



Oponentský posudek disertační práce

„Proteomika jako nástroj studia molekulárních mechanismů závažných onemocnění“

Mgr. Jana Pospíšilová

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

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

Obecná charakteristika

Disertační práce v pevné vazbě formátu A4 má rozsah 136 stran (včetně použité literatury a prací autora se vztahem ke studované problematice - 4 publikací, z toho 1x jako první autor (ze 7 autorů), 2x jako druhý autor (z 12 a 8 autorů) a 1x jako čtvrtý autor (ze 7 autorů)). Práce je členěna do kapitol zahrnujících: 1. Úvod, 2. Cíle disertační práce, 3. Diskuze, 4. Závěr, 5. Použitá literatura, 6. Seznam publikací, 7. Příloha – Publikace.

Cíle práce

Cíle disertace jsou jasně formulovány.

Cílem je studium molekulárních mechanismů závažných onemocnění s využitím proteomických přístupů.

Dosažené výsledky

Klasický postup využívající kombinaci 2-DE separace a MS identifikace byl využit při identifikaci molekulárních cílů pro selektivní likvidaci buněk lymfomů z plášťové zóny rezistentních na protinádorovou molekulu TRAIL. Práce využívá buněčnou linii HBL-2 odvozenou z MCL a prvním krokem je ustavení rezistentního subklonu. Tento model je pak podroben proteomickému srovnání sensitivních versus rezistentních buněk. Kromě jiných pozorovaných změn se zajímavým pozorováním staly změny enzymů purinového metabolismu, u nich docházelo k 1,6 – 2,2 snížené expresi. Po semikvantitativní verifikaci těchto změn Western blotem bylo patrné, že v rezistentních HBL-2/R buňkách je narušená homeostáza purinů, což od určité hranice může být pro buňku kritické vzhledem k nedostatku ribonukleotidů a deoxyribonukleotidu pro tvorbu RNA a DNA. Velmi vtipným směrem studie pak je využití inhibitorů purinového metabolismu pro zvýšení toxicity vůči rezistentním 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 rezistentních subpopulací u pacientů?

Ve druhé práci byla proteomická analýza aplikovaná na sledování mechanismů srdečního selhání u potkaního modelu objemového přetížení. Zde bylo použita kvantifikační metoda iTRAQ pro značení peptidů pomocí izobarických značek. Následně byly peptidy separovány pomocí IPG IEF, extrahovány a po rozdělení na RP-HPLC identifikovány na MALDI MS/MS. Je zřejmé, že takový metodický postup je velice efektivní jak z hlediska kvantifikace proteinů tak i identifikace. Z celkového počtu identifikovaných a kvantifikovaných proteinů (2030) bylo 32 % (66) signifikantně diferencně



exprimováno podle zvoleného kritéria – iTRAQ signál $>1,5$ a $p < 0,05$. V tomto bodě je dobré podotknout, že spolu s proteomickou částí proběhla i transkriptomová analýza, a z výsledných 66 diferenčních proteinů korespondovalo s trendem změny 44% transkriptů (29), což je překvapivě vysoká shoda. Výsledkem této komplexní analýzy je návrh dvou potenciálních terapeutických cílů (TGM2 a MAO-A) pro zásah inhibitorů, a návrh annexinů 2 a 5 jako možných biomarkerů srdečního selhání. Otázka - bylo by možné přemýšlet o kombinovaném působení inhibitorů TGM2 a MAO-A? *Proč právě ANX 2 a 5 jsou navrženy jako potenciální biomarkery a bylo by možné uvažovat i o možné kombinaci diferenčních proteinů (zvýšených u srdečního selhání) s výhledem na multiplexní test biomarkerů?* Např. tropomyosin je také popisován jako marker srdečního selhání. *Jsou takovéto buněčné proteiny z pohledu biomarkerů dostatečně dostupné pro vhodný test a za jakých podmínek?*

Třetí 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.

Použitá metodika

Metodické postupy použité v jednotlivých experimentech disertační práci odpovídají současným trendům v oblasti proteomiky a hmotnostní spektrometrie a jejich kombinace je vhodně volena s ohledem na cíle experimentů.

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 pathogenese různých onemocnění zejména na molekulární úrovni a vytváří tak první krůčky k cílené terapii.

Dotazy a připomínky pro diskusi

Viz. výše.

Závěr

Mgr. Jana Pospíšilová předložila disertační práci, která prokazuje její předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu Ph.D. za jménem.

V Liběchově, dne 4. 5. 2014

RNDr. Hana Kovářová, CSc.