

Oponentský posudek disertační práce

„Vývoj strategií pro cílenou eliminaci buněk CLL s mutacemi v genu TP53“

Doktorand: Mgr. Miroslav Boudný

Oponent: Mgr. Michal Šmída, Ph.D.

Předložená disertační práce se zabývá velmi aktuální problematikou cílené terapie u chronické lymfocytární leukémie (CLL). I přes úspěšné zavedení tří nových cílených inhibitorů do klinické praxe, zůstává CLL nevyléčitelnou nemocí. Je tedy stále nutné hledat další terapeutické strategie, resp. jejich kombinace pro zlepšení léčebné odpovědi. Tato práce předkládá jednu takovou strategii. Práce si vzala za cíl otestovat účinnost nově vyvinutého specifického inhibitoru CHK1. Doktorand nejprve ověřil funkčnost inhibitoru na různých leukemických a lymfoidních liniích a potvrdil, že u nich skutečně dochází k inhibici CHK1 aktivity a následně k letalitě těchto linií. CHK1 inhibitor navíc působil synergicky s chemoterapeutickými agens. Poté přistoupil doktorand k testování primárních patientských CLL vzorků a to jak v systému napodobujícím mikroprostředí lymfatických orgánů, tak i vzorků nestimulovaných. Také zde se podařilo prokázat, že CHK1 inhibitor tlumí aktivaci CHK1 dráhy, indukuje replikační stres a vede k usmrcení buněk. Kupodivu nebyl prokázán žádný rozdíl mezi wild-type vzorky a vzorky s mutací (popř. delecí) v *ATM* či *TP53* genech. Na závěr se podařilo prokázat účinnost CHK1 inhibitoru také *in vivo* na myším modelu. CHK1 inhibitor se tak jeví jako slibná strategie, která by mohla pravděpodobně specificky eliminovat CLL buňky (nejspíše v kombinaci s jinými inhibitory) a to i u nejagresivnějších forem CLL s mutacemi v genu *TP53*.

Práce je velmi kvalitní, pěkně a čtivě napsaná, je rozdělena do standardních částí, které na sebe logicky navazují. V celé práci se téměř nevyskytuje žádný překlep či chyba. Vzájemný poměr jednotlivých kapitol je vyvážený. Teoretický úvod pěkně shrnuje relevantní aktuální poznatky o CLL, funkci CHK1 a inhibici CHK1 u leukémií. Jen myslím, že by doktorand neměl v rámci literární rešerše v kapitole „Úvod“ citovat svoji vlastní publikaci, jejíž výsledky jsou předmětem této disertační práce. Rovněž bych neuváděl již v kapitole „Metody“ výsledky viability testovaných vzorků vůči CHK1 inhibitoru. Metody jsou velmi pěkně popsány, jen není téměř v celé práci zmínka o počtu replik a opakování

jednotlivých experimentů. Výsledky i diskuze jsou členěny do logicky navazujících částí, které reflektují stanovené cíle. Cíle vytyčené na začátku práce se doktorandovi podařilo splnit. Nicméně mi název práce přijde poněkud zavádějící, jelikož implikuje, že bude doktorand vyvíjet terapii specificky pro *TP53*-mutované CLL subtypy, což se rozhodně neděje.

Výsledky předložené práce vedly k jedné prvoautorské publikaci v zahraničním časopise.

K práci bych měl několik připomínek a dotazů:

- 1) V práci je několikrát zmíněno, že aplikace MU380 zvyšuje množství dvouřetězcových zlomů DNA (měřeno pomocí gH2AX). Jakým molekulárním mechanismem vede inhibice CHK1 kinázy ke vzniku dvouřetězcových zlomů DNA?
- 2) Zkoušel doktorand asociovat citlivost na MU380 u patientských CLL vzorků v závislosti na předchozí terapii cílenými inhibitory versus klasickou chemo(imuno)terapií? Tedy, má inhibice BCR signalizace vliv na citlivost k MU380?
- 3) Na základě čeho byla stanovena dávka 20 mg/kg MU380 pro *in vivo* aplikaci? Vedla by vyšší dávka k lepší odpovědi? V práci chybí křivky přežití i jakákoliv zmínka o případné toxicitě. V myším modelu nebyla u nádorů z MU380 léčených myši detekována aktivace apoptózy. Jak tedy funguje účinek MU380 *in vivo*? Provedl doktorand barvení na Ki67 u nádorů po aplikaci MU380?
- 4) V obr. 44 na str. 56 je patrná silná synergie Fludarabinu plus MU380 v aktivaci p53 cílových genů u buněčné linie NALM-6, kdežto u primárních CLL buněk není žádný efekt. Jak si doktorand vysvětluje tuto diskrepanci? Testoval i jiné buněčné linie?
- 5) Signální dráha ATR-CHK1 by měla být synteticky letální s ATM-CHK2 drahou. Jak to, že student nepozoroval rozdíly v citlivosti u ATM-mutovaných vzorků versus wild-type vzorků?

Závěrem bych rád konstatoval, že doktorand prokázal tvůrčí schopnosti a předložená práce splnila požadavky standardně kladené na disertační práci v oboru Onkologie a hematologie. Předloženou disertační práci doporučuji k obhajobě (podle § 47 VŠ zákona 111/98 Sb.) a doktorandovi udělení titulu Ph.D.

V Brně dne 03. 12. 2019

Mgr. Michal Šmída, Ph.D.
CEITEC MU