



Oponentský posudek disertační práce

„Proteomické přístupy ke studiu nádorových onemocnění“

Ing. Lucie Lorková

**1. LF UK v Praze,
studijní program Biomedicína,
studijní obor „Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie“.**

**Školitel: Doc. RNDr. J. Petrák, Ph.D.
Laboratoř klinické proteomiky
Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK v Praze**

Obecná charakteristika

Disertační práce v pevné vazbě formátu A4 má rozsah 112 stran (včetně použité literatury a prací autora se vztahem ke studované problematice - 3 publikací, z toho 1x jako první autor (ze 7 autorů, IF 2,29), 1x jako druhý autor (z 16 autorů, IF 5,39) a 1x jako třetí autor (ze 7 autorů). Práce je členěna do kapitol zahrnujících: 1. Úvod, 2. Literární přehled, 3) Výsledky – „ Proteomika jako nástroj k analýze nádorových onemocnění“ se třemi podkapitoly věnovaných jednotlivým studiím, 4) Shrnutí a diskuze, 5. Použitá literatura, 7. Příloha – Publikace.

Cíle práce

Hlavní cíl disertace je v podstatě formulován názvem celé práce, a to „Proteomické přístupy ke studiu nádorových onemocnění“.

Specifické cíle jsou jasně uvedeny u jednotlivých prací ve výsledkové části: 1) Identifikace nových biomarkerů pro časnou diagnózu ovariaálního karcinomu; 2) Studium molekulárních mechanismů rezistence lymfomu z buněk pláštěvé zóny (MCL) na cytarabin; 3) hledání nových molekulárních terčů selektivních pro odstranění TRAIL resistantních MCL buněk.

Dosažené výsledky

První část předkládané práce se zaměřuje na proteomickou analýzu sér pacientek s karcinomem ovaria. V tomto případě jde o analýzu reálných vzorků pacientů, tudíž zde hraje velkou roli odběr a skladování vzorků, a velice pečlivý výběr skupin pacientů v rámci klinických ukazatelů, ale i kontrolní skupiny. Při analýze byly využity dvě kombinace technik: a) imunodeplece a shotgun MS, b) hexapeptidová knihovna a 2-DE. Podstatné je oddělení vysoce abundantních proteinů sera, aby byl umožněn přístup k méně abundantním proteinům. Obě kombinace technik poskytly celkem 3 proteiny s rozdílnou koncentrací v sérech pacientek s karcinomem ovaria oproti kontrolní skupině, z toho změny 2 proteinů (APOA4 a RBP4) byly potvrzeny u obou postupů. Jediným dosud nepublikovaným proteinem v této souvislosti je RBP4, takže bylo pochopitelné zaměřit se na ověření pozorovaného poklesu RBP4 v jednotlivých vzorcích pacientek a zdravých žen. Western blot potvrdil tento pokles a ELISA poskytla absolutní kvantifikaci a signifikantní pokles u pacientek oproti zdravým ženám.

Použití proteomického přístupu se osvědčilo, otázkou zůstává specifická i selektivita takového potenciálního markeru jako RBP4 pro ovariaální karcinom. Jakým způsobem by bylo možné tyto kritické parametry marker zvýšit?



Ve druhé práci byla proteomická a transkriptomová analýza aplikovaná ke sledování mechanismů rezistence MCL buněk na cytarabin – zástupce chemoterapeutik ze skupiny nukleosidových anti – metabolitů. Na počátku studia byly využity buněčné linie odvozené od cytarabine sensitivních MCL buněk – JEKO- 1, MINO, REC-1, HBL-2 a GRANT- 519. *Ve výsledkové části disertace je nutné specifikovat původ/zdroj těchto linií –bez ohledu na to, že je možné si tento údaj dohledat ve finální publikaci.* Z odvozených resistantních linií byla MINO-R linie analyzována klasickým postupem kombinace 2DE +MS pro identifikaci proteinů typických pro resistantní klon. Nález snížené exprese deoxycytidin kinázy, následně potvrzený western blotem i u dalších odvozených cytarabine resistantních klonů, vzhledem ke klíčové úloze v metabolismu cytarabinu, není nijak překvapivý. *Je jen škoda, že tato proteomová analýza nebyla doplněna jiným proteomickým postupem, který by snad poskytl další komplementární výsledky - jaký postup pro tento účel by jste zvolila?* Důležitým nálezem této studie je *křížová rezistence k jiným typům nukleosidových anti- metabolitů. Je z tohoto pohledu perspektivní použití biologické léčby, např. anti- CD-20 protilátky (rituximab) samotné nebo případně v kombinaci s jinými genotoxickými či alklyčnými chemoterapeutiky?*

Klasický postup využívající kombinaci 2-DE separace a MS identifikace byl využit při identifikaci molekulárních cílů pro selektivní likvidaci buněk lymfomů z plášťové zóny resistantních na protinádorovou molekulu TRAIL. Práce využívá buněčnou linii HBL-2 odvozenou z MCL a prvním krokem je ustavení resistantního subklonu. Tento model je pak podroben proteomickému srovnání sensitivních versus resistantních buněk. Kromě jiných pozorovaných změn se zajímavým pozorováním staly změny enzymů purinového metabolismu, u nich docházelo k 1,6 – 2,2x snížené expresi. Po semikvantitativní verifikaci těchto změn Western blotem bylo patrné, že v resistantních HBL-2/R buňkách je narušená homeostáza purinů, což od určité hranice může být pro buňku kritické vzhledem k nedostatku ribonukleotidů a deoxyribonukleotidů pro tvorbu RNA a DNA. Velmi vtipným směrem studie pak je využití inhibitorů purinového metabolismu pro zvýšení toxicity vůči resistantním HBL-2/R buňkám, což představuje slibný terapeutický směr. *Kombinace modelového buněčného systému a proteomického přístupu se osvědčila, otázkou zůstává přenos poznatků do reálného světa medicíny. Jakou roli zde hraje heterogenita resistantních subpopulací u pacientů?*

Závěrečná otázka:

Jaké jsou výhledy „proteomických markerů“ pro rutinní praxi?

Použitá metodika

Metodické postupy použité v jednotlivých experimentech disertační práce odpovídají současným trendům v oblasti proteomiky a hmotnostní spektrometrie a jejich kombinace je vhodně volena s ohledem na cíle experimentů. Zejména u prací s buněčnými modely by bylo vhodné další použití komplementárních MS technik.

Splnění cílů

Domnívám se, že cíle doktorandské disertační práce byly splněny. Tuto práci lze považovat za přínosnou z toho pohledu, že demonstruje úspěšnost propojení proteomických technik se studiem nádorových onemocnění zejména na molekulární úrovni a vytváří tak důležité krůčky k přenosu do medicíny s vidinou cílené terapie.

Dotazy a připomínky pro diskusi

Viz. výše.



Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.

Rumburská 89, 277 21 Liběchov

tel.: 315 639 532; fax: 315 639 510

E-mail: uzfg@iapg.cas.cz; URL <http://www.iapg.cas.cz>

Závěr

Ing. Lucie Lorková předložila disertační práci, která prokazuje její předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu Ph.D. za jménem.

V Liběchově, dne 26. 9. 2014

RNDr. Hana Kovářová, CSc.