

POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Předložená diplomová práce Bc. Anny Dubánkové nazvaná „Strukturní charakterizace replikace RNA lidského Aichi viru“, se zaměřila na problematiku týkající se virových RNA dependentních RNA polymeráz (RdRp). Tyto enzymy umožňují RNA virům replikovat svůj genom a připravit mediátorovou RNA pro translaci virových bílkovin.

Aichi virus je lidský patogen a používá se jako modelový organismus pro studium podobných virů, které jsou ovšem svojí virulencí mnohem agresivnější jako je virus hepatitidy A, SARS, virus žluté horečky apod. Struktura RdRp, 3D^{pol} z tohoto viru nebyla dosud vyřešena. V první části práce byl připraven protein 3D^{pol} v dostatečném množství a čistotě, ale proteinové krystaly difraktovaly v příliš nízkém rozlišení. Bylo proto připraveno několik mutantních proteinů 3D^{pol}, jejichž krystaly měly lepší difrakci a bylo je třeba dále optimalizovat dehydratací, kterou se získala data s rozlišením 3.8Å. Řešení struktury při tak nízkém rozlišení bylo velmi obtížné, proto se zde uvádí neúplné řešení, kde je přiřazen pouze hlavní řetězec a postranní zbytky nejsou vůbec modelovány. Na základě strukturních srovnání se strukturami 3D^{pol} z Polioviru 1 nebo Cocksackie viru 3b se dá předpokládat, že vyřešení struktury tohoto proteinu je, po navržení nových mutantních konstruktů 3D^{pol}, které by mohly vytvářet krystaly s lepšími difrakčními vlastnostmi, pouze otázkou času.

Ve druhé části práce se studentka zabývala možností zda-li se bílkovina 3D^{pol} váže na membránu skrze fosfolipid fosfatidylinositol 4 fosfát (PI4P). Podle nedávno publikovaných experimentálních dat podobný virový protein 3a rekrutuje fosfatidylinositol 4 kinasu IIIbeta, která katalyzuje tvorbu PI4P. Interakce proteinu 3D^{pol} s tímto fosfolipidem by vysvětlovala lokalizaci virového aplikačního komplexu na membráně. Membrána poskytuje scaffold virovému replikačnímu komplexu a současně zvyšuje lokální koncentraci komponentů nutných pro replikaci RNA. Koncentrace PI4P ve virově indukovaných membránách má vliv na replikaci virové RNA. Může se jednat o přímou interakci bílkoviny 3D^{pol} s PI4P. Podle dat získaných z in vitro experimentů tzv. pulldown assay 3D^{pol} netvoří komplex s PI4P. Interakce v buňce je tedy buď nepřímá, přes nějaký další dosud neidentifikovaný protein a nebo vyžaduje dosud neznámou posttranslační modifikaci 3D^{pol} například fosforylaci.

V neposlední řadě byl ještě zkoumán vliv ribonukleotidů na stabilitu proteinu 3D^{pol}. Analýzou teplotní denaturace wt proteinu 3D^{pol} z Aichu viru bylo zjištěno, že pyrimidinové base destabilizují protein, zatímco purinové base jej mírně stabilizují.

K úspěšnému splnění vytčených cílů musela Anna Dubánková zvládnout celou šíři metod z molekulární biologie, purifikaci a krystalizaci bílkovin a různé biofyzikální metody.

Diplomová práce Anny Dubánkové je formálně i jazykově na velmi dobré úrovni s vyváženou proporcí mezi teoretickou a výsledkovou částí. Výsledky a diskuze zabírají dostatečnou část z celkového počtu stránek. Citovaná literatura je použita v dostatečném množství odkazů. Práce je napsána velmi přehledně a s minimem překlepů.

K diplomové práci mám následující dotazy:

1. Jaký je důvod nízké difrakce krystalů 3D^{pol}?
2. Proč právě glycerol tak dobře stabilizuje protein 3D^{pol}?
3. Jaké další patogeny využívají signální lipid PI4P a proč?

Závěrem mohu konstatovat, že předložená práce Anny Dubánkové je velmi kvalitní a zcela vyhovuje požadavkům kladených na diplomovou práci. Studentka prokázala schopnost samostatně pracovat a prezentovat získané výsledky. Navrhuji tuto práci uznat jako práci diplomovou a hodnotím jí známkou výborně.

V Praze dne 17.5. 2016

ing. Jan Teisinger CSc.
FGÚ AVČR, v.v.i.