

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Anny Dubánkové nazvanou: „Structural and functional study of viral RNA polymerases“

Předkládaná dizertační práce je založena na čtyřech publikacích v časopisech (Scientific Reports, Journal of Structural Biology a Antiviral Research), kde je studentka prvním nebo sdíleným prvním autorem. Oceňuji, že disertační práce je napsána v angličtině. Experimentální výsledky, které jsou základem disertační práce Anny Dubánkové jsou působivé. Práce přinesla nové poznatky k současnému chápání replikace pikornavirů a flavivirů.

Studentka ukázala, jak proteiny pikornavirů indukují re-lokalizaci buněčných proteinů zodpovědných za fosforylaci PI4K do membrán tvořících virové replikační organely. Fosforylace PI4K a následný negativní náboj umožňují preferenční asociaci virových 3D RNA polymeráz do těchto membrán. Krystalografické studie RNA polymeráz kobuvirů a sicinivirů ukázaly, jak N-koncové aminokyseliny těchto proteinů podmiňují jejich enzymatickou aktivitu. Tyto výsledky mohou přispět k vývoji proti-virových inhibitorů.

Studentka také určila strukturu RNA-polymerázy a metyl transferázy NS5 viru žluté zimnice. Pomocí simulací Anna připravila model RNA-polymerázy NS5 viru Zika v komplexu s RNA dinukleotidem, ATP, a hořčičnými ionty. Struktura a model těchto polymeráz poslouží k *in silico* dokovacím experimentům, které mohou přispět k vývoji proti-virových léčiv.

Práce demonstruje značné zkušenosti autorky v oblasti exprese a purifikace proteinů, biochemické charakterizace RNA-polymeráz, a v oblasti určování proteinových struktur s pomocí krystalografie. Práce má klasické členění na úvod, cíle, výsledky dělené podle publikací, diskusi dělenou podle publikací, závěry a seznam výsledků. K práci nemám zásadní výhrady, jen drobné připomínky:

- 1) Text je repetitivní, stejné informace jsou prezentovány v kapitolách výsledky, diskuse, závěry a seznam výsledků. Pokud by autorka zjednodušila strukturu práce, tak by text byl kratší a čtivější.
- 2) Úvod práce má nekonzistentní strukturu. V sekci flavivirů jsou diskutovány specificky YFV a ZIKV (které byly předmětem studií autorky), obdobná informace pro pikornaviry chybí.
- 3) Doporučuji používat menší množství zkratk – text se stane čtivějším.
- 4) Text obsahuje řadu překlepů, jazykových chyb a místy i chybějících slov. Jako příklad uvedu pouze větu z abstraktu: “In this study, we investigated the recruitment of picornaviral polymerase membrane.”
- 5) Některé formulace jsou nejasné, nebo zavádějící. Prosím autorku o bližší vysvětlení:
 - Strana 8: “+RNA viruses have developed various replication strategies but the most important replication tactic is the recognition of their genomic RNA by the host cell machinery as mRNA.” – Je zvláštní spojit replikaci virů s rolí mRNA v translaci.
 - Strana 13: “Structural proteins are pre-matured as VP0, VP1 and VP3. Protein VP0 is consequently matured into proteins VP2 and VP4²⁸. Proteins VP1–VP4 assemble into the viral icosahedral capsid.” – Nezralé kapsidy pikornavirů se sestavují z proteinů VP0, VP1 a VP3.

- Strany 13-14: “The VP1 protein forms a vertex with the capsid and is responsible for the host cell receptor attachment²⁹.” – Přílišné zjednodušení, pikornaviry používají různé receptory, které se vážou i na ostatní kapsidové proteiny. Uvedená reference není relevantní.

K disertační práci mám následující podněty pro diskusi:

1. Existují obecné principy, které umožňují úspěšnou purifikaci a krystalizaci RNA-polymeráz pikornavirů a flavivirů?
2. S jakými prostorovými skupinami jste se během své práce setkala? Která z nich měla nejkompexnější symetrii?
3. Pracovala jste v průběhu Vašeho PhD studia na nějakém projektu, který byl neúspěšný / nevedl k publikaci? Pokud ano, proč tomu tak bylo a co by bylo možné změnit, naplánovat jinak?
4. Navrhněte další směry výzkumu RNA-polymeráz pikornavirů a flavivirů.

Práci doporučuji k obhajobě.

V Brně 20. listopadu 2019.

Pavel Plevka
CEITEC, Masarykova Univerzita
Kamenice 5
Brno, 625 00