

<b>Posudek školitele na diplomovou práci</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> školitelský posudek	Jméno školitele: RNDr. Petr Malý, CSc.
	Datum: 24/8/2021
Autor: Bc. Tereza Zosinčuková	
Název práce: Proteiny mimikující epitopy široce neutralizujících protilátek proti viru HIV-1	
<p><b>Zadané cíle práce, včetně tématu literárního přehledu:</b> Tematem diplomové práce Terezy Zosinčukové byla identifikace vazebných proteinů, které rozpoznávají paratop protilátek široce neutralizujících vir HIV-1, a které díky tvarové podobnosti interakčních povrchů mohou mimikovat epitop obalového glykoproteinu Env v oblasti V3 smyčky. Vhodně vybrané proteiny by mohly být použité jako vakcinační imunogeny k navození ochranné imunity před infekcí virem HIV-1 a k prevenci před rozvojem nemoci AIDS. Řešené téma je součástí Výzkumného záměru 1 projektu CEREBIT podporovaného MŠMT ČR v rámci programu OP VVV. Tematicky práce navazuje na dvě předchozí studie, ve kterých autoři z Laboratoře inženýrství vazebných proteinů Biotechnologického ústavu AVČR společně s týmem prof. Milana Rašky z Univerzity Palackého v Olomouci navrhli alternativní strategii pro vývoj vakcín pomocí mimikujících proteinů. Tento přístup je atraktivní zejména v oblastech, kde vývoj vakcín klasickými přístupy dosud selhal. Cílem práce studentky bylo plošně otestovat desítky proteinových variant kombinatoriálně odvozených od mateřského vazebného proteinu Myomedinu, které byly cíleny na dvě vybrané široce neutralizující protilátky proti viru HIV-1, a to PGT121 a PGT126. Získané proteiny řady MLB a MLD pak měly být dále testovány biochemickými, biofyzikálními a funkčními přístupy s cílem identifikovat nejnadějnější kandidáty, které by bylo možné použít jako mimikující imunogeny k produkci HIV-1 neutralizujících myších sér. Tento přístup by nám umožnil otestovat jednotlivá myší séra v testovaných skupinách in vitro z hlediska neutralizačního potenciálu na panelu pseudovirových variant a vybrat nejúčinnější Myomedinové varianty jako potenciální vakcinační komponenty pro další experimentální ověřování.</p>	
<p><b>Přístup studenta k práci s literaturou:</b> Snaha o vývoj účinné vakcíny bránící infekci virem HIV-1 probíhá již více než 30 let a dostatečně účinná preventivní vakcína dosud nebyla vyvinuta. Protože se stále více výzkumných týmů tomuto tématu věnuje, je nárůst publikovaných vědeckých prací značný, a proto je nesmírně náročné sledovat nové trendy a orientovat se v hlavních směrech vývoje. Toto klade na studenta velmi náročný úkol k prostudování mnoha publikovaných prací a zorientování se v této oblasti. Při přípravě diplomové práce chci proto vyzdvihnout nesmírně pečlivý přístup studentky ke studiu relevantní literatury a detailního prostudování řady důležitých článků, který následně vyústil do velice komplexně zpracovaného úvodu předložené diplomové práce. Velmi pozitivně také hodnotím i její zpracování diskuse, kde jsem ponechal prostor pro její tvořivost a nezasahoval příliš do navrženého konceptu. Díky výborné znalosti nejen nejnovějších závěrů nových prací, ale i probíhajících klinických studií, byla studentka schopná diskutovat výsledky ve vztahu k novým publikovaným poznatkům.</p>	
<p><b>Přístup studenta k práci v laboratoři (přístup při učení se nových metod, aktivita, samostatnost, systematičnost práce i docházky do laboratoře):</b> V první části diplomové práce se Tereza Zosinčuková zaměřila na identifikaci variant Myomedinů, které specificky rozpoznávají široce neutralizující anti-HIV-1 protilátku PGT126. Tato část zahrnovala plošné testování více než 50 individuálních klonů vazebných proteinů produkovaných z bakteriálních kolonií a následné testování jejich lyzátů metodou ELISA. Tato část</p>	



vyžadovala vysokou pečlivost a systematickosti práce k nalezení nejvhodnějších kandidátů pro další charakterizaci. Tuto část práce Tereza provedla samostatně a velmi precizně. Kromě metody ELISA se studentka naučila připravovat bakteriální kultury k produkci vybraných variant a jejich následnou purifikaci pomocí afinitní chromatografie a další charakterizaci proteinů pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu, která byla ještě dále kombinována s metodou Western blot. Seznámila se i s metodou molekulárního klonování. Hlavním výstupem Terezy pak byla sada vazebných křivek purifikovaných kandidátních proteinů, které tvoří součást připravovaného článku. Ve spolupráci s konzultantkou Mgr. Veronikou Daniel Liškovou, Ph.D. pak ještě provedly kompetiční ELISA test s gp120 glykoproteinem a protilátkou PGT126 na vybraných proteinových variantách a výsledkem práce byl návrh na výběr proteinových variant vhodných k imunizaci myši.

V druhé části diplomové práce se studentka samostatně věnovala identifikaci a charakterizaci vazebných Myomedinů cílených na široce neutralizující protilátku PGT121. V této části se věnovala skříninku 147 klonů pomocí ELISA a analýzy vazby proteinů ve srovnání s isotypovou kontrolou IgG lambda. Provedla charakterizaci proteinů elektroforézou a Western blotem. Výsledkem bylo vybrání 14 variant, jejich produkce a purifikace a zhotovení vazebných křivek pro nejnadějnější klony. Ve spolupráci s konzultantkou pak provedly i test kompetice Myomedinů s gp120 o vazbu na imobilizovanou protilátku PGT121. Výsledkem byl návrh proteinových variant pro test ověřující mimikující schopnosti, a to pomocí imunizace myši vedoucí k tvorbě HIV neutralizujících sérových protilátek. Celkově lze říci, že studentka pracovala s vysokou precizností a splnila naše očekávání, a tím významně přispěla k identifikaci a charakterizaci dvou sad kandidátních vazebných Myomedinů MLB a MLD.

V poslední části práce se Tereza Zosinčuková zaměřila na biofyzikální charakterizaci vybraných Myomedinů sérií MLB a MLD. To obnášelo přípravu velkého množství produktů pro chromatografickou separaci proteinů, identifikaci jejich monomerních frakcí a měření stability proteinů. Zde bych chtěl vyzdvihnout její přínos při měření termální stability, na které se podílela ve spolupráci s kolegy. Jednalo se o určení bodu tání kapilárním měřením na přístroji Prometheus a získané výsledky tvoří část připravovaného článku.

Z hlediska docházky studentky do laboratoře jsem nezaznamenal problémy, případné absence byly dopředu hlášeny a alternativní možnosti vždy diskutovány.

**Přístup studenta při sepisování práce:** Sepsání diplomové práce věnovala Tereza Zosinčuková poměrně dlouhou dobu. Bylo to dáno tím, že chtěla jednotlivé části práce dovést do vysokého stupně kvality a také tím, že chtěla prostudovat velké množství literatury, aby byla schopná kvalitně okomentovat dosažené výsledky. Tomu jsme proto přizpůsobili časový plán přípravy diplomové práce, který studentka dodržela. Proto byla spolupráce v tomto směru poměrně efektivní a v zásadě bez větších problémů. V tomto směru jsem byl s jejím přístupem spokojen.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:** Shrnu-li celkové působení Bc. Terezy Zosinčukové v naší laboratoři a její výsledky při řešení tematu magisterské diplomové práce, mohu prohlásit, že Tereza splnila naše očekávání na výbornou a podílela se na získání nezbytných dat, které tvoří důležitou část připravovaného článku a posouvají náš výzkum významným směrem k experimentálnímu konceptu směsi Myomedinových variant jako možných imunogenů pro vývoj vakcíny proti infekci virem HIV.

Návrh hodnocení školitele:

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis školitele: