

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Charles University, Faculty of Science

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie

Doctoral study programme: Physical chemistry



Mgr. Anna Dubánková

Strukturní a funkční studie virových RNA polymeráz
Structural and functional study of viral RNA polymerases

Autoreferát disertační práce

Doctoral thesis summary

Scientific Supervisor: Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, PhD.

Praha / Prague, 2019

Abstrakt

Virové RNA dependentní RNA polymerázy (RdRp) jsou enzymy nezbytné pro množení RNA virů. Obecná funkce RdRp je pro všechny RNA viry stejná: RdRp rozpozná virovou RNA, nasedne na ni a syntetizuje komplementární řetězec RNA. Série těchto kroků je pro virovou infekci naprosto nepostradatelná.

Je důležité si uvědomit, že neinfikovaná buňka RNA nereplikuje. Hostitelská buňka přirozeně neexprimuje žádné RdRp. Pro můj výzkum jsem si vybrala RdRp, protože jsou nezbytné pro virovou replikaci a tudíž excelentní cíl pro virovou terapii.

V této studii jsou do hloubky charakterizovány polymerázy z rodiny picornavirů a flavivirů. Picornavirová replikace je lokalizovaná ve viry indukovaných, membránových strukturách, které nazýváme replikační organely (RO). V těchto RO je virová polymeráza lokalizovaná na membráně. Nalezli jsme podmínky, ve kterých se polymeráza váže na membránu. Následně byla studována aktivace picornavirových polymeráz, která je indukována inzercí první aminokyseliny do středu proteinu.

V této studii jsou rovněž diskutovány RdRp z rodiny flavivirů, konkrétně z viru žluté zimnice (YFV) a Zika viru (ZIKV). Studie prezentuje první strukturu polymerázy z YFV (v plné délce) a model ZIKV polymerázy v komplexu s RNA. Model ZIKV poskytuje strukturní informaci o aktivním místě potřebnou k “docking” ligandů.

Úvod

Tato práce se zabývá RdRp ze dvou virových rodin: picornavirů a flavivirů. Obě rodiny spadají do skupiny plus jednovláknových RNA (+RNA) virů. Dovolte mi Vás nejprve seznámit s picornavirovými a následně pak s flavivirovými polymerázami.

Picornaviry

Picornavirová rodina virů čítá mnoho nebezpečných lidských patogenů, příkladem uveďme virus dětské obrny (PV), coxsackie virus (CV), nebo rhinovirus (HRV), který způsobuje běžnou rýmu.

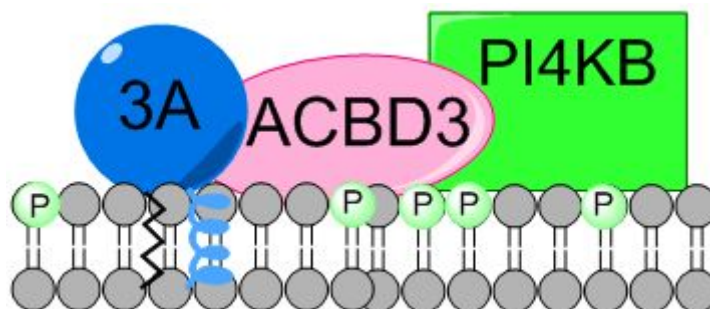
Replikační organely (RO)

+RNA viry manipulují membránami hostitelské buňky, které tak vytváří membránové struktury specializované na virovou replikaci RNA¹. V této studii se zabýváme RO kobuvirů, které byly již dříve popsány na základě *in vivo* experimentů². Kobuviry spadají do rodiny picornavirů.

Picornaviry nekódují vlastní fosfatidylinositol kinázy (PI4K) a musí je tedy krást hostitelské buňce. Kobuviry používají následující mechanismus:

Na membránách RO je zanořen virový protein 3A. Tento protein interaguje s proteinem hostitelské buňky: tzv. Proteinem-3 obsahujícím doménu vázající acyl-CoA (ACBD3). Protein ACBD3 vycytává PI4KB (PI4K III - β) a udržuje ji na membráně. PI4KB fosforyluje fosfatidylinositol (PI) v pozici 4 za vzniku fosfatidylinositol 4-fosfátu (PI4P)². Popsaný komplex je schematicky znázorněn na obrázku 1.

Picornavirové polymerázy specificky interagují s PI4P a rekrutují se tím na membránu³. Lokalizace polymeráz na membráně zvyšuje jejich procesivitu a chrání vznikající dvouvláknovou RNA (dsRNA) před vrozenou imunitou⁴.



Obrázek 1: 3A-ACBD3-PI4KB proteinový komplex: Virový membránu vázající protein 3A váže protein hostitelské buňky ACBD3 a tím přichytí PI4KB na membránu. PI4KB vytváří fosforylovaný povrch membrány.

Picornavirové RdRp

Všechny picornavirové proteiny jsou translatovány společně jako jeden polyprotein. Polyprotein je postupně proteolyticky maturován do podoby stabilních (funkčních) intermediátů a jednotlivých proteinů.

Picornavirová RdRp se nazývá $3D^{pol}$ a nachází se na C konci polyproteinu. Polymeráza je v první fázi maturovaná jako 3CD protein, který má pouze proteolytickou aktivitu. Intermediát 3CD je následně štěpen na 3C proteázu a $3D^{pol}$ polymerázu⁵. V průběhu maturace $3D^{pol}$ dochází k aktivaci její polymerační aktivity⁶. Ta je způsobena zasunutím N-konce do kapsy v blízkost aktivního místa. Stabilizace N-konce je podmíněna interakcí první aminokyseliny s reziduy kapsy⁷. První aminokyselina $3D^{pol}$ je vysoce, ale nikoli 100 % konzervovaný glycin⁴.

Polymerázy $3D^{pol}$ používají takzvaný primer dependentní mechanismus replikace RNA, kde místo primeru využívají virový protein 3B⁸. Protein 3B se v infikované buňce vyskytuje rovněž jako stabilní intermediát 3AB⁹.

Flaviviry

Flaviviry rovněž spadají do skupiny +RNA virů. Flaviviry i v současné době způsobují rozsáhlé, často smrtící epidemie. Mezi nejznámější zástupce této rodiny patří: virus horečky Dengue (DEV), virus japonské encefalitidy (JEV), virus klíšťové encefalitidy (TBE virus), virus západonilské horečky (WNV), Zika virus (ZIKV) a virus žluté zimnice (YFV). Tato práce je zaměřena na studium RdRp ze ZIKV a YFV.

Flavivirové polymerázy

Flavivirové polymerázy nesou označení NS5 proteiny. Na rozdíl od picornavirových 3D^{pol} jsou NS5 složeny ze dvou domén: z metyltransferázové domény (MTase) a RdRp¹⁰.

MTase je zodpovědná za tvorbu metyl-guanosinové čepičky na 5' konci flavivirové RNA. Čepička je tvořena guanosinem navázaným 5'-5' trifosfátovým můstkem. MTase katalyzuje metylaci guanosinu v pozici N-7. MTase rovněž rozpoznává 2'O pozici prvního adenosinu, kterou metyluje¹¹. Obě metylace dohromady vedou ke zvýšení stability struktury RNA a zároveň ji chrání pře vrozenou imunitou buňky.

RdRp doména má úlohu replikace RNA. Flavivirové polymerázy používají *de novo* replikační mechanismus, který jim umožňuje tzv. „priming loop“¹².

Jedním ze slibných cílů antivirové terapie je právě protein NS5, protože každá z jeho domén má kritickou úlohu pro virovou replikaci¹³.

Specifická léčba infekce žluté zimnice dosud není k dispozici, jednou z možností léčby by mohla být inhibice YFV NS5. Při vývoji specifické léčby je výhodou plně rozumět mechanismu infekce a strukturně charakterizovat možné cíle antivirové terapie. Dosud bylo k dispozici jen několik struktur proteinů YFV: helikáza¹⁴, MTase¹⁵, nestrukturní protein 1¹⁶ a kapsida¹⁷.

Další virová nákaza, která by mohla být léčena inhibicí NS5 proteinu, je ZIKV infekce. Doposud byla dostupná pouze struktura ZIKV NS5 s apo formou RdRp^{18–20}. Od roku 2015, kdy vypukla epidemie ZIKV, je Zika virus intenzivně studován.

Cíle práce

1. Za použití umělých membrán a rekombinantních proteinů *in vitro* rekonstruovat protein - membránový komplex 3A-ACBD3-PI4KB.
2. Zjistit jakým způsobem 3D^{pol} protein interaguje s membránou.
3. Strukturně charakterizovat 3D^{pol} s unikátním N-koncem zapoužití proteinové krystalografie.
4. Charakterizovat vliv prvního rezidua 3D^{pol} na jeho polymerázovou aktivitu.
5. Vyřešit strukturu YFV NS5 obsahující MTase a RdRp doménu.
6. Vytvořit biologicky relevantní model ZIKV NS5 v komplexu s RNA.

Použité metody

V této práci jsem použila standardní metody molekulární biologie a proteinové krystalografie:

Klonování DNA (příprava expresních vektorů a mutageneze), exprese a purifikace proteinů, enzymatické aktivní eseje, liposomové “pulldown” eseje, diferenční skenovací fluorimetrie.

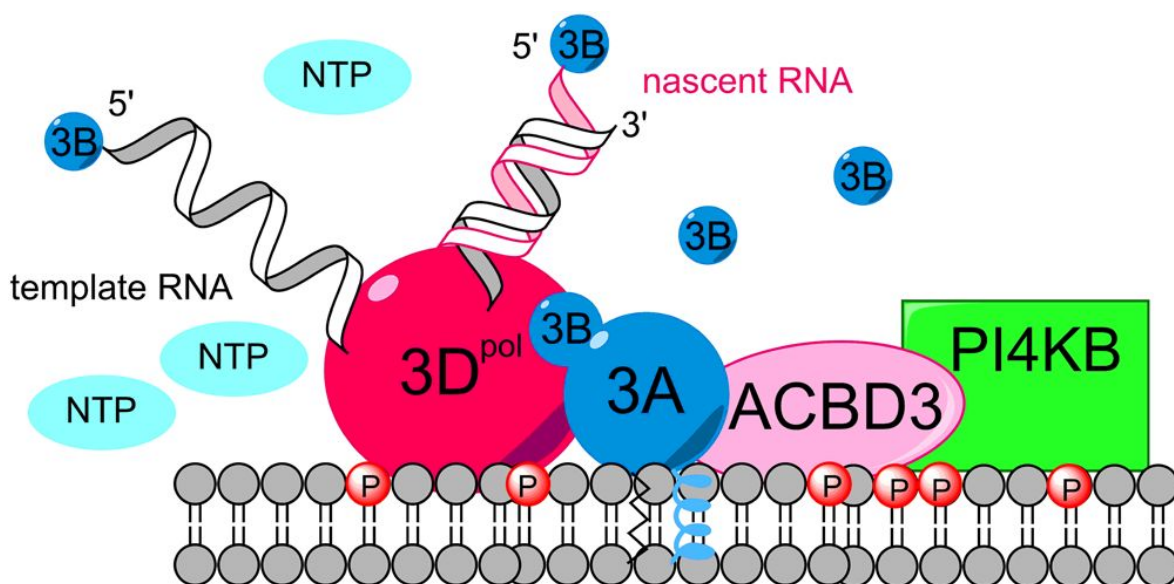
Proteinová krystalografie - krystalizace proteinů, sběr difrakčních dat na rotační anodě a synchrotronu, procesování dat (škálování a integrace), řešení struktury pomocí molekulárního nahrazení, “refinement” struktury.

Výsledky

Negativní náboj membrány a protein 3B vázaný na membránu, kooperují při vazbě virové RNA dependentní RNA polymerázy na membránu.

Krok po kroku jsme *in vitro* zrekonstruovali vychytávání PI4KB na membránu, které se odehrává v buňkách infikovaných kobuviry. Tvorba komplexu 3A-ACBD3-PI4KB byla již popsána experimenty *in vivo*². Výsledky našich experimentů *in vitro* s nimi byly v souladu.

Ukázali jsme, jak se polymeráza 3D^{pol} váže na negativně nabitě membrány v přítomnosti 3B přichyceného k membráně (mimikuje 3AB intermediát). Hypotetický model replikačního komplexu je ukázán na obrázku 2.



Obrázek 2: Schématický model 3D^{pol}-3AB-ACBD3-PI4KB proteinového komplexu²¹.

Výsledky byly použity pro sepsání této publikace:

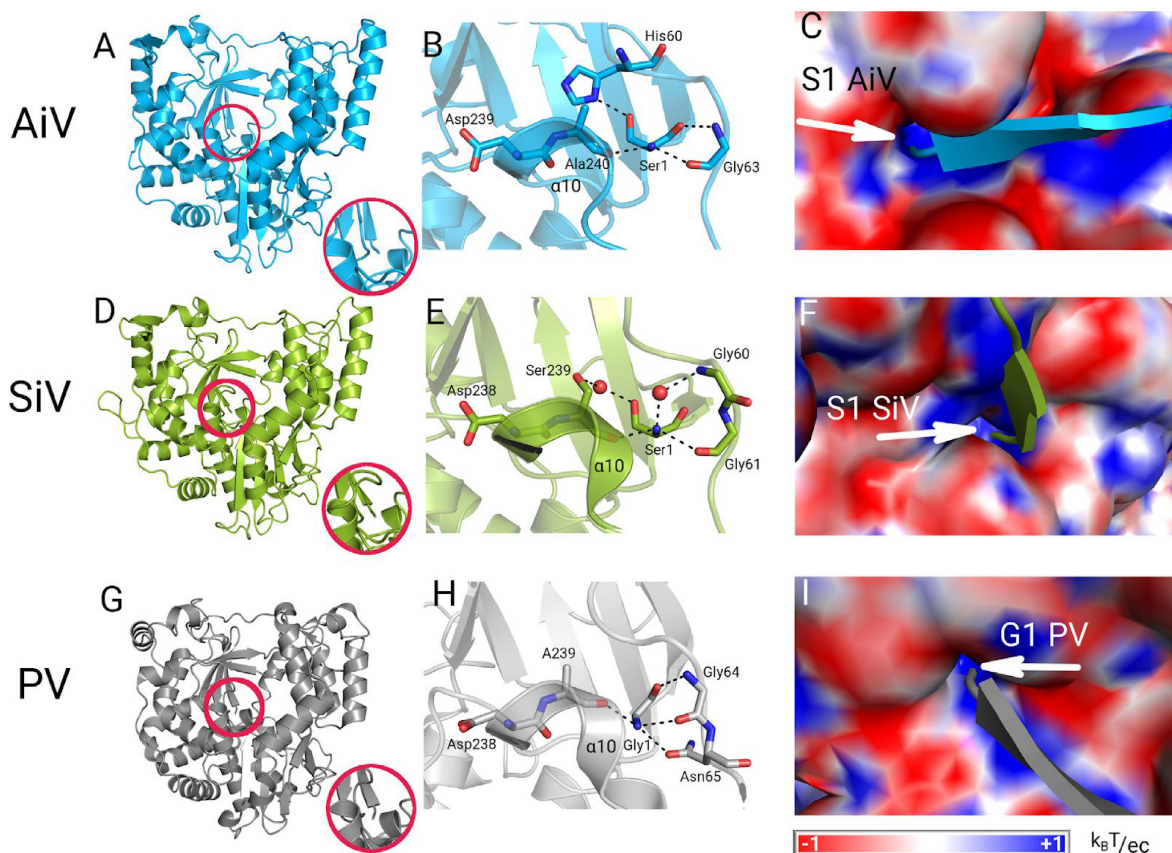
Dubankova, A.#, Humpolickova, J.#, Klima, M. & Boura, E. Negative charge and membrane-tethered viral 3B cooperate to recruit viral RNA dependent RNA-polymerase 3D^{pol}. Sci. Rep. 7, 17309 (2017).”

Struktura kobuvirové a sicinivirové polymerázy odhaluje konzervovaný mechanismus aktivace picornavirových polymeráz

Porovnání primární sekvence všech picornavirů odhalilo sedm rodů s nekanonickým prvním reziduem 3D^{pol} (gallivirus, oscivirus, passerivirus, sakobivirus, salivirus, kobuvirus and sicinivirus).

Vyřešili jsme krystalové struktury kobuvirové a sicinivirové polymerázy 3D^{pol}. V obou případech byl N-konec zanořený v povrchové kapse, podobně jako u kanonicky začínajících polymeráz. Tato kavita je koncipovaná pro interakci se správným prvním reziduem. Pro kobuvirovou a sicinivirovou 3D^{pol} dochází ke stabilizaci N-konce pomocí interakce s hydroxylem na Ser1. Kobuvirový hydroxyl na Ser1 vytváří vodíkovou vazbu s His60. Sicinivirový hydroxyl na Ser1 zase vytváří vodní můstek se Ser239. Detailní pohled na kobuvirovou a sicinivirovou polymerázu v porovnání s PV polymerázou je ukázán na obrázku 3.

Specifitu vazby N-konce 3D^{pol} v kavitě jsme otestovali na 3D^{pol} s mutovaným prvním reziduem. Objevili jsme, že každá testovaná změna v prvním reziduu 3D^{pol} naruší replikaci viru.



Obrázek 3: *Atypický tvar N-konce kobuvirového (Aichi virus - AiV) a sicinivirového (SiV) 3D^{pol} v porovnání s ostatními 3D^{pol} enzymy.*

***A-C** První reziduum AiV 3D^{pol} je uzavřené v pozitivně nabitě kavitě v blízkosti aktivního centra proteinu. **D-F** Odpovídající pohled na SiV 3D^{pol} strukturu. **G-I** Většina picornavirů má první reziduum glycin vložený v nabitě kavitě, jak je ilustrativně ukázáno na struktuře PV 3D^{pol} 22.*

Výsledky byly použity pro sepsání této publikace:

“**Dubankova, A.**, Horova, V., Klima, M. & Boura, E. Structures of kobuviral and siciniviral polymerases reveal conserved mechanism of picornaviral polymerase activation. *J. Struct. Biol.* (2019). doi:10.1016/j.jsb.2019.08.004”

Struktura proteinu NS5 ze žluté zimnice odkrývá konzervované cíle pro antivirovou léčbu společné pro flaviviry.

Vyřešili jsme strukturu enzymu NS5 ze žluté zimnice v jeho plné délce, s rozlišením 3.1 Å. Ve struktuře jsme hledali oblasti, které jsou konzervované mezi flaviviry. Tyto oblasti jsou klíčové pro design léčiv na základě struktury.

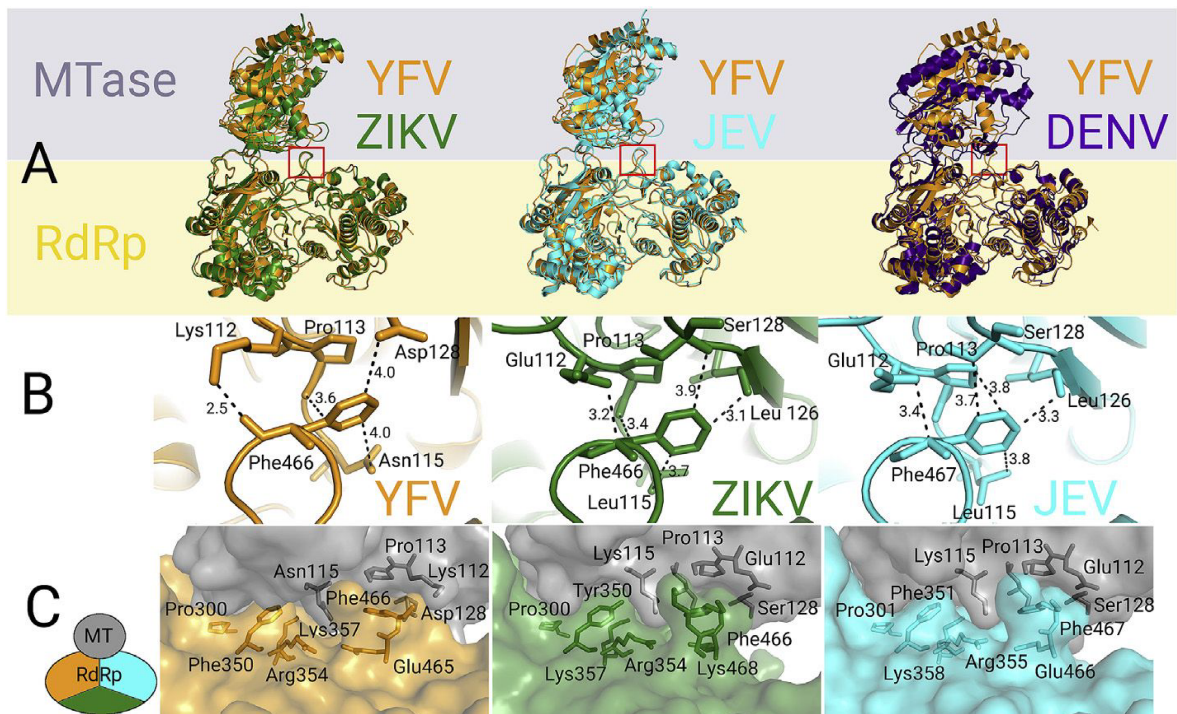
Kontakt mezi MTase a RdRp doménou je zprostředkován konzervovaným prolinem 113 (z MTase domény) a fenylalaninem 466 (z RdRp domény), který je zasunutý do kapsy na povrchu MTasy. Ukázali jsme, že obě domény se touto interakcí vzájemně stabilizují.

Pro iniciaci replikace je důležitá primerovací smyčka a zejména reziduum zprostředkující patrovou interakci. U YFV je to Trp799, který je konzervovaný u ZIKV, ale liší se u HCV polymerázy.

NS5 proteiny jsou stabilizovány dvěma zinkovými prsty. První prst je tvořen cysteiny (Cys448 a Cys451), histidinem 443 and glutamátem 439. Vyjma Glu439 je první zinkový prst plně konzervovaný u NS5 proteinů z YFV, ZIKV, DENV, and WNV.

Druhý zinkový prst je tvořen dvěma cysteiny (Cys732 a Cys851) a dvěma histidiny (His716 a His718). Tento zinkový prst je konzervovaný s výjimkou His716, který se liší u ZIKV a WNV, ale je konzervovaný pro DENV.

Na základě porovnání vzájemné orientace domén jsme zjistili, že YFV má konzervovanou orientaci s ZIKV a JEV, ale ne s DENV NS5. Pro detailní pohled na rozhraní mezi MTase a RdRp doména si prohlédněte obrázek 4.



Obrázek 4: Flavivirová konzervovanost rozhraní mezi MTase a RdRp doménou²³.

A Superpozice flavivirových NS5 založená na RdRp doméně odhaluje konzervovanost vzájemné orientace domén. Doménová orientace YFV NS5 je konzervovaná v rámci ZIKV a JEV NS5, ale není v DENV NS5. **B** Konzervované reziduum Phe466 a Pro113 definují rozhraní MTase a RdRp domény. **C** Detail rozhraní RdRp a MTase. MTase je zobrazena šedě. Barva RdRp je pro YFV žlutá, ZIKV lesní zelená a JEV tyrkysová.

Výsledky byly použity pro sepsání této publikace:

“**Dubankova, A.** & Boura, E. Structure of the yellow fever NS5 protein reveals conserved drug targets shared among flaviviruses. *Antiviral Research* 169, 104536 (2019).”

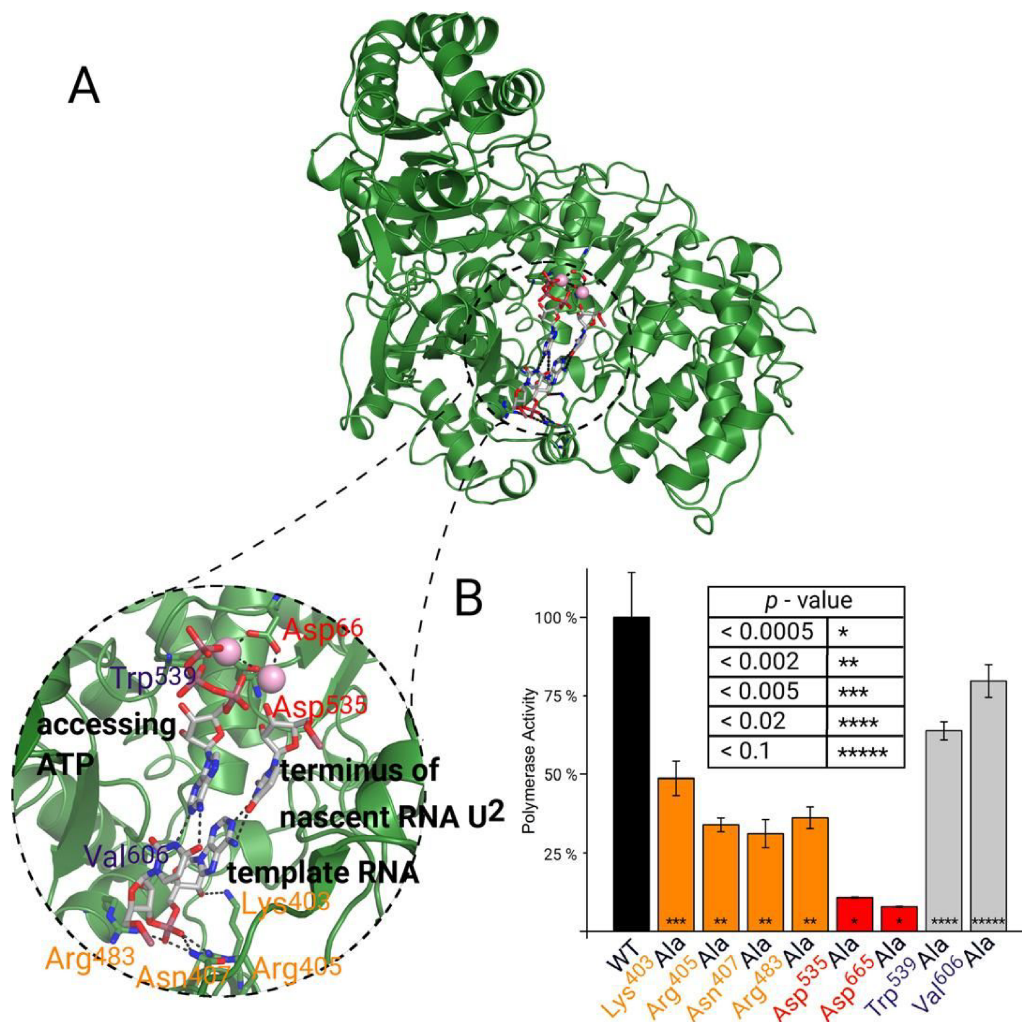
Strukturní model RNA dependentní RNA polymerázy viru Zika v komplexu s RNA pro racionální design nových nukleosidových inhibitorů.

V této studii jsme vypočetli model ZIKV NS5 v komplexu s malým fragmentem RNA. Tento model je určený pro dokovací experimenty, které jsou nezbytné pro racionální návrh inhibitorů.

Model byl postaven na základě krystalové struktury ZIKV NS5¹⁹ a struktury HCV (virus hepatitidy C) RdRp²⁴ v komplexu s ADP, manganem a primer-templátovou vlásenkou.

Model byl biologicky evaluován pomocí enzymatických esejí, pro více detailů si prohlédněte obrázek 5.

Tento model byl připraven metodou kvantové mechaniky / molekulové mechaniky (QM/MM) pro potenciální “dockingové” experimenty, které jsou nezbytností pro racionální design inhibitorů. Vypočtený model obsahuje templátovou RNA (tvořenou dinukleotidem), přistupující ATP, dva hořečnaté ionty a konec vznikající RNA.



Obrázek 5: Enzymatická analýza modelu ZIKV NS5 s RNA²⁵.

A ZIKV RdRp-RNA komplex s detailem RNA vazebného místa. RNA templát je dinukleotid složený z A-U. Dále je zde přítomen vznikající U² a ATP. Ve zvětšeném obrázku jsou zvýrazněné aminokyseliny vztažené k aktivitním esejím. **B** Aktivita ZIKV RdRp: Mutace v červených oblastech přerušily polymerázovou aktivitu, v oranžových významně snížily aktivitu a v šedých jemně ovlivnily aktivitu. Čísla uvedená v tabulce jsou p - hodnoty studentova testu t .

Výsledky byly použity pro sepsání této publikace:

“Šebera, J.#, **Dubankova, A.#**, Sychrovský, V., Ruzek, D., Boura, E. & Nencka, R. The structural model of Zika virus RNA-dependent RNA polymerase in complex with RNA for rational design of novel nucleotide inhibitors. *Sci. Rep.* 8, 11132 (2018).”

Seznam Výsledků

1. *In vitro* jsme rekonstruovali tvorbu proteinového komplexu 3A-ACBD3-PI4KB na membráně.
2. Zjistili jsme, že picornavirové polymerázy 3D^{pol} jsou rekrutovány na povrch membrány v přítomnosti PI4P, nebo jiného záporně nabitého lipidů a proteinu 3B navázaného na membránu.
3. Porovnání aminokyselinových sekvencí picornavirových polymeráz 3D^{pol} odhalilo sedm rodů s nekonzervovaným prvním reziduem. Vybrali jsme si kobuvirovou a sicinivirovou 3D^{pol} pro další strukturní analýzu.
4. Vyřešili jsme krystalové struktury kobuvirové a sicinivirové 3D^{pol}. Struktury odhalily stabilizaci N-konce enzymu jeho prvním reziduem. Rovněž jsme ukázali, že struktury kobuvirové a sicinivirové polymerázy jsou evolučně vzdálené od ostatních známých picornavirových polymeráz.
5. Zapoužití biologických esejí jsme ukázali význam prvního rezidua. Ukázali jsme, že (z testovaných mutací) pouze původní první aminokyselina aktivuje polymerázu.
6. Vyřešili jsme první krystalovou strukturu YFV NS5. Struktura odkrývá strukturní podobnosti a rozdíly od ostatních známých flavivirových NS5 struktur.
7. Vytvořili jsme biologicky relevantní model ZIKV polymerázy v komplexu s RNA pro studie dokování ligandu.

Abstract

Viral RNA-dependent RNA polymerases (RdRps) are enzymes essential for viral multiplication. The general function of RdRp is universal for all RNA viruses: to recognise viral RNA, bind it and synthesize the complementary RNA strand. This series of steps is absolutely crucial for viral infection.

It is important to mention that the non-infected cell is incapable of replicating any RNA. The host cell thus does not naturally express any RdRps. I chose RdRps for my research because these enzymes are key to viral replication and thus an excellent target for antivirals.

This study characterises polymerases from *Picornaviridae* and *Flaviviridae* families, in depth. Picornaviral replication takes place in viral-induced membrane structures called Replication Organelles (ROs), where the polymerase is localised to the membrane. In this study, we investigated the recruitment of picornaviral polymerase membrane. Subsequently, we focused on the activation of picornaviral RdRp induced by the insertion of the very first residue into the protein core.

Next, we focused on the flaviviral RdRps specifically from Yellow fever virus (YFV) and Zika virus (ZIKV). This study reports the first structure of a full length YFV polymerase and a model of ZIKV polymerase in complex with RNA. The model of ZIKV RdRp in complex with RNA provides the information needed for ligand docking.

Introduction

This study is focused on RdRps from two plus single stranded RNA (+RNA) viral families, namely picornaviruses and flaviviruses. Let me introduce them.

Picornaviruses

Picornaviruses belong to +RNA viruses. This viral family contains many important human pathogens such as poliovirus (PV), coxsackie virus (CV) or rhinovirus (HRV). Picornaviruses cause diseases ranging from common flu to life threatening infections.

Replication organelles (ROs)

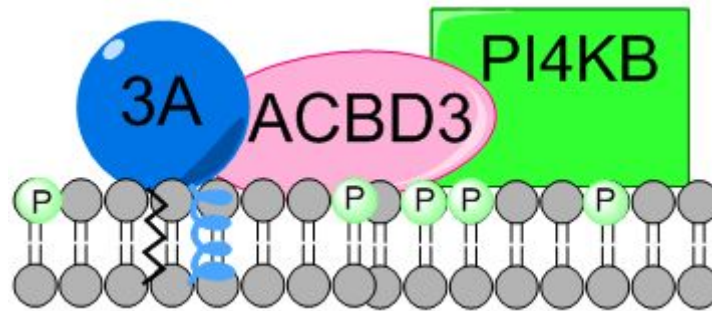
+RNA viruses manipulate host cell membranes to create membranous structures where the viral RNA replication takes place¹. Here, we focus on *in vitro* characterization of kobuviral ROs (a genus of the *Picornaviridea* family), which were already described using the *in vivo* approach².

A key lipid component of ROs is PI4P (phosphatidylinositol 4-phosphate), however, picornaviruses don't encode any phosphatidylinositol kinase (PI4K), thus they have to hijack the host cell PI4K.

The viral 3A protein is anchored to the membrane and there it interacts with the host factor acyl-CoA-binding domain-containing protein-3" (ACBD3). Protein ACBD3 subsequently recruits PI4KB and activates it on the membrane. PI4KB phosphorylates phosphatidylinositol (PI) in position 4 to creates PI4P². The described complex is shown schematically in picture 1.

It was shown that picornaviral polymerases specifically interact with

PI4P³. It could be the interaction with PI4P what the polymerases recruits to the membrane. The membrane localization causes an increase polymerase enzymatic processivity and protects nascent double strand-RNA (dsRNA) from degradation⁴.



Picture 1: The 3A-ACBD3-PI4KB protein complex: Viral membrane binding protein 3A interact with host factor ACBD3 to hijack PI4KB to the membrane. The PI4KB creates hyperphosphorylated membrane surface.

Picornaviral RdRp

All picornaviral proteins arise from a single polyprotein by proteolytic maturation to stable (functional) intermediates and individual proteins.

Picornaviral polymerase 3D^{pol} is located on the C terminus of the polyprotein. In the first stage, is polymerase matured in the 3CD protein, which has only proteolytic activity. The stable 3CD intermediate is then cleaved to a 3C protease and the 3D^{pol} polymerase⁵. During 3D^{pol} maturation the polymerase activity is evoked⁶. This activation is mediated by insertion of the polymerase N terminus to a pocket in proximity to the polymerase active site. The N terminus stabilization is structurally determined by the interaction of the first 3D^{pol} amino acid with several pocket residues⁷. Importantly, the first 3D^{pol} residue is a highly conserved glycine⁴.

The 3D^{pol} polymerases use a primer dependent mechanism of RNA replication. But instead of a nucleic acid primer they use the viral 3B protein as a primer⁸. Protein 3B is present in the infected cell also in the form of 3AB intermediate⁹.

Flaviviruses

Flaviviruses also belong to +RNA viruses and they can cause widespread epidemics, in many cases lethal. The most known flaviviral representatives are Dengue virus (DENV), Japanese encephalitis virus (JEV), tick borne-encephalitis virus (TBE), West Nile virus (WNV), Zika virus (ZIKV) and yellow fever virus (YFV).

This study is focused on the ZIKV and YFV RdRp enzymes.

Flaviviral polymerases

Flaviviral polymerases are termed NS5 proteins. In contrast to picornaviral 3D^{pol} the flaviviral NS5 enzyme is composed of two domains: the methyltransferase (MTase) and the RdRp domains¹⁰.

MTase is responsible for a methyl-guanosine cap formation at the 5' end of flaviviral RNA. The cap is created by a guanosine base connected to the first adenosine base of the RNA through 5' to 5' triphosphate bridge. MTase catalyses methylation at the N-7 position of the guanosine base. MTase also recognizes 2'O position on the first RNA adenosine and methylates it¹¹. Both methylations together increase the RNA stability and protect RNA from the innate immunity. RdRp domain ensures the replication of RNA. Flaviviral polymerases use a *de novo* replication mechanism, which is secured by the priming loop¹².

The fact, that NS5 is composed from two domains which both have a

critical function in viral replication, makes NS5 promising targets in the antiviral therapy.¹³

A specific medication for yellow fever infection is not available, inhibition of YF NS5 could be a possible treatment.

For the development of a specific treatment it is an advantage to fully understand mechanism of the infection and to structurally describe possible targets of antiviral therapy. Only few structures of YFV have been available so far: helicase¹⁴, MTase¹⁵, non-structural protein 1 (involved in virulence and replication)¹⁶ and capsid¹⁷.

Another viral disease which would be treatable by NS5 inhibition is ZIKV infection. Only structures of the apo form of ZIKV NS5 are known¹⁸⁻²⁰. Since 2015, when ZIKV epidemic started, the virus has been extensively studied.

Aims of the study

1. To *in vitro* reconstitute protein - membrane complex 3A-ACBD3-PI4KB using artificial membranes and recombinant proteins.
2. To find lipid and protein composition of membrane that leads to the 3D^{pol} recruitment into ROs.
3. To align all Picornaviral 3D^{pol} primary sequences and analyse conservation of the very first residue.
4. To structurally characterise 3D^{pol} with unique N terminus, using protein crystallography.
5. To characterize the effect of 3D^{pol} very first residue on polymerase activity.
6. To solve the structure of full length YFV NS5 protein containing MTase and RdRp domains.
7. To compute biologically relevant model of Zika NS5 in complex with RNA.

Used methods

In this study I used standard methods of molecular biology and protein crystallography:

DNA cloning (expression vectors preparation and mutagenesis), protein expression and purification, enzymatic activity assays, liposome pulldown assays, thermal shift assays.

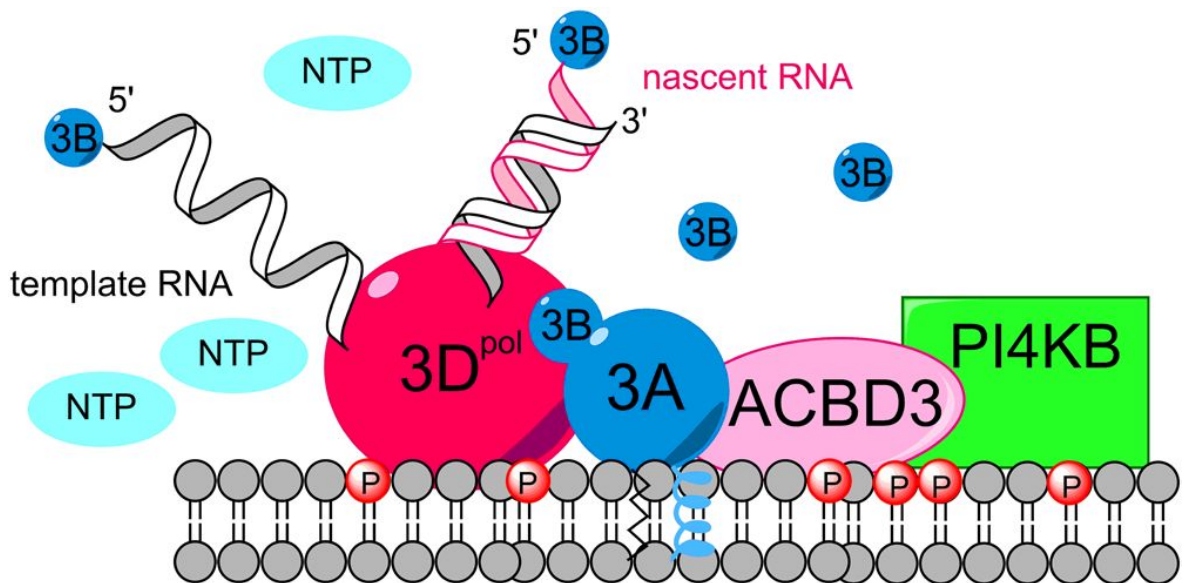
Protein crystallography - protein crystallization, diffraction data collection using home source and synchrotron X-ray sources, data processing (scaling and integration), structure solving using the molecular replacement method, structure refinement.

Results

Negative charge and membrane-tethered viral 3B cooperate to recruit viral RNA dependent RNA-polymerase 3D^{pol}.

Step by step we *in vitro* reconstituted PI4KB membrane hijacking as it occurs in kobuviral infected cells. The 3A-ACBD3-PI4KB complex formation was well described by previous *in vivo* experiments². Our *in vitro* experiments are in good agreement with the data obtained in cells.

We observed that polymerase 3D^{pol} is recruited to negatively charged membranes in the presence of membrane tethered 3B (mimicking 3AB intermediate). The hypothetical model of replication complex is shown in picture 2.



Picture 2: Schematic model of the 3D^{pol}-3AB-ACBD3-PI4KB protein complex²¹.

These results were published in:

Dubankova, A.#, Humpolickova, J.#, Klima, M. & Boura, E. Negative charge and membrane-tethered viral 3B cooperate to recruit viral RNA dependent RNA-polymerase 3D^{pol}. *Sci. Rep.* 7, 17309 (2017).

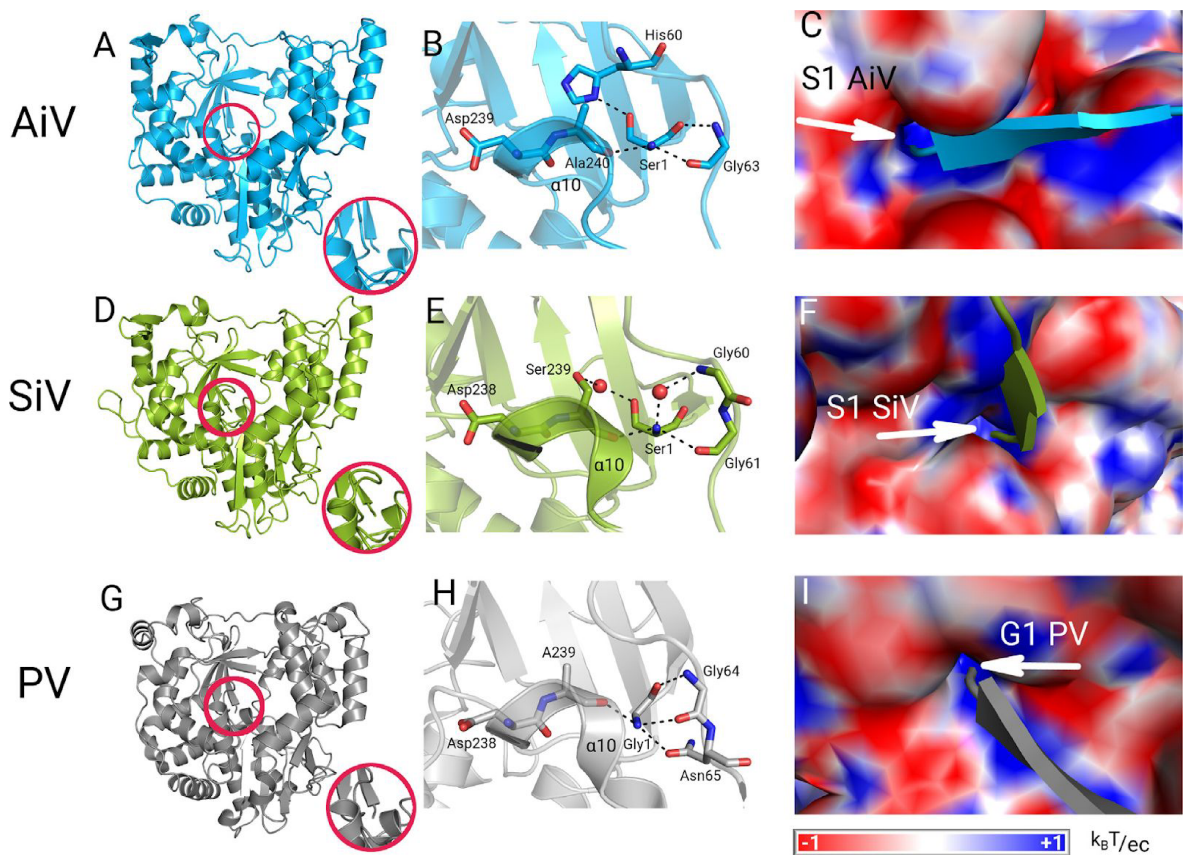
Structures of kobuviral and siciniviral polymerases reveal conserved mechanism of picornaviral polymerase activation.

Picornaviral sequential alignment uncovered seven genera with an uncanonical first residue in the 3D^{pol} enzyme (galliviruses, osciviruses, passeriviruse, sakobuviruses, saliviruses, kobuviruses and siciniviruses).

We solved crystal structures of kobuviral and siciniviral 3D^{pol} polymerases. Both of them have the N terminus buried in a surface pocket similarly as canonically beginning polymerases. The surface pocket of kobuviral and siciniviral 3D^{pol} is evolutionarily designed for interaction with first serine residue. The hydroxyl of Ser1 from kobuviral 3D^{pol} interact with His60.

The hydroxyl of the first serine from siciniviral 3D^{pol} creates a water bridge with the Ser239. Detailed view of kobuviral and siciniviral polymerase in comparison to PV polymerase is shown on picture 3.

We tested the specificity of the N terminus binding pocket by variety of mutations in the 3D^{pol} first residue. We discovered that every tested change in the first residue disrupts viral replication.



Picture 3: Atypical fold of kobuviral (Aichi virus - AiV) and siciniviral (SiV) $3D^{pol}$ N terminus within $3D^{pol}$ enzymes.

A-C The first residue of AiV $3D^{pol}$ is locked to a positively charged cavity in proximity to protein active site. **D-F** Corresponding view of the SiV $3D^{pol}$ structure.²⁶ **G-I** The majority of picornaviruses has the first glycine residue inserted in a charged cavity as illustrated by the PV $3D^{pol}$ structure²².

These results were published in:

Dubankova, A., Horova, V., Klima, M. & Boura, E. Structures of kobuviral and siciniviral polymerases reveal conserved mechanism of picornaviral polymerase activation. *J. Struct. Biol.* (2019).

Structure of the yellow fever NS5 protein reveals conserved drug targets shared among flaviviruses.

We solved the crystal structure of the full length Yellow fever NS5 enzyme at resolution 3.1 Å. We discovered regions which are structurally conserved in the *Flaviviridae* family. These regions are pivotal for structure based drug design.

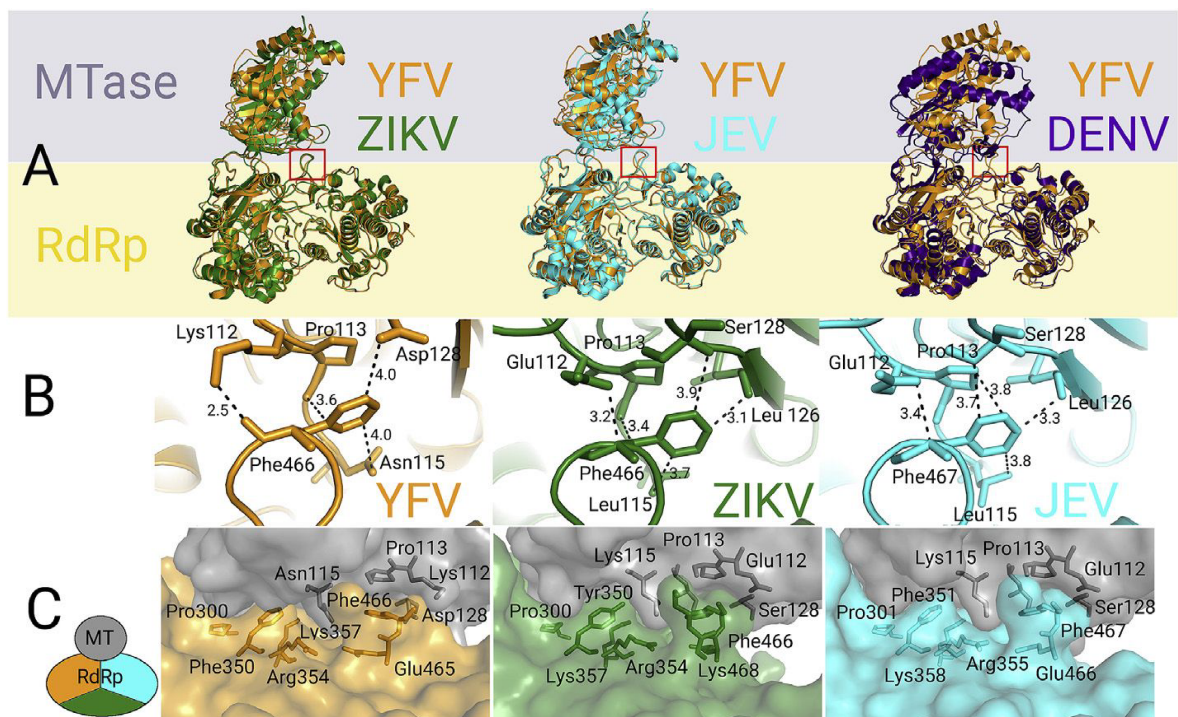
The priming loop is essential in the initiation of RNA replication. In the priming loop is localised a residue (Trp799) responsible for a stacking interaction with the initiating nucleotide. The YFV NS5 has this residue conserved with ZIKV NS5, but different to HCV.

YFV NS5 is stabilised by two zinc fingers. The first zinc site is coordinated by two cysteines (Cys448 and Cys451), histidine 443 and glutamate 439 residues. Except for the glutamate 439 residue the zinc binding sites are absolutely conserved among NS5 proteins from YFV, ZIKV, DENV, and WNV.

The second zinc site is coordinated by two cysteine (Cys732 and Cys851) and two histidine (His716 and His718) residues. This zinc site is also highly conserved except for histidine 716 residue which varies in ZIKV and WNV, but is conserved in DENV.

The interdomain contact between MTase and RdRp is mediated by highly conserved proline 113 (from MTase) and phenylalanine 466 (from RdRp domain) which is stuck into pocket on MTase surface. We showed that domains stabilise each other by this interaction.

From comparison of mutual domains orientation we discovered that YFV NS5 orientation is conserved in ZIKV and JEV, but not in DENV NS5. For detailed view of MTase RdRp interface comparison see picture 4.



Picture 4: *The MTase RdRp interface*²³.

A Structures of full length flaviviral NS5 proteins were superimposed on the structure of YF NS5 based on the RdRp domain. This revealed that the domain orientation is conserved in yellow fever, Zika and Japanese encephalitis virus RdRp but not in Dengue RdRp. **B** The conserved residues Phe466 and Pro113 define the MTase-RdRp interface. **C** Detail of RdRp MTase interface. MTase is shown in gray color. The color of RdRp is colored depending on viral origin (YFV–yellow, ZIKV–forest green, JEV–cyan).

These results were used in our publication:

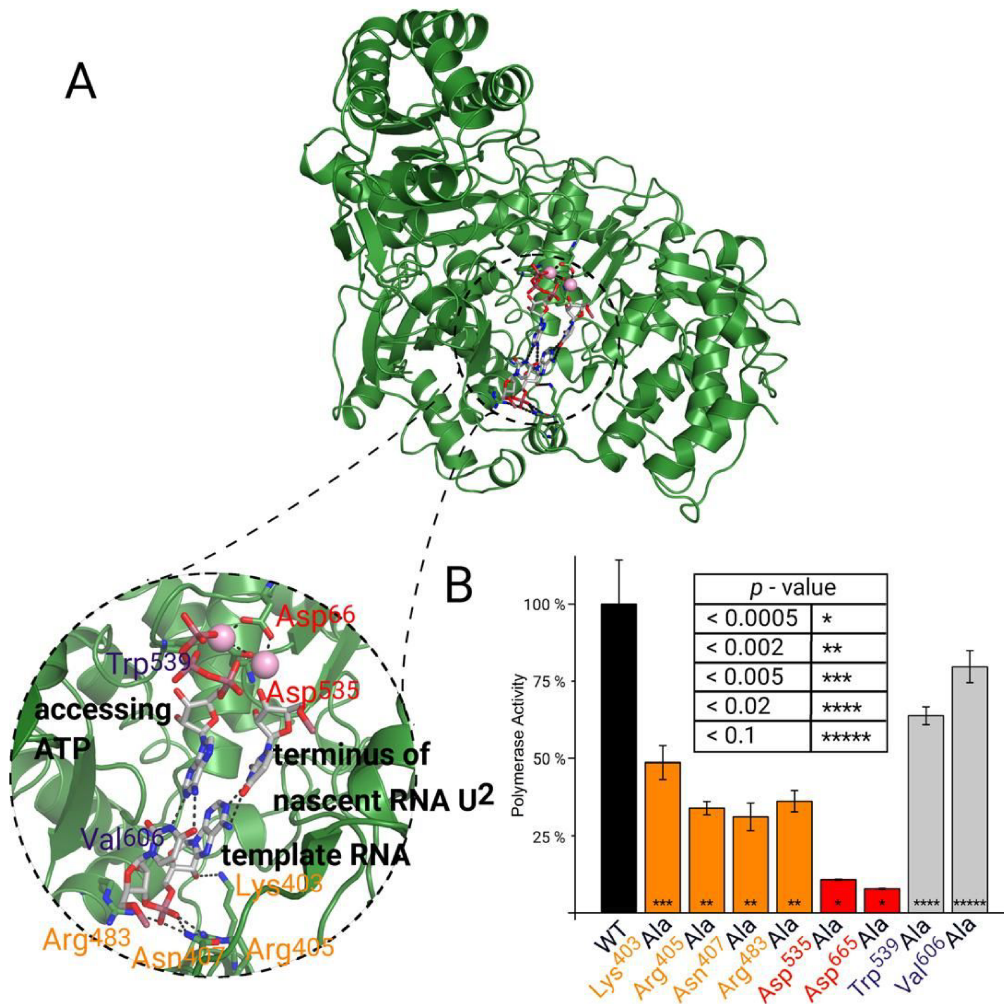
Dubankova, A. & Boura, E. Structure of the yellow fever NS5 protein reveals conserved drug targets shared among flaviviruses. *Antiviral Research* 169, 104536 (2019).

The structural model of Zika virus RNA dependent RNA polymerase in complex with RNA for rational design of novel nucleotide inhibitors.

In this study we calculated model of ZIKV NS5 in complex with small fragment of RNA. This model proved to be beneficial for docking experiments which are necessary for rational drug design. The model was built on foundations of crystal structure of the full length NS5 ZIKV¹⁹ and HCV (Hepatitis C virus) RdRp in complex with ADP, manganese and a primer-template hairpin²⁴.

The model was biologically evaluated by enzymatic assays, see picture 5 for more details.

This model was calculated using the QM/MM (quantum mechanics / molecular mechanics) method for docking experiments which are necessary for rational inhibitor design. The calculated model contains the template RNA, accessing ATP, two magnesium ions and terminus of the nascent RNA.



Picture 5: Enzymatic analysis of ZIKV NS5 model with RNA²⁵.

A ZIKV RdRp RNA complex model with zoomed RNA binding site. The RNA template is a dinucleotide composed of an A – U. Nascent U² and ATP are present. In the enlarged view the highlighted amino acids relate to activity assay. B Activity of ZIKV RdRp: Mutations in red region disrupt polymerase activity, in orange regions significantly decrease the activity and in gray regions slightly influence the activity. The values in box are Student t-test p values.

These results were published in:

Šebera, J.#, **Dubankova, A.#**, Sychrovský, V., Ruzek, D., Boura, E. & Nencka, R. The structural model of Zika virus RNA-dependent RNA polymerase in complex with RNA for rational design of novel nucleotide inhibitors. *Sci. Rep.* 8, 11132 (2018).

List of results:

1. We reconstituted *in vitro* formation of the 3A-ACBD3-PI4KB protein complex on the surface of biomimetic membranes.
2. We observed that a picornaviral polymerase 3D^{pol} is recruited to the membrane surface in the presence of PI4P or other negatively charged lipid and membrane tethered 3B.
3. The sequence alignment of picornaviral 3D^{pol} polymerases revealed seven genera with non-conserved first residue. We chose kobuviral and siciniviral 3D^{pol} enzymes for further structural analysis.
4. We solved the crystal structures of kobuviral and siciniviral 3D^{pol} polymerases. The structures revealed N terminus stabilisation by the first residue. We also showed that the structures of kobuvirus and sicinivirus polymerases are evolutionarily distinct from the other known picornaviral polymerases.
5. Using biological assays we demonstrated the essentiality of the proper first residue. We showed that (from tested set of mutations) only the original N terminus activates the polymerase.
6. We solved first crystal structure of YFV NS5. The structure revealed similarities and differences of YFV NS5 to other known flaviviral NS5 structures.
7. We calculated a biologically relevant model of ZIKV polymerase in complex with RNA for ligand docking studies.

Publications included in doctoral thesis

Dubankova, A.#, Humpolickova, J.#, Klima, M. & Boura, E. Negative charge and membrane-tethered viral 3B cooperate to recruit viral RNA dependent RNA-polymerase 3D^{pol}. *Sci. Rep.* 7, 17309 (2017).

Dubankova, A., Horova, V., Klima, M. & Boura, E. Structures of kobuviral and siciniviral polymerases reveal conserved mechanism of picornaviral polymerase activation. *J. Struct. Biol.* (2019). doi:10.1016/j.jsb.2019.08.004

Dubankova, A. & Boura, E. Structure of the yellow fever NS5 protein reveals conserved drug targets shared among flaviviruses. *Antiviral Research* 169, 104536 (2019).

Šebera, J.#, **Dubankova, A.#**, Sychrovský, V., Ruzek, D., Boura, E. & Nencka, R. The structural model of Zika virus RNA-dependent RNA polymerase in complex with RNA for rational design of novel nucleotide inhibitors. *Sci. Rep.* 8, 11132 (2018).

both authors contributed equally

Publications not included in doctoral thesis

Boura, E., Baumlova, A., Chalupska, D., **Dubankova, A.** & Klima, M.

Metal ions-binding T4 lysozyme as an intramolecular protein purification tag compatible with X-ray crystallography. *Protein Sci.* 26, 1116–1123 (2017).

Klima, M., Tóth, DJ., Hexnerova, R., Baumlova, A., Chalupska, D., Tykvart, J., Rezaczkova, L., Sengupta, N., Man, P., **Dubankova, A.**, Humpolickova, J., Nencka, R., Veverka, V., Balla, T. & Boura, E. Structural insights and in vitro reconstitution of membrane targeting and activation of human PI4KB by the ACBD3 protein. *Sci. Rep.* 6, 23641 (2016).

Baumlova, A. Chalupska, D., Różycki, B., Jovic, M., Wisniewski, E., Klima, M., **Dubankova, A.**, Kloer, DP., Nencka, R., Balla, T. & Boura, E. The crystal structure of the phosphatidylinositol 4-kinase II α . *EMBO Rep.* 15, 1085–1092 (2014).

Jović, M., Kean, MJ., **Dubankova, A.**, Boura, E., Gingras, AC., Brill, JA. & Balla, T. Endosomal sorting of VAMP3 is regulated by PI4K2A. *J. Cell Sci.* 127, 3745–3756 (2014).

Curriculum vitae

Mgr. Anna Dubánková

(*2. 2. 1992 Prague)

Work experience

2013 - present

IOCB Prague, Evzen Boura lab - Structural Biology.

Student (Bc. - PhD.)

Education

2016 - present

Charles University in Prague, Physical chemistry, PhD.

2014 - 2016

Charles University in Prague, Biophysical chemistry, Mgr.

2011 - 2014

Charles University in Prague, Biochemistry, Bc.

Awards

2019

Prize of The Czech society for structural biology for outstanding student poster XVI Discussion in Structural Molecular Biology in Nové Hrady

2019

Best Poster Award CzechoSlovak Virology Conference

Courses and conferences:

- Positive-Strand RNA Viruses, Keystone Symposia (Ireland, 2019)
- XVI Discussion in Structural Molecular Biology in Nové Hradý (Czechia, 2019)
- CzechoSlovak Virology Conference (Slovakia, 2019)
- 31st International Conference on Antiviral Research (Portugal, 2018)
- International Workshop on Biological Membranes (Finland, 2018)
- Phosphoinositide Biology: New Therapeutic Targets Beyond Class I PI3K (New Mexico, 2018)
- FEBS congress 2017 FROM MOLECULES TO CELLS AND BACK (Israel, 2017)
- Biomolecules and Nanostructures 6 (Poland, 2017)
- 4th Antivirals Congress 2016 - Elsevier (Spain, 2016)

Certificates:

Cambridge English Entry Level Certificate in ESOL International

Zkratky / Abbreviation

	Česky	in English
ACBD3	Protein-3 obsahující doménu vázající acyl-CoA	Acyl-CoA-binding domain-containing protein-3
AiV	Aichi virus	Aichi virus
CV	Coxsackie virus	Coxsackie virus
DENV	Virus horečky Dengue	Dengue virus
dsRNA	Dvouvláknová RNA	Double-stranded RNA
HCV	Virus hepatitidy C	Hepatitis C virus
HRV	Lidský Rhinovirus	Human rhinovirus
JEV	Virus Japonské encefalitidy	Japanese encephalitis virus
L	Vedoucí protein	Leader protein
MTase	Metyltransferáza	Methyltransferase
PI	Fosfatidylinositol	Phosphatidylinositol
PI4K	Fosfatidylinositol 4 kináza	Phosphatidylinositol 4-kinase
PI4KB	Fosfatidylinositol 4 kináza III β	Phosphatidylinositol 4-kinase III β
PI4P	Fosfatidylinositol 4 fosfát	Phosphatidylinositol 4-phosphate

PV	Virus dětské obrny	Poliovirus
QM/MM	kvantová mechanika / molekulová mechanika	quantum mechanics / molecular mechanics
RdRp	RNA dependentní RNA polymeráza	RNA-dependent RNA polymerase
RO	Replikační organela	Replication organelle
ssRNA	Jednovláknová RNA	Single-stranded RNA
TBE	Virus klíšťové encefalitidy	Tick-borne encephalitis
WNV	Virus Západonilské horečky	West Nile virus
YFV	Virus žluté zimnice	Yellow fever virus
ZIKV	Zika virus	Zika virus

Bibliography

1. den Boon, J. A. & Ahlquist, P. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 241–256 (2010).
2. Ishikawa-Sasaki, K., Sasaki, J. & Taniguchi, K. A complex comprising phosphatidylinositol 4-kinase III β , ACBD3, and Aichi virus proteins enhances phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis and is critical for formation of the viral replication complex. *J. Virol.* **88**, 6586–6598 (2014).
3. Hsu, N.-Y. *et al.* Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* **141**, 799–811 (2010).
4. Peersen, O. B. Picornaviral polymerase structure, function, and fidelity modulation. *Virus Res.* **234**, 4–20 (2017).
5. Harris, K. S., Reddigari, S. R., Nicklin, M. J., Hämmerle, T. & Wimmer, E. Purification and characterization of poliovirus polypeptide 3CD, a proteinase and a precursor for RNA polymerase. *J. Virol.* **66**, 7481–7489 (1992).
6. Sun, D., Chen, S., Cheng, A. & Wang, M. Roles of the Picornaviral 3C Proteinase in the Viral Life Cycle and Host Cells. *Viruses* **8**, 82 (2016).
7. Gohara, D. W., Arnold, J. J. & Cameron, C. E. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): kinetic, thermodynamic, and structural analysis of ribonucleotide selection. *Biochemistry* **43**, 5149–5158 (2004).
8. Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. & Wimmer, E. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**, 280–284 (1998).
9. Gangaramani, D. R., Eden, E. L., Shah, M. & Destefano, J. J. The twenty-nine amino acid C-terminal cytoplasmic domain of poliovirus 3AB is critical for nucleic acid

- chaperone activity. *RNA Biol.* **7**, 820–829 (2010).
10. Selisko, B., Papageorgiou, N., Ferron, F. & Canard, B. Structural and Functional Basis of the Fidelity of Nucleotide Selection by Flavivirus RNA-Dependent RNA Polymerases. *Viruses* **10**, (2018).
 11. Dong, H. *et al.* Biochemical and genetic characterization of dengue virus methyltransferase. *Virology* **405**, 568–578 (2010).
 12. Malet, H. *et al.* Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. *J. Biol. Chem.* **282**, 10678–10689 (2007).
 13. Coutard, B. *et al.* Zika Virus Methyltransferase: Structure and Functions for Drug Design Perspectives. *J. Virol.* **91**, (2017).
 14. Wu, J., Bera, A. K., Kuhn, R. J. & Smith, J. L. Structure of the Flavivirus helicase: implications for catalytic activity, protein interactions, and proteolytic processing. *J. Virol.* **79**, 10268–10277 (2005).
 15. Geiss, B. J. *et al.* Analysis of flavivirus NS5 methyltransferase cap binding. *J. Mol. Biol.* **385**, 1643–1654 (2009).
 16. Wang, H. *et al.* Crystal structure of the C-terminal fragment of NS1 protein from yellow fever virus. *Sci. China Life Sci.* **60**, 1403–1406 (2017).
 17. Zhang, Y. *et al.* Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.* **22**, 2604–2613 (2003).
 18. Zhao, B. *et al.* Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. *Nat. Commun.* **8**, 14762 (2017).
 19. Upadhyay, A. K. *et al.* Crystal structure of full-length Zika virus NS5 protein reveals a conformation similar to Japanese encephalitis virus NS5. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **73**, 116–122 (2017).
 20. Godoy, A. S. *et al.* Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase. *Nat. Commun.* **8**, 14764 (2017).

21. Dubankova, A., Humpolickova, J., Klima, M. & Boura, E. Negative charge and membrane-tethered viral 3B cooperate to recruit viral RNA dependent RNA polymerase 3D. *Sci. Rep.* **7**, 17309 (2017).
22. Moustafa, I. M. *et al.* Structural dynamics as a contributor to error-prone replication by an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **289**, 36229–36248 (2014).
23. Dubankova, A. & Boura, E. Structure of the yellow fever NS5 protein reveals conserved drug targets shared among flaviviruses. *Antiviral Res.* **169**, 104536 (2019).
24. Appleby, T. C. *et al.* Viral replication. Structural basis for RNA replication by the hepatitis C virus polymerase. *Science* **347**, 771–775 (2015).
25. Šebera, J. *et al.* The structural model of Zika virus RNA-dependent RNA polymerase in complex with RNA for rational design of novel nucleotide inhibitors. *Sci. Rep.* **8**, 11132 (2018).
26. Dubankova, A., Horova, V., Klima, M. & Boura, E. Structures of kobuviral and siciniviral polymerases reveal conserved mechanism of picornaviral polymerase activation. *J. Struct. Biol.* (2019). doi:10.1016/j.jsb.2019.08.004