



ÚOCHB AV
ČR
IOCB PRAGUE

Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky, v. v. i.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
of the Czech Academy of Sciences

Supervisor's opinion on the Dissertation Thesis

Thesis title: Structural characterization of influenza A polymerase PA subunit domains in complex with novel inhibitors

Researcher: MSc. Kateřina Radilová

Thesis subject area: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology

Faculty: First Faculty of Medicine, Charles University

Supervisor: Milan Kožíšek, Ph.D.

The submitted dissertation thesis of Kateřina Radilová summarizes the results of four years of her research on new principles of inhibition of important domains of influenza virus RNA-dependent RNA polymerase. The student focused on the research of the PA subunit of the polymerase, whose N-terminus carries a domain with endonuclease activity and the C-terminus is important for interaction with the second subunit PB1. Both of these targets are now considered to be very relevant for the development of new therapeutic inhibitors. Thus, detailed research in this area is extremely important for future generations of antivirals.

The present work contains 138 pages of text, an extensive list of used references and 4 accepted publications. The first publication was published during the third year of study in Antiviral Research, the student is the second author here. In the second and third year, two publications appeared in the European Journal of Medicinal Chemistry and the International Journal of Molecular Sciences, where the student shares first authorship. The last publication of the present thesis is a first-authored one, which appeared in the Antiviral Research this year. In addition to these four papers, Kateřina Radilová made a major contribution to the Gregor et al. paper in *Molecules* in 2021.

In the first part of her dissertation, the PhD student summarises the knowledge about influenza virus and available antiviral drugs. She points out the importance of developing new inhibitors, given the possibility of new variants of the virus that may cause a pandemic in the future in which vaccination will

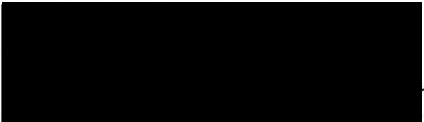
not be effective and antivirals will be the only choice for therapy. For her dissertation, the PhD student chose the PA subunit of polymerase, which contains 2 new targets for potential therapy. In two publications, she was able to identify high affinity peptide inhibitors derived from the PB1 subunit that bind to the C-terminal domain of the PA subunit and thus disrupt the protein-protein interaction between PA and PB1. This interaction is important for the stability of the ternary polymerase complex and active polymerase is not formed when inhibited. Due to their peptide nature, these new inhibitors are unable to enter cells and thus show activity only in non-cellular assays. The PhD student was able to solve this important deficiency by a novel approach, using bicyclic peptides with a CPP sequence, allowing the penetration through the cell membrane, entering the target cell and the inhibiting peptide prevents the formation of polymerase. The new bicyclic peptide thus already has an antiviral effect compared to the original peptide. The PhD student also worked on blocking the endonuclease activity of the N-terminus of the PA subunit, which plays an important role in the cap-snatching process, essential for the transcription of viral mRNA molecules. In the course of this work, the target protein of flavonoids in the treatment of influenza was elucidated. These plant substances are taken as an adjunct in treatment, but the exact mechanism of their antiviral action was not known. The PhD student was not only able to discover that many flavonoids are inhibitors of the endonuclease PA subunit, but also obtained several crystal structures of complexes of these natural compounds with the endonuclease. Flavonoids have a number of activities, not only antiviral, but the clarification of their action was still lacking. Thus, thanks to the work in this dissertation, we were the first to describe their effect in detail while obtaining structural information on their binding to the target biomolecule.

PhD student Kateřina Radilová successfully fulfilled the objectives set in the thesis assignment. She proved during her studies that she is a very careful, independent student, capable of leading a scientific project. She has always been actively interested in new approaches and has participated in many professional seminars and courses. She has been skilled in solving the structures of proteins and their complexes with inhibitors, which she has measured on instruments in the Czech Republic, but also on the synchrotron in Berlin. Her work was essential in the publications presented here. During her studies, she also passed on her skills to other students, which I appreciate very much. I would like to emphasize that she has contributed to many results yet to be published.

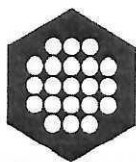
Kateřina worked very actively throughout her PhD studies. She has presented high quality work with significant medical relevance. I believe that she will defend her thesis and thus successfully complete her PhD study.

For the reasons mentioned above, I recommend the dissertation of MSc. Kateřina Radilová for defence.

In Prague, 28th November 2022

.....

Milan Kožíšek, Ph.D.

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences



ÚOCHB ^{AV}_{ČR}
IOCB PRAGUE

Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky, v. v. i.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
of the Czech Academy of Sciences

Posudek školitele disertační práce

Název práce: Strukturní charakterizace komplexů domén PA podjednotky chřipkové polymerasy s novými inhibitory
Structural characterization of influenza A polymerase PA subunit domains in complex with novel inhibitors

Autor práce: Mgr. Kateřina Radilová

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie

Fakulta: 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova

Školitel: RNDr. Milan Kožíšek, Ph.D.

Předkládaná disertační práce Mgr. Kateřiny Radilové shrnuje výsledky čtyřletého výzkumu nových principů inhibic důležitých domén RNA dependentní RNA polymerasy viru chřipky. Studentka se zaměřila na výzkum PA podjednotky polymerasy, jejíž N-konec nese doménu s endonukleasovou aktivitou a C-konec je důležitý pro interakci s druhou podjednotkou PB1. Oba tyto cíle jsou nyní považovány jako velice aktuální při vývoji nových terapeutických inhibitorů. Detailní výzkum v této oblasti je tak nesmírně důležitý pro antivirotika budoucích generací.

Předložená práce obsahuje 138 stran textu, obsáhlý seznam použitých literárních zdrojů a předložené 4 publikace. První publikace vyšla během třetího roku studia v *Antiviral Research*, studentka je zde druhou autorkou. Ve druhém a třetím roce vyšly dvě publikace v *European Journal of Medicinal Chemistry* a *International Journal of Molecular Sciences*, kde studentka sdílí prvoautorství. Poslední publikace předkládané práce je prvoautorská, která vyšla v časopise *Antiviral Research* v tomto roce. Kromě těchto čtyř prací se Kateřina Radilová významně podílela ještě na práci Gregor et al. v *Molecules* z roku 2021.

V první části své disertační práce doktorandka shrnuje poznatky o viru chřipky a dostupných antivirotikách. Poukazuje na důležitost vývoje nových inhibitorů vzhledem k možnosti vzniku nových

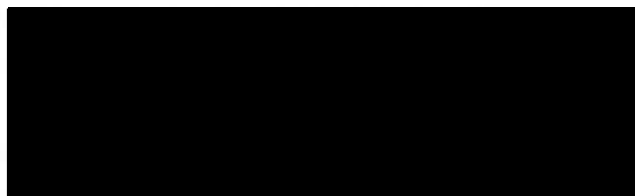
variant viru, které mohou v budoucnu způsobit pandemii, při které nebude účinné očkování a antivirotika tak budou jedinou volbou při terapii. Doktorandka si vybrala pro svou disertaci PA podjednotku polymerasy, která obsahuje 2 nové cíle potenciální terapie. Ve dvou publikacích se jí podařilo identifikovat vysoce afinitní peptidové inhibitory odvozené od PB1 podjednotky, které se váží na C-koncovou doménu podjednotky PA a rozrušují tak protein-proteinovou interakci mezi PA a PB1. Tato interakce je důležitá pro stabilitu ternárního komplexu polymerasy a při inhibici se aktivní polymerasa neutvoří. Vzhledem k peptidovému charakteru se tyto nové inhibitory prakticky nedostávají do buněk a vykazují tak aktivitu pouze v nebuněčných esejích. Tento významný nedostatek se podařilo doktorandce vyřešit novým přístupem, kdy se tzv. bicyklické peptidy s CPP sekvencí, umožňující přístup skrze buněčnou membránu, dostanou dovnitř cílové buňky a inhibující peptid znemožní tvorbu polymerasy. Nový bicyklický peptid má tak již oproti původnímu peptidu antivirový účinek. Doktorandka se zabývala též blokadou endonukleasové aktivity N-konce PA podjednotky, která hraje důležitou roli při tzv. procesu cap-snatching, důležitým pro transkripci virových mRNA molekul. Během práce se podařilo objasnit cílový protein flavonoidů při léčbě chřipky. Tyto rostlinné látky jsou brány jako doplněk při léčbě, nebyl ale znám přesný mechanismus, jak protivirově působí. Doktorandce se podařilo nejen zjistit, že řada flavonoidů jsou inhibitory endonukleasy PA podjednotky, získala několik krystalových struktur komplexů těchto přírodních sloučenin s endonukleasou. Flavonoidy mají řadu aktivit, nejen protivirových, stále však chybí objasnění jejich účinku. Díky pracem v této disertaci jsme tak byli prvními, kteří detailně popsali jejich účinek a zároveň získali strukturální informace o vazbě k cílové biomolekule.

Doktorandka Kateřina Radilová úspěšně splnila cíle vytyčené v zadání práce. Dokázala během svého studia, že se jedná o velmi pečlivou, samostatnou studentku, schopnou vést vědecký projekt. Vždy se aktivně zajímala o nové přístupy, zúčastnila se řady odborných seminářů a kurzů. Nejvíce se vyprofilovala při řešení struktur proteinů a jejich komplexů s inhibitory, které měřila nejen na přístrojích v České republice, ale i na synchrotronu v Berlíně. Její práce byla v předkládaných publikacích nezbytná. Během studia své dovednosti předávala i dalším studentům, což velice oceňuji. Rád bych ještě zdůraznil, že se spolupodílela na řadě výsledků, které dosud publikovány nebyly.

Kateřina pracovala během celého doktorského studia velmi aktivně. Předložila kvalitní práci s výrazným medicínským významem. Věřím, že svou práci obhájí a zakončí tak úspěšně své doktorské studium.

Z výše uvedených důvodů disertační práci Mgr. Kateřiny Radilové doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 28. listopadu 2022



RNDr. Milan Kožíšek, Ph.D.

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR