



ÚOCHB AV
CR
IOCB PRAGUE

Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky, v. v. i.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
of the Czech Academy of Sciences

Posudek na diplomovou práci Bc. Robina Kryštůfka nazvanou

„Vývoj instrumentace a metod s vysokou propustností pro hledání a validaci peptidových ligandů“

vypracovanou pod vedením Prof. RNDr. Jana Konvalinky CSc. na Přírodovědecké fakultě
Univerzity Karlovy v Praze

Robin Kryštůfek se ve své diplomové práci zabýval vývojem metodiky a instrumentace pro automatizovanou kombinatoriální chemickou syntézu peptidů a dále automatizovaného protokolu pro syntézu knihoven sekvencí mRNA (tzv. mRNA display), která se rovněž používá pro selekci biologicky aktivních peptidů. Robin v rámci této práce vyvinul přístroj pro automatizovanou paralelní syntézu peptidů a pro syntézu mRNA přizpůsobil pipetovacího robota, PCR cykler a robotickou ruku. Metodiky a instrumentace byly validovány na binární knihovně epitopů pro modelové protilátky a dále na několika kombinatoriálních knihovnách zahrnujících celkem více než tisíc peptidů. Výsledky byly pečlivě dokumentovány a diskutovány.

Celkově se domnívám, že Robin Kryštůfek odvedl vynikající práci, stanovené cíle splnil a že předložená diplomová práce svou kvalitou a rozsahem více než splňuje nároky obvykle kladené na diplomovou práci. Robin nejen, že optimalizoval a vyvíjel chemické reakce potřebné pro syntézu knihoven peptidů a mRNA, ale i vyvíjel, sestavoval a optimalizoval potřebné přístroje, což svědčí o jeho mimořádném technickém talentu. Robin se během řešení úkolů diplomové práce setkal s řadou technických či chemických komplikací, které se mu většinou podařilo úspěšně překonat. Jediné, co mohu práci trochu vytknout, je, že je sepsána dosti zhuštěně, a jelikož obsahuje řadu speciálních technických termínů a obrátů, klade na čtenáře, zvláště když není ve všem popsaném odborník, značné nároky, aby se v práci orientoval. Na této práci je také dobře vidět jak se čeština poněkud těžko vyrovnává s anglickými termíny a trochu kostrbatě pro ně hledá ekvivalenty (např. věty „... k dekonvoluci patientské protilátkové odpovědi v průběhu infekce.“ či „validace vysoko-propustnostního mRNA display protokolu...“). Možná by tato situace mohla být inspirací pro české chemické či biochemické společnosti, jak do českého názvosloví vnést nové pojmy. Celkově hodnotím diplomovou práci Robina Kryštůfka velmi vysoko a jednoznačně navrhuji jedničku.

Několik specifických otázek a komentářů:

1. Str. 24, druhý odstavec odspoda: co znamená „realizované v C#“ ?
2. Str. 31, Tabulka 5, neměla by „přesnost“ být spíše definována jako nepřesnost nebo chyba?
3. Str. 33, druhý odstavec: „pro aminokyseliny Asp a Asn připojené v daném cyklu byl na místo roztoku 2 použit odchraňovací roztok 1“. Předpokládám, že méně bazický roztok 1 byl použit s cílem zabránit tvorbě aspartimidů. Jen chci upozornit, že aspartimidy mohou vznikat nejen při odchraňování Fmoc skupiny toho daného aspartátu, ale kdykoliv při bazické deprotekcí během syntézy peptidu či stání peptidu v bazickém prostředí. Pozorovali jste častější vznik aspartimidů? Pozorovali jste pozitivní vliv chránící skupiny OBno? Zkoušeli jste OEpe?
4. Str. 64, zmiňujete, že v MS spektrech cyklizovaných peptidů nebyly nalezeny necyklizované peptidy. Pozorovali jste vznik dimerů či multimerů? Při cyklizaci na pryskyřici bych je předpokládal.
5. Jestli jsem dobře pochopil, zaznamenali jste ztráty na výtěžcích peptidů při extrakci štěpící směsí diethyletherem. Vynechání extrakce naopak mělo negativní vliv na čistotu peptidů. Ve vašem případě bych zvažoval použití acidostabilního a bazicky štěpitelného linkeru pro připojení peptidu k pryskyřici (viz např. Pícha et al. ChemPlusChem 2020).
6. Co brání spojení obou vyvíjených metod, tzn. syntézy peptidů na peptidového syntetizátoru a protokolu pro mRNA display, pro jeden tzv. „ostrý“ projekt, který by mohl vyústit ve vývoj nových ligandů pro nějaký relevantní target?

V Praze, 8. července 2021, Jiří Jiráček