

## Oponentský posudek diplomové práce Nikola Bělousová: Deriváty protilátek využitelné k detekci lidské glutamátkarboxypeptidasy II

Diplomová práce Nikoly Bělousové se zabývá expresí, purifikací a studiem vlastností jednořetězcových fragmentů protilátky proti lidské glutamátkarboxypeptidase II. Označení této protilátky je 5D3 a pochází z laboratoře vedoucího této diplomové práce, Dr. Bařinky. Cílem práce kandidátky bylo exprimovat několik konstruktů pro scFv fragmenty dané protilátky v různých expresních systémech (bakterie, kvasinky, hmyzí buňky), vzájemně tyto systémy porovnat z hlediska úrovně exprese a otestovat připravené fragmenty pomocí metod ELISA, průtokové cytometrie a imunofluorescenční mikroskopie. Jedním z cílů bylo také srovnat vlastnosti připravených fragmentů s původní protilátkou 5D3. Celý pracovní proces zahrnoval i přípravu použitých expresních vektorů, jakož i optimalizaci purifikačních protokolů apod.

Předložená práce má 106 stran, 30 obrázků, 10 tabulek a je členěna klasickým způsobem. Seznam literatury obsahuje 147 citací. Text je psán srozumitelně a obsahuje tolerovatelné množství překlepů a chyb. Vyzdvihnout lze např. hned úvod, zvláště tu část, která se zabývá genovým inženýrstvím protilátek a jejich derivátů. Takovýchto textů v češtině zřejmě není v současné době dostupných mnoho. Následuje metodická část s podrobným popisem použitých technik a pracovních postupů, dále část obsahující získané výsledky a diskuse. Práci zakončuje krátký závěr shrnující získané výsledky a seznam citované literatury.

Celá diplomová práce zahrnuje úctyhodné množství použitých metodik a technik – od metod molekulární biologie, přes metody exprese a purifikace proteinů až k metodám průtokové cytometrie a imunofluorescenční mikroskopie. Osobně považuji za největší přínos vypracování expresního a purifikačního protokolu pro přípravu scFv 5D3 HL fragmentu ve hmyzích buňkách a úspěšné otestování využitelnosti připraveného proteinového produktu pro imunofluorescenční zobrazovací techniky. Je zřejmé, že tyto výsledky nepředstavují konec příběhu, ale že v laboratoři budou následovat další snahy o testování a praktické využití tohoto fragmentu protilátky.

K práci mám několik poznámek:

- 1) Jazyk práce je srozumitelný a čtivý. Občas se objevují překlepy, či nepřesnosti. Viriony zmíněné na str. 10 zřejmě ve skutečnosti nemají průměr 7 mm a kvasinka zmíněná na str. 21 dvakrát jako „*Pichia pastoris*“ a jednou jako „*P. Pastoris*“ se správně píše „*Pichia pastoris*“. Věta na str. 20, začínající slovy: „U kvasinek se objevuje několik výhod prokaryotických systémů...“ je zřejmě neobratně formulovaná.
- 2) Spisovná čeština je jazyk, který se neustále vyvíjí, nicméně výrazy jako „epinka“ (str.46), by asi bylo vhodnější nahradit některým tradičnějším označením (mikrozkumavka?).
- 3) Text v použitých obrázcích má občas nízkou grafickou kvalitu (např. Obr. 5). Domnívám se, že u jednotlivých obrázků není nutno udávat „Obrázek vytvořil autor“. Pokud není uvedeno jinak, samozřejmě se to předpokládá. Tabulky 9 a 10 (na str. 56 a 75) budí trochu úsměv množstvím čísel za desetinou čárkou a měly by samozřejmě obsahovat zaokrouhlené údaje.

K práci mám tyto dotazy:

1. Byly fragmenty protilátek získané expresí v *E. coli* a v S2 buňkách charakterizovány hmotnostní spektrometrií? Je možno mít jistotu, že je výsledný proteinový produkt zcela intaktní?
2. Je známo něco o tom, zda se proteinové produkty v tomto konkrétním případě liší posttranslačními modifikacemi? Mohlo by to vysvětlovat rozdílné pozorované vlastnosti fragmentů?
3. Celá protilátka 5D3 má hodnotu  $K_d$  vůči GCPII přibližně osmkrát nižší, než fragment scFv připravený v S2 buňkách. Je tento poměr v souladu s tím, co bývá pro poměr síly vazby scFv fragmentů vzhledem k celým protilátkám běžně pozorováno?
4. Je něco známo o tom, kde přesně se protilátka 5D3 na molekulu GCPII váže? Váže se také na GCPIII?

Přes uvedené drobné komentáře považuji tuto práci za velice kvalitní a představující skutečný vědecký přínos v dané problematice. Podle mého mínění splňuje všechny podmínky, které jsou na takovou práci kladeny. Doporučuji proto přijmout ji k další obhajobě.

V Praze 18. 5. 2018

RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D.