

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Jakub Hejdánek

Molekulární charakterizace vazby inhibitorů neuraminidasy viru chřipky

**Molecular characterisation of the binding of influenza virus neuraminidase
with inhibitors**

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka CSc.

Praha 2016

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze 18.5.2016

.....

Jakub Hejdánek

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Janu Konvalinkovi za vedení práce a za mnohé rady poskytnuté při jejím vypracování.

Dále bych chtěl poděkovat Milanu Kožíškovi za profesionální školení v laboratorní praxi, za pozitivní přístup a příjemné pracovní prostředí.

Poděkování také patří Ivě Flaisigové, Janě Pokorné, Petru Pachlovi a Eleně Karlukové za jejich pomoc při vypracování práce.

Obsah

Seznam zkratk.....	6
Abstract	7
Abstrakt	8
1. Teoretická část.....	9
1.1. Chřipkové onemocnění.....	9
1.2. Virus chřipky	9
1.2.1. Klasifikace.....	10
1.2.2. Struktura viru chřipky	10
1.2.2.1. Struktura genomu	12
1.2.3. Životní cyklus viru chřipky	12
1.2.3.1. Přichycení a vstup viru	12
1.2.3.2. Syntéza virové RNA, replikace a tvorba proteinů.....	14
1.2.3.3. Skládání viru a uvolnění z buňky	14
1.2.4. Chřipková pandemie.....	14
1.2.4.1. Španělská chřipka 1918.....	15
1.2.4.2. Asijská chřipka 1957 a hongkongská chřipka 1968.....	15
1.2.4.3. Pandemie 2009	16
1.3. Neuraminidasa.....	16
1.3.1. Struktura neuraminidasy.....	16
1.3.1.1. Aktivní místo neuraminidasy	18
1.3.1.2. Reakční mechanismus	19
1.3.1.3. Porovnání aktivních míst jednotlivých subtypů	20
1.3.2. Inhibitory neuraminidasy	20
1.3.2.1. Zanamivir a oseltamivir.....	20
1.3.2.2. Laninamivir a peramivir	22
1.3.2.3. Tamifosfor	23
1.3.3. Vývoj resistance proti inhibitorům neuraminidasy	23
1.3.3.1. Vznik resistencí	24

1.3.3.2. Mutace S247N	24
2. Cíle práce.....	26
3. Materiál a metody.....	27
3.1. Materiál	27
3.2. Chemikálie.....	27
3.3. Přístroje	28
3.4. Purifikace proteinu	29
3.5. SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	30
3.6. Elektropřenos a imunodetekce	31
3.7. Proteolytické odštěpení proteinové kotvy	31
3.8. Stanovení koncentrace proteinu	32
3.9. Krystalizace proteinu.....	32
3.10. Kinetická charakterizace	33
3.10.1. Stanovení Michaelisovy konstanty.....	33
3.10.2. Stanovení inhibičních konstant	34
3.11. Isotermální titrační kalorimetrie	34
4. Výsledky.....	35
4.1. Purifikace proteinu	35
4.2. Stěpení afinitní kotvy neuraminidasy.....	36
4.2.1. Určení Michaelisovy konstanty a katalytické efektivity mutantu S247N neuraminidasy	37
4.2.2. Určení inhibičních konstant.....	38
4.3. Thermodynamická analýza.....	38
4.4. Proteinová krystalizace.....	40
5. Diskuze	41
6. Závěr.....	44
Reference.....	45

Seznam zkratek

APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
CCD	Elektronická součástka používaná pro snímání obrazové informace (z angl. „charge-coupled device“)
FDA	Úřad pro schvalování léčiv a potravin (z angl. „Food and Drug Administration“)
HA	hemaglutinin
HABA	kyselina 2-(4-hydroxyfenylazo) benzoová
HRP	křenuvát peroxidasa (z angl. horseradish peroxidase)
kb	tisíc bází
kDa	kilodalton
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NA	neuraminidasa
Neu5Ac	N-acetyl-neuraminová kyselina
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate-buffered saline)
PEG	polyethylenglykol
RFU	relativní fluorescenční jednotka (z angl. relative fluorescence unit)
RNA	ribonukleová kyselina
RNP	ribonukleoprotein
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate)
TEMED	tetramethylethylendiamin
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. „World health organization“)

Abstract

Influenza virus is responsible for seasonal epidemics among human population. Flu illness usually causes only mild symptoms and can be overcome by few days rest. However, this illness might have fatal consequences for young, elderly and immunocompromised individuals. Some viruses are able to „jump“ across species resulting in rise of new types of virus that can have pandemic potential. The search for new treatment options to prevent emergence of new pandemics is thus a high priority task.

Influenza virus neuraminidase is a protein located on the surface of viral particles. It has enzyme activity and catalyzes release of newly formed viral particles from cytoplasmic membrane of infected host cells. This step is crucial in virus life cycle, so the active site of this enzyme has become an important target for development of anti-influenza drugs.

The neuraminidase inhibitors are currently the only effective drugs used for influenza treatment. Nowadays, there are two drugs against flu used worldwide: Tamiflu (oseltamivir) and Relenza (zanamivir).

Recently, resistant influenza strains have been detected with increasing frequency. Point mutations in the active site of neuraminidase are causing decreased susceptibility of virus to inhibitors. Formerly, it was thought that these mutations would significantly impair viral transmission effectivity and fitness. However, these primary mutations are often accompanied by secondary mutations that compensate for negative effect of the primary mutations to viral fitness.

In this bachelor thesis, the characterization of binding of oseltamivir carboxylate and tamiphosphor was performed with recombinant neuraminidase carrying mutation of serine to arginine at position 247 of recent pandemic virus. This mutation plays significant role in emergence of new influenza strains resistant to commonly used inhibitors. The enzyme kinetic, microcalorimetric and X-ray structural analyses of neuraminidase with inhibitors provide valuable information about the effect of this mutation in inhibitor binding.

Keywords: neuraminidase, enzyme kinetics, crystallography, isothermal titration calorimetry, recombinant proteins

[In Czech]

Abstrakt

Virus chřipky způsobuje sezónní epidemie v lidské populaci. Nemoc většinou není doprovázena vážnějšími příznaky a jako léčba ve většině případů stačí odpočinek. Může však mít vážnější průběh u mladistvých a starších lidí nebo u jedinců s oslabenou imunitou. Různé typy viru jsou schopny přenosu mezi odlišnými živočišnými druhy, což může mít za následek vznik nových typů viru s pandemickým potenciálem. Hledání nových možností léčby je důležitým faktorem ve snaze zabránit vzniku nové pandemie.

Neuraminidasa viru chřipky je protein, který se nachází na povrchu virových částic. Tento protein vykazuje enzymovou aktivitu, která je nezbytná pro uvolnění nově vznikajících virových částic z cytoplazmatické membrány infikovaných hostitelských buněk. To jí činí důležitým faktorem v životním cyklu viru. Aktivní místo tohoto enzymu se stalo důležitým cílem terapeutického zásahu pro vývoj inhibitorů zpomalujících replikaci viru.

Nejběžněji používanými léky ve světě proti chřipce jsou Tamiflu (oseltamivir) a Relenza (zanamivir) cílené proti neuraminidase. V posledních letech se stále více objevují resistantní kmeny viru chřipky. Bodové mutace v aktivním místě neuraminidasy způsobují sníženou citlivost vůči inhibitorům. Dříve se předpokládalo, že by takovéto mutace měly významně oslabit virus i jeho schopnost se efektivně šířit. Tyto primární mutace jsou však často doprovázeny sekundárními mutacemi, které kompenzují negativní vliv primárních mutací na virovou životaschopnost („fitness“).

V této práci byla provedena charakterizace vazby inhibitorů oseltamivir karboxylátu a tamifosforu s rekombinantní neuraminidasou nedávného pandemického viru nesoucí mutaci serinu za arginin v pozici 247. Tato mutace hraje důležitou roli při vzniku nových variant viru chřipky resistantních vůči běžně užívaným inhibitorům. Analýza pomocí enzymové kinetiky, isothermální kalorimetrie a rentgenové krystalografie neuraminidasy s inhibitory poskytla užitečné informace o vlivu mutace na vazbu těchto inhibitorů

Klíčová slova: neuraminidasa, enzymová kinetika, krystalografie, isothermální titrační kalorimetrie, rekombinantní proteiny

1. Teoretická část

1.1. Chřipkové onemocnění

Virus chřipky způsobuje vysoce nakažlivou nemoc napadající dýchací systém lidí, zvířat a způsobuje akutní infekci dýchacích cest [1]. Virus napadá všechny věkové skupiny a způsobuje každoroční epidemie nejčastěji v zimním období a v chladných klimatech. Virus se šíří snadno a rychle kapénkami, rozprášenými kašlem nakažených lidí ve vzduchu a následným vdechnutím zdravým jedincem. Mezi příznaky chřipky patří vysoká horečka, kašel, bolest hlavy, bolest kloubů a svalů, bolest v krku a rýma. Nemoc nejčastěji není nutné léčit a sama zanikne po týdnu či dvou strávených na lůžku. Ve vážnějších případech, například v kombinaci s jinou nemocí, je nutné nasadit antivirotika. Nejeefektivnější obranou proti nemoci dodnes zůstává prevence ve formě vakcinace [2].

1.2. Virus chřipky

Virus chřipky patří mezi viry s jedno-vláknovou RNA negativní polarity z rodiny *Orthomyxoviridae*. Rozlišují se tři typy viru A, B a C, které se globálně vyskytují v populaci [3]. Onemocnění způsobují převážně typy A a B, které dávají vznikat sezónním epidemiím. Typ C způsobuje pouze lehké infekce dýchacího traktu a nezdá se, že by způsoboval epidemie [4]. Nejrozšířenější je typ A. Viry chřipky typu A mají největší komplexitu a diverzitu genetické informace. Zároveň typ A napadá velký rozsah hostitelů a způsobuje majoritní část závažných průběhů onemocnění u lidí a je i jednou z nejčastějších příčin pandemií. Celý genom je dlouhý přibližně 13 kb a skládá se z osmi segmentů kódujících jednotlivé virové proteiny. Divoké vodní ptactvo je hostitelem pro různé antigenicky odlišné subtypy viru chřipky A. Dva hlavní antigeny jsou povrchové glykoproteiny hemaglutinin (HA) a neuraminidasa (NA) [3]. Existuje 18 rozdílných HA (H) a 11 rozdílných NA (N) subtypů [4]. Virus se z ptactva často přenáší na jiný druh, ve kterém způsobuje infekční onemocnění. Někdy se může stát, že se virus ustálí v novém hostiteli, což může zapříčinit vznik pandemického typu následně ohrožujícího lidskou populaci [3].

1.2.1. Klasifikace

Jak již bylo zmíněno výše, existují 3 typy viru chřipky A, B a C. Viry chřipky typu A lze dělit na rozdílné subtypy. V současné době lze v lidské populaci najít subtypy A (H1N1) a A (H3N2). Na jaře roku 2009 se objevil nový A (H1N1) virus, který způsobil první pandemii za posledních více jak 40 let. Tento virus se často nazývá „2009 H1N1“ a nahradil předešlý H1N1 virus, dříve kolující v lidské populaci. Viry chřipky typu B nejsou rozděleny na jednotlivé subtypy. Mohou však být rozděleny na rozdílné rodokmeny a kmeny. V současné době lze v populaci najít dva rodokmeny: B/Yamagata a B/Victoria. V roce 1980 byla organizací WHO publikovaná konvence pro pojmenovávání virů chřipky. Tato konvence používá následující komponenty [4]:

- Antigenní typ (např. A, B, C)
- Původní hostitel (např. swine (prase), duck (kachna) etc.)
- Geografický původ (např. Denver, Taiwan)
- Číslo kmene
- Rok izolace
- Pro viry chřipky typu A popis antigenu hemaglutininu a neuraminidasy závorkách (např. (H1N1), (H3N2))

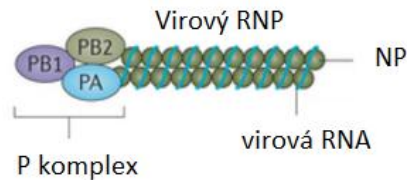
Například

- A/duck/Alberta/35/76 (H1N1)
- A/Perth/16/2009 (H3N2)

1.2.2. Struktura viru chřipky

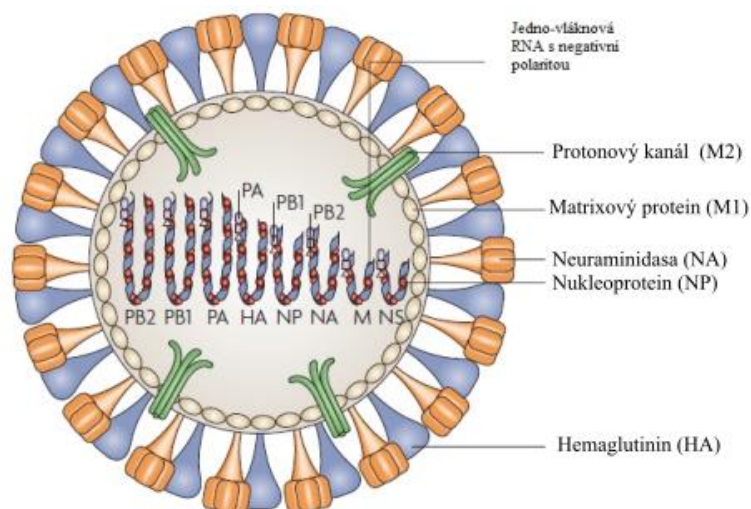
Viry chřipky typu A, B a C pocházejí ze společného viru. Mezi jednotlivými typy dochází k tzv. „resortmentu“, výměně virových RNA segmentů. Viry chřipky typu A a B jsou od sebe nerozlišitelné použitím elektronové mikroskopie. Mají sférický nebo vláknitý tvar. Sférická forma má 100 nm v průměru a vláknitá forma dosahuje délky 300 nm. Virion chřipky typu A je pokryt glykoproteiny HA a NA v poměru 4:1, které jsou na povrchu lipidové membrány, převzaté z buňky hostitele [5]. V lipidové membráně je malé množství matrixových (M2) proteinů, tvořících protonový kanál, které se vyskytují v poměru M2:HA 1:10 - 1:100 [6]. Tyto tři integrální membránové proteiny tvoří obálku, která pokrývá matici M1 proteinů uzavírající jádro virionu. V těsné blízkosti M1

proteinu se nachází nestrukturní protein (NS2) a ribonukleoprotein (RNP), což je komplex skládající se z virového RNA segmentu pokrytého nukleoproteinem (NP) a heterotrimerické RNA-dependentní RNA polymerasy (P komplex) [5, 7].



Obrázek 1: Struktura ribonukleoproteinů (RNP) viru chřipky typu A. Převzato a upraveno z [8].

Molekuly nukleoproteinů obalují, a tak ochraňují virové jedno-vláknové RNA. Zároveň se účastní importu a exportu RNP ve viru a na virové replikaci [9]. Organizace viru chřipky typu B je podobná typu A. Obsahuje čtyři proteiny obálky NA, HA a místo M2 obsahuje další dva proteiny NB a BM2, které tvoří kanály podobné kanálům z M2 proteinu u typu A. Viry chřipky typu C jsou strukturně odlišné od předešlých typů. Na povrchu infikovaných buněk tvoří až 500 nm dlouhé struktury. Obálku viru tvoří pouze jeden majoritně zastoupený glykoprotein, fúzní protein hemagglutininesterasy [7].



Obrázek 2: Struktura viru chřipky typu A. Uvnitř viru se nachází jednotlivé RNA segmenty kódující tři podjednotky polymerasy (PB2, PB1, PA), hemagglutinin (HA), nukleoprotein (NP), neuraminidasu (NA), M1 matrixový protein a M2 protein protonového kanálu (M) a segment kódující dva nestrukturní proteiny NS1, NS2 (NS). Převzato a upraveno z [3].

1.2.2.1. Struktura genomu

Oba typy viru chřipky A i B se skládají z osmi segmentů RNA negativní polarity, zatímco virus chřipky typu C má pouze sedm segmentů. Segmenty jsou v obou případech číslovány popořadě s klesající délkou. Segmenty 1, 3, 4, a 5 kódují každý pouze jeden protein a sice: PB2, PA, HA a NP proteiny [7]. Segment 2 kódující PB1 podjednotku zároveň kóduje malý nestrukturní protein (PB1-F2) s apoptotickou funkcí, skládající se z 87 aminokyselin. Třetí nejmenší segment je segment pro NA. Druhý nejmenší segment kóduje M1 matrixový protein a M2 protein protonového kanálu. Nejmenší segment kóduje dva nestrukturní proteiny NS1 a NS2 [9]. NS1 protein hraje kritickou roli v zabraňování hostitelské antivirové odpovědi. Vyřazení genu pro NS1 protein významně oslabí virus díky rapidní nekontrolované interferonové odpovědi hostitelského organismu, který zabrání virové replikaci [10]. NS1 interaguje s cytoplazmatickými a jadernými hostitelskými faktory, a tak významně oslabuje interferonovou odpověď organismu [11]. NS2 protein hraje roli při vzniku nových ribonukleoproteinových částic [12].

1.2.3. Životní cyklus viru chřipky

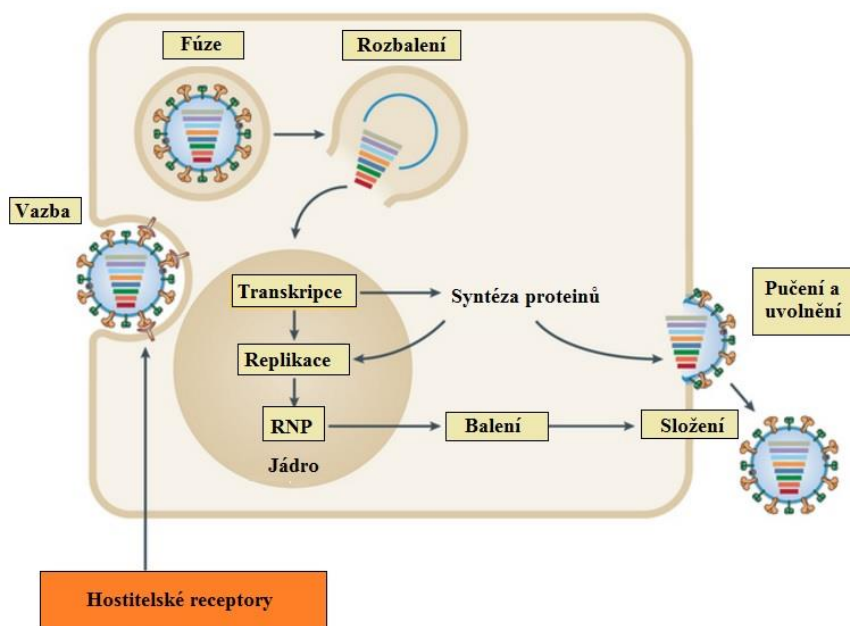
Důkladné prozkoumání životního cyklu viru chřipky dává možnost hledat potenciální terapeutické cíle pro budoucí výzkum léčiv. Obrázek 3 na straně 13 ukazuje zjednodušeně průběh životního cyklu viru.

1.2.3.1. Přichycení a vstup viru

Hemagglutinin je homotrimer, který tvoří výstupky z virové lipidové membrány. Tyto výstupky se váží na N-acetyl-neuraminovou kyselinu (dle názvosloví IUPAC: 5-(acetylamo)-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosic acid), také nazývanou kyselina sialová, umístěnou na konci oligosacharidového řetězce některých membránových glykoproteinů na povrchu buněčné membrány hostitelské buňky [13]. Nově nasyntetizovaný hemagglutinin má velikost přibližně 70 kDa. Následně je štěpen na dvě podjednotky HA1 a HA2, které jsou spojeny disulfidickými můstky. HA1 podjednotka obsahuje vazebnou doménu pro receptor zakončený kyselinou sialovou. Existují dvě hlavní připojení kyseliny sialové ke glykoproteinům na hostitelské buňce: $\alpha(2,3)$ a $\alpha(2,6)$. Lidské viry rozeznávají $\alpha(2,6)$ vazbu, ptačí a koňské rozeznávají $\alpha(2,3)$. Prasečí pak rozeznává oba typy, což je podstatné pro vznik nových virů kombinací různých kmenů. Po vazbě na kyselinu sialovou nastává receptorově řízená endocytóza a

virus vstupuje do buňky. Poté dochází k okyselení endosomu, které vyvolá konformační změny v molekule HA. Endosom má nízké pH kolem 5-6. Při tomto pH dochází k disociaci HA1 podjednotky z endosomální membrány a zároveň k odklonění od HA2 podjednotky. HA2 podjednotka se váže N-terminálním koncem k endosomální membráně a dochází k spojení virové a endosomální membrány [9, 14]. Nízké pH endosomu zároveň otevírá M2 protonový kanál.

M2 protein se skládá z 97 aminokyselin. Obsahuje transmembránovou doménu (TM) a C-terminální cytoplasmatický amfifilní helix. Helixy čtyř TM domén tvoří tetramerní strukturu a vytváří protonový kanál. V tomto protonovém kanálu jsou dvě významné aminokyseliny His37 a Trp 41. Při nízkém pH je histidin protonován a urychluje proud protonů kanálem. Tryptofany jsou v pozici blízko histidinů a při vysokém pH tvoří tzv. „bránu kanálu“, která blokuje proud protonů. Tato brána se otevře při nízkém pH a dochází k změně uspořádání TM helixů. [9]. Po otevření kanálu proudí H^+ protony do nitra virionu, to způsobí uvolnění RNP z M1 matrice a ty poté mohou volně vstoupit do cytoplasmy hostitelské buňky [15].



Obrázek 3: Jednoduchý přehled životního cyklu viru chřipky. Převzato a upraveno z [8].

1.2.3.2. Syntéza virové RNA, replikace a tvorba proteinů

Z cytoplasmy se RNP musí dostat do buněčného jádra. Všechny proteiny v RNP (NP, PA, PB1, PB2) obsahují známé jaderné lokalizační signály, které se mohou vázat k jadernému importnímu systému, a tedy mohou vstoupit do jádra [14]. Virová polymerasa je heterotrimer tří podjednotek PA, PB1 a PB2. Dohromady je tento komplex velký přibližně 250 kDa [9]. RNA viru chřipky má negativní polaritu. Prvním krokem k transkripci musí být přepis na RNA pozitivní polarity [14]. Virová RNA dependentní RNA polymerasa, která je součástí RNP vniklé do jádra, použije RNA vlákno negativní polarity jako templát pro syntézu dvou vláken RNA pozitivní polarity: mRNA templát pro produkci virových proteinů a komplementární RNA (cRNA) intermediát, ze kterého dále RNA polymerasa transkribuje další kopie genomické RNA negativní polarity [7]. Na začátku transkripce dochází k vazbě segmentu 10-13 nukleotidů s 7-methylguanosiinovou čepičkou z 5' konce hostitelské prekurzorové mRNA na PB2 podjednotku. Následně je tvořeno nové vlákno virové mRNA z 3' konce tohoto segmentu. [9, 16]. Proteiny obálky (HA, NA a M2) jsou syntetizovány z mRNA virového původu na membránových ribosomech endoplazmatického retikula, ve kterém se následně skládají a jsou transportovány do Golgiho aparátu pro vznik postranlačních modifikací. Všechny tyto proteiny mají apikální třídící signály, které je navádějí k buněčné membráně. O translaci zbylých proteinů dosud není vše známo [7].

1.2.3.3. Skládání viru a uvolnění z buňky

Po odchodu RNP z jádra zbývá viru jen vytvořit virové partikule a opustit buňku. Chřipka patří mezi obalené viry, používá hostitelskou plasmatickou membránu pro tvorbu obálky [14]. K pučení viru dochází u plasmatické membrány. K iniciaci pučení dochází pravděpodobně akumulací M1 matrixového proteinu u cytoplasmatické strany lipidové dvojvrstvy. Když je pučení ukončeno výstupky HA proteinu stále tvoří vazbu s kyselinou sialovou na povrchu buňky. Neuraminidasa následně odštěpuje koncové kyseliny sialové od glykoproteinů a gangliosidů buněčné membrány [7]. Neuraminidasa hraje klíčovou roli v životním cyklu viru a stala se hlavním cílem terapeutického zásahu.

1.2.4. Chřipková pandemie

Vysoce nakažlivá nemoc napadající dýchací soustavu byla poprvé popsána Hippokratem roku 412 před Kristem. Historický popis pandemií chřipky naznačuje, že se objevovaly v nepravidelných intervalech, lišily se v závažnosti, a často zapříčinily

vysokou úmrtnost převážně u starších lidí. Pandemie se objevují se vznikem nového viru chřipky, proti kterému nemá většina populace protilátky [11].

1.2.4.1. Španělská chřipka 1918

Španělská chřipka se na začátku 20. století rozšířila po světě současně ve třech samostatných vlnách v období dvanácti měsíců v Evropě, Asii a Severní Americe [17]. Španělská se nazývá proto, že v době první světové války bylo Španělsko neutrální zemí konfliktu a nebyla zde vojenská cenzura. Ve zprávách se tedy šířila informace o probíhající epidemii poprvé právě ve Španělsku, a zároveň byl vznik epidemie připisován této zemi v důsledku kolujících nepravdivých informací [18]. Odhadovaný počet obětí je více jak 50 miliónů. Donedávna bylo pouze málo konkrétních informací o příčinách vysoké závažnosti této pandemie. Existovaly spekulace, že roli v mohutnosti pandemie sehráli sociologické a mikrobiologické faktory. Ze studií klonování získaného kmenu však byly získány informace o vysoké virulenci. Úmrtnost nakažených lidí dosahovala 2,5%, což je v porovnání s 0,1% u ostatních pandemií velký rozdíl [19]. Unikátní na pandemii bylo, že byly infikovány zvířata i lidé. Sekvenační analýzy zároveň ukázaly, že geny kódující HA a NA pocházely z ptačího viru chřipky. Vir byl tedy adaptován na rozpoznání obou typů sialových receptorů (viz výše). Chřipka jevila vysokou virulenci především u mladých pacientů narozených po roce 1889. Jedna z teorií je, že v roce 1889 koloval v populaci podobný kmen, díky kterému měli starší lidé zvýšenou imunitní odpověď. Jeden z dalších faktorů zvyšujících patogenitu byla synergie viru s bakteriálními infekcemi. Vznikaly i nové symptomy jako bakteriální pneumonie, kdy docházelo k záplavě plic tekutinou a k jejich vnitřnímu krvácení [17, 19, 20].

1.2.4.2. Asijská chřipka 1957 a hongkongská chřipka 1968

V roce 1957 v Hong Kongu vypukla epidemie chřipky, u které byla zjištěna antigenní záměna. Tři segmenty pro NA, PB1 a HA se přenesly z ptačího viru do A(H1N1) subtypu za vzniku nového subtypu H2N2 (kmen A/Singapore/1/1957). Nákaza se postupně rozšířila z Asie do světa [21]. Celkem nákaza ovlivnila 40-50% lidské populace, z kterých 25-30% jevilo klinické příznaky. Průběh infekce se prezentoval typickým průběhem. Nejvíce případů smrti bylo způsobeno sekundární bakteriální pneumonií. Odhad celkových obětí pandemie činí kolem jednoho miliónu lidí [22].

Za 11 let znovu vypukla v Hong Kongu pandemie chřipky. Tentokrát virus vznikl antigenní záměnou, kdy se geny z mnoha subtypů utřídili v novém kmenu H3N2 (kmen A/Hong Kong/1/68), také nazývaným „hongkongská chřipka“. Celý průběh byl podobný pandemii z roku 1957 [11].

1.2.4.3. Pandemie 2009

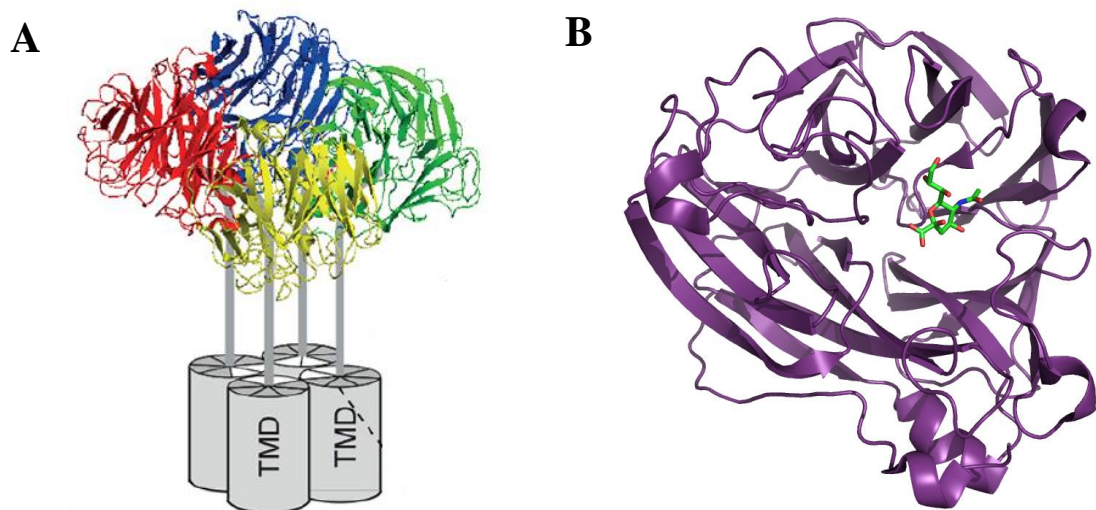
V roce 2009 se v Mexiku objevil nový kmen viru chřipky H1N1. Analýza genomu viru ukázala, že lidský virus je příbuzný běžnému prasečímu viru chřipky typu A vyskytujícímu se ve světě [23]. Segmenty kódující P komplex, HA a NP vykazovaly vysokou podobnost s prasečím virem chřipky H1N2 izolovaným v devadesátých letech 20. století v Severní Americe. Ten je potomkem H3N2 subtypu. Segmenty kódující NA a matrixové proteiny jsou však potomky kmenu prasečího viru kolujícímu v 90. letech v Evropě [24]. Původní rychlé šíření nákazy do Severní Ameriky a Evropy bylo způsobeno leteckou dopravou. Předchozí příprava vakcíny byla soustředěna na předpovězený příchod subtypu H5N1. Vakcíny, proti novému typu tedy nebyly včas připraveny. Na počátku pandemie mnoho států disponovalo velkou zásobou antivirotik. V Japonsku bylo během pandemie spotřebováno velké množství antivirotik a byla zde mnohem nižší procentuální úmrtnost v porovnání se světem. Ve Spojeném království byl například oseltamivir předepisován k profylaxi z důvodu udržení šíření nákazy na nízké úrovni. Charakteristiky pandemie se opět lišily od typického průběhu. Virus měl závažnější průběh především u mladších lidí. Zároveň se často vyvinul syndrom akutní dechové tísně. Jen zřídka byla nemoc doprovázena bakteriální infekcí. Lidé starší 64 let nebyli často nakaženi v důsledku imunity získané z dřívějších infekcí. Světová zdravotnická organizace potvrdila během 1 roku 18500 případů úmrtí, které přímo souvisely s nákazou pandemickým virem [11, 25, 26].

1.3. Neuraminidasa

1.3.1. Struktura neuraminidasy

Neuraminidasa je tetramerický enzym tvořený čtyřmi identickými monomery. Každý monomer se skládá z přibližně 470 aminokyselin a lze ho dělit na 4 samostatné domény. N-terminální cytoplasmatická část, transmembránová hydrofobní doména kotvící enzym v membráně, kmenová doména s proměnlivou délkou propojující transmembránovou a globulární katalytickou doménu která nese aktivní místo enzymu [27]. Velikost jedné molekuly neuraminidasy s glykosylacemi je přibližně 60 kDa a celý

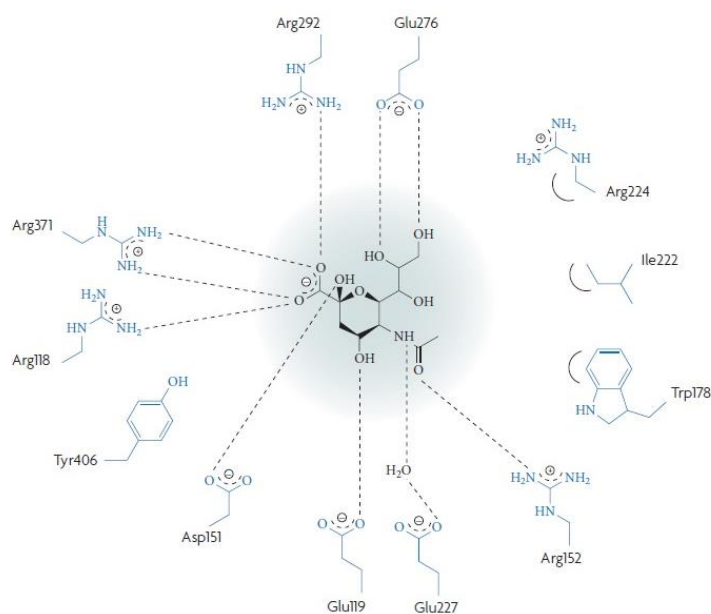
homotetramer je velký přibližně 240 kDa [28]. N-terminální cytoplasmatická doména je krátká sekvence šesti aminokyselin (MNPNQK). Tato sekvence je téměř ze 100% zachovaná ve všech subtypech viru chřipky typu A, její funkce však dosud není známa [27]. Viry, které obsahovaly mutaci v této sekvenci, vykazovaly sníženou schopnost pučení z membrány a měly pozměněnou morfologii [29]. Přímo na cytoplasmatickou doménu navazuje transmembránová doména s výrazně se lišící sekvencí aminokyselin u různých subtypů. U všech je však predikována struktura transmembránového helixu. Tato doména má zároveň funkci navádění NA skrze endoplazmatické retikulum i funkci udržení enzymu zakotveného v membráně. Kmenová doména se nachází mezi sekvencí transmembránové domény a globulární katalytickou doménou. Molekula zároveň obsahuje cysteiny tvořící disulfidické můstky mezi jednotlivými podjednotkami. Zároveň mají všechny subtypy místa pro N-glykosylaci, lišící se v počtu u jednotlivých subtypů [27]. Katalytická globulární doména je tvořena šesti identickými antiparalelními β -skládanými listy organizovanými v čepelovité struktuře [30]. Odlišné kmény jednoho subtypu vykazují 90% homologii, zatímco homologie mezi jednotlivými subtypy činí přibližně 50%. Mezi typem viru A a B je pak 30% homologie [31]. V molekule se též nalézá vazebné místo pro vápník [28].



Obrázek 4: A) Model tetrameru neuraminidasy. Znázorněny jsou katalytické domény barevně a transmembránové domény (TMD) jako šedé válce. B) Struktura katalytické domény neuraminidasy v komplexu s kyselinou sialovou v aktivním místě. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL užitím kódu 2BAT z PDB databáze [32].

1.3.1.1. Aktivní místo neuraminidasy

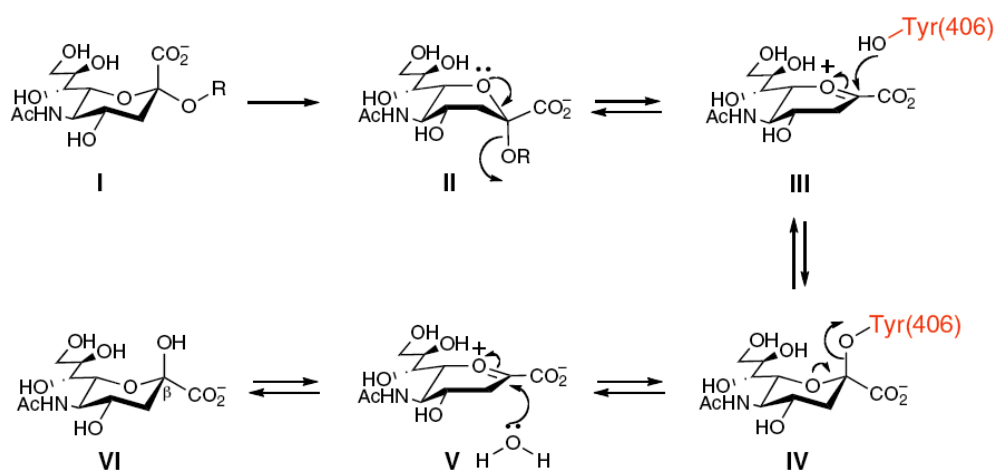
Virová neuraminidasa patří do skupiny enzymů *exo-alfa-sialidas* (EC 3.2.1.18). Tato skupina enzymů katalyzuje hydrolytické štěpení glykosidové vazby mezi terminální sialovou kyselinou a za ní následujícím sacharidem. Existuje mnoho homologních enzymů napříč širokým spektrem organismů [33]. Aktivní místo enzymu se skládá z aminokyselin Arg118, Glu119, Asp151, Arg152, Arg156, Trp178, Ser179, Asp198, Ile222, Arg224, Glu276, Glu277, Arg292, Asp293, Arg371, Tyr406 a Glu425 [30]. Funkční skupiny jsou v přímém kontaktu s kyselinou sialovou díky polárním interakcím, kromě Arg224, jehož alifatická část nepolárně interaguje s glycerolovým fragmentem kyseliny sialové [31]. Osm aminokyselin je pak uspořádáno do jednotlivých částí aktivního místa. Jedna z nich je tvořena svazkem tří argininů 118, 292 a 371. Tyto aminokyseliny interagují s karboxylovou skupinou kyseliny sialové a pravděpodobně napomáhají přechodu do vaničkové konformace. V této části aktivního místa se zároveň nachází tyrosin 406, který zastává kritickou roli v reakčním mechanismu. Na tento úsek navazují tři kyselé aminokyseliny. Asp151 a Glu119, které interagují s hydroxylovými skupinami na uhlících 3 a 4. Dále pak Glu227, tvořící vodíkovou vazbu s molekulou vody, která interaguje s NH skupinou acetoamidové skupiny na C5 uhlíku. Kyslík této acetoamidové skupiny tvoří vodíkovou vazbu s argininem v pozici 152. V poslední části pak Glu276 tvoří nabité vazby s hydroxylovými skupinami uhlíků 8 a 9 glycerolového postranního řetězce [11, 34].



Obrázek 5: Interakce jednotlivých postranních skupin aminokyselin z aktivního místa neuraminidasy s N-acetyl-neuraminovou kyselinou. Převzato a upraveno z [35].

1.3.1.2. Reakční mechanismus

Katalytický mechanismus nebyl dokázán, existují však jednotlivé kroky, které jsou všeobecně akceptovány. Dostane-li se neuraminový zbytek oligosacharidového řetězce do aktivního místa, změní konformaci z židličkové konformace (I) na vaničkovou (II) interakcemi s aminokyselinami, jak bylo popsáno výše. Dochází k tvorbě kationtového intermediátu (III) díky silným iontovým interakcím substrátu s guanidinovými skupinami argininů 118, 292 a 371. Dojde ke štěpení glykosidové vazby mezi koncovou kyselinou sialovou a oligosacharidovým skeletem. Tento skelet odchází z aktivního místa s glykosidickým kyslíkem. Dochází k stabilizaci intermediátu kyselými aminokyselinami aktivního místa. Kyselina sialová je kovalentně vázaná na hydroxylovou skupinu tyrosinu 406 (IV). Dále je hydroxylován C2 uhlík pomocí molekuly vody (V). Produktem této reakce je Neu5Ac (VI), který odchází z aktivního místa [11, 30, 35].



Obrázek 6: Katalytický mechanismus odštěpování kyseliny sialové z oligosacharidového skeletu membránového glykoproteinu. Převzato a upraveno z [11].

1.3.1.3. Porovnání aktivních míst jednotlivých subtypů

Subtypy neuraminidasy lze rozdělit do dvou skupin podle charakteru jejich aktivních míst. Do skupiny 1 se řadí N1, N4, N5 a N8. Do skupiny 2 pak N2, N3, N6, N7, a N9 [27]. Skupina 1 vykazuje dutinu blízko aktivního místa tvořenou aminokyselinami 147-152. Nazývá se také „150 smyčka“. Tato 150 smyčka byla potvrzena pomocí krystalografických studií u subtypu neuraminidasy N1, N4 a N8 v otevřené formě. Jediný případ, kdy je smyčka uzavřená u neuraminidasy z 1. skupiny, je ve struktuře pandemické N1 prasečí neuraminidasy (kmen A/California/04/2009) [27, 36, 37].

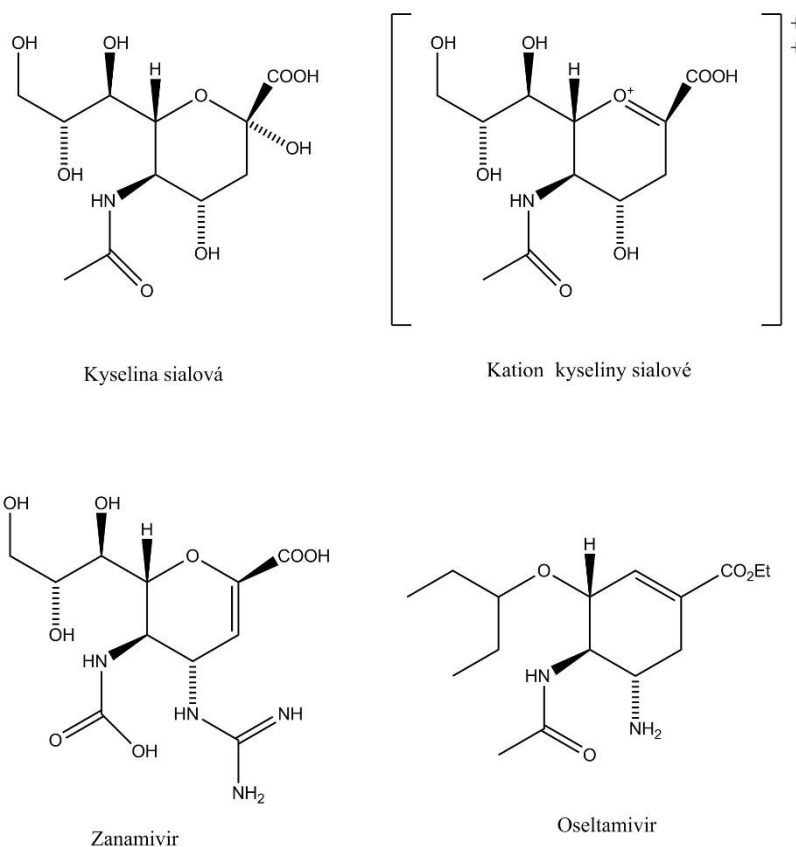
1.3.2. Inhibitory neuraminidasy

Existují pouze dva základní typy antivirotik proti viru chřipky, které byly licencované ve většině částí světa. Inhibitory M2 protonového kanálu a inhibitory neuraminidasy. První z nich byly deriváty adamantanu zaměřené na inhibici M2 kanálu. V šedesátých letech 20. století byl objeven lék adamantin. Později byl v Rusku objeven lék s názvem rimantadin. Tyto léky však byly účinné pouze proti viru chřipky typu A. Léky byly zprvu účinné a hojně se používaly v době pandemie roku 1968. Virus si však velice rychle vytvořil resistenci a v dnešní době většina cirkulujících kmenů chřipky již je resistantních proti těmto typům léků. Díky tomuto faktu ve světě vznikla snaha vyvinout léky proti novým cílům, které by nevedly k tak rychlému vývoji resistance a fungovaly by proti většímu spektru jednotlivých typů viru chřipky. Objev funkce a mechanismu neuraminidasy vedl k nasměrování vědeckých bádání, ve snaze objevu nových léčiv proti chřipce tímto směrem. Neuraminidasa je dodnes hlavním cílem, proti kterému se vyvíjejí nová léčiva [11, 35].

1.3.2.1. Zanamivir a oseltamivir

V době vývoje zanamiviru stále ještě nebyly dostatečně přesné krystalografické údaje popisující strukturu neuraminidasy. To bylo omezením pro stukturně-založenou studii léčiv. Vývoj se tedy soustředil na výzkum látek napodobujících přirozený substrát neuraminidasy. Zkoumaly se tedy deriváty kyseliny sialové (α -Neu5Ac). První slibný derivát 2-deoxy- α -Neu5Ac vykazoval slabý efekt ve zvířecích modelech. Postupem času se zdokonalovaly techniky zlepšující rozlišení krystalografických struktur, které odhalily konzervované aminokyseliny v aktivním centru enzymu. Díky těmto objevům bylo možné navrhnout model látky, která by mohla být lepším inhibitorem. Bylo zjištěno, že

přidání větší bazické skupiny na základní skelet kyseliny sialové by mohlo vést k vzniku látky s vysokou afinitou k enzymu. Zároveň byla potvrzená zlepšená aktivita látky s dvojnou vazbou v šestičleném cyklu molekuly. Byly tedy nasyntetizované dvě molekuly 4-amino-4-deoxy-Neu5Ac2en a 4-deoxy-4-guanidino-Neu5Ac2en. U obou látek byly zjištěny konstanty K_i a sice pro 4-amino-4-deoxy-Neu5Ac2en $K_i=4 \times 10^{-8}$ M a pro 4-deoxy-4-guanidino-Neu5Ac2en $K_i=2 \times 10^{-10}$ M. Molekula 4-deoxy-4-guanidino-Neu5Ac2en byla vybrána jako kandidát pro vývoj léku firmou GlaxoSmithKline pod názvem zanamivir. Látka vykazovala vysokou polaritu a rychlou exkreci z organismu. Lék byl tedy cíleně vyvinut pro použití v podobě inhalačního podání pod názvem Relenza a byl roku 1999 schválen úřadem FDA jako první lék proti chřipce cílený na inhibici neuraminidasy [35, 38].



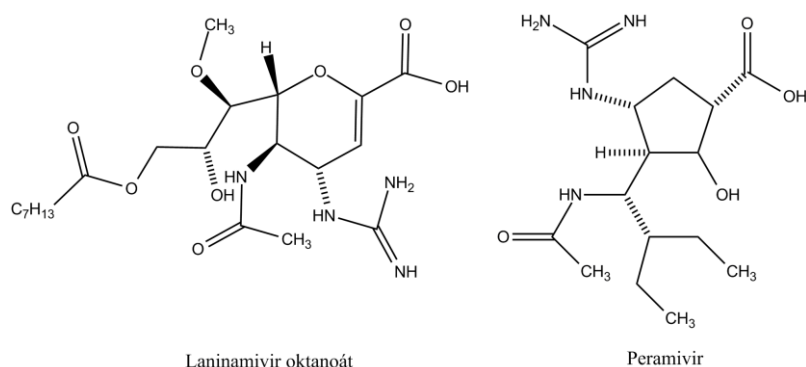
Obrázek 7: Strukturní vzorce kyseliny sialové, jejího intermediátu kationtu kyseliny sialové, zanamiviru a oseltamiviru. Vzorce byly vytvořeny v programu ChemDraw.

Objev zanamiviru znamenal posun k širšímu bádání po nových inhibitorech neuraminidasy. Zdokonalené analýzy sledující vztah mezi aktivitou a strukturou vedly k výzkumu látek necukernatých templátů jako jsou například cyklohexany. Takto byl

objeven nový inhibitor oseltamivir. Základní tělo molekuly bylo navrženo tak, aby se blíže podobalo intermediátu enzymové reakce neuraminidasy s kyselinou sialovou, sialovému kationtu. Dále byla nahrazena glycerolová skupina kyseliny sialové lipofilní skupinou, která měla lépe interagovat s nepolárními strukturními aminokyselinami v aktivním centru enzymu. Na hexanový skelet byl tedy přidán 3-pentyl etherový postranní řetězec. Látka však byla příliš lipofilní pro vývoj léku pro orální použití. Lék byl tedy vyvinut v proaktivní formě. Tato forma nesla název oseltamivir. Lék byl vyvinut americkou firmou Gilead a přiveden na trh firmou Roche roku 1999 pod obchodním názvem Tamiflu [35].

1.3.2.2. Laninamivir a peramivir

Oseltamivir je stále nejrozšířenějším lékem proti chřipce na světě. Nicméně studie ukázaly, že léky jako zanamivir, které se více podobají přirozenému substrátu neuraminidasy kyselině sialové, méně podléhají vzniku resistencí. Zanamivir však musí být dávkován dvakrát denně po dobu pěti dní pro maximální efekt. Vznikala tedy snaha o vývoj léku s dlouhou účinností, který by dobře fungoval proti kmenům resistantním vůči oseltamiviru. Laninamivir se liší od zanamiviru přítomností 7-methoxy skupiny na glycerolovém zbytku. Samotný lék je pak opět proaktivní formou, tzv. laninamivir oktanoát. Laninamivir oktanoát i samotný laninamivir pak díky 7-methoxy skupině vykazují zvýšenou účinnost zadržení v plicích a jsou schopny efektivně fungovat po požití jedné dávky. Laninamivir je velmi slibným novým inhibitorem neuraminidasy, který vykazuje účinnost proti kmenům resistantním vůči oseltamiviru. Tento lék je však přístupný pouze na trhu v Japonsku pod názvem Inavir [39, 40].

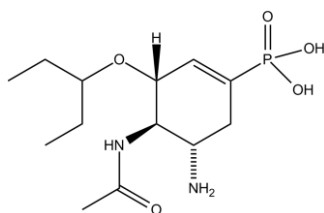


Obrázek 8: Strukturální vzorce laninamiviru oktanoátu a peramiviru. Vzorce byly vytvořeny v programu ChemDraw.

Peramivir byl vyvinut ve snaze po hledání nového inhibitoru strukturně odlišného od kyseliny sialové a s orální dostupností [41]. Byla však zjištěna nízká biologická dostupnost touto cestou [42]. Peramivir se liší od ostatních inhibitorů NA tím, že má dva aktivní substituenty, které tvoří vícečetné interakce s aktivním místem enzymu a může být aktivní proti některým kmenům resistantním vůči ostatním inhibitorům NA [41]. Rapivab je prvním lékem schváleným k intravenóznímu užití. Je určen pro akutní případy chřipky u lidí starších 18 let [43].

1.3.2.3. Tamifosfor

S příchodem resistantních kmenů viru chřipky v posledních letech, je stále velkou prioritou hledat nové látky, které by proti nim byly účinné. Kyselina fosforečná má kyselější charakter v porovnání s karboxylovou kyselinou. Tento kyselý zbytek vykazuje v třírozměrné struktuře vazbu s třemi guanidinovými skupinami argininů v aktivním místě neuraminidasy. Dokovací studie a teoretické výpočty ukázaly tvorbu osmi vodíkových vazeb s těmito arginininy, což je o dvě vodíkové vazby více než v komplexu oseltamiviru karboxylátu a neuraminidasy [44].



Tamifosfor

Obrázek 9: Strukturální vzorec tamifosforu. Vzorec byl vytvořen v programu ChemDraw.

1.3.3. Vývoj resistance proti inhibitorům neuraminidasy

Dříve se předpokládalo, že resistance vznikající na inhibitory NA nebudou významným problémem, zejména z důvodu, že neuraminidasa je klíčovým enzymem ve virové replikaci. Dřívější varianty viru resistantní na oseltamivir zároveň vykazovaly slabý přenos mezi hostiteli a virus se celkově jevil oslabeně [45]. Mezi roky 2007 až 2009 se však objevila převládající varianta viru resistantní na oseltamivir (H1N1) virus (A/Brisbane/59/2007, clade 2B), což bylo překvapením [46]. Později se objevila varianta viru resistantní na oseltamivir, která obsahoval mutaci v pozici H275Y (dle N1 číslování, H274Y dle N2 číslování, dále je v textu používáno N1 číslování). Tato mutace se od té doby stala nejčastěji vyskytující. Studie ukázaly, že si kmen s touto funkční mutací

zachovává virulenci i schopnost přenosu díky sekundárním mutacím, jako například R222Q, které pomáhají zachovat funkční schopnost enzymu. Tyto sekundární mutace se mohou lišit. Napomáhající mutace se zároveň mohou vyskytovat i v molekule hemagglutininu, především v místě vazby receptoru [47-49]. Jednotlivé mutace jsou typicky specifické pro jednotlivé typy/subtypy neuraminidasy. Mutace H275Y například nezpůsobuje resistenci vůči oseltamiviru v N2 subtypech viru [50]. Virus chřipky typu B nejeví tak častý vznik resistencí vůči inhibitorům neuraminidasy jako typ A [51]. Mezi další často detekované mutace patří záměny aminokyselin v pozicích E119V a R293K u N2 subtypu [52].

1.3.3.1. Vznik resistencí

Mezi hlavní faktory ovlivňující vznik resistencí na inhibitory NA patří profylaxe (především s nižšími dávkami inhibitorů) po expozici virem. Resistence pak také často vznikají u pacientů s oslabeným imunitním systémem. Jedna z hlavních příčin je prodlužovaná doba medikace inhibitory [47]. Během první vlny pandemie v roce 2009 bylo nahlášeno až 30% případů s resistencí proti oseltamiviru u pacientů s narušeným imunitním systémem. Imunosuprese je tedy hlavním faktorem u vzniku resistantních kmenů [53]. Od začátku pandemie v roce 2009 bylo nahlášeno více jak 80% virů H1N1 pandemické chřipky resistantní na oseltamivir u pacientů, kteří byli léčeni v předchozí době nebo byli právě léčeni oseltamivirem [54].

1.3.3.2. Mutace S247N

V roce 1997 byl objeven vysoce patogenní ptačí virus chřipky H5N1, který se rozšířil do více jak 60 států světa a způsobil ztráty miliónů kusů drůbeže. Tento vir se pak lokálně vyvinul v nové varianty viru. Mezi lety 2006 až 2008 byla vedena studie zjišťující pandemický potenciál H5N1 viru chřipky izolovaného z drůbeže při její nákaze v Laoské lidově demokratické republice. Mezi jednotlivými získanými izoláty se objevily viry, které jevíly sníženou citlivost vůči oseltamiviru. Bylo zjištěno několik různých mutací napříč jednotlivými izolovanými viry. Ve dvou izolátech (A/chicken/Laos/13/08) byla nalezena dosud nepopsaná mutace serinu v pozici 247 za asparagin. Tato mutace vykazovala 24krát zhoršenou citlivost vůči oseltamiviru [55-57]. Nebyl však pozorován vyšší přenos viru na lidského hostitele.

Na konci roku 2010 byly v Austrálii a v Singapuru izolovány viry pandemické chřipky A (H1N1) 2009, které obsahovaly mutaci S247N. Na jaře roku 2011 pak byl

tento vir detekován u pacienta s oslabeným imunitním systémem. Tento pacient byl léčen oseltamivirem a po pěti dnech léčby byl v pacientovi detekován virus, který obsahoval dvě mutace neuraminidasy, a sice H275Y v kombinaci s S247N. Tento dvojitý mutant vykazoval hodnotu IC₅₀ 6000krát vyšší v porovnání s virem bez mutací. Strukturální analýzy naznačují, že mutace S247N může měnit vodíkové vazby kyseliny glutamové v pozici 277 u neuraminidasy. V kombinaci s H275Y mutací by mohla být E277 zatlačena do kapsy, kde se váže hydrofobní skupina oseltamiviru, což by vysvětlovalo sníženou citlivost vůči tomuto inhibitoru. Data získaná při studii zároveň ukazují, že virus s S247N mutací nevykazuje sníženou přenosnost ani aktivitu viru. Panuje obava možnosti rozšíření této mutace do světa. Tato mutace by totiž mohla v kombinaci s jinými mutacemi, jako například v pozici I223 způsobit vysoce zvýšené oslabení citlivosti inhibitorů neuraminidasy [58].

Jak bylo zmíněno, dvojitý mutant H275Y+S247N pandemické chřipky z roku 2009 jeví vysokou resistenci vůči oseltamiviru. Studie přenosu viru na morčatech však ukázaly o 50 % sníženou přenosnost tohoto dvojitého mutantu v porovnání s virem bez mutací. Zároveň virus pouze s jednou mutací S247N i H275Y vykazoval sníženou přenosnost na 88 % v porovnání s virem bez mutací. Byl testován i kmen, který se také podařilo izolovat v Austrálii obsahující tři dodatečné sekundární mutace V106I, N248D a S299A. Kmen viru obsahující mutace V106I, N248D, S299A a S247N vykazoval efektivní přenosnost mezi morčaty, a to i v kombinaci s mutací H275N. Tyto tři sekundární mutace mohou potenciálně změnit strukturu neuraminidasy a tím zlepšit životaschopnost viru [59, 60].

V letech 2009, 2011 a 2012 byly analyzovány varianty pandemického viru chřipky v Brazílii a bylo nalezeno přibližně deset variant obsahujících S247N nebo H275Y mutaci. Některé byly detekovány před užitím oseltamiviru pro léčbu nákazy, což by naznačovalo možnou efektivní přenosnost viru mezi lidmi [61].

Dodnes nebyla publikována struktura neuraminidasy s mutací S247N. Tato struktura by umožnila dále studovat vliv této mutace na citlivost vůči oseltamiviru. Zároveň by pomohla při hledání nových inhibitorů neuraminidasy zaměřených na resistantní varianty viru.

2. Cíle práce

- Purifikace rekombinantní neuraminidasy subtypu H1N1 nesoucí mutaci S247N
- Kinetická charakterizace neuraminidasy
- Kinetická charakterizace vazby inhibitorů oseltamivir karboxylátu a tamifosforu do aktivního místa neuraminidasy s mutací S247N
- Thermodynamická charakterizace vzniku komplexu neuraminidasy s mutací S247N a inhibitoru oseltamivir karboxylátu
- Příprava krystalů komplexu inhibitoru oseltamivir karboxylátu a neuraminidasy s mutací S247N pro strukturní analýzu pomocí rentgenové krystalografie

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

- Strep-Tactin Sepharosa, 50% suspenze, IBA (Německo)
- Filtrační jednotka Sterivex GP 0.22 μm , Millipore (USA)
- Nitrocelulosoová membrána
- SuperSignal West Femto souprava, ThermoFisher Scientific (USA)
- Dialyzační membrána Spectrapore (8000 MWCO), Spectrum laboratories (USA)
- BCA Protein assay souprava, ThermoFisher Scientific (USA)
- Dialyzační mikrozkušavky (7000 MWCO), ThermoFisher Scientific (USA)
- Nunc černá 96 jamková černá mikrotitrační destička, ThermoFisher Scientific (USA)
- Nunc černá 96 jamková transparentní mikrotitrační destička, ThermoFisher Scientific (USA)
- Centrifugační filtry na 10000 Da (4 ml), Millipore (USA)
- Centrifugační filtry na 10000 Da (500 μl), Millipore (USA)
- Thrombin CleanCleave souprava, Sigma-Aldrich (USA)
- Krystalizační miska EasyXtal 15 jamková, QIAGEN (Nizozemsko)
- Polypropylenová kolonka na 5 ml, ThermoFisher Scientific (USA)
- All blue standard molekulových hmotností, Bio-Rad (USA)

3.2. Chemikálie

- IBA (USA)
BioLock
- Lach-Ner (Česká republika)
hydrogenfosforečnan sodný, dusičnan stříbrný
- Lachema (Česká republika)
chlorid draselný, dihydrogenfosforečnan draselný
- Sigma-Aldrich (USA)

D-desthiobiotin, HABA, SDS, TEMED, APS, 2-merkaptoethanol, N, N' - methylen bisakrylamid, thiosíran sodný, chlorid vápenatý, myší monoklonální ANTI-FLAG M2-HRP protilátka, bromfenolová modř, HEPES, akrylamid, MES, dimethyl sulfoxid, PEG 8000, 4-MUNANA, BSA, glycin

- Penta (Česká republika)
glycerol, methanol, formaldehyd, kyselina octová, uhličitan sodný, chlorid sodný
- Promega (USA)
Tris
- SDT (Německo)
kaseinový pufr 20× koncentrát
- ThermoFisher Scientific (USA)
Decon 90
- USB (USA)
Tween 20

3.3. Přístroje

- Centrifuga 5415R, Eppendorf (Germany)
- Centrifuga Allegra X-15R, Beckman Coulter (USA)
- Suchá míchací lázeň ThermoCell MiXingBlock, BIOER (Čína)
- Vertikální polyakrylamidová gelová elektroforéza, Bio-Rad (USA)
- Mini Trans-Blot cela, Bio-Rad (USA)
- CCD kamera ChemiDoc-It 600, UVP (Spojené království)
- Válečkový rotátor SRT6D, Stuart (UK)
- Inkubátor IPP 400, Memmert (USA)
- Čtečka Infinite M1000 PRO, Tecan (Švýcarsko)
- MicroCal VP – ITC mikrokolorimetr, Malvern (USA)
- MicroCal ThermoVac Odvzdušňovač vzorků, Malvern (USA)
- Mikroskop Olympus SZX10, Olympus corporation (Japonsko)
- Fotoaparát Olympus E-620, Olympus corporation (Japonsko)
- pH metr model pH 50, XS Instruments (Itálie)
- Zdroj napětí EPS 301, GE Healthcare (USA)

3.4. Purifikace proteinu

- Promývací pufr: 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl
- Eluční pufr: 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM D-desthiobiotin
- Regenerační pufr: 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM HABA

Byly rozmrazeny dva díly po 250 ml buněčného média po produkci rekombinantního neuraminidasy s mutací S247N v S2 buňkách *Drosophila*, připraveného Ing. Janou Stárkovou (ÚOCHB AV ČR v.v.i.) Protein zároveň obsahoval na N-konci kotvu “Twin-Strep-tag“ pro purifikační a detekční účely a štěpné místo pro thrombin. K jednomu dílu bylo přidáno 0,7 ml roztoku BioLock obsahujícího avidin, který vyvazuje biotin přítomný v médiu, který by mohl interferovat s nosičem. Médium bylo následně filtrováno pomocí filtrační jednotky Sterivex GP 0.22 µm (Millipore). Pro purifikaci byly použity čtyři plastové kolonky, každá obsahující 1 ml sepharosy „Strep-Tactin“. Kolonka byla ekvilibrována 8 ml promývacího pufru. Následně bylo na kolonky ekvivalentně aplikováno buněčné médium a byla jímána proteklá frakce. Posléze bylo na každou kolonku aplikováno 10 ml promývacího pufru a byla jímána promývací frakce. Kolonky byly poté uzavřeny, aby nedocházelo k průtoku a bylo přidáno 4 ml elučního pufru. Takto byly kolonky uzavřeny po dobu 30 minut pro vyvázání zachyceného proteinu. Následně byla jímána 1. eluční frakce. Na kolonku bylo přidáno 4 ml promývacího pufru a byla jímána 2. eluční frakce. Nakonec bylo na kolonku opět přidáno 4 ml promývacího pufru a byla jímána 3. eluční frakce. Kolonka byla regenerována promytím přibližně 20 ml regeneračního pufru a byla pozorována barevná změna nosiče z bílé na sytě červenou barvu, což signalizovalo vyvázání D-desthiobiotinu z sepharosy. Nosič byl dále promýván promývacím pufrem (přibližně 24 ml) do úplného odbarvení nosiče. Zhodnocení úspěšnosti purifikace bylo analyzováno pomocí experimentu SDS elektroforézy a pomocí imunodetekce.

3.5. SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

- Vzorkový pufr (6 × koncentrát): 350mM Tris/HCl, pH 6.8, 30 % (v/v) glycerol, 350 mM SDS, 4 % (v/v) 2 mM 2-merkptoethanol, 180 μM bromfenolová modř
- Elektrodový pufr (5 × koncentrát): 140 mM Tris/HCl, pH 8.8, 1.4 M glycin, 20 mM SDS
- 14% rozlišovací gel: 375 mM Tris/HCl, pH 8.8, 14 % akrylamid, 0.1 % (w/v) SDS, 0.2 % (v/v) TEMED, 0.1 % (w/v) APS
- 6 % zaostřovací gel: 250 mM Tris/HCl, pH 6.8, 6.6 % akrylamid, 0.1 % (w/v) SDS, 0.2 % (v/v) TEMED, 0.1 % (w/v) APS

Pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu byl sledován průběh purifikace proteinu a průběh štěpení kotvy „Twin-Strep tag“. Ke 100 μl odebraných vzorků bylo přidáno 20 μl (6×koncentrovaného) vzorkového pufru. Vzorky byly následně inkubovány po dobu 10 minut v suché míchací lázni při 96 °C pro denuraci proteinů. Elektroforéza byla provedena ve vertikálním uspořádání použitím aparatury (Bio-Rad). Napětí zdroje bylo nastaveno na 140 V a elektroforéza probíhala 90 minut. Proteiny v gelu byly vizualizovány pomocí barvení stříbrem:

1. Fixace (30 minut): 12 % (v/v) kys. octová, 50 % (v/v) methanol, 0.02 % (v/v) formaldehyd
2. Promytí (3 × 15 minut): 50 % (v/v) methanol
3. Redukce (1 minuta): 0.02 % (w/v) thiosíran sodný
4. Promytí (3 × 20 sekund): deionizovaná voda
5. Impregnace (20 minut): 0.2 % (w/v) dusičnan stříbrný, 0.02 % (v/v) formaldehyd
6. Promytí (3 × 20 sekund): deionizovaná voda
7. Vyvolání (10 sekund – 5 minut): 566 mM uhličitan sodný, 16 μM thiosíran sodný, 0.02 % (v/v) formaldehyd
8. Promytí (3 × 20 sekund): deionizovaná voda
9. Zastavení vyvolávání (10 minut): 12 % (v/v) kyselina octová, 50 % (v/v) methanol

3.6. Elektropřenos a imunodetekce

- Přenosový pufr: 192 mM glycin, 25 mM Tris/HCl, 10 % (v/v) methanol
- PBS pufr: 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl
- PBS/Tween pufr: 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05 % Tween

Gel po SDS elektroforéze byl promyt v přenosovém pufru. Nitrocelulosová membrána byla také ekvilibrována po dobu 3 minut v přenosovém pufru. Gel byl následně převrstven membránou a dvěma namočenými silnými filtračními papíry a zasazen do cely Mini Trans-Blot (Bio-Rad). Proteiny byly přeneseny na membránu za konstantního napětí 100 V po dobu 60 minut v aparatuře od firmy Bio-Rad. Po přenosu proteinů na membránu byla membrána následně blokována v 10 ml roztoku kaseinu v PBS pufru. K membráně bylo poté přidáno 6 µl myší monoklonální ANTI-FLAG M2-HRP protilátky na výslednou koncentraci 0.6 µg/ml. Membrána byla inkubována v přítomnosti protilátky přes noc ve 4 °C. Membrána byla následující den 3×15 minut promyta pufrům PBS/Tween, poté opatrně osušena mezi filtračními papíry a vložena do plastové fólie, kde byla vyvolána pomocí soupravy SuperSignal West Femto (Thermo Scientific). Chemiluminescenční signál byl detekován pomocí CCD kamery ChemiDoc-It 600 (UVP).

3.7. Proteolytické odštěpení proteinové kotvy

- Pufr T: 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂
- Promývací pufr: 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl

Po purifikaci proteinu přes nosič „Strep-Tactin“ bylo nutné odštěpit sekvenci specifické kotvy na N-koncové části proteinu. Bylo spojeno 5 prvních elučních frakcí z předešlých purifikací o celkovém objemu přibližně 80 ml. Roztok byl aplikován do dialyzační membrány propouštějící látky o molekulové hmotnosti nižší než 8 kDa. Roztok proteinu byl dialyzován proti 2 l pufru T přes noc při 4 °C. Ráno byl pufr vyměněn za 2 litry nového pufru T a roztok byl dialyzován další 4 hodiny. Následně byl roztok rozdělen do dvou kónických zkumavek. Do každé zkumavky bylo přidáno 100 µl thrombin agarosy ze soupravy Thrombin CleanCleave (Sigma-Aldrich). Zkumavky byly

ponechány na válečkovém rotátoru přes noc při laboratorní teplotě. Roztok suspenze byl ráno odstředěn po dobu 15 minut při teplotě 25 °C při otáčkách 3724×g. Následně byl opatrně odebrán supernatant, který byl dále aplikován na plastovou kolonku s ekvilibrovanou „Strep-tactin“ sepharosou dle postupu v kapitole 3.4 pro zachycení kotvy. Byla jímána proteklá frakce neuraminidasy. Kolonka byla regenerována dle postupu v kapitole 3.4. Během celého procesu byly odebírány vzorky na SDS elektroforézu v polyakrylamidovém gelu, pro pokus imunodetekce a pro zjištění finální koncentrace proteinu.

3.8. Stanovení koncentrace proteinu

50 µl všech odebíraných vzorků během purifikačních a štěpících kroků bylo dialyzováno v mikrozkuvkách s dialyzační membránou proti 1 l dialyzačního pufru (10 mM HEPES, pH 7.5) při 4 °C přes noc. 25 µl vzorků bylo pipetováno na transparentní 96 jamkovou destičku. Dále byly na destičku pipetovány roztoky o známé koncentraci BSA (0.0125 mg.ml⁻¹, 0.025 mg.ml⁻¹, 0.05 mg.ml⁻¹, 0.1 mg.ml⁻¹, 0.2 mg.ml⁻¹)

Pro stanovení koncentrace proteinu byla použita souprava „BCA Protein Assay“ (Thermo Scientific)“. Byly smíchány reagenty A a B v poměru 50:1. Následně bylo do každé jamky se vzorkem přidáno 200 µl tohoto roztoku a vzorky byly důkladně promíchány pomocí automatické pipety. Destička se vzorky byla poté inkubována po dobu 30 minut při 37 °C. Následně byla změřena absorbance při 562 nm na čtečce Infinite M1000 PRO (Tecan). Koncentrace proteinů byla stanovena dle kalibrační křivky sestavené pomocí kalibračních roztoků BSA.

3.9. Krystalizace proteinu

Protein byl krystalizován v přítomnosti oseltamivir karboxylátu metodou visící kapky. Purifikovaný protein neuraminidasy byl zakoncentrován pomocí centrifugačního filtru s póry zachycujícími částice větší než 10 kDA při 10 °C za odstředivého zrychlení 9300×g na objem 44 µl o výsledné koncentraci proteinu 8 mg.ml⁻¹. Následně byl roztok proteinu promyt 1 ml krystalizačního pufru (5 mM Tris/HCl, pH 8.0) a znovu zakoncentrován na 44 µl. Dále byl roztok proteinu promyt 500 µl 0.5 mM roztoku oseltamivir karboxylátu a znovu zakoncentrován na 44 µl. Pro krystalizaci bylo do každé jamky 15-ti jamkové krystalizační destičky pipetováno 0.5 ml roztoku krystalizační podmínky. Na vnitřní straně víčka destičky byl připraven roztok smícháním 1 µl roztoku

proteinu a 1 μ l roztoku krystalizační podmínky. Krystalizační podmínka byla optimalizována použitím podmínky, ve které krystalizoval divoký typ neuraminidasy v komplexu s tamifosforem [62]. Víčka byla pevně uzavřena a destička byla ponechána při 18 ° C. Jednotlivé kapky byly často kontrolovány pod mikroskopem pro analýzu krystalizačních podmínek.

3.10. Kinetická charakterizace

3.10.1. Stanovení Michaelisovy konstanty

Kinetická charakterizace byla provedena pomocí fluorometrické analýzy využívající syntetický substrát MUNANA (2'-(4-methylumbelliferyl)-D-N-acetylneuraminová kyselina), mimikující přirozený substrát neuraminidasy. V mikrozkuvkách bylo smícháno 5 μ l roztoku proteinu (koncentrace 1.587 μ M stanovená pomocí HPLC aminokyselinové analýzy Radko Součkem – ÚOCHB AV ČR v.v.i.) společně s 20 μ l 2 \times koncentrovaným MES pufrem (100 mM MES, pH 6.15, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂) a odlišným objemem deionizované vody pro výsledný objem reakční směsi 40 μ l. Samotná reakce byla zahájena přidáním 14 mM substrátu MUNANA (výsledné koncentrace substrátu v rozmezí 0.1 mM - 2.8 mM). Reakční směsi byly inkubovány při 37 ° C v suché lázni a míchány při 900 otáčkách za minutu po dobu 20 minut. Po této době byla reakce zastavena přidáním 40 μ l roztoku 1 M Na₂CO₃. Pro odečtení vlivu fluorescence samotného substrátu a pro kvantifikaci fluorescence produktu byly provedeny kalibrační stanovení pro směsi obdobné předešlým bez přítomnosti enzymu o odlišných koncentracích substrátu a produktu enzymatického štěpení. Jednotlivé reakční směsi byly po zastavení reakce pipetovány do tmavé destičky o 96 jamkách. Bylo změřeno emisní záření při 450 nm po excitaci zářením o vlnové délce 365 nm na čtečce Infinite M1000 PRO (Tecan). Měření bylo vyhodnoceno pomocí výnosu dle Lineweara-Burka a statistické zpracování provedl Dr. Pavel Pokorný na VŠCHT.

3.10.2. Stanovení inhibičních konstant

Průběh stanovení inhibičních konstant byl obdobný postupu stanovení Michaelisovy konstanty. Reakční směs se skládala z 20 μl 2 \times koncentrovaného MES pufru, 5 μl deionizované vody, 4 μl roztoku proteinu (koncentrace 1.587 μM) a 1 μl roztoku inhibitoru o rozdílných koncentracích (v rozmezí 1 μM - 150 μM). Reakce byla zahájena přidáním 10 μl 2 mM MUNANA substrátu. Ostatní parametry měření byly shodné s postupem při stanovení Michaelisovy konstanty. Výsledky měření byly vyhodnoceny pomocí Dixonova výnosu. Měření byly provedeny v duplikátech.

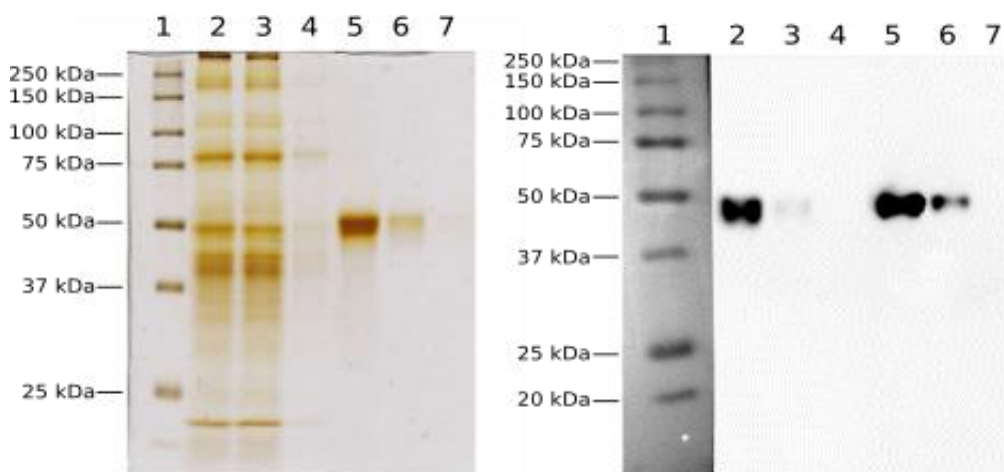
3.11. Isothermální titrační kalorimetrie

Roztok purifikovaného proteinu byl dialyzován v dialyzační trubici proti 1 l pufru ITC (50 mM MES, pH 6.15, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂) přes noc při teplotě 4 °C. Poté byl roztok proteinu zahušťován v kónické zkumavce s filtrem propouštějícím částice o molekulové hmotnosti nižší než 10 kDa na požadovanou koncentraci odstředěním při otáčkách 3724 \times g při 20 °C. Zároveň byl připraven roztok inhibitoru o koncentraci 13.2 \times vyšší než finálně zahuštěný roztok proteinu. Přesná koncentrace proteinu byla stanovena HPLC aminokyselinovou analýzou Radko Součkem (ÚOCHB AV ČR v.v.i.) a přesná koncentrace inhibitoru elementární analýzou, Stanislavou Matějkovou (ÚOCHB AV ČR v.v.i.) Finální roztok proteinu i inhibitoru byly následně odvzdušněny. Titrační cela a byreta byly promyty roztokem detergentu, deionizovanou vodou a pufrem pro ITC. Do cely o objemu 1.43 ml byl následně byretou postupně přidáván roztok inhibitoru injekcemi o objemu 9 μl . Celkem bylo do cely přidáno 30 injekcí v intervalech 240 s mezi jednotlivými injekcemi pro ustálení základní linie. Měření bylo provedeno za teploty 25 °C. Dále bylo provedeno měření, kdy byl za stejných podmínek titrován roztok inhibitoru do pufru bez proteinu pro stanovení rozpouštěcího tepla inhibitoru. Výsledek měření byl analyzován v programu Origin se speciálním softwarem od firmy MicroCal.

4. Výsledky

4.1. Purifikace proteinu

Globulární katalytická doména neuraminidasy kmenu A/California/7/2009 (H1N1) nesoucí mutaci S247N a obsahující „Twin-Strep-Tag“ kotvu na N-konci, byla rekombinantně exprimována v S2 buňkách *Drosophila* Ing. Janou Starkovou (ÚOCHB AV ČR v.v.i.). Protein byl purifikován z 1 l buněčného média pomocí sepharosového nosiče specifického pro kotvu „Strep-Tag“. Purifikace byla rozdělena na díly po 250 ml média. Poté byly spojeny dvě proteklé frakce, které byly znovu nanášeny na nosič. Průběh purifikace byl sledován pomocí SDS elektroforézy a imunodetekce.



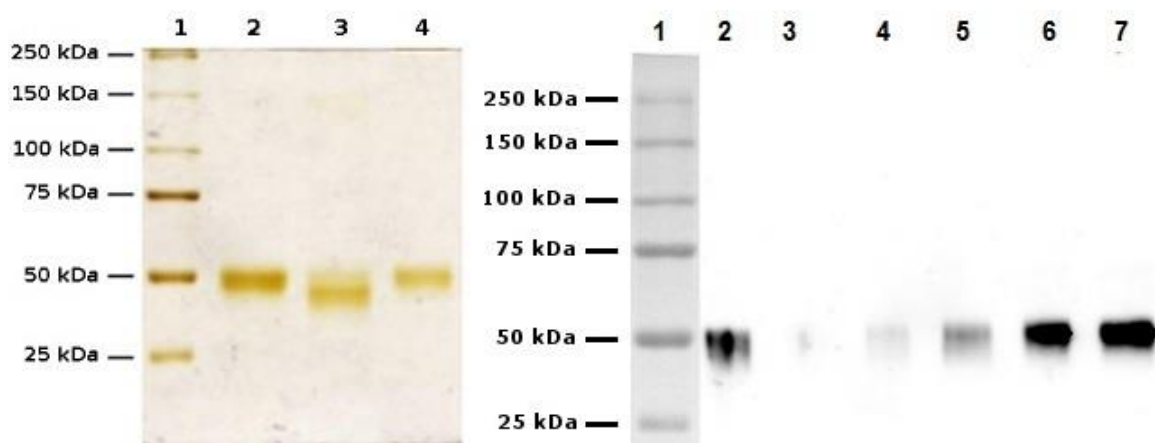
Obrázek 10: Průběh purifikace S247N mutantu neuraminidasy. Jednotlivé purifikované frakce detekované SDS Elektroforézou (vlevo) a pomocí imunodetekce (vpravo). SDS elektroforéza: dráha 1: 0,6 μ l All blue standard molekulových hmotností, dráha 2: 7 μ l buněčné médium, dráha 3: 7 μ l proteklá frakce, dráha 4: 7 μ l promývací frakce, dráha 5: 7 μ l 1. eluční frakce, dráha 6: 7 μ l 2. eluční frakce, dráha 7: 7 μ l 3. eluční frakce. Imunodetekce: Jednotlivé dráhy odpovídají stejným vzorkům jako u SDS elektroforézy s následujícími nanáškami: dráha 1: 2 μ l, 2: 1 μ l, 3: 1 μ l, 4: 0.2 μ l, 5: 3 μ l (20 \times ředění), 6: 3 μ l (5 \times ředění), 7: 3 μ l (5 \times ředění).

Tabulka 1: Tabulka zaznamenávající průběh purifikace S247N mutantu neuraminidasy. V záhlaví tabulky: V objem, c koncentrace proteinu, a aktivita enzymu, a_s specifická aktivita enzymu, P purifikační koeficient.

Frakce	V [ml]	c [mg.ml ⁻¹]	a [Δ RFU $\times 10^5$]	a_s [Δ RFU $\times 10^5$.mg ⁻¹]	P
Buněčné médium	250	1.03	7000	27	1
Proteklá frakce	250	0.99	670	2.7	0.1
Promývací frakce	40	0.12	0	0.0	0
1. eluční frakce	16	0.13	810	400	15
2. eluční frakce	16	0.05	220	280	10
3. eluční frakce	16	0.01	0	0	0

4.2. Štěpení afinitní kotvy neuraminidasy

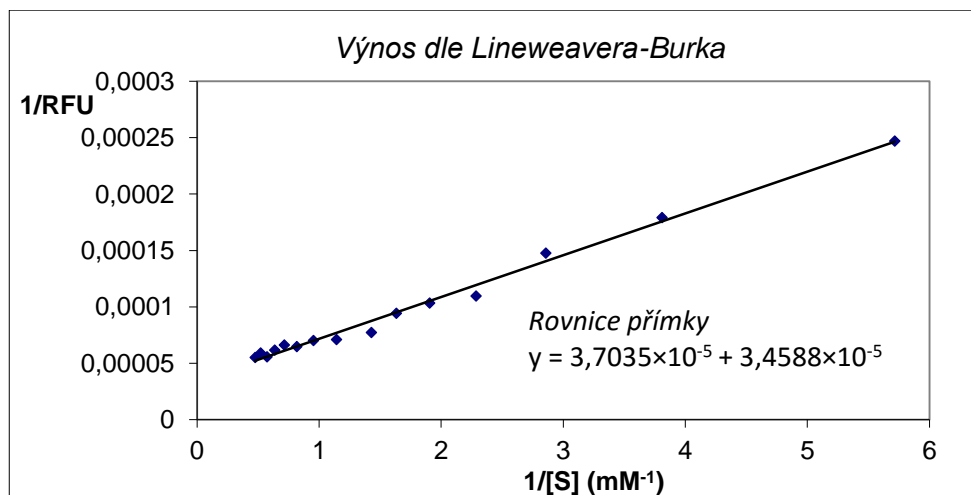
Z proteinu byla v dalším kroku odštěpena afinitní kotva na N-konci neuraminidasy („Twin-Strep-Tag“), která sloužila pro purifikační účely. Z důvodu možného ovlivnění charakterizace proteinu byla tato kotva odštěpena pomocí thrombinu, pro který bylo na konci sekvence kotvy předem vneseno štěpné místo. Po dokončení štěpení byla tato kotva odstraněna pomocí specifického sepharosového nosiče („Strep-Tactin“). Kotva se na rozdíl od neuraminidasy navázala na nosič, a došlo tak k jejich vzájemnému oddělení. Výsledkem byl čistý protein. Na obrázku 11 na následující straně je z pokusu SDS elektroforézy v dráze 3 patrné posunutí proužku oproti dráze 2 což ukazuje odštěpení „Twin-Strep-Tag“ kotvy. Po imonodetekci lze pozorovat v dráze 2 proužek značící navázání Anti-FLAG M2-HRP protilátky na „Twin-Strep-Tag“ kotvu obsahující „FLAG“ sekvenci. V dráze 3 není detekovatelný proužek, což potvrzuje odštěpení „Twin-Strep-Tag“ kotvy z neuraminidasy.



Obrázek 11: Průběh odštěpení kotvy neuraminidasy thrombinem. Na obrázku jsou zobrazeny jednotlivé frakce detekované SDS elektroforézou (vlevo) a imunodetekcí (vpravo) během štěpícího procesu. SDS elektroforéza: dráha 1: 0,8 μ l All blue standard molekulových hmotností, dráha 2: 7 μ l spojené eluční frakce před štěpením, dráha 3: 7 μ l frakce finálního proteinu po štěpení thrombinem, dráha 4: 3 μ l divokého kmenu neuraminidasy obsahujícího „Twin-Strep-Tag“ kotvu. Na gelu je v dráze 3 patrné posunutí proužku oproti dráze 2 což ukazuje odštěpení „Twin-Strep-Tag“ kotvy. Imunodetekce: dráha 1: 2 μ l All blue standard molekulových hmotností, dráha 2: 1.5 μ l spojené eluční frakce před štěpením ($15.5 \times$ ředění), dráha 3: 1.5 μ l frakce finálního proteinu po štěpení thrombinem ($15.5 \times$ ř), dráha 4-7: (5 ng, 7.5 ng, 10 ng, 12.5 ng) standard divokého typu neuraminidasy.

4.2.1. Určení Michaelisovy konstanty a katalytické efektivity mutantu S247N neuraminidasy

S247N mutant neuraminidasy byl kineticky charakterizován použitím fluorescenčního substrátu 4-MUNANA o rozdílných koncentracích a 198 nM neuraminidasy. Data byla vyhodnocena použitím výnosu dle Lineweaver-Burka (Obrázek 12 na straně 38) a následně statisticky zpracována za pomoci Dr. Pavla Pokorného z VŠCHT. Výsledná hodnota Michaelisovy konstanty K_m byla 1.1 ± 0.1 mM (shodná s neuraminidasou divokého typu). Číslo přeměny k_{cat} bylo 0.17 ± 0.01 s^{-1} ($5 \times$ nižší než u neuraminidasy divokého typu) a katalytická efektivita k_{cat}/K_m 160 ± 20 $s^{-1}M^{-1}$ ($5 \times$ nižší než u neuraminidasy divokého typu).



Obrázek 12: Kinetická charakterizace neuraminidasy A/California/7/2009 (H1N1) s S247N mutací s použitím fluorescenčního substrátu 4-MUNANA při pH 6.15 (experimentální detaily viz kap 3.10.1 na straně 34). Naměřená data jsou vynesena do grafu dle Lineweavera-Burka.

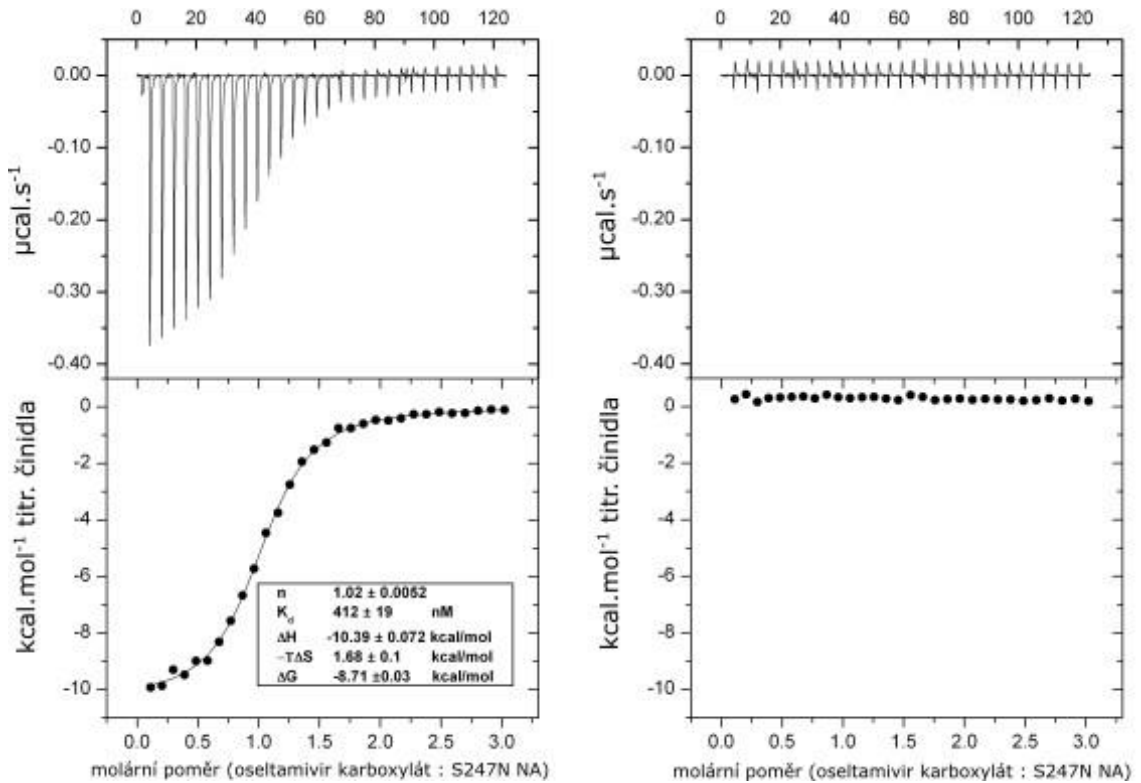
4.2.2. Určení inhibičních konstant

Po detailní enzymové charakterizaci byly pro inhibitory oseltamivir karboxylát a tamifosfor stanoveny inhibiční konstanty měřením aktivity enzymu v přítomnosti různých koncentrací inhibitoru. Reakční směsi obsahovaly 159 nM enzym, odlišné koncentrace inhibitoru a 500 μ M substrát 4-MUNANA. Výsledná data byla vyhodnocena dle Dixonova výnosu. Pro každý inhibitor byl pokus proveden dvakrát a výsledky byly statisticky vyhodnoceny. K_i pro oseltamivir karboxylát bylo 450 ± 40 ($19 \times$ vyšší než u neuraminidasy divokého typu) a pro tamifosfor 930 ± 50 ($36 \times$ vyšší než u neuraminidasy divokého typu).

4.3. Thermodynamická analýza

Byla provedena isothermální titrační kalorimetrie, kdy byl titrován roztok obsahující S247N mutant neuraminidasy postupnými přídávky oseltamiviru karboxylátu za průběžného zaznamenávání exothermních pulsů. Tyto pulsy byly následně integrovány a proloženy titrační křivkou v programu Origin (Obrázek 13 na straně 39). Následně byl proveden pokus, kdy byl inhibitor titrován do pufru ITC, pro stanovení rozpouštěcího tepla inhibitoru. V programu Origin byly vyhodnoceny vazebné parametry této interakce. Interakce byla doprovázena příznivou změnou enthalpie ($\Delta H = -10.4 \pm 0.1$ kcal.mol⁻¹) a slabě nepříznivou změnou entropie ($-T\Delta S 1.7 \pm 0.1$ kcal.mol⁻¹).

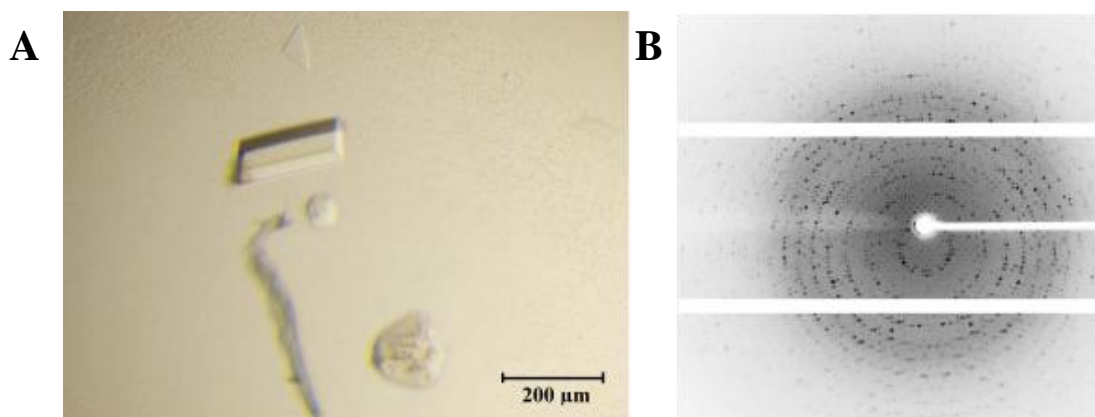
Stechiometrie reakce odpovídala 1.02 ± 0.01 (inhibitor : podjednotka neuraminidasy) a hodnota disociační konstanty K_d byla stanovena 410 ± 20 nM.



Obrázek 13: Isothermální titrační kalorimetrie S247N mutantu neuraminidasy a jejího inhibitoru oseltamiviru karboxylátu. Graf vpravo ukazuje rozpouštěcí teplo inhibitoru za nepřítomnosti proteinu.

4.4. Proteinová krystalizace

Byla provedena kokrystalizace S247N mutantu neuraminidasy (A/California/7/2009) s inhibítoem oseltamivir karboxylátem metodou visící kapky. Pro nalezení optimální podmínky kokrystalizace byla použita podmínka, ve které se povedlo krystalizovat divoký typ neuraminidasy v komplexu s tamifosforem Dr. Milanem Kožíškem (ÚOCHB AV ČR v.v.i.). Komplex krystalizoval v 0.1 M HEPES v rozmezí pH 6.5 – 7.75, 7-10 % PEG 8000 při finální koncentraci neuraminidasy 8 mg/ml a 3-molárního nadbytku inhibitoru. Jako optimální podmínka byla nalezena podmínka 0.1 M HEPES pH 6.75, 8.5 % PEG 8000. Krystal rostl v podmínce 127 dní a poté byl zamražen a změřen Dr. Petrem Pachlem (ÚOCHB AV ČR v.v.i.), který následně i vyhodnotil naměřená data. V současné době je struktura krystalu v průběhu řešení.



Obrázek 14: A) krystal S247N mutantu neuraminidasy v komplexu s oseltamivir karboxylátem. B) difrakční obrazec po ozařování komplexu rentgenovým zářením.

5. Diskuze

Virus chřipky způsobuje každoroční sezónní epidemie v celém světě. Nemoc se často projevuje rychlým nástupem. U většiny lidí však nemoc nezpůsobí větší následky a pacienti se z nemoci plně zotaví. Vzhledem k širokému spektru hostitelů má však virus vysoký potenciál ke vzniku vysoce patogenních kmenů. Současné terapeutické cíle zároveň vykazují schopnost mutovat a vznikají resistantní varianty proti běžně užívaným lékům. Léky proti M2 proteinovému kanálu, prvnímu terapeutickému cíli viru chřipky, nejsou dnes díky resistenci volně kolujících typů ve většině zemí světa nadále používány. Vzhledem k vysoké variabilitě chřipky není v dnešní době ani očkování dokonalou prevencí vůči této nemoci.

Hledání klíčových míst ve virovém cyklu a nalezení vhodného terapeutického cíle je v posledních letech důležité. V současné době se jako nejlepší varianta jeví hledat sloučeniny cílené na proteiny viru chřipky. Neuraminidasa je jeden z nejlépe prozkoumaných proteinů chřipky. Tento protein je pro svojí enzymatickou aktivitu, která je nezbytně nutná pro uvolnění nového viru z hostitelské buňky, důležitým cílem terapeutického zásahu. Dříve se předpokládalo, že by mutace v aktivním místě neuraminidasy a v jeho blízkosti neměly vznikat z důvodu oslabení schopnosti viru se množit. Avšak dnes se tento předpoklad jeví jako ne zcela správný. Po světě se objevují viry s mutacemi způsobujícími resistenci viru vůči inhibitorům, které se bez větších potíží šíří mezi populací. Je proto velice důležité hledat nové inhibitory, které by lépe účinkovaly proti těmto resistantním typům ve snaze zabránění vzniku nové pandemie s vysokou úmrtností.

V našich experimentech byla neuraminidasa exprimována v S2 hmyzích buňkách z důvodu komplexních postranlačních modifikací. Pro purifikační účely byla před samotný protein přidána polypeptidová kotva „Twin-Strep-tag“ obsahující značku „FLAG“ pro specifickou detekci proteinu při purifikaci a dvě peptidové sekvence „STREP“ pro purifikaci. Na pomezí sekvence „Twin-Strep-tag“ a samotné neuraminidasy bylo také umístěno štěpné místo pro thrombin pro následné odštěpení kotvy. Protein byl jednodrokově purifikován pomocí afinitní chromatografie. Kotva se specificky váže na „Strep-Tactin“ vázaný na sepharosovém nosiči. „Strep-Tactin“ je upravený streptavidin a peptidová sekvence „Strep“ k němu vykazuje vysokou afinitu [63]. Ostatní proteiny obsažené v buněčném médiu se na nosič nenavázaly a protekly

kolonou. Protein byl následně vytěsněn z kolony D-desthiobiotinem za zisku vysoce čistého proteinu, jak lze pozorovat na obrázku 10 na straně 35. Část proteinu nebyla kolonou zachycena, a proto byla proteklá frakce znovu čištěna stejným postupem jako primární buněčné médium. Protein byl následně štěpen thrombinem pro odstranění afinitní kotvy. Štěpení proběhlo úspěšně, jak lze pozorovat z pokusu SDS elektroforézy a z imunodetekce na obrázku 11 na straně 37. Purifikace byla tedy úspěšná a celkem bylo získáno 7.5 mg čistého proteinu z 1000 ml buněčného S2 média pro jeho následnou charakterizaci.

Z výsledků dle Michaelisovy konstanty mutantu S247N neuraminidasy lze posoudit vliv mutace na vazebné parametry enzymu v porovnání s divokým typem. Afinita enzymu k substrátu zůstávala u mutantu nezměněna. Tato mutace však přibližně 5× oslabuje schopnost enzymu přeměňovat množství substrátu za jednotku času. Snižuje se tedy i enzymová efektivita, a sice také přibližně 5×. Vazba substrátu tedy není ovlivněna touto mutací, ale samotná enzymatická aktivita je zhoršena.

Inhibiční konstanty ukazují vliv mutace na vazbu inhibitorů. K_i pro oseltamivir karboxylát ukazuje 19× sníženou citlivost mutantu vůči tomuto inhibitoru v porovnání s neuraminidasou divokého typu. Citlivost mutace na vazbu tamifosforu je o něco více zhoršena (36×) než pro oseltamivir karboxylát. Tato mutace jako samotná tedy způsobuje mírné zhoršení vazby těchto vybraných inhibitorů.

Z thermodynamické analýzy vazby oseltamivir karboxylátu a mutantu S247N neuraminidasy lze zhodnotit parametry vazby tohoto inhibitoru. Ze stechiometrie reakce vyplývá, že jedna molekula inhibitoru interaguje s jednou monomerní jednotkou enzymu. Vypočtená disociační konstanta vyšla přibližně 3× vyšší v porovnání s neuraminidasou divokého typu. Tento trend se shoduje s výsledkem z kinetické charakterizace a potvrzuje zhoršení vazby tohoto inhibitoru s S247N mutantem neuraminidasy. Tvorba tohoto komplexu je stejně jako u divokého typu poháněna příznivou změnou enthalpie. Tato změna je však přibližně o 0.4 kcal.mol⁻¹ méně příznivá než pro divoký typ. Lze tedy předpokládat, že mutace velmi mírně ovlivňuje vodíkové vazby nebo elektrostatické interakce mezi enzymem a inhibitorem. Změna entropického členu však zůstává v rámci chyby měření stejná jako u divokého typu neuraminidasy. Mutace tedy pravděpodobně výrazně neovlivňuje hydrofobní interakce mezi inhibitorem a enzymem či jejich stupně volnosti.

Optimalizace podmínky použité pro kokrystalizaci divokého typu neuraminidasy s tamifosforem umožnila kokrystalizaci S247N mutantu s oseltamivir karboxylátem. Podmínku bylo nutné pouze mírně optimalizovat a po krátké době byla nalezena podmínka optimální. Krystaly však rostly značně dlouhou dobu. Celkem bylo testováno v řádu desítek krystalů před nalezením dobře difraktujícího krystalu. Dalším nepříznivým faktorem byla specifická charakteristika komplexu krystalizovat zároveň ve dvou navzájem posunutých krystalových mřížkách. Bylo tedy nutné najít krystal, který vykazoval nejvyšší podíl jedné formy pro možnost řešení krystalografických dat. Nakonec byl nalezen krystal, který difraktoval a poskytl data o rozlišení 1.8 Å.

6. Závěr

Byla purifikována globulární katalytická doména S247N mutantu neuraminidasy kmenu A/California/7/2009 (H1N1) předem exprimovaná v S2 hmyzích buňkách. Bylo získáno dostatečné množství velmi čistého proteinu pro následné experimentální pokusy.

Enzym byl kineticky charakterizován a byly zjištěny kinetické parametry vazby inhibitorů neuraminidasy.

Byla provedena thermodynamická analýza vazby oseltamivir karboxylátu do aktivního místa neuraminidasy.

Enzym byl úspěšně kokrytalizován v přítomnosti inhibitoru oseltamivir karboxylátu a byla přibližně změřena data z rentgenové analýzy.

Reference

- [1] S. Kapoor, K. Dhama: *Insights into Influenza Viruses of Animals and Humans*, Springer Science & Business Media, Switzerland (2014)
- [2] WHO: Influenza (Seasonal), staženo 27.12.2015, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
- [3] M. I. Nelson, E. C. Holmes: The evolution of epidemic influenza, *Nat. Rev. Genet.*, 8, 196-205, (2007)
- [4] CDC: Types of Influenza Viruses, staženo 27.12.2015, <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
- [5] P. Palese, M. L. Shaw: *Orthomyxoviridae: The Viruses and their Replication*, Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Health. Philadelphia (2007)
- [6] S. L. Zebedee, R. A. Lamb: Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions, *J. Virol.*, 62, 2762-2772 (1988).
- [7] N. M. Bouvier, P. Palese: The biology of influenza viruses, *Vaccine*, 26, 49-53 (2008)
- [8] Y. Shi, Y. Wu, W. Zhang, J. Qi, G. F. Gao: Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses, *Nat. Rev. Microbiol.*, 12, 822-831 (2014)
- [9] K. Das, J. M. Aramini, L. C. Ma, R. M. Krug, E. Arnold: Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17, 530-538 (2010)
- [10] A. Garcia-Sastre, A. Egorov, D. Matassov, S. Brandt, D. E. Levy, J. E. Durbin, et al.: Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems, *Virology*, 252, 324-330 (1998)
- [11] R. Webster, A. Monto, T. Braciale, R. Lamb: *Textbook of Influenza*, druhá edice. Wiley Blackwell, West Sussex, UK (2013).
- [12] G. Neumann, M. T. Hughes, Y. Kawaoka: Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1, *Embo J.*, 19, 6751-6758 (2000)
- [13] J. J. Skehel, D. C. Wiley: Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin, *Annu. Rev. Biochem.*, 69, 531-569, (2000)
- [14] T. Samji: Influenza A: understanding the viral life cycle, *Yale J. Biol. Med.*, 82, 153-159 (2009)
- [15] L. H. Pinto, R. A. Lamb: The M2 proton channels of influenza A and B viruses, *J Biol Chem*, 281, 8997-9000 (2006)
- [16] S. Boivin, S. Cusack, R. W. Ruigrok, D. J. Hart: Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms, *J. Biol. Chem.*, 285, 28411-28417 (2010)
- [17] CDC: 1918 Influenza: the Mother of All Pandemics, staženo 27.12.2015 <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
- [18] A. Trilla, G. Trilla, C. Daer: The 1918 "Spanish flu" in Spain, *Clin Infect Dis*, 47, 668-673, (2008)
- [19] J. K. Taubenberger, A. H. Reid, A. E. Krafft, K. E. Bijwaard, T. G. Fanning: Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus, *Science*, 275, 1793-1796 (1997)

- [20] D. M. Morens, J. K. Taubenberger, A. S. Fauci: Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness, *J. Infect. Dis.*, 198, 962-970 (2008)
- [21] Y. Kawaoka, S. Krauss, R. G. Webster: Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics, *J. Virol.*, 63, 4603-4608 (1989)
- [22] C. W. Potter: A history of influenza, *J. Appl. Microbiol.*, 91, 572-579 (2001)
- [23] V. Trifonov, H. Khiabani, B. Greenbaum, and R. Rabadan, "The origin of the recent swine influenza A(H1N1) virus infecting humans," *Euro. Surveill.*, 14, (2009)
- [24] V. Trifonov, H. Khiabani, R. Rabadan: Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus, *N. Engl. J. Med.*, 361, 115-119 (2009)
- [25] C. Viboud, M. Miller, D. Olson, M. Osterholm, L. Simonsen: Preliminary Estimates of Mortality and Years of Life Lost Associated with the 2009 A/H1N1 Pandemic in the US and Comparison with Past Influenza Seasons, *PLoS Curr.*, 2, RRN1153, 2010.
- [26] L. Simonsen, P. Spreeuwenberg, R. Lustig, R. J. Taylor, D. M. Fleming, M. Kroneman, et al.: Global mortality estimates for the 2009 Influenza Pandemic from the GLaMOR project: a modeling study, *PLoS Med.*, 10, e1001558 (2013)
- [27] G. M. Air: Influenza Neuraminidase, *Influenza Other Respir. Viruses*, 6, 245-256 (2012)
- [28] J. N. Varghese, P. M. Colman: Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, 221, 473-486 (1991)
- [29] S. Barman, L. Adhikary, A. K. Chakrabarti, C. Bernas, Y. Kawaoka, D. P. Nayak: Role of Transmembrane Domain and Cytoplasmic Tail Amino Acid Sequences of Influenza A Virus Neuraminidase in Raft Association and Virus Budding, *J. Virol.*, 78, 5258-5269 (2004)
- [30] Y. Shtyrya: Influenza Virus Neuraminidase: Structure and Function, 1, 26-32 (2009)
- [31] P. M. Colman, P. A. Hoyne, M. C. Lawrence: Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase, *J. Virol.*, 67, 2972-2980, (1993)
- [32] Protein Data Bank, staženo 31.12.2015, <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2BAT>
- [33] R. Schauer: Chemistry, Metabolism, and Biological Functions of Sialic Acids, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40, 131-234 (1982)
- [34] P. M. Colman: Structural basis of antigenic variation: Studies of influenza virus neuraminidase, *Immunol. Cell. Biol.*, 70, 209-214 (1992)
- [35] M. von Itzstein: The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 6, 967-974 (2007)
- [36] R. J. Russell, L. F. Haire, D. J. Stevens, P. J. Collins, Y. P. Lin, G. M. Blackburn, et al.: The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design, *Nature*, 443, 45-49 (2006)
- [37] Q. Li, J. Qi, W. Zhang, C. J. Vavricka, Y. Shi, J. Wei, et al.: The 2009 pandemic H1N1 neuraminidase N1 lacks the 150-cavity in its active site, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17, 1266-1268 (2010)
- [38] M. von Itzstein, W. Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, et al.: Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication, *Nature*, 363, 418-423 (1993)

- [39] C. J. Vavricka, Q. Li, Y. Wu, J. Qi, M. Wang, Y. Liu, et al.: Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition, *PLoS Pathog.*, 7, e1002249 (2011)
- [40] M. Yamashita: Laninamivir and its prodrug, CS-8958: long-acting neuraminidase inhibitors for the treatment of influenza, *Antivir. Chem. Chemother.*, 21, 71-84 (2010)
- [41] Y. S. Babu, P. Chand, S. Bantia, P. Kotian, A. Dehghani, Y. El-Kattan, et al.: BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design, *J. Med. Chem.*, 43, 3482-3486 (2000)
- [42] L. Barroso, J. Treanor, L. Gubareva, F. G. Hayden: Efficacy and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor peramivir in experimental human influenza: randomized, controlled trials for prophylaxis and treatment, *Antivir. Ther.*, 10, 901-910 (2005)
- [43] FDA: FDA approves Rapivab to treat flu infection, staženo 27.12.2015 <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm427755.htm>
- [44] J.J. Shie, J.M. Fang: Phosphonate Congeners of Oseltamivir and Zanamivir as Effective Anti-influenza Drugs: Design, Synthesis and Biological Activity, *J. Chin. Chem. Soc.*, 61, 127-141 (2014)
- [45] J. A. Ives, J. A. Carr, D. B. Mendel, C. Y. Tai, R. Lambkin, L. Kelly, et al.: The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo, *Antiviral Res.*, 55, 307-317 (2002)
- [46] N. J. Dharan, L. V. Gubareva, J. J. Meyer, M. Okomo-Adhiambo, R. C. McClinton, S. A. Marshall, et al.: Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States," *Jama*, 301, 1034-1041 (2009)
- [47] B. Guy: Detection and management of antiviral resistance for influenza viruses, *Influenza Other Respir. Viruses*, 7, 13-23 (2013)
- [48] J. D. Bloom, L. I. Gong, D. Baltimore: Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance, *Science*, 328, 1272-1275 (2010)
- [49] J. L. McKimm-Breschkin, A. Sahasrabudhe, T. J. Blick, M. McDonald, P. M. Colman, G. J. Hart, et al.: Mutations in a conserved residue in the influenza virus neuraminidase active site decreases sensitivity to Neu5Ac2en-derived inhibitors, *J. Virol.*, 72, 2456-2462 (1998)
- [50] Y. Abed, M. Baz, G. Boivin: Impact of neuraminidase mutations conferring influenza resistance to neuraminidase inhibitors in the N1 and N2 genetic backgrounds, *Antivir. Ther.*, 11, 971-976 (2006)
- [51] S. Hatakeyama, N. Sugaya, M. Ito, M. Yamazaki, M. Ichikawa, K. Kimura, et al.: Emergence of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors, *Jama*, 297, 1435-1442 (2007)
- [52] A. C. Hurt, J. K. Holien, M. W. Parker, I. G. Barr: Oseltamivir resistance and the H274Y neuraminidase mutation in seasonal, pandemic and highly pathogenic influenza viruses, *Drugs*, 69, 2523-2531 (2009)
- [53] A. C. Hurt, T. Chotpitayasunondh, N. J. Cox, R. Daniels, A. M. Fry, L. V. Gubareva, et al.: Antiviral resistance during the 2009 influenza A H1N1 pandemic: public health, laboratory, and clinical perspectives, *Lancet. Infect. Dis.*, 12, 240-248 (2012)
- [54] S. B. Graitcer, L. Gubareva, L. Kamimoto, S. Doshi, M. Vandermeer, J. Louie, et al.: Characteristics of Patients with Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009, United States, *Emerg. Infect. Dis.*, 17, 255-257 (2011)

- [55] K. S. Li, Y. Guan, J. Wang, G. J. Smith, K. M. Xu, L. Duan, et al.: Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia, *Nature*, 430, 209-213 (2004)
- [56] M. R. Landon, R. E. Amaro, R. Baron, C. H. Ngan, D. Ozonoff, J. A. McCammon, et al.: Novel druggable hot spots in avian influenza neuraminidase H5N1 revealed by computational solvent mapping of a reduced and representative receptor ensemble, *Chem. Biol. Drug Des.*, 71, 106-116 (2008)
- [57] D. A. Boltz, B. Douangneun, P. Phommachanh, S. Sinthasak, R. Mondry, C. Obert, et al.: Emergence of H5N1 avian influenza viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors and novel reassortants in Lao People's Democratic Republic, *J. Gen. Virol.*, 91, 949-959 (2010)
- [58] A. C. Hurt, R. T. Lee, S. K. Leang, L. Cui, Y. M. Deng, S. P. Phuah, et al.: Increased detection in Australia and Singapore of a novel influenza A(H1N1)2009 variant with reduced oseltamivir and zanamivir sensitivity due to a S247N neuraminidase mutation, *Euro. Surveill.*, 16, 2-7 (2011)
- [59] C. W. Seibert, S. Rahmat, F. Krammer, P. Palese, N. M. Bouvier: Efficient transmission of pandemic H1N1 influenza viruses with high-level oseltamivir resistance, *J. Virol.*, 86, 5386-5389 (2012)
- [60] C. W. Seibert, M. Kaminski, J. Philipp, D. Rubbenstroth, R. A. Albrecht, F. Schwalm, et al.: Oseltamivir-resistant variants of the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus are not attenuated in the guinea pig and ferret transmission models, *J. Virol.*, 84, 11219-11226 (2010)
- [61] T. M. Souza, P. C. Resende, N. Fintelman-Rodrigues, T. S. Gregianini, N. Ikuta, S. B. Fernandes, et al.: Detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A(H1N1)pdm2009 in Brazil: can community transmission be ruled out?, *PLoS One*, 8, p. e80081 (2013)
- [62] C. Berenguer Albiñana, A. Machara, P. Řezáčová, P. Pachel, J. Konvalinka, M. Kožíšek, "Kinetic, thermodynamic and structural analysis of tamiphosphor binding to neuraminidase of H1N1 (2009) pandemic influenza," *Eur. J. Med. Chem.*, (přijato k publikaci) (2016)
- [63] T. GM Schmidt, A. Skerra: The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.*, 6, 1528–1535 (2007)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka