

Oponentský posudok dizertačnej práce Mgr. Kateřiny Krejčovej

Predložená dizertačná práca Mgr. Kateřiny Krejčovej s názvom “**Biofyzikální a strukturní studie virových polymeráz a methyltransferáz**” pojednáva o aktuálnej téme potreby vývoja antivirálnych látok, ktoré sú schopné inhibovať kľúčové enzýmy potrebné na replikáciu +RNA vírusov. Práca bola vypracovaná pod vedením školiteľa Mgr. et Mgr. Evžena Bouřy, Ph.D.

Práca sa zameriava na dve veľké skupiny vírusov: flavivírusy a koronavírusy, a ich enzýmy RNA-dependentné RNA polymerázy (RdRp) a methyltransferázy (MTase). Tieto enzýmy sú nepostrádateľné pre replikáciu vírusu a preto aj vhodným cieľom na inhibíciu replikačného cyklu.

Dizertačná práca je písaná v českom jazyku a je formálne aj obsahovo na vysokej úrovni. V teoretickom úvode autorka ozrejmúje životný cyklus flavivírusov a koronavírusov, pričom v dostatočnom detaile popisuje štruktúrne a neštruktúrne proteíny kódované vírusovým genómom. Funkcia jednotlivých proteínov je popísaná dostatočne podrobne, čo umožňuje aj čitateľovi menej znalému problematiky neštruktúrnych proteínov uvedených vírusov rýchlo sa zorientovať. Kapitola je uzavretá prehľadom súčasných možností antivírusovej terapie pre uvedené rodiny vírusov. V teoretickom úvode by som uvítal aspoň schematické znázornenie replikačného cyklu koronavírusov, podobne ako je to uvedené pre flavivírusy na obr. 2.

Ciele práce sú rozdelené do dvoch hlavných kategórií. Prvá sa zaoberá štruktúrnymi štúdiami RNA-dependentných RNA polymeráz, methyltransferáz a ich inhibítormi, pričom druhá časť je zameraná na testovanie inhibičných efektov nových antivirových. Ciele sú definované jednoznačne a zrozumiteľne.

Výsledky sú súhrnom troch publikácií a jedného manuskriptu, na ktorých sa autorka spolupodieľala. Na dvoch publikáciách a manuskripte je uvedená ako hlavná autorka štúdie, na jednej publikácii je spoluautorkou. Okrem uvedených publikácií sa autorka dizertačnej práce spolupodieľala na výsledkoch ďalšej publikácie, ktorá netvorí súčasť predloženej dizertačnej práce.

Vo výsledkovej časti má každá publikácia svoj súhrn, obsahujúci krátky úvod do problematiky, zhrnutie výsledkov a v samostatnej časti diskusiu k výsledkom. Veľmi pozitívne hodnotím, že ku každej publikácii je uvedené, akým príspevkom autorka k výsledkom prispela. Kópie publikácií sa nachádzajú v prílohe dizertačnej práce. Na tomto mieste by som vyzdvihol kvalitu publikácií, pričom jedna z nich je publikovaná v prestížnom časopise *Structure*. Na tejto publikácii je Kateřina Krejčová zároveň prvou autorkou.

Kateřina Krejčová v rámci svojej práce zvládla metódy prípravy rekombinantných vírusových proteínov v čistote vhodnej na kryštalizáciu a štruktúrnu analýzu. Taktiež sama vykonala všetky kryštalizačné experimenty a nazbierala difrakčné dáta potrebné na vyriešenie štruktúry vykryštalizovaných proteínov. Pri purifikovaných enzýmoch realizovala všetky *in vitro* testovania nových antivirov, čím preukázala schopnosť zvládnuť široké spektrum laboratórnych metód a techník potrebných na dosiahnutie výsledkov uvedených v dizertačnej práci.

Otázky k diskusii:

1. V článku "*Structural and functional insights in flavivirus NS5...*" ste zistili výrazné rozdiely v enzýmovej aktivite RdRp a MTase u rôznych flavivírusov. Aktivita bola stanovená pri konštantnej koncentrácii enzýmu, ale v článku nie je uvedené, akou metódou bola koncentrácia enzýmov-proteínov stanovená. Proteíny RdRp/MTase boli produkované v bakteriálnom expresnom systéme. Aj keď boli enzýmy jednotlivých vírusov purifikované rovnakou metódou, je možné, že u rôznych vírusov vedie daná metóda k enzýmom s rôznou aktivitou. Overovali ste, či sú po purifikácii produkované proteíny správne zbalené?
2. Zistili ste, že N-kapsa RdRp ZIKV a NTAV sa výrazne líši objemom. Na základe toho predpokladáte, že sa do tejto kapsy pravdepodobne nebudú viazať širokospektrálne inhibítory. U viacerých inhibítorov, ktoré sa viažu do kavit proteínov, sa však preukázalo, že sú po naviazaní schopné prispôbiť tvar kapsy a inhibovať replikáciu vírusu. Máte konkrétny príklad inhibítora, ktorý je schopný viazať sa do N-kapsy ZIKV, ale nie NTAV (alebo naopak)?
3. V manuskripte "*Structural basis for broad spectrum binding of AT-9010...*" popisujete látku, ktorá je schopná viazať sa na RdRp aj MTase flavivírusov. Na prvý pohľad je takýto inhibítor ideálny, keďže inhibuje dve rozdielne reakcie. Na druhej strane sa môžeme na interakciu s inhibítormi pozeráť ako na kompetitívnu reakciu medzi RdRp a MTase o inhibítora. Zároveň vieme, že aktivita MTase je výrazne nižšia než RdRp. Predpokladáte v konečnom dôsledku synergický alebo skôr antagonistický efekt?

Záver: V závere konštatujem, že všetky ciele práce boli splnené. Kandidátka preukázala schopnosť samostatnej vedeckej práce od návrhu experimentov, cez ich realizáciu, až po úspešnú publikáciu výsledkov.

Prácu **odporúčam prijať k obhajobe**, keďže splnila všetky predpoklady na to potrebné.

V Brne, dňa 20.11.2024

Ing. Tibor Füzik, Ph.D.