

Posudek na dizertační práci „Strukturní a funkční studie virových RNA polymeráz“

Předkladatelka: Mgr. Anna Dubánková

Školitel: Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, PhD.

Předkládaná dizertační práce je založena na čtyřech rukopisech přijatých v renomovaných impaktovaných časopisech (2x *Scientific Reports*, *Antiviral Research*, *Journal of Structural Biology*), kde ve všech případech je předkladatelka první autorkou. Práce o celkovém rozsahu 87 stran (včetně příloh) je psána v angličtině s klasickým členěním zahrnující obecný úvod, metodickou část, výsledkovou část a diskuzi, seznam citací a čtyři vložené rukopisy. Formální stránka práce je zdařilá. Výhrady mám nicméně k diskuzi, respektive k její citelné absenci. Čtyři strany diskuze jsou sice svým rozsahem úměrné ostatním kapitolám dizertace, ale namísto kritického zhodnocení získaných dat ve vztahu k publikovaným skutečnostem, se jedná spíše o opakované shrnutí výsledků, popřípadě přehled studované problematiky.

Cílem dizertace byla biochemická a strukturní charakterizace RNA polymeráz pikornavirů a flavivirů, které jsou nepostradatelné pro životní cyklus virů a tudíž vhodných cílem terapeutických zásahů. Dizertační práce objasnila mechanismus tvorby multiproteinových komplexů zahrnujících mimo jiné PI4K a virovou polymerázu na buněčných membránách, poskytla strukturní vysvětlení aktivace pikornavirových RNA polymeráz s nekanonickou N-koncovou aminokyselinou a vyřešené struktury polymeráz virů Zika a žluté zimnice mohou být využity pro racionální návrh inhibitorů těchto enzymů. Získaná data tudíž budou bezesporu přínosná pro širší vědeckou komunitu zabývající se studiem virů ať už v základním nebo aplikovaném výzkumu.

K dosažení cílů předkládané práce si Anna musela osvojit široký rozsah experimentálních technik od metod molekulární biologie (klonování, mutagenese), heterologní exprese, purifikační metody, biochemická stanovení, molekulové modelování a v neposlední řadě pokročilé techniky strukturní biologie. Pevně věřím, že takto široké metodologické portfolio bude dobrým základem pro další kariéru Mgr. Dubánkové ať už v akademické nebo privátní sféře.

Rád bych kandidátce položil následující dotazy:

1. V *in vitro* experimentech popisujících skládání proteinových komplexů na membránách využíváte několik typů tzv. „umělých membrán“ (Multimamellar Large Vesicles, Giant Unilamellar Vesicles, Large Unilamellar Vehicles). Můžete krátce shrnout rozdíly v biofyzikálních vlastnostech těchto membrán, způsobech jejich přípravy a jejich experimentálním využití?

2. V publikaci popisující strukturu RNA-polymerasy Aichi viru jste zvolila poněkud konzervativní kritéria pro určení maximálního rozlišení experimentálních dat ($l/\sigma = 5$, $CC_{1/2} = 0,94$). Můžete zmínit Váš pohled na v rentgenostrukturní analýze často diskutovanou problematiku stanovení maximálního rozlišení experimentálních dat? Jaké parametry (jejich hodnoty) považujete za kritické/limitní?
3. V teoretickém úvodu na straně 10 zmiňujete, že v replikačních organelách je výrazně zvýšena koncentrace komponent potřebných k replikaci virů, například nukleosid trifosfátů? Jaký je mechanismus zvýšení této lokální koncentrace, o jak velké zvýšení oproti cytoplazmatické/jaderné koncentraci se jedná a jak moc jsou obecně virové RNA polymerázy závislé na koncentraci nukleosid trifosfátů?

Závěrem můžu konstatovat, že předkládaná dizertační práce splňuje všechny požadavky Oborové rady Fyzikální chemie a proto ji plně doporučuji k obhajobě.

Ve Vestci, 1. prosinec 2019

RNDr. Cyril Bařinka, PhD
Laboratoř Strukturní Biologie
Biotechnologický ústav AV ĀR
Průmyslová 595, Vestec, Āeská republika
telefon: +420-325-873-777
e-mail: cyril.barinka@ibt.cas.cz
<http://lsb.avcr.cz/>

