



FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR

RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.
Laboratoř Strukturní biologie signálních proteinů
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.
detašované pracoviště BIOCEV
Průmyslová 595
25250 Vestec
Tel.: +420 325873513
Email: veronika.obsilova@fgu.cas.cz

Oponentský posudek na disertační práci
Mgr. Kateřiny Krejčové s názvem „Biofyzikální a strukturní studie virových
polymeráz a methyltransferáz“

Předkládaná disertační práce Mgr. Kateřiny Krejčové se strukturní a funkční charakterizací vybraných virových methyltransferáz a polymeráz. Disertační práce vznikla na ÚOCHB AV ČR, v. v. i. pod vedením Mgr. et Mgr. Evžena Bouři, Ph.D.

Práce je psána klasickou formou a je členěna do obvyklých částí (abstrakt-teoretický úvod-cíle práce-publikace-výsledky-diskuze-závěr-seznam zkratk-seznam použité literatury). Kopie čtyř publikací, které tvoří základ disertační práce Mgr. Kateřiny Krejčové, jsou uvedené formou přílohy. Všechny čtyři experimentální práce byly publikovány ve velmi kvalitních mezinárodních časopisech s IF. Na třech publikacích je kandidátka první či sdílenou první autorkou, jedná se o publikace v časopisech *Structure*, *Molecules* a *Archives of Virology*, kde bude práce publikována. Na čtvrté publikaci v časopise *Viruses* je Mgr. Krejčová v kolektivu autorů. Navíc má kandidátka ještě jednu publikaci v *J. Org. Chem.*, která není zahrnuta do této disertační práce.

Práce je psána česky, formální úroveň a grafické zpracování je na velmi dobré úrovni s občasným výskytem překlepů. Autorka v literárním přehledu popisuje flaviviry, koronaviry a antivirovou terapii. V literárním úvodu nechybí velmi pěkné ilustrace a schémata, která usnadňují pochopit popisovanou problematiku. Cíle práce jsou jasně formulovány. Je škoda, že samotné metody do práce vůbec zahrnuty nejsou. Je zřejmé, že metody jsou uvedeny v příložených publikacích, ale autorka mohla zmínit stručně alespoň některé z biochemických či strukturních metod, které používala. Kapitola výsledky je členěna do čtyř částí podle publikací a každá z částí vždy obsahuje úvod, souhrn s přehledem získaných výsledků, vlastním příspěvkem doktorandky k této publikaci a obrázek s vybraným hlavním výsledkem z článku. Kapitola diskuze je rovněž dělena na čtyři části podle jednotlivých publikací, kdy jsou výsledky podrobněji diskutovány. Disertační práce je završena závěrem. Všechny použité literární zdroje jsou řádně citovány, literatura čítá cca 113 citací.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám několik dotazů:

- 1) Obě dvě domény Ntaya NS5 proteinu (MTásovou a RdRp) jste studovali separátně. Byl učiněn pokus exprimovat a krystalovat i protein o plné délce? Pokud ne, byl k tomu nějaký důvod?
- 2) Proč byly v článku ve *Structure* porovnávány RdRp enzymové aktivity Ntaya viru s NTAV, JEV, WNV, YF a ZIKV flaviviry, zatímco MTAsové aktivity téhož viru byly porovnávány s jinými flaviviry (DENV3, JEV, WNV, YFV, ZIKV a TBEV)? Jak se liší NS5 u vybraných testovaných flavivirů?
- 3) Vzhledem k absenci metod popište prosím enzymovou esej ke stanovení aktivity MTAsových domén.
- 4) Jak jsou veliké jednotlivé proteiny z RdRp SARS-CoV-2, které jste v práci purifikovala: NSP7, NSP8 a NSP12? Byl nějaký důvod exprimovat NSP7 a NSP8 odděleně, vzhledem k tomu, že oba proteiny se exprimovaly ve stejném expresním systému?
- 5) Popište v krátkosti, jak jste stanovila inhibiční aktivitu látky PR673 vůči různým RdRp, co bylo bráno jako kontrola (obrázek 12, strana 34).
- 6) V práci uvádíte, že PR673 je netoxická s hodnotou CC_{50} přes $50\mu\text{M}$. V publikaci (v *Molecules*) je však uvedeno, že se jedná o mírnou cytotoxicitu. Jaká hodnota je brána jako přijatelná z hlediska cytotoxicity?
- 7) Popište obě „primer extension polymerase“ aktivní esej (fluorescenční a radioaktivní) pro vyhodnocení inhibice RdRp a následné určení hodnoty IC_{50} (obrázek 13, strana 37).
- 8) Píšete, že nejlepším inhibitorem RdRp ze SARS-CoV-2 se ukázala původní sloučenina HeE1-2Tyr (16), její dva nové analogy (17 a 18) byly slabší. Budete pokračovat v přípravě nových analogů? Pokud ano, máte už představu, jaké modifikace by vedly k přípravě více účinných látek?

Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce Mgr. Kateřiny Krejčové představuje cenný přínos pro lepší pochopení strukturní a funkční podobnosti mezi MTázami nebo RdRp z různých flavivirů. Je zřejmé, že si kandidátka při řešení vytčených cílů osvojila řadu sofistikovaných technik, především metody rekombinantní produkce proteinů, metody proteinové krystalografie a testování enzymových aktivity. Výsledky práce jsou diskutovány a dávány do souvislostí. Autorka ve své disertační práci dokázala, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce. Předložená práce Mgr. Kateřiny Krejčové vyhovuje všem požadavkům kladeným na disertační práci, a proto ji plně doporučuji k přijetí.

V Praze dne 14. 11. 2024

RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.