

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Ing. Radim Osička, Ph.D.

Datum: 4. 9. 2021

Autor: Bc. Tereza Zosinčuková

Název práce: Proteiny mimikující epitopy široce neutralizujících protilátek proti viru HIV-1

### Cíle práce

V předložené diplomové práci byly definovány tři hlavní cíle:

- 1) Identifikovat mimotopy z vysoce komplexní kombinatoriální proteinové knihovny odvozené od Myomedinového proteinového „scaffoldu“, které úspěšně napodobují konzervované oblasti V3-smyčky Env glykoproteinového komplexu viru HIV-1.
- 2) Vybrané varianty proteinů biochemicky, biofyzikálně a funkčně charakterizovat.
- 3) Vyselektovat takové varianty mimotopů, které mají potenciál účinně navozovat tvorbu široce neutralizujících protilátek v experimentálních myších.

Vzhledem k tomu, že virus HIV-1 představuje jeden z předních světových zdravotnických problémů a doposud se proti němu nepodařilo připravit účinnou vakcínu, jedná se o téma stále vysoce aktuální a konkurenční.

### Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 110

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

### Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

Použila autorka v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO

Literární přehled je na velmi vysoké úrovni, cituje téměř 190 literárních zdrojů, z nichž je řada z posledních pěti let. Jediný komentář mám k počtu obrázků, které jsou na 32 stranách textu pouze čtyři. Čtenáři by jistě byla ku prospěchu bohatší vizuální podpora ve formě několika dalších obrázků (např. struktura genomu a virionu HIV-1, 3D struktura Env glykoproteinového komplexu, životní cyklus HIV-1, schéma ribozomálního displeje).

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? 19

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

V sekci metody se některé části textu zbytečně a v podstatě doslovně opakují (např. dělení DNA fragmentů na agarosovém gelu, izolace fragmentů z gelu, ELISA stanovení). Přiklání bych se k variantě popsat danou metodiku jednou a při jejím opakování na jiném místě napsat jen odkaz tak, jak to máte např. pro ligaci („Ligační reakce probíhala stejně, jak je popsáno výše.“), ale i pro jiné metody (např. transformace a kultivace buněk, afinitní

purifikace, vazebné studie).

**Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

**Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

Text diskuze na devíti stranách je na vysoké úrovni a získané výsledky jsou v něm zdařile zasazeny do kontextu s jinými literárními zdroji. Navíc, informace uvedené v diskuzi odpovídají na řadu otázek, které u čtenáře vyvstanou po přečtení výsledkové části.

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

**Formální úroveň práce** (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Z formálního hlediska je práce na velmi dobré úrovni. V práci se sice vyskytly pravopisné chyby, překlepy, mluvnické či odborné nepřesnosti a stylistické neobratnosti, ale jejich počet není velký.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Diplomantka si osvojila celou řadu experimentálních technik, pomocí nichž úspěšně připravila a charakterizovala sadu variant Myomedinu mimikujících epitopy dvou široce neutralizujících protilátek proti viru HIV-1. Na základě získaných výsledků pak bylo vybráno osm variant Myomedinu pro imunizace myší. Všechny tři naplánované cíle práce tak byly beze zbytku splněny. I přes drobné nedostatky považuji celou práci jak kvalitou zpracování, tak množstvím provedených pokusů a získaných výsledků za nadstandardní a doporučuji ji k obhajobě.

**Otázky a připomínky oponenta:**

- 1) Co přispělo k vyřešení problémů u PCR reakce z bakteriálních kolonií (str. 51-53), výměna použitých primerů (Myo-TEV-SLIC-F, Myo-TEV-SLIC-R za pETup, T7 terminator) nebo záměna Q5 polymerasy za One Taq polymerasu?
- 2) Když jste na Obr. 6A ukázala vesměs negativní výsledek PCR reakce z bakteriálních kolonií s Q5 polymerasou, proč jste neukázala výsledek PCR reakce po optimalizaci s One Taq polymerasou a druhou dvojicí primerů? Navíc, neměl by být Obr. 6 spíše součástí výsledkové části práce než metodické?
- 3) Nejsou tabulky č. 3 a 4 v práci uvedeny zbytečně? Metodická část by měla být napsána tak, aby se dané pokusy daly zopakovat, k tomu asi znalost rozložení dvou protilátek, popřípadě BSA v mikrotitrační destičce není nutná.
- 4) Na straně 55 píšete, že byly klony z knihovny PGT121 lyzovány komerčním lyzačním pufrem B-PER reagent a klony z PGT126 knihovny jiným lyzačním pufrem (2 mM EDTA, 1 mM PMSF, lysozym 1 mg/ml, T50 N100). Z jakého důvodu, když se jednalo o knihovny připravené ve stejných bakteriálních buňkách?
- 5) Na straně 56 je uvedeno, že varianty Myomedinu byly pro vazebné studie produkovány v bakteriích BL21(DE3). Proč nebyly produkovány v buňkách BL21-Gold(DE3), jak

tomu bylo v případě variant Myomedinu předtím použitých k plošnému testování pomocí ELISA stanovení?

- 6) Na základě čeho jste se rozhodla, že z PGT121 knihovny budete testovat celkem 147 variant Myomedinu a z PGT126 knihovny jen 57 variant (str. 70)?
- 7) Na rozdíl od variant Myomedinu cílených proti monoklonální protilátce PGT121, obsahují varianty Myomedinu cílené proti protilátce PGT126 v N-koncové části molekuly navíc zásahové místo pro TEV proteasu (str. 71 a 72). Z jakého důvodu?
- 8) Z Obr. 10 je patrné, že některé z variant Myomedinu získaných po třech kolech ribozomálního displeje měly k protilátce PGT126 významně nižší afinitu (na úrovni pozadí izotypové kontroly IgG  $\lambda$ ) než původní WT Myomedin. Testovali jste příčinu (např. varianta Myomedinu nebyla exprimována z důvodu přerušenoého čtecího rámce sekvence kódující danou variantu, nižší produkce kvůli nestabilitě varianty, popřípadě jiné důvody)?
- 9) Na straně 75 píšete: „Pro potvrzení toho, že proteiny označené jako Myomedin na SDS-PAGE gelech na Obr. 11 jsou skutečně vybrané varianty Myomedinu, byl proveden kontrolní Western blot. Výsledek je zobrazen na Obr. 12.“ Nicméně na Obr. 12 jsou ukázány jiné varianty Myomedinu (1, 3, 5, 7 a WT) než na Obr. 11 (33, 68, 36, 41 a 49). Proč nebyl WB udělán se stejnými variantami Myomedinu jako SDS-PAGE?
- 10) Proč je na Obr. 15 absorbance při 450 nm varianty Myomedinu č. 33 při kompetiční studii v bodě bez kompetitoru gp120 P4 na hodnotě přibližně 0,3 a u vazebného experimentu na Obr. 13 je při stejné koncentraci této varianty hodnota absorbance téměř na hodnotě 2,5? Obdobně je to patrné i u jiných variant. Znamená to, že FLAG-tag připojený k variantám Myomedinu použitých v kompetiční studii snižuje schopnost vazby těchto variant na cílovou protilátku PGT121, resp. PGT126?
- 11) Na Obr. 18B jsou v oblasti, kde by se měl nacházet monomer varianty Myomedinu č. 49, rozpoznávány anti-V5 protilátkou cílenou proti této variantě tři pruhy. Můžete vysvětlit proč?
- 12) V diskusi a závěru píšete, že tři z osmi variant Myomedinu vybraných pro imunizaci myši indukovaly tvorbu široce neutralizujících protilátek. Můžete zmínit, na kolika a kterých variantách HIV-1 pseudovirů byly tyto protilátky testovány a porovnat jejich účinnost s protilátkami indukovanými variantami ABD „scaffoldu“ (Kosztu et al. 2019) a variantami Myomedinu mimikujícími strukturu epitopu protilátky 10E8 (Kuchař et al. 2021)?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

