

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky: Bc. Elena KARLUKOVA

Název práce:

Development of high-throughput screening assay for the identification of inhibitors targeting influenza A polymerase.

A. Bodové hodnocení jednotlivých aspektů práce (označte právě jednu z možností)

1. Rozsah DP a její členění	
X	A - přiměřené, odpovídají charakteru DP a významu jednotlivých částí
	B - nevyrovnané, členění není logické n. rozsah jednotlivých částí nekoresponduje s jejich významem
	C - uspokojivé, rozsah některých částí nedostačuje
	N - nedostatečné

2. Odborná správnost	
X	A - výborná, bez závažnějších připomínek
	B - velmi dobrá, s ojedinělými drobnými závadami (nejasnost výkladu, chyby ve vzorcích nebo chemických názvech, nedokonalý popis metod nebo výsledků)
	C - uspokojivá, s četnějšími drobnými závadami
	N - nevyhovující, s hrubými chybami

3. Uvedení použitých literárních a j. zdrojů	
X	A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce
	B - uspokojivé, s občasnými neobratnostmi zejm. v umístění odkazů, nebo s celkově nižším počtem citací
	C - s vážnějšími závadami, např. převažují "nestandardní" odkazy na učebnice, přednášky, webové stránky, nebo se ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat
	N - nevyhovující, velmi málo citací, ev. rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu)

4. Jazyk práce	
X	A - výborný, práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb
	B - velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby
	C - uspokojivý, četnější slohové neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby, ojediněle se vyskytují obtížně srozumitelné n. nejednoznačné formulace
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

5. Formální a grafická úroveň práce	
X	A - výborná, bez překlepů a chyb ve formátování
	B - velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy, chybějící zkratky apod.
	C - uspokojivá, s ojedinělými většími (např. vynechání stránky) nebo četnějšími drobnými chybami
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5. :

Main goals of Elena Karlukova's diploma thesis were to prepare recombinant PA endonuclease (NPA) and PB2 cap-binding domains and then used prepared proteins to develop and optimize high-throughput screening assays based on DIANA and AlphaScreen technologies. The student successfully prepared three different recombinant proteins (GST-NPA, NPA and His-tagged PB2). GST-NPA was consequently used to develop and optimize AlphaScreen-based assay in which HIV integrase inhibitor raltegravir was shown to be micromolar inhibitor of PA endonuclease activity. NPA protein was used in co-crystallization experiments with raltegravir and his-tagged PB2 protein was used for optimization of DIANA-based screening assay. Both developed and optimized assays can be used for the high-throughput screening of large small-molecule libraries to look for inhibitors of influenza polymerase endonuclease activity and cap binding.

The thesis is well structured and clearly written in good English. The occurrence of typos is low. In my opinion it is an excellent diploma thesis presenting a wealth of interesting results. The thesis demonstrates that Elena Karlukova learned and mastered various methods of protein biochemistry, biophysical techniques for the characterization of protein-ligand interactions and protein crystallization. In conclusion, I fully recommend this diploma thesis for defense.

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

1. Is there any connection between „HA-NA functional balance“ and virulence of various influenza strains?
2. Which ions are present within the active site of PA endonuclease domain under physiological conditions? Did the structural data on PA help to identify these ions?
3. Is the inhibitory function of Baloxavir marboxil entirely based just on chelation of metal ions required for endonuclease activity?
4. The co-crystallization of PA endonuclease domain with raltegravir was performed with approx. 1 mM ligand concentration. Why higher raltegravir concentrations were not tested?
5. Fig. 37 (page 81) – there are relatively large differences between K_D values reported for m^7 GTP binding to PB2 cap-binding domain by you and in the literature. Can you comment on that?

Stanovisko k opravě chyb v práci:

opravný lístek/oprava v textu **NENÍ** podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

Navrhovaná celková klasifikace: výborně

Datum vypracování posudku: 28.8. 2018

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS): prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.