



Katedra biochemie
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova
Hlavova 8
12840 Praha 2
Tel. +2-2195-1285 Fax. +2-2195-1283
miroslav.sulc@natur.cuni.cz.

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Lucie Lorkové

Proteomické přístupy ke studiu nádorových onemocnění

Předkládaná disertační práce je založena na souhrnu výsledků tří recenzovaných vědeckých článků v kvalitních impaktovaných časopisech. V souladu s pravidly jedna práce je prvoautorskou publikací. Všechny články řeší aktuální problematiku studia mechanismů a rozvoje nádorových nemocí a následného rozvoje rezistencí na použitá léčiva především proteomickými, ale i dalšími experimentálními přístupy (např. molekulárně biologickými). Nejen prezentovaná studie nádorové resistance, ale i další práce obsahují aplikační potenciál tohoto veskrze základního výzkumu do klinické praxe.

Ačkoli z celkového pohledu působí text práce poměrně nevyrovnaně, obsahuje skutečně čtivě napsané pasáže, které jsou ale ve většině českým překladem originálních publikací. Kromě těchto částí textu jsou součástí práce i partie, které svou kvalitou jak formální tak formální působí často značně rozporuplně. Některé tyto části jsou napsány kvalitně o dalších to bohužel konstatovat nemohu. Zvláště tyto pasáže jsou poměrně značně zatíženy množstvím překlepů a formálních nedostatků (např. na str. 14 v typickém proteomickém experimentu..., separována některou ze vhodných..., či z puristického hlediska nesprávné použití zkratky MALDI-MS na straně 52). Jako příklad formální neobratnosti si dovoluji uvést větu ze strany 60 (2-DE elektroforéza je přes svá omezení metodou k analýze proteomu nebo alespoň k části proteomu, představující hojně solubilní proteiny, jak jsme v našich pracích demonstrovali, přesto je však na ústupu a její vůdčí místo přebírají "shot-gun" metody.), nebo věta na začátku odstavce na straně 62 (a tak se v sérovém ...stále nacházel depletované proteiny v dostatečném množství k jejich detekci.). Navíc se v textu objevují opakující se části, tak jako v případě poslední citované věty. Na druhou stranu text netrpí výskytem anglickanismů či laboratorního žargonu. Další formální připomínkou je absence data u všech webových citací, a časté používání zkratk bez jejich vysvětlení při prvním použití v textu či v seznamu zkratk (např. BRCA1, TP53, Bcl-2, Bcl-X, ...). Přítomnost těchto jazykových a formálních nepřesností/neobratností působí značně rušivě a čtenáři příliš neusnadňují procházení textu.

V úvodu je čtenář postupně uveden do tématu s uvedeným přehledem použitých metod, který obsahuje řadu potřebných informací pro pochopení metodické a následně i výsledkové části a diskuse. V úvodu je ale i několik tvrzení, především v kapitole 2.5. Hmotnostní spektrometrie, s kterými nemohu souhlasit. Již obecné schéma "jednotlivých kroků analýzy v hmotnostní spektrometrii" uvedené na straně 9 obsahuje nepřesnosti jako citované tvrzení: "-detekce iontů, stanovení m/z a určení relativní intenzity jednotlivých iontů v detektoru". Při vysvětlení zkratky MALDI chybí objasnění Desorption. Na straně 10 je popisována Coulombická exploze nepřesně/neúplně uvedeným principem. Při popisu vlastností MALDI matrice, slabá organická kyselina, je opět uvedena nepřesná informace (dle mého názoru by formulace mohla znít: "v případě použití UV laseru se jedná o

aromatickou slabou kyselinu"). Je energie laseru převážně "adsorbována" maticí? V uvedených principech analyzátorů není principem TOF analyzátoru různá doba letu, to je důsledek. Co je tedy principem a počáteční podmínkou tohoto analyzátoru? Opravdu lineární past používá Fourierovu transformaci a je kombinací analyzátoru a detektoru? Lze provést tandemovou hmotností spektrometrii MS/MS i bez spojené dvou a více hmotnostních analyzátorů, jak je tvrzeno na straně 11?

Výsledková část obsahuje tři tematické okruhy shrnující informace z použitých publikací. Předkládané výsledky jsou objasněny v kontextu již známých informací z literárních zdrojů, které ukazují široký literární přehled a metodickou erudici autorů článků. Proto i komentáře převzaté z originálních publikací jsou fundované, kritické a bezesporu kvalitní. Nevím, do jaké míry participoval na této části textu školitel, Doc. RNDr. J. Petrák, Ph.D., ale minimálně předpokládám předání tohoto kritického a současně syntetického pohledu na získané výsledky v průběhu školení předkladatelky.

V první prvoautorské publikaci, jsou různými proteomickými přístupy charakterizovány reálné klinické vzorky ve srovnání s kontrolními s cílem nalezení kandidátních proteinů pro včasnou diagnostiku ovariaálního karcinomu. Zde velmi oceňuji komentář použitých metodik a také diskusi, ve které byl dán návrh vysvětlení rozdílné identifikace kandidátního biomarkeru RBP4 po použití MARS 14 kolony nebo postupu "ProteoMiner" firmy Biorad. Současně oceňuji nastínění probíhající diskuse nad principem metodiky "ProteoMiner". Můžete ji přiblížit? Velmi se mi také líbí skutečně kritická interpretace výsledků identifikace biomarkeru RBP4, kdy postupně byly vyloučeny jednoduše se nabízející interpretace.

Ve vaší diskusi uvádíte jednu z interpretací výsledků jako možné změny v metabolismu retinoidů, jaké máte konkrétně na mysli?

Další dvě práce řeší problematiku objasnění mechanismus vzniku nádorových rezistencí.

V prvním případě lymfomu z buněk plášťové zóny na cytarabin, kde byla použita řada experimentálních technik na ověření *in vitro* studie a možný přenos výsledků do klinické praxe. Zde se mi líbí provedená detekce exprese na úrovni mRNA a proteinů v primárních buňkách získaných z pacientů, která podporuje získané výsledky *in vitro* studie. Uvádíte, že u pěti pacientů s relapsem či progresí jste pozorovali sníženou expresi DCK. Škoda, že toto tvrzení není v textu práce podpořeno experimentálními daty, tak jako u publikace.

Jak si vysvětlujete sníženou expresi u jednoho pacienta jen na úrovni proteinu?

Současně použití xenotransplantačního modelu testování toxicity protinádorových molekul na cytarabin rezistentní MCL buňky v *in vivo* systému podporuje relevanci získaných *in vitro* výsledků a jejich aplikační potenciál do klinické praxe.

Můžete mi detailněji vysvětlit experimentální popis kontrolních experimentů xenotransplantačního modelu?

Bohužel i v této části jinak překrásné studie trpí text formálními chybami (např. chyby v tabulce 2 na straně 42).

V poslední publikaci je studována populace buněk MCL rezistentních na molekulu TRAIL. K úvodu této problematiky si neodpustím otázku, proč "caspázy" uvádíte v počestlé formě caspázy. Proč je dle mého názoru vhodnější psát "caspázy", a jaká je jejich enzymová aktivita?

Proč není uvedena relativní exprese metodou w. blot třetího identifikovaného proteinu IMPDH2 v HBL-2 a HBL-2/R?

Předkládaná disertační práce přes všechny komentáře a výhrady je podložena kvalitně odvedenou prací a třemi skutečně pěknými publikacemi, a proto dle mého názoru splňuje požadavky kladené na disertační práci. Autorka v publikacích prokázala schopnost přesné experimentální práce, korektní analýzy a diskuse. Vědeckou erudici a tvůrčí potenciál ilustruje aplikovatelnost získaných výsledků pro klinickou praxi.

Podle Studijního a zkušebního řádu 1. Lékařské fakulty UK v Praze proto doporučuji předloženou práci Mgr. Lucie Lorkové přijmout k obhajobě, protože prokazuje předpoklady autorky k samostatné experimentální vědecké práci. Současně na základě úspěšné obhajoby doporučuji udělení titulu „Ph.D.“ předkladatelce, Mgr. Lucii Lorkové.

V Praze dne 29. září 2014


Doc. Miroslav Šulc, PhD.
katedra biochemie PŘF-UK