



VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE

prof. Michaela Rumlová, Ph.D.  
PROREKTORKA PRO VNĚJŠÍ VZTAHY A KOMUNIKACI

## Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Kateřiny Radilové

### *Structural characterization of influenza A polymerase PA subunit domains in complex with novel inhibitors*

Doktorská práce Mgr. Kateřiny Radilové byla vypracována pod vedením RNDr. Milana Kožíška, Ph.D. na Ústavu organické chemie a biochemie, AV ČR.

Práce se věnuje strukturně-funkční analýze heterotrimerního proteinového komplexu RNA-dependentní RNA polymerasy (RdRp) viru chřipky (IAV). V první části se zabývá možností inhibice protein-protein interakcí mezi dvěma podjednotkami heterotrimerního komplexu RdRp, CPA a PB1. Vzájemná interakce těchto dvou podjednotek je zcela kritická pro aktivitu RdRp a tedy i pro replikaci viru. Zablokování této interakce tudíž představuje nadějný cíl pro vývoj nových antivirotik. Práce se nejprve věnuje charakterizaci a optimalizaci série peptidových inhibitorů, odvozených z N-konce PB1 podjednotky. Za tímto účelem bylo vyvinuto nové stanovení, založené na technologii Alpha screenu pomocí které byl proměřen inhibiční potenciál připravených peptidových inhibitorů. Účinné peptidové inhibitory byly dále testovány prostřednictvím třech odlišných buněčných stanovení. Vzhledem k velmi špatným farmakokinetickým vlastnostem peptidových inhibitorů byly vybrané deka-peptidy modifikovány za účelem zvýšení stability a prostupu přes membránu, a to nejprve fúzí k Tat-penetrujícímu peptidu a posléze jejich reverzibilní bicyklizací. V porovnání s lineárními peptidy, vykazovala jejich bicyklická analoga značné zlepšení ve farmakokinetických charakteristikách a schopnosti inhibice v buněčných stanoveních. Komplexy CPA s nejučinnějšími peptidovými inhibitory byly krystalizovány a jejich struktury byly vzájemně porovnány.

Kromě C-terminální domény PA podjednotky chřipkové RdRp se autorka také věnovala strukturní analýze její N-terminální domény (NPA), která vykazuje endonukleasovou aktivitu. Zavedením nového stanovení pomocí Alpha screenu a následnou strukturní analýzou, byl odhalen nový účinek vybraných flavonoidů, jako možných inhibitorů chřipkové endonukleasové aktivity. Následně byly také testovány nové deriváty jednoho z účinných flavonoidů, luteolinu. Bylo zjištěno, že derivace na C-7 a C-8 luteolinu jsou nejučinnější. Byla určena struktura komplexu vybraných inhibitorů s NPA divokého typu i s NPA nesoucí rezistentní mutaci I38T.

I když zdánlivě chřipkové epidemie/pandemie ustoupily do pozadí díky nedávné pandemii covid-19, je hledání možností, jak inhibovat některý z klíčových kroků replikace viru chřipky velmi důležité. Stále se jedná o virus s potenciálem pandemicky se rozšířit a jeho RNA polymerasa představuje jeden z možných cílů pro vývoj nových antivirotik. Téma této doktorské práce, zaměřující se na možnou inhibici sestavení funkčního heterotrimeru chřipkové RdRp, či na inhibici její endonukleasové aktivity, je tak více než aktuální a žádoucí.

Co se týká formální stránky předložené práce, musím konstatovat, že s takto zajímavě vázanou a na kvalitním papíru vytištěnou prací, jsem se ještě nesetkala. Je vidět, že si autorka na finalizaci své disertační práce dala opravdu záležet. Práce je členěna do osmi částí, obsahujících úvod, cíle práce, výsledky, závěr a diskusi, anglický a český souhrn, seznam citovaných prací a doplňkový materiál.

Práce působí kompaktním dojmem, je pečlivě zpracována, psaná srozumitelnou angličtinou, s minimem překlepů a chyb.

Informační obsah teoretického úvodu je vzhledem k tématu práce vhodný, vložené obrázky mu dodávají na přehlednosti a obsahuje přiměřený počet literárních odkazů. Výsledková část je řešena vložением čtyř publikací, na kterých se Mgr. Radilová podílela. Před každou publikací je autorčino krátké shrnutí dané problematiky, včetně jasného vymezení jejího příspěvku k dané práci. Vzhledem k tomu, že doktorandka je spoluautorkou čtyř publikací, na jedné jako první autor, na dvou sdílí prvenství a na jedné je uvedena jako druhý autor, připadá mi toto řešení vhodné. Výsledky obou vědeckých tématik disertace jsou poté samostatně diskutovány, kde autorka shrnuje získané poznatky a dává je do kontextu s daty, publikovanými jinými vědeckými skupinami. Závěr disertace poté tvoří souhrn v českém a anglickém jazyce, který bych ale spíše očekávala na jejím začátku.

Dle mého názoru představuje práce velmi cenný příspěvek k problematice týkající se nových možností inhibice jednoho z kroků replikačního cyklu viru chřipky. RNA dependentní RNA polymerasa je jedním z atraktivních cílů pro hledání nových antivirotik. Příspěvek doktorandky, zaměřený na dva odlišné potenciální inhibiční cíle v PA podjednotce, významně obohacuje naše znalosti v oblasti strukturně-funkčních vlastností RdRp, a v charakterizaci jak peptidových inhibitorů interakčního rozhraní RB1 a CPA podjednotek, tak flavonoidových inhibitorů endonukleasové aktivity NPA.

K práci mám několik dotazů:

- 1) Neuvažovali jste během optimalizace farmakokinetických vlastností peptidových inhibitorů o jejich enkapsulaci do liposomů nebo jiných nanočástic (např. liposomů modifikovaných Tat-penetrujícím peptidem), které by napomohly přestupu přes membránu?
- 2) Všechny studované virové proteiny nebo jejich části byly produkovány v *E. coli*. Nejsou u RdRp podjednotek popsány post-translační modifikace, které by mohly ovlivňovat vytvoření RdRp heterotrimeru?

Na závěr bych chtěla vyzdvihnout, že se jedná o zdařilou práci, s výstupy ve velmi kvalitních vědeckých časopisech a příslibem terapeutického potenciálu při hledání nových inhibitorů chřipkové RNA polymerasy. Všechny vytčené cíle doktorské práce byly splněny.

Předloženou práci Mgr. Kateřiny Radilové jsem prostudovala a konstatuji, že splňuje všechny požadavky kladené na úroveň disertační práce a prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu Ph.D. za jménem.

Disertační práci Mgr. Kateřiny Radilové **doporučuji** k obhajobě.

V Praze 31. 1. 2023

prof. Dr. Ing. Michaela Rumlová