

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Kristýny Pimkové

Disertační práce Mgr. Kristýny Pimkové „**Proteomická analýza vybraných onkohematologických onemocnění**“ byla vypracována v Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze. Školitelem byl Prof. Ing. Jan E. Dyr, DrSc.

Jedná se o disertační práci založenou z větší části na dosud nezveřejněných výsledcích v kombinaci s daty již publikovanými. Autorka se opírá (různou měrou) o tři původní práce (jedna je typu „letter to editor“) v mezinárodních časopisech (IF 1,7-4,5).

V úvodu práce podává Mgr. Kristýna Pimková v dostatečném rozsahu obecné informace o oxidativním stresu a jím způsobených modifikacích bílkovin a také o tom, co je to myelodysplastický syndrom. Další části úvodu jsou věnovány interakcím protein-protein a metodám stanovení oxidačního statusu a poškození. (Text je bohužel místy nespojitý a čtenáři zůstává záhadou, proč po obecném textu o interakcích protein-protein následuje bez jakéhokoli vysvětlení text o VEGF a jeho receptoru.) Následně jsou autorkou postulovány 2 pracovní hypotézy a vytyčeny cíle práce. Prvním cílem bylo stanovit parametry oxidačního stresu u MDS a korelovat je s léčbou a hladinami železa a feritinu. Druhým cílem bylo charakterizovat PTM proteinů u pacientů s MDS a popsat plazmatické proteiny účastníky se patofyziologických procesů i MDS (pomocí metody SPR).

Po dostatečně detailním popisu metod se autorka věnuje vlastním výsledkům práce. Byly stanoveny hladiny látek vypovídajících o oxidačním stavu organismu nebo jeho oxidativním poškozením u pacientů s MDS (stanoveny aminothioly, MDA, aktivita GGT...). Byly nalezeny některé významné změny mezi pacienty a zdravými kontrolami. Získané hodnoty byly korelovány například s hladinami feritinu a sérového železa (coby hodnot odrážejících systemické hladiny železa - klasického zdroje oxidativního poškození). Byla nalezena korelace mezi hladinami železa a MDA a feritinu a MDA. Zajímavé je rovněž zjištění snížené hladiny dusitanů v plazmě pacientů s MDS. Srovnání mezi pacienty a zdravými jedinci zde prováděná však mohou být zatížena odlišným věkem zdravých a nemocných jedinců – u porovnávaných skupin se věk jedinců podle všech indicií značně lišil (uveden je bohužel jen rozptyl věku, nikoliv průměr nebo medián). Tuto skutečnost autorka v diskuzi přiznává a zvažuje. Další potenciální komplikací vyhodnocení naměřených dat je malý počet jedinců ve skupinách (po rozdělení dle WHO klasifikace MDS). Ve skupinách 3 a 4 bylo pouze 9 pacientů. Jak statisticky robustní jsou data získaná na základě tak malé skupiny pacientů?

Další část výsledků patří analýze oxidativních PTM bílkovin (karbonylaci a S-nitrosylaci) v krevní plazmě. Byla stanovena celková karbonylace proteinů plazmy (s pomocí DNPH), dle autorky byla o 20% vyšší než u zdravých dárců (vlastní numerické hodnoty však v práci chybí, není jasné jak byli pacienti vybráni, zdali se jednalo o směsný vzorek či nikoliv).

Dále byla vyvinuta snaha o identifikaci individuálních karbonylovaných proteinů na základě korelace WB s migrací na SDS-PAGE. Bylo identifikováno několik proteinů migrujících se stejnou relativní rychlostí migrace (tedy s podobnou MW), z nichž některé mohou být karbonylovány. Pokud

však nelze přímo prokázat karboxylaci daných proteinů je interpretace jejich nálezu čistě spekulativní.

Poslední část výsledkové sekce se týká studia interakcí protein-protein pomocí metody SPR. Nejprve byla vyvinuta metoda pro detekci VEGEF receptoru skrze jeho interakci s imobilizovaným VEGEF-A. Tuto sekci osobně pokládám za nejcennější část předkládané práce. Následně byly na základě literatury (literatura ani algoritmus výběru zde nejsou specifikovány) vybrány 4 kandidátní proteiny jejichž koncentrace je v plazmě zvýšena u pacientů s MDS a rovněž jejich 4 interakční partneři. Tyto proteiny byly zakotveny na čip a byla studována jejich interakce s proteiny plazmy několika pacientů a zdravých jedinců. Na základě SPR odezvy byly vybrány některé z komplexů pro izolaci a identifikaci pomocí MS. Na základě bioinformatické analýzy interakcí byly postulovány hypotézy pro budoucí výzkum.

Práce demonstruje značné množství experimentální práce a získaných dat, která jsou však zatížena některými výše uvedenými nedostatky v experimentálním designu (viz výše). V literárním zpracování práce lze nalézt drobné nepřesnosti a místa, která bylo možné pečlivěji a lépe podat. Lze však konstatovat že Mgr. Kristýna Pimková prokázala schopnost osvojit si moderní metody biologického studia a s jejich pomocí samostatně vědecky pracovat.

Doporučuji proto přijetí předkládané práce k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení souhlasím s udělením titulu Ph. D.

Rád bych však Mgr. Kristýně Pimkové položil několik doplňujících otázek:

1. Proč byla pro účely stanovení celkové karboxylace proteinů plazmy použita plazma depletovaná, když v takové situaci nehledáme minoritní proteiny a deplece je navíc finančně náročná a navíc je potenciálně zdrojem artefaktů?
2. Jak vysvětlíte identifikaci alfa-1-makroglobulinu mezi „potenciálně karboxylovanými“ proteiny (tab 11), když použitý vzorek pocházel z plazmy imunodepletované pomocí Mars Hu-14 (zahrnující depleci alfa-1-makroglobulinu)
3. Jak relevantní je existence proteinových komplexů vzniklých za pokojové teploty (podmínky měření SPR) vzhledem ke skutečným fyziologickým podmínkám ?

V Praze dne 28. 11. 2013

RNDr. Jiří Petrák, Ph.D.



Ústav patologické fyziologie 1. LF UK
U Nemocnice 5
Praha 2
jpetr@lf1.cuni.cz
Tel: 224 965 865