



Oponentský posudek disertační práce RNDr. Denisy Petráčkové

Název práce:

Využití gelově-založených proteomových technik při analýze genové exprese u prokaryotních a eukaryotních modelů

Cílem hodnocené disertační práce bylo využití klasické dvojrozměrné gelové elektroforézy pro srovnávací proteomové studie tří různých projektů.

Předložená disertační práce má 133 stran je standardně členěna na literární úvod, metodiku, výsledky a diskusi. Práce neobsahuje žádné přílohy. V literárním přehledu jsou nejprve charakterizovány různé typy proteomických studií a poté je popisována metoda dvojrozměrné elektroforézy, včetně možností detekce separovaných proteinů a obrazové analýzy. Z uvedeného textu je zřejmé, že autorka má velmi dobrý přehled o této problematice a značné zkušenosti s její aplikací. V další části se pak věnuje dalším metodikám používaným v proteomice. Tato část je velmi stručná, což na jedné straně odráží skutečnost, že tyto postupy nebyly v rámci experimentální práce uplatněny, na druhé straně je zřejmé, že autorka si je v této oblasti méně jistá. To se projevuje například na straně 13, kde autorka spojila dohromady dvě různé technologie ICAT a iTRAQ. Dále mi ve výčtu shotgun postupů chybí zmínka o SILAC analýze, která v současné době v případě komparativních shotgunových studií převládá. V této části by bylo rovněž vhodné zmínit technologii Selective Reaction Monitoring - SRM, která umožňuje souběžnou selektivní kvantifikaci stovek peptidů.

V části výsledky je nejprve popisována srovnávací proteomová analýza membránových proteinů mikroba *Bacillus subtilis*, jenž byl dlouhodobě vystaven nízké hodnotě pH. Výsledkem této práce byla detekce 25 proteinových změn, z nichž 5 proteinů vykazovalo signifikantní změny. Dále byla prokázána změna v uspořádání a rigiditě cytoplazmatické membrány mikroba.

Další projekt pak byl zaměřen na proteomovou analýzu celkových proteinů *Escherichia coli* s cílem odhalit proteinové změny spojené se vznikem rezistence vůči

antibiotiku erytromycin. Autorka sledovala změny v průběhu kontinuální kultivace, a to v časových intervalech 43, 68 a 103 hodin od začátku kultivace. Celkově bylo nalezeno 61 proteinů se změněnou expresí, dále byl prokázán vliv přítomného antibiotika na generační čas a na výkonnost a přesnost translace.

Poslední část výsledků je věnována identifikaci proteinů v kostní plazmě, které jsou charakteristické pro patogenezu akutní lymfoblastické leukémie u dětí. Pro vyšší citlivost detekce byly ze vzorků nejprve imunoafinitní chromatografií odstraněny proteiny, které jsou v plazmě zastoupeny ve vysokých koncentracích. Avšak ani tato prefrakcionace nevedla k identifikaci signifikantních změn v proteinovém složení kostní plazmy získané od pacientů. Rozdíly v proteinovém složení byly nalezeny pouze u kontrolní plazmy, nicméně identifikované změny se týkají běžně se vyskytujících proteinů, což dokladuje, že citlivost provedené analýzy nebyla stále na dostatečné úrovni.

K disertační práci mám následující dotazy:

1. Kolik technických a biologických replikátů bylo použito pro srovnávací proteomové studie? Dále jaký typ softwaru byl použit pro identifikaci signifikantních změn v koncentraci proteinů?
2. Pro komplexní srovnávací proteomové studie je vhodné kombinovat různé pH gradienty v prvním směru, tak aby bylo postiženo co nejširší spektrum proteinů. V případě membránových proteinů se uvádí, že řada těchto proteinů vykazuje bazické pH. Provedla nebo plánuje autorka separace membránových proteinů také na bazických gradientech?
3. Jakým způsobem autorka kontrolovala úspěšnost v extrakci membránových proteinů pomocí lysozymu? Bioinformatická analýza čtyř z pěti proteinů se signifikantní změnou koncentrace v kyselém prostředí, konkrétně AcoB, SOD, YjcH a YwaC, totiž ukazuje, že se jedná spíše o cytoplazmatické proteiny.
4. V případě proteomové studie kostní plazmy je zřejmé, že samotné odstranění proteinů s vysokou koncentrací nestačí pro detekci proteinů vyskytujících se v nízkých koncentracích. U těchto proteinů se právě předpokládá, že by mohly být významné pro diagnostiku a monitorování onemocnění. Má autorka v plánu zavést nějaké další metodiky vedoucí k obohacení této proteinové frakce o velmi nízké koncentraci?

Závěr: Autorka prokázala schopnost adekvátně aplikovat metodiku gelové proteomiky na různé biologické modely a získala výsledky, jež jistě přispějí k pochopení probíhajících fyziologických a patologických dějů. Výsledky této práce byly publikovány ve dvou

časopisech s impakt faktorem. Celkově lze tedy konstatovat, že RNDr. Denisa Petráčková splnila požadavky podle odstavce 4, paragrafu 47 Zákona o vysokých školách. Tudíž doporučuji přijetí její práce k obhajobě a po úspěšném obhájení souhlasím s udělením titulu PhD.

Prof MUDr. Jiří Stulík, CSC.



V Hradci Králové 14.11. 2011

Fakulta vojenského zdravotnictví

Univerzita obrany Hradec Králové