



Posudek oponenta disertační práce

Masarykova univerzita
Přírodovědecká fakulta
Doktorský studijní obor

Biochemie

Student

Mgr. Jakub Faktor

Disertační práce (název)

Targeted proteomics, a new approach for protein quantitation in tumor biology

Oponent

prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.

Pracoviště oponenta

Katedra biochemie PřF UP

Text posudku (rozsah dle zvážení oponenta) ...

Práce byla vypracována na pracovištích Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno a Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně. Školitelem byl Doc. Pavel Bouchal. K posouzení jsem měl elektronickou i tištěnou verzi. Celý spis čítá 229 stran. Po formální stránce se jedná o kombinaci autorského textu a příloh vědeckých článků, buď již publikovaných, nebo ve formě rukopisů. Členění práce je standardní, použitým jazykem je angličtina. Shrnutí je v jazyce anglickém i českém, následuje seznam použitých zkratk, obsah a úvodní teoretická část podávající ucelený výsledek rešerše odborné literatury. Pokračuje se přehledem použité metodiky a formulace cílů práce. Konečně je k dispozici výsledková část spojená s diskusí, a to ve formě šesti oddělených celků představujících jednotlivě řešené výzkumné projekty. Následuje formulace závěrů disertační práce, přehled citované literatury a již zmíněné přílohy.

Formální stránka zpracování je v pořádku. Text je svižný, čtivý a angličtina je srozumitelná. Jako nerodilý mluvčí bych mohl posuzovat pouze jazykové excesy, které v žádném případě nejsou. Povšiml jsem si, že místy jsou pasáže, kde se jen minimálně používají gramatické členy, např. na str. 31, místy chybí předložky, např. na str. 36 – „a mass ratio OF 1:33“. Literárních zdrojů je uvedeno úctyhodných 286, jejich použití je relevantní. Za formální chyby zpracování lze označit někde nejednotný formát citací (používají se velké i malé iniciály v názvech, čísla v dílech (volume) jsou, či nejsou, apod. Forma citací je místy zvláštní, např. [31][32][33][34][35][36] namísto jednoduššího [31-36]. Citace [268] až [283] nejsou v textu vůbec citovány. Citace [125] je na str. 31 použita mimo systém číslování, citace [192] není Procházková et al., jak je

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta

Kotlářská 267/2, 611 37 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 3278, E: pbures@sci.muni.cz, www.sci.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



uvedeno na str. 59. V teoretické části by také neměly být citovány originální práce, které jsou součástí výsledků (tj. zde např. [169]). Terminologie je v pořádku, pouze na str. 44 není použit správný tvar Schiff's base.

Shrnutí dobře vystihuje, čím se disertační práce zabývá, tedy výzkumem nádorů a metastáz, hledání proteinových markerů vhodných pro diagnostiku onemocnění. Zmíněny jsou použité nástroje kvantitativní proteomiky (experimenty SRM tj. „single reaction monitoring“ a SWATH tj. „sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion mass spectra“). V úvodu teorie se zdůrazňuje posun současné proteomiky od prosté identifikace ke kvantifikaci. Popisují se nádorové onemocnění prsu, jeho subtypy, tvorba metastáz, hledání cílů léčby. Uvádí se charakteristika nádorových tkání, problematika snížené adheze a pohyblivosti buněk, signální dráhy metastáz. Definuje se pojem biomarkeru rakoviny, jeho hledání metodami biochemie a molekulární biologie, použití pro diagnostiku, prognózu a sledování odezvy na léčbu. Zdůrazněna je nutnost validace s použitím ortogonálních metod (imunohistochemie, přenos (blot), transkriptomika) a skutečnost, že jen několik biomarkerů bylo schváleno pro klinické použití. Pokračuje se klasifikováním nádoru prsu: obecně dva typy (duktální a lobulární), 18 podtypů, souvislost s odezvou na léčbu. Popisují se nejběžnějších 4 podtypy a testování receptorovými, histochemickými či genetickými testy.

K této části mám dotaz, v textu není blíže vysvětlen pojem mammostrat, chtěl bych v průběhu obhajoby blíže objasnit, jak toto testování probíhá a jaký je princip.

Zbývající textová část teoretického úvodu je věnována významu proteomiky pro studium biologických a biochemických aspektů rakoviny. Popisuje se metodika: příprava vzorku, varianty štěpení pro získání analyzovatelných peptidů, odsolování peptidů, strategie pro měření. Zdůrazněn je význam reprodukovatelnosti s ohledem na porovnání velkých sérií vzorků. Komentována je problematika výskytu abundantních proteinů a jejich odstranění (deplece) a záležitost možného obohacení („enrichment“) vzorku. Zájem je věnován kvantifikaci, ať již se značením stabilními izotopy (chemicky či enzymově), nebo bez značení („label free“). V detailu je zpracována oblast spojení kapalinové chromatografie pro separaci peptidů a hmotnostní spektrometrie jako citlivé techniky detekce (LC-MS analýzy). Vysvětlen je rozdíl mezi stochastickým postupem DDA („data-dependent analysis“) a modernějším přístupem DIA („data-independent analysis“), např. ve variantě SWATH. Probrán je rozdíl mezi kvantifikacemi označovanými jako SRM/p-SRM a PRM, definování přechodů prekursor - fragment, vysvětlen pojem proteotypické peptidy. V závěru je podán přehled bioinformatických přístupů včetně softwaru používaného k vyhodnocení kvantifikačních experimentů.

Celkem je uvedeno 6 cílů práce: připravit přehledný článek o biomarkerech nádorových metastáz; srovnat analytické parametry různých metod kvantifikace v nádorové proteomice; studovat hladinu proteinu AGR2 u pacientek s karcinomem endometria;

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta

Kotlářská 2, 602 00 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 1410, E: info@sci.muni.cz, www.sci.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



identifikovat proteinové markery, které umožňují rozdělit pacientky s rakovinou prsu do skupin podle subtypu; porovnat „pull down“ (strhávací) metody pro studium proteinových interakcí a konečně hledat markery z povrchu buněk pro posouzení metastázování nádorů prsní žlázy. V části Materiál a metody je zdůrazněn klíčový význam přípravy vzorku včetně použití parafinovaných preparátů tkání, je popsána charakteristika použitých vzorků nádorové tkáně, značení proteinů biotinylací. Vysvětlen je průběh nanoLC-MS/MS měření na přístrojích triple TOF nebo QTRAP 5500 a také validace pomocí přenosu (Western blot) s chemiluminiscenční detekcí.

Výsledky jsou s diskusí představeny v blocích jednotlivých projektů. Příslušné výstupy, ať již ve formě publikovaných článků, či jako rukopisy, jsou přílohovými materiály disertační práce. Mgr. Jakub Faktor je 2 x prvním autorem (z toho jeden rukopis v přípravě), 2 x druhým autorem, 1 x třetím autorem a 1 x sedmým autorem v pořadí. Vždy je v detailu uveden autorský podíl, který prokazuje významný přínos autora disertace.

Přehledový článek je věnován použití proteomiky při studiu rakovinových metastáz. Uvedeny jsou schválené biomarkery pro rakovinu prsu. Zmíněny jsou povrchové proteiny buněk jako potenciální cíle antimetastatických léčiv, sekretované proteiny jako markery, význam posttranslačních modifikací a protein-proteinové interakce. Originální vědecké články představují v prvním článku porovnání postupů cílené proteomiky (SRM, pseudo SRM a SWATH) pro nádory prsu na základě zjištěných analytických parametrů mj. limitu detekce, či limitu kvantifikace. Využilo se různých přístupů značení a přístrojů triple TOF a QTRAP. Druhý článek má souvislost s rakovinou endometria (děložní sliznice), která je mimo jiné příčinou rizikem při léčbě pacientek s rakovinou prsu tamoxifenem. Jako marker je znám „anterior gradient protein 2“ (AGR2), který je zahrnut v regulaci. SRM odhalila signifikantně zvýšené hladiny AGR2 u pacientek s karcinomem endometria léčených tamoxifenem v porovnání s karcinomy endometria vzniklými *de novo*. Třetí práce se týká klasifikace nádorů prsu, Využilo se analýzy SWATH, bylo kvantifikováno téměř 3000 proteinů. Ukázalo se, že pro klasifikování jsou vhodné proteiny inositol-3,4-bisfosfát-4-fosfatasa typu II (INPP4B), cyklin-dependentní kinasa 1 (CDK1) a ERBB2 protein, validováno to bylo např. na úrovni transkriptu. Čtvrtý článek vychází ze strhávací analýzy („pull down“) pro studium interakcí. Předmětem analýz byl „PDZ and LIM domain protein 2“ (PDLIM2), součást aktinového cytoskeletu, který může být zodpovědný za migraci epitelových buněk. Proběhla optimalizace několika aspektů analýzy, zejména eluční procedury (lepší výsledky vlivem prosté gravitace, než centrifugace – zde můj dotaz: „*Jak si toto zjištění vysvětlujete?*“). Poslední článek, ve formě rukopisu, řeší povrchové proteiny spojené s metastázemí rakoviny prsu. Předpokládá se, že povrchové proteiny mají účast v procesu signalizace, která je aberantní u nádorových buněk. Byly použity buňky s různými migračními schopnostmi, značení stabilními izotopy, biotinylace a obohacení. Jako slibné markery by mohly být využity dva transmembránové proteiny –

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta

Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 1410, E: info@sci.muni.cz, www.sci.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



katechol-o-methyltransferasa a desmoglein1. U agresivních nádorů byla zvýšená hladina methyltransferasy – spojení se zvýšenou migrací, invazivností a metastázemi.

Můj další dotaz k výsledkové části se týká poslední kapitoly, tedy analyzovaných povrchových proteinů. Byla potvrzena např. rozdílná glykosylace či fosforylace proteinů u buněk s rozdílnou schopností migrovat?

Závěr je zpracován stručně a výstižně. Formuluje význam proteomických a genetických metod v moderním experimentálním výzkumu rakoviny. Zdůrazňuje důležitost metod cílené proteomiky („targeted proteomics“) pro kvantifikaci změn proteomu a nalezení, verifikaci a validaci biomarkerů. Výsledky disertační práce potvrzují vhodnost a význam experimentální strategie SWATH pro identifikaci a kvantifikaci proteinů umožňujících stratifikaci pacientů s nádory prsu podle subtypů, což má význam pro diagnózu a neefektivnější léčbu. Autor si je vědom nedostatku proteomiky založené na analýze peptidů získaných proteolytickým štěpením, tedy nedokonalého pokrytí sekvence identifikovaných proteinů, v jejímž důsledku mohou chybět vhodné peptidy pro kvantifikaci. Jako řešení uvádí modernější „top-down“ postupy, kdy experiment nevyžaduje proteolýzu.

Na závěr posudku konstatuji, že Mgr. Jakub Faktor prokázal jednoznačným způsobem tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu a splnil tak předpoklady kladené na studenty doktorského studia pro jeho úspěšné zakončení. Disertační práci proto doporučuji k obhajobě.

Závěr

V disertační práci student prokázal tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu:

ANO ☒ NE ☐

Disertační práci doporučuji k obhajobě:

ANO ☒ NE ☐

Datum 29.10.2018

.....
Podpis

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta

Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 1410, E: info@sci.muni.cz, www.sci.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.

