. Jaroslav Malina, Ph.D.

Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.

Královopolská 135

612 65 Brno