

Oponentský posudek disertační práce

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Doktorský studijní program:	Vnitřní nemoci
Uchazeč:	Ing. Zdeněk Tůma
Pracoviště:	Biomedicínské centrum
Název dizertační práce:	Analýza a identifikace proteinů při orgánových dysfunkcích pomocí proteomických metod
Školitel:	MUDr. Martin Matějovič, Ph.D.
Oponent:	prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.
Pracoviště oponenta:	Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Disertační práce představuje komentovaný souhrn devíti článků vzniklých v průběhu doktorského studia Ing. Zdeňka Tůmy souvisejících s aplikací proteomických metod sledujících změny proteomu buněk při orgánových dysfunkcích.

Autor uvádí dva hlavní cíle práce: (1) vyvinout vhodné metodické přístupy pro monitorování změn mitochondriálních proteinů s využitím centrifugace, dvourozměrné gelové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie; a dále aplikovat proteomické přístupy pro analýzy plazmy a tkání u prasečích modelů sepse, (2) izolovat a identifikovat proteiny navázané na membrány, které jsou používány u mimotělních hemopurifikačních metod.

Disertační práce je předložena v českém jazyce v klasickém formátu, který obsahuje úvod, popis současného stavu problematiky, představení experimentální práce a klinických studií, závěr a literární odkazy. Práce má 36 stran, bez obrázků a tabulek. Na komentované představení práce navazuje příloha s originály článků v plném

znění. Práce se zabývá studiem různých typů onemocnění a vlivu léčby, jenž spojují proteomické přístupy.

Úvod disertační práce je v souladu s tématem práce a je zaměřen na stručný popis současného stavu proteomiky v medicíně. Dále je zde uveden krátký popis šesti studií z experimentálního i klinického prostředí, u nichž byly využity proteomické přístupy. V experimentální části jsou uvedeny záměry a cíle jednotlivých studií s následným rozбором výsledků a diskuzí. Závěr krátce shrnuje data získaná z proteomických experimentálních i klinických studií. Z informací uvedených v disertační práci je patrné získání nových, unikátních poznatků, které lze využít přímo v praxi, nebo budou tvořit podklad pro další studie. Ing. Tůma tedy doložil splnění cílů disertační práce.

K textu disertační práce mám však několik připomínek. Ve větách se vyskytují anglicismy, které lze nahradit českými výrazy, např. „*abundantní proteiny*“ (str. 11) lze nahradit „*proteiny přítomné ve vyšších/vysokých koncentracích*“, „*akvizice fragmentačních spekter*“ (str. 13) lze nahradit „*měření fragmentačních spekter*“. Celkově text by mohl být čtivější, pokud by na sebe lépe navazovaly věty a myšlenky v jednotlivých odstavcích, kapitolách (např. str. 6, předposlední odstavec – informace o podílu práce autora by mohla být vždy uvedena na začátku nebo konci odstavce; str. 13, první odstavec – nenavazuje text ve větě: „*Mezi výhody dvourozměrné elektroforézy patří uváděny robustnost....*“; stejně jako na str. 15, první odstavec v podkapitole 3.3. – „*Schopnost proteomiky v rychlém, přesném a reprodukovatelném kvantifikaci velkého množství proteinů....*“; dále na str. 10, 2. odstavec a na str. 14, 1. odstavec v podkapitole 3.2.4. – se vyskytuje opakující se text o ionizačních technikách včetně citací a zkratk). Dále jsou v textu uvedena nepřesná tvrzení, např. str. 13, podkapitola 3.2.2. – autor tvrdí, že „*Pomocí hmotnostního spektrometru jsou změřeny hmotnosti peptidů....*“, což není pravda. Hmotnostní spektrometr je schopný měřit pouze látky převedené na ionty (kladně nebo záporně nabitě částice vznikající v ionizačních zdrojích) a ty dále fragmentovat, přičemž principy fragmentačních spekter nejsou v práci vůbec zmíněny. Dále je uvedeno: „*K identifikaci pak slouží*

fragmentační data a na základě přiřazení aminokyselinových sekvencí k peptidům jsou pak identifikovány proteiny.“ Proces identifikace se neskládá pouze z tohoto tvrzení, ale je třeba k tomu dodat další informace, např., že musí být zadány parametry, podle nichž daný program je schopný data z hmotnostního spektrometru vyhodnotit. V práci měly být uvedeny např. tyto parametry FDR, chyba měření v MS a MS/MS modu, fixní a variabilní modifikace proteinu, počet povolených míst neštěpených enzymem. Dále v tomto odstavci je napsáno: „*Tato akvizice fragmentačních spekter je klíčová pro identifikaci a kvantifikaci proteinů.*“ Opět toto tvrzení je nepřesné. Je používáno více metod pro kvantifikaci proteinů (např. značení proteinů/peptidů může být enzymatické, chemické nebo metabolické). U chemického značení peptidů (např. TMT, iTRAQ) se k hodnocení využívají fragmentační spektra, ale u SILAC metabolického značení proteinů, se ke kvantifikaci využívají peptidová (MS) spektra. Autor práce by si dále měl dávat pozor na tvrzení, která neobsahují uvedení podmínek, za kterých platí. To se, např. týká textu o SRM metodě uvedené na str. 15 v prvním odstavci: „*Hmotnostně spektrometrickými metodami monitorování vybraných reakcí (SRM/MRM) lze cíleně stanovit peptidy s velmi vysokou citlivostí....*“. To je pravda, ale musí tam být také uvedeno, že je nutné najít prototypické unikátní peptidy, které dobře ionizují a mají dané parametry (přechody) jinak tato metoda není funkční. V práci jsou používány zastaralé výrazy, např. *izoformy proteinů* (str. 19, podkapitola 6.2.2., 1. odstavec). Již v roce 1996 Peter Jungblut uvedl, že je správné použití spojení „*protein species*“ (Jungblut P et al. *Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels. Electrophoresis. 1996, 17: 839-47*) pro proteiny, které se na gelu 2-DE vyskytují v různých proteinových skvrnách a jsou pravděpodobně posttranslačně upraveny. V roce 2009 byl publikován článek, ve kterém informují o vzniku nomenklatury v proteomice pro „*protein species*“ s vysvětlením, že výraz *izoforma* je používán pro genetickou variabilitu, jako je, např. alelická heterogenita (Schlüter H. et al. *Finding one's way in proteomics: a protein species nomenclature. Chemistry Central Journal 2009;11*), proto není vhodné stejný výraz používat pro proteinovou variabilitu.

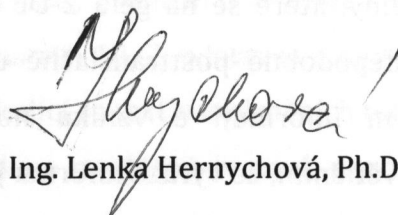
Dotazy oponenta k obhajobě disertační práce

- 1) Vysvětlete propojení proteinových čipů se SELDI a MALDI-TOF analýzou a využití tohoto propojení pro hledání a validaci biomarkerů (máte uvedeno v textu na str. 14, podkapitola 3.2.3.). Zvláště by mě zajímal postup identifikace biomarkerů z čipů.
- 2) Jaké podmínky musí být splněny, aby mohly být publikovány identifikace proteinů získané metodou peptidového mapování (jedná se o soubor parametrů určujících správnost identifikace, v textu práce na str. 14, podkapitole 3.2.4. tato informace chybí).
- 3) Velmi zajímavé jsou uvedené klinické studie, u kterých byly identifikovány proteiny interagující s materiály adsorpčních kolon systému Prometheus. Zajímalo by mě, zda bude možné výsledky uplatnit v praxi, např. u studie V – analýza interakce krve s kapilárami dialyzátorů.

Závěr

Ing. Zdeněk Tůma ve své práci prokázal tvůrčí vědecké schopnosti, je autorem či spoluautorem 9 článků publikovaných v časopisech s IF. Získal kvalitní originální výsledky a splnil cíle disertační práce. Tato předložená práce splňuje požadavky standardně kladené na disertační práce v oboru Vnitřní nemoci a i přes velké množství nepřesností, které se vyskytují v textu, **doporučuji její postoupení k obhajobě a dalšímu řízení.**

V Brně 18.7. 2016



prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.