



RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.
Fyziologický ústav AVČR, v.v.i.
Oddělení Strukturní biologie signálních proteinů
Detašované pracoviště BIOCEV
Průmyslová 595
252 50 Vestec
Tel.: +420 325873513
Email: veronika.obsilova@fgu.cas.cz

Posudek oponentky na diplomovou práci:

Bc. Tereza Nepokojová
obor Biofyzikální chemie, PřFUK v Praze

„Modulace interakcí interleukinů a jejich receptorů“.

Ve své diplomové práci se Tereza Nepokojová zabývala produkcí a biofyzikální charakterizací vazebných proteinů s cílem nalézt takový vazebný protein, který by simuloval funkci přirozeného cytokinu a spouštěl signalizaci vedoucí k imunitní odpovědi. V této práci byly jako vazebné proteiny použity scaffoldy, což jsou proteiny s vysokou konformační stabilitou. Scaffold měl dva vazebné povrchy, které byly nezávisle mutovány pro vazbu dvou různých cytokinů pomocí jedné z metod řízené evoluce – kvasinkového displeje.

Tereza Nepokojová se nejprve zaměřila na přípravu expresních konstruktů variant proteinového skafoldu, kdy byl mutován jeden nebo oba vazebné povrchy pro vazbu na Receptor 1 nebo 2. Za tímto účelem použila dvě různé metody klonování: bez restrikčních enzymů i s restrikčními enzymy a získala celkem osm různých variant scaffoldů pro Receptor 1 a sedm pro Receptor 2. Následně expresní konstrukty exprimovala v bakteriálním expresním systému a purifikovala dvoustupňovou purifikací. Všechny vazebné proteiny byly charakterizovány pomocí několika biofyzikálních technik: nanoDSF, CD, DLS

V dalších experimentech Tereza Nepokojová sledovala sílu interakce jednotlivých vazebných proteinů na Receptor 1 či Receptor 2 pomocí metody MST, přičemž vazebné křivky úspěšně získala pro vazbu rekombinantních vazebných proteinů Receptoru 2. Rovněž zahájila krystalizaci vybraných proteinů vázajících Receptor 1, u jednoho z nich se podařilo získat předběžné krystaly. Výsledky této zevrubné charakterizace budou brány v potaz při dalším výběru pomocí kvasinkového displeje s cílem aplikace v léčbě autoimunitních onemocnění

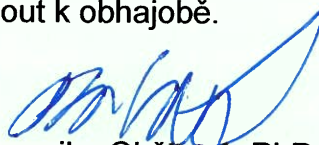
Předkládaná diplomová práce ukazuje, že autorka získala řadu originálních poznatků a velmi dobře zvládla rozličné pokročilé biofyzikální

metody: nano DSF, CD spektroskopii, mikrotermoforézu, dynamický rozptyl světla, ale i přípravu expresních konstruktů, následnou expresi proteinů v bakteriálním expresním systému, purifikaci proteinů a přípravu proteinů pro krystalizaci. K formální podobě práce nemám žádné připomínky, práce má standardní členění, je napsána přehledně, pečlivě, s minimálním výskytem překlepů a použitím hantýrky, výsledky jsou názorně prezentovány. Diskuse získaných výsledků a citace použité literatury jsou také zcela adekvátní.

K předkládané diplomové práci mám jen několik drobných otázek do diskuse:

1. V teoretickém úvodu popisujete dva typy skafoldů: anticaliny a DARPiny. S jakými varianty proteinového skafoldu jste pracovala vy?
2. Pro transformování DNA knihoven získaných z kvasinek do *E. coli* jste použila kompetentní buňky *E. coli Clooni*. Proč byly použity tyto buňky a čím se vyznačují? Tyto buňky byly rovněž použity po RF klónování spolu s buňkami TOP10 pro přípravu vazebných konstruktů pro Receptor 1, zatímco pro přípravu vazebných konstruktů pro Receptor 2 byly použity pouze buňky TOP10. Byl k tomu důvod? Můžete kdyžtak komentovat rozdílné výsledky pro oba kmeny po PCR, str. 64, obr. 12?
3. Proč máte na všech obrázcích zachycující průběh gelové permeační chromatografie osu x nastavenou od objemu 7 ml (str. 67, 78)?
4. Jaká byla afinita Vámi připravených vybraných vazebných proteinů pro Receptor 2 určená pomocí mikrotermoforézy, dle obr. 36 na str. 85? Plánujete mutovat i druhý vazebný povrch vazebných proteinů Receptoru 2? Myslíte si, že by to mohlo zlepšit vazbu?
5. Jakým směrem se bude dále vyvíjet příprava skafoldů pro Receptor 1 a 2? Jaký skafold bude následně použit v praxi?

Závěrem konstatuji, že Tereza Nepokojová ve své diplomové práci splnila všechny vytčené cíle a demonstrovala schopnost samostatné vědecké činnosti. Předložená diplomová práce více než splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci a plně ji doporučuji přijmout k obhajobě.



RNDr. Veronika Obšilová, PhD.

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., BIOCEV

27. srpna 2020