

Posudek diplomové práce Josefa Šulce

Josef Šulc napsal diplomovou práci „Příprava a charakterizace vazebných proteinů mimikujících epitopy protilátek neutralizujících virus HIV-1“, ve které se věnuje využití myomedinových proteinových scaffoldů jako slibných prostředků k navození efektivní produkce neutralizačních protilátek proti HIV-1.

Práce je založena na dvou odlišných experimentálních částech – části biochemicko-biofyzikální, kde byly produkovány a charakterizovány myomedinové varianty a části bioinformatické, kde byla využita celá řada nástrojů k predikci a validaci myomedinových variant a k charakterizaci jejich interakce s protilátkou 10E8. Vzhledem ke svému znalostem a zkušenostem se ve svém hodnocení budu věnovat především bioinformatické části, která sama o sobě svým rozsahem i obsahem naplňuje požadavky na diplomovou práci.

Práce má však klasické členění, kdy po úvodu přichází logicky vystavěný literární přehled, který shrnuje současné poznatky o biologii HIV-1. Jen ta zkratka HIV-1 je formálně zavedena až poté co je několikrát použita. V úvodu jsem také postrádal informace o dalších malých scaffoldech, které lze využít jako mimikující proteiny či alespoň vysvětlení proč zrovna domény myomesinu-1 jsou tou správnou cestou.

V části Materiál mám prosbu, aby autor uváděl k sekvencím proteinů i unikátní identifikátory (např. Uniprot), aby bylo naprosto zřejmé o jaké sekvence jde a bylo možné sekvence znovu použít. U použitých struktur, které jsou možná trochu nelogicky v postupu práce místo v materiálu, jsou unikátní identifikátory z PDB databáze použity, ale zase chybí informace o tom o jaký protein jde a text je tak méně přehledný. U použitého softwaru by pak byly skvělé odkazy na místo, kde lze příslušné verze získat. Velmi obsáhlá je část o homologním modelování a optimalizaci vzniklých modelů. Z mého pohledu chybí klíčové informace, proč byl vybrán templát, který byl pak dále používán a proč bylo v hodnocení modelu použito score DOPE a ne molpdf, které pro každý model Modeller také generuje. Použitý templát má nejlepší dostupné rozlišení, ale kvalita struktury rozhodně není oslnivá a neodpovídá získanému rozlišení. Trochu jsem postrádal smysl třech kol „vylepšování“ modelů, jak tomu autor v textu říká – autorovi se tím dařilo zlepšovat kvalitu modelu dle několika parametrů, které měří Molprobity, ale které jsou relativně snadno optimalizovatelné – zda jsou však tyto „vylepšení“ biologicky relevantní či nějak ovlivnily závěry, které následně autor díky modelům udělal mi nebylo jasné. Molprobity skóre, které pro své modely získával byly výrazně lepší než Molprobity skóre templátu použitého pro modelování – homologní modely obecně nemívají vyšší kvalitu než templáty z kterých pocházejí. Autor této části věnoval velké úsilí a energii, ale nejsem si jistý, že to mělo smysl vzhledem k cílům, které si vytkl.

V kapitole Výsledky a diskuse jsou pak pečlivě popsány experimenty, které autor provedl a které doslova ohromují jak svou metodickou šíří tak prostým rozsahem a množstvím – v hlavním textu je 32 obrázků a 20 tabulek. A to ani nemluvíme o dalších bezmála 30 stranách příloh, které jsou také prošpikované dalšími výsledky. V takovém množství se autor nevyhnul drobným nedokonalostem – např. je v textu správně označen obrázek 22 a v popisku je obrázek označen jako obrázek 1. Když už jsem u těch formálních nedodělků, tak v seznamu literatury není používán konzistentní formát a je možné najít jak Nucleic Acid Research tak Nucleic Acid Res.. Mým hlavním komentářem však mělo být, že vysoce oceňuji množství, kvalitu a metodický rozsah práce, které tato diplomová práce pokrývá a které je z mé zkušenosti vysoce nadprůměrné. V této kapitole bych však snad ocenil více ocenil podrobnější diskusi s existující literaturou, které je v textu velmi málo. Naopak však autor

vždy poctivě uvažuje o metodických i jiných faktorech, které mohly ovlivnit výsledky jeho experimentů.

Po mém soudu jedním z nejpřekvapivějších výsledků, které autor získal, je, že predikovaný způsob interakce mezi myomedinovým scaffoldem a protilátkou je odlišný od interakce pozorované v experimentálně určené struktuře. Pokud jsem správně pochopil text, tak se Josef Šulc přiklání k hypotéze, že správný mód interakce je ten jím predikovaný – nenašel jsem však v textu hypotézu či vysvětlení, jak mohlo dojít k zachycení interakce ve špatné konformaci u experimentálně určené struktury.

Text je i přes svou délku psán dobrou a srozumitelnou češtinou.

Celkově práci hodnotím jako vysoce nadprůměrnou s množstvím originálních výsledků na extrémně kompetitivním a smysluplném poli a práci jednoznačně doporučuji k obhajobě a hodnocení stupněm výborně.

Otázky:

Proč jste modeloval struktury původně i s His-tagy, u kterých nelze předpokládat, že ovlivní vlastnosti scaffoldu?

Vaše výsledky jsou často reportovány s velkou přesností – např. translační difuzní koeficient s přesností na dvě desetinná místa. Chci se zeptat, zda je to podle Vás racionální při vědomí, že jde o predikované struktury a že proteiny jsou flexibilní a svou strukturu do jisté míry neustále proměňují?

V práci jste použil i extrémně novou databázi Alphafold pro model proteinu Hsp70 a srovnával je s experimentálně určenou strukturou Hsp70. Proč jste toto srovnání dělal a co Vám přineslo?

Máte nějaké vysvětlení proč není interakce myomedinu a protilátky v experimentálně určené struktuře ve shodě s Vámi predikovanou interakcí?

V práci máte velmi podrobně popsané interakční energie u jednotlivých variant na úrovni aminokyselin -pomohlo Vám to navrhnout např. další varianty, které by mohly zamýšlený cíl naplnit ještě lépe?

V Praze, dne 6.9. 2021.

Marian Novotný

