

## Oponentský posudek doktorské disertační práce

„ Nové vazebné proteiny odvozené od malých proteinových domén cílené na diagnosticky využitelné terče“

Autor: Mgr. Lucie Vaňková

Školitel: RNDr. Petr Malý, CSc.,

Práce se zabývá vývojem vazebných proteinů cílených na biomarkery karcinomu lidské prostaty, na povrchové markery epiteliálních a mesenchymálních buněk pro třídění cirkulujících rakovinných buněk, vazebných proteinů cílených na biomarkery specifických pro B podjednotku Shiga toxinu a na vývoj postupů a nástrojů pro validaci polyvalentních vakcín proti bakteriálním enterálním chorobám.

Téma předložené disertační práce je naprosto aktuální, výzkumně velmi zajímavé a týká se důležitých oblastí a problematiky rakoviny prostaty a identifikace Shiga toxinu.

Mgr. Lucie Vaňková předkládá svoji práci jako kompilaci pěti publikovaných impaktovaných vědeckých článků (*Protein & Cell*, 2015, vol. 6, s. 774-779., *PLoS ONE*, 2016, vol. 11., *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 2018, *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19., *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19.), kde je buď jako hlavní autor, nebo jako spoluautor a validační zprávy ELISA testu pro detekci protilátek proti rekombinantnímu adhesinům K88, K99, 987P and F41 and heat-labile toxin z *Escherichia coli*, toxins alpha, beta, beta2 and epsilon z *Clostridium perfringens* and toxin A z *Clostridium difficile*. Při tomto členění samozřejmě nemá smysl jakkoliv komentovat vyzrálост a hlavně vědeckou erudici předkladatele disertační zprávy, protože oponenti publikace v impaktovaných časopisech dostatečně identifikují vědeckou kvalitu předkládané publikace.

Nicméně je možné posoudit cíle předkládané práce, které byly celkem čtyři. Jednalo se o vývoj vazebných proteinů cílených na biomarkery karcinomu prostaty (proteiny lidského PSP94 a kallikrein 2 a kallikrein 11) na povrchové markery epiteliálních a mesenchymálních buněk pro třídění cirkulujících rakovinných buněk (vazebné proteiny založené na ABD a Myomedinovém skafoldu), vazebných proteinů cílených na biomarkery specifických pro B podjednotku Shiga toxinu a na vývoj postupů a nástrojů pro validaci polyvalentních vakcín proti bakteriálním enterálním chorobám. Z uvedených prvních 3 cílů jasně vyplývá, že se jednalo o participaci a realizaci disertační práce na řešených grantech v BTÚ v prestižní

laboratoři Dr. Malého, který je znám vysokou úrovní své vědecké činnosti směřující do využitelné praxe jak ve veterinární, tak humánní medicíně a kde byla poměrně vysoká šance plánovaných ambiciózních cílů při tvrdé práci dosáhnout. Cíle skutečně pro doktorandku nebyly malé a byly realizovatelné pouze ve skupině zkušených odborníků. O to víc je nutné vyzdvihnout práci publikovanou v *Protein & Cell*, 2015 s velmi vysokým IF, kde je předkladatelka dizertační práce na prvním místě.

Co se týká samotných výsledků je v práci jasně prezentován vývoj a charakterizace unikátních vazebných proteinů specifických pro lidské biomarkery rakoviny prostaty PSP94, KLK2 a KLK11, kdy pro selekci vazebných proteinů byly exprimovány a charakterizovány různé rekombinantní varianty cílových proteinů a kde rekombinantní cíle s výjimkou KLK2 byly produkovány v rozpustné formě v *Escherichia coli*. Dále pomocí kombinatoriální knihovny založené na ABD skafoldu byly v kombinaci s RD vyselektovány DNA sbírky PAB, KLA and HIP vazebných proteinů. V práci byla prokázána vazba těchto selektivních variant na příslušné rekombinantní terče. V experimentech, kde byly provedeny vazebné a kompetiční experimenty s použitím průtokové cytometrie na buněčné linii rakoviny prostaty LNCaP, se u variant PAB046 a PAB050 prokázalo, že rozpoznávají cílový protein PSP94 v jeho nativní konformaci. Souhlasím s tvrzením, že po dopracování by mohly být tyto vazebné molekuly zajímavé pro vývoj nových multifaktorových biosenzorů pro přesnější diagnostiku rakoviny prostaty.

Pomocí kombinatorické knihovny odvozené z ABD skafoldu byly pomocí RD vyselektovány a zaklonovány DNA sbírky CAB vazebných proteinů cílících na mezenchymální membránový marker N-cadherin a EBA vazebných proteinů vážících epiteliální membránový marker EpCAM.

Bylo prokázáno, že EBA014, EBA062, CAB043 a CAB101 varianty se váží na své rekombinantní terče, EBA014, EBA062 a CAB101 vykazovaly selektivní vazebné vlastnosti. V dalším cíli byly vytvořeny sbírky vazebných proteinů odvozených od Myomedinu vážící N-cadherin a EpCAM. Vytvořené vazebné proteiny mohou být využity jako zachycovací jednotky potřebné pro vývoj mikrofluidního čipu pro detekci a separaci CTC. Důležité praktické zjištění je, že třídění buněčných populací různých fenotypů prostřednictvím dvou povrchových biomarkerů může významně zvýšit citlivost a přesnost diagnostické metody a být tak užitečným nástrojem v klinické praxi!

Dále byl prokázán účinný a funkční displej vazebných proteinů odvozených od ABD na povrchu buněk *L. lactis*. Na základě mnoha experimentů byla vazebná varianta S1B26 označena jako nejslibnější pro vazbu Stx1B pomocí povrchového displeje na *L. lactis*.

Rekombinantní antigeny (CPA, CPB1, CPB2, ETX *C. perfringens* a TcdA toxin *C. difficile*) byly použity jako standardy pro vývoj citlivých a specifických ELISA souprav a protokolů pro kvantifikaci protilátek v myších sérech. Byly testovány parametry a kritéria přijatelnosti metody pro validaci, které prokázaly, že ELISA soupravy vyvinuté v této studii poskytují požadovanou specifitu a citlivost pro detekci klostridiových toxinů CPA, CPB1, CPB2, ETX a TcdA. Optimalizované protokoly ELISA byly navíc použity pro srovnání účinnosti vakcín, které jsou v současné době vyvíjeny firmou Dyntec s.r.o., s odpovídajícími komerčně dostupnými vakcínami. Výsledky ukazují, že vzorky vakcín společnosti Dyntec s.r.o. mají ve čtyřech testovaných valencích alespoň srovnatelné parametry jako konkurenční produkty. Tyto vyvinuté ELISA protokoly tvoří nedílnou součást oficiální validační dokumentace požadované pro certifikaci očkovacích látek českými i evropskými veterinárními orgány a budou využívány společností Dyntec s.r.o. pro testování kvality svých budoucích komerčních produktů.

K prezentaci výsledků nemám závažnějších připomínek. Překladatelka disertační práce splnila cíle této práce v plném rozsahu.

Dosavadní výsledky považuji za velmi zajímavé, zásadní a doporučuji pokusit se je dotáhnout do praktických aplikací.

K autorce práce mám několik dotazů:

- Podstatná část disertační práce je směřována k přípravě nových vazebných proteinů, které by měly sloužit jako kotevní komponenty mikrofluidního čipu k detekci sérových onkomarkerů nebo ke třídění buněk za dynamických podmínek. Z výsledků práce je patrné, že použitým konceptem ABD knihovny lze vyselektovat buněčně selektivní nebo cíleně specifické varianty vazebných proteinů, ale dosažené vazebné afinity v uvedených příkladech nejsou příliš vysoké. Je možné afinitu variant dále vylepšit nebo lze citlivost detekce na mikrofluidním čipu zlepšit povrchovým uspořádáním s využitím aviditního efektu? Je ABD model vhodným typem scaffoldu pro in vitro diagnostiku? Dá se odhadnout reálná komplexita obou použitých kombinatoriálních knihoven?
- Při selekci vazebných variant ribosomálním displejem jste v některých případech zvolila molekulární konstrukci vlastních rekombinantních proteinů produkovaných v bakteriích, v jiných případech jste zvolila zacílení na komerční protein produkovaný eukaryotickým hostitelem. Můžete uvést důvody, proč jste se rozhodla pro daný způsob a porovnat výhody či rizika obou přístupů?

- Při zrání imunitního systému dochází k eliminaci klonů, které tvoří protilátky proti vlastním antigenům. Tím se podstatně snižuje možnost krosreakivity protilátek vytvořených v živém organismu. Jak se vypořádáváte s vyšším množstvím krosreakivity – pokud k ní dochází.
- Jak je daleko praktická realizace u společnosti Dyntec s.r.o.?

**Závěr:**

Dizertační práce Mgr. Lucie Vaňkové je výborné úrovně a lze konstatovat, že tato práce splnila veškeré požadavky kladené na tento typ práce.

V Pohoří-Chotouni dne 7.12.2018

Ing. Pavel Trefil, DrSc.



Výzkum a Vývoj, BIOPHARM, Výzkumný ústav biofarmacie a veterinárních léčiv, a.,s.

Pohoří – Chotouň, 91