

**Univerzita Karlova**  
**Prírodovedecká fakulta**

Študijný program: Genetika, molekulárna biológia a virológia  
Študijný odbor: Viroológia



**Bc. Michal Vaško**

Príprava a charakterizácia koronavírusovej exonukleázy nsp14  
Příprava a charakterizace koronavirové exonukleázy nsp14  
Characterization of a recombinant exonuclease nsp14 of the SARS-CoV-2

Typ záverečnej práce:

Diplomová práca

Školiteľ: Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D.

Praha, 2023

## **Prehlásenie:**

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracoval samostatne pod vedením Mgr. et Mgr. Evžena Bouři, Ph.D., a že som uviedol všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 09.08.2023

Podpis.....

## **Pod'akovanie**

Týmto by som chcel poďakovať RNDr. Eve Žileckej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady, čas a trpezlivosť, ktorú mi venovala počas vypracovania aj písania tejto práce. Ďalej ďakujem Mgr. et Mgr. Evženovi Bouřovi, Ph.D. za odborné vedenie práce a všetkým členom laboratória za vytvorenie príjemného pracovného prostredia a ochotu pomôcť. V neposlednom rade ďakujem svojej rodine a priateľom za podporu počas celého štúdia.

Tento výskum bol financovaný z projektu Národného ústavu virológie a bakteriológie (Program EXCELES, Projekt č. LX22NPO5103) - Financovaný Európskou úniou - Next Generation EU.

## Abstrakt

Koronavírusy sú obalené vírusy s genómom tvoreným jednovláknovou molekulou RNA v pozitívnej forme. S veľkosťou genómu, u niektorých druhov, presahujúcou 30 kb predstavujú najväčšie známe RNA vírusy. Infikujú vtáky a cicavce, vrátane človeka a spôsobujú široké spektrum ochorení. Väčšina ľudských koronavírusov spôsobuje prevažne mierne respiračné infekcie. Za posledné dve desaťročia však došlo k dvom rozsiahlym epidémiám a globálnej pandémie vážnych respiračných ochorení, v mnohých prípadoch končiacich smrťou, spôsobených koronavírusmi. Najnovšia a najrozsiahlejšia z nich bola spôsobená koronavírusom SARS-CoV-2 (z angl. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus). V genóme koronavírusov sa nachádza gén kódujúci neštruktúrny proteín 14 (nsp14), ktorý má 3'-5' exonukleázovú a metyltransferázovú enzymatickú aktivitu. Exonukleáza nsp14 sa zúčastňuje opráv nesprávne zaradených nukleotidov počas replikácie vírusového genómu a jej prítomnosť je u RNA vírusov veľmi výnimočná. Exonukleázová aktivita nsp14 je výrazne podporená väzbou ďalšieho vírusového proteínu, nsp10, ktorý nemá enzymatickú aktivitu ale je významným kofaktorom pre niekoľko enzymaticky aktívnych koronavírusových nsp. Nsp14 aj nsp10 sú vysoko konzervované a sekvenčne podobné medzi jednotlivými druhmi koronavírusov.

Na charakterizáciu exonukleázovej aktivity nsp14 a jej interakcií s nsp10 boli PCR mutagenézou vytvorené mutované verzie proteínov nsp14 aj nsp10. Nemutované a mutované verzie nsp14 a nsp10, rovnako ako skrátená verzia nsp10 boli vyprodukované v bakteriálnom expresnom systéme využívajúcom baktérie *E. coli*. Exonukleázová aktivita jednotlivých verzií nsp14 v prítomnosti aj neprítomnosti verzií nsp10 bola pozorovaná *in vitro* aktívnymi esejami využívajúcimi ssRNA, dsRNA a dsRNA s nesprávnym párovaním bázy ako substrát. Výsledky tejto práce priniesli poznatky o fungovaní exonukleázy nsp14 a jej interakciách s nsp10, ktoré môžu slúžiť ako základ pre podrobnejšiu charakterizáciu v budúcom výskume.

**Kľúčové slová:** Koronavírusy, SARS-CoV-2, COVID-19, exonukleáza, nsp14, nsp10

## Abstrakt

Koronaviry jsou obalené viry s genomem tvořeným jednovláknovou molekulou RNA v pozitivní formě. S velikostí genomu, u některých druhů, přesahující 30 kb představují největší známé RNA viry. Infikují ptáky a savce včetně člověka a způsobují široké spektrum onemocnění. Většina lidských koronavirů způsobuje převážně mírné respirační infekce. Za poslední dvě desetiletí však došlo ke dvěma rozsáhlým epidemiím a globální pandemii vážných respiračních onemocnění, v mnoha případech končících smrtí, způsobených koronaviry. Nejnovější a nejrozsáhlejší z nich byla způsobena koronavirem SARS-CoV-2 (z angl. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus). V genomu koronavirů se nachází gen kódující nestrukturní protein 14 (nsp14), který má 3'-5' exonukleázovou a metyltransferázovou enzymatickou aktivitu. Exonukleáza nsp14 se účastní oprav nesprávně zařazených nukleotidů během replikace virového genomu a její přítomnost je u RNA virů velmi výjimečná. Exonukleázová aktivita nsp14 je výrazně podpořena vazbou dalšího virového proteinu, nsp10, který nemá enzymatickou aktivitu, ale je významným kofaktorem pro několik enzymaticky aktivních koronavirových nsps. Nsp14 i nsp10 jsou vysoce konzervované a sekvenčně podobné mezi jednotlivými druhy koronavirů.

Pro charakterizaci exonukleázové aktivity nsp14 a její interakcí s nsp10 byly PCR mutagenézou vytvořeny mutované verze proteinů nsp14 i nsp10. Nemutované a mutované verze nsp14 a nsp10, stejně jako zkrácená verze nsp10 byly vyprodukovány v bakteriálním expresním systému využívajícím bakterie *E. coli*. Exonukleázová aktivita jednotlivých verzí nsp14 v přítomnosti i nepřítomnosti verzí nsp10 byla pozorována *in vitro* aktivními esejemi využívajícími ssRNA, dsRNA a dsRNA s nesprávným párováním báze jako substrát. Výsledky této práce přinesly poznatky o fungování exonukleázy nsp14 a její interakcích s nsp10, které mohou sloužit jako základ pro podrobnější charakterizaci v budoucím výzkumu.

**Klíčová slova:** Koronaviry, SARS-CoV-2, COVID-19, exonukleáza, nsp14, nsp10

## Abstract

Coronaviruses are enveloped viruses with a genome composed of a single-stranded positive-sense RNA molecule. With genome sizes, in some species, exceeding 30 kb, they represent the largest known RNA viruses. They infect birds and mammals, including humans, causing a wide spectrum of diseases. Most human coronaviruses predominantly cause mild respiratory infections. However, in the last two decades, there have been two extensive epidemics and a global pandemic of severe respiratory illnesses, often ending in fatalities, caused by coronaviruses. The most recent and extensive of these was caused by the coronavirus SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus). Within the coronavirus genome, there is a gene encoding a non-structural protein 14 (nsp14), which possesses 3'-5' exonuclease and methyltransferase enzymatic activities. The exonuclease nsp14 participates in the repair of misincorporated nucleotides during viral genome replication, and its presence is exceptionally rare among RNA viruses. The exonuclease activity of nsp14 is significantly enhanced by the binding of another viral protein, nsp10, which lacks enzymatic activity but acts as a critical cofactor for several enzymatically active coronavirus nsps. Both nsp14 and nsp10 are highly conserved and sequence-similar among various coronavirus species.

To characterize the exonuclease activity of nsp14 and its interactions with nsp10, mutant versions of the nsp14 and nsp10 proteins were created using PCR mutagenesis. Both wild-type and mutant versions of nsp14 and nsp10, as well as a truncated version of nsp10, were produced in a bacterial expression system utilizing *E. coli* bacteria. The exonuclease activity of each nsp14 variant was observed *in vitro* using activity assays with ssRNA, dsRNA, and dsRNA with mismatched base pair as substrates, in the presence or absence of nsp10 variants. The results of this study provided insights into the functioning of nsp14 exonuclease and its interactions with nsp10, which may serve as a basis for more detailed characterization in future research.

**Key words:** Coronaviruses, SARS-CoV-2, COVID-19, exonuclease, nsp14, nsp10

## Zoznam použitých skratiek

ACE	Angiotenzín-konvertujúci enzým	Z angl. Angiotensin-converting enzyme
APN	aminopeptidáza N	
APS	Peroxodisíran amónny	z angl. ammonium persulfate
BME	$\beta$ -merkaptoetanol	
CEACAM	Bunková adhézna molekula súvisiaca s karcinoemryonálnym antigénom	Z angl. carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule
DEPC	Dietyl pyrokarbonát	
dH <sub>2</sub> O	Deionizovaná voda	
DMV	Dvojmembránový vâčok	
DNA	Deoxyribonukleová kyselina	Z angl. deoxyribonucleic acid
DPP	Dipeptidyl peptidáza	
DTT	1,4-Dithiotreitol	
dsRNA	Dvojvláknová RNA	Z angl. double-stranded RNA
EDTA	Kyselina etyléndiamintetraoctová	Z angl. ethylenediaminetetraacetic acid
FPLC		Z angl. fast protein liquid chromatography
FW	Priamy	Z angl. forward
INF	Interferón	
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranozid	
LB	Kultivačné médium	Z angl. lysogeny broth
NTA	Nitrilotrioctová kyselina	Z angl. nitrilotriacetic acid
Nsp	Neštruktúrny proteín	Z angl. nonstructural protein
Orf	Otvorený čítací rámeč	Z angl. Open reading frame

PCR	Polymerázová reťazová reakcia	Z angl. polymerase chain reaction
PRF	Programovaný ribozomálny posun	Z angl. Programmed ribosomal frameshifting
RBD	Receptor väzobná doména	Z angl. Receptor binding domain
REV	Spätný	Z angl. reverse
RNA	Ribonukleová kyselina	Z angl. ribonucleic acid
RTC	Replikázový/transkriptázový komplex	Z angl. Replicase/transcriptase complex
SDS	Dodecylsírán sodný	Z angl. sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová elektroforéza	
ssRNA	Jednovláknová RNA	Z angl. single-stranded RNA
TAE	Tris-acetátový pufor s EDTA	
TBE	Tris-borátový pufor s EDTA	
TCEP	Tris(2-karboxyetyl)fosfin	Z angl. tris(2-carboxyethyl)phospine
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin	
Tris	Tris(hydroxymetyl)aminometán	
TRS	Transkripčná regulačná sekvencia	Z angl. Transcription regulatory sequence
UTR	Netranslatovaná oblasť	Z angl. Untranslated region
WT	Divoký kmeň	Z angl. wild-type



# Obsah

1	Úvod .....	9
2	Prehľad literatúry .....	11
2.1	Koronavírusy .....	11
2.1.1	História .....	11
2.1.2	Klasifikácia .....	12
2.1.3	Morfológia .....	13
2.1.4	Genóm .....	14
2.1.5	Vírusové proteíny .....	16
2.1.6	Replikačný cyklus .....	19
2.2	SARS-CoV-2 .....	24
2.3	Nsp14 .....	25
2.4	Nsp10 .....	26
3	Ciele práce .....	28
4	Materiál a metódy .....	29
4.1	Materiál .....	29
4.1.1	Prístroje .....	29
4.1.2	Laboratórne pomôcky .....	30
4.1.3	Chemikálie .....	30
4.1.4	Pufry a roztoky .....	31
4.1.5	Enzýmy .....	32
4.1.6	Médiá .....	32
4.1.7	Bakteriálne kmene .....	32
4.1.8	Oligonukleotidy .....	33
4.2	Metódy .....	34
4.2.1	Príprava plazmidov mutovaných verzií nsp14, nsp10 a skrátenej verzie nsp10 .....	34
4.2.2	Príprava proteínu nsp14 a jeho mutovaných verzií .....	38
4.2.3	Príprava proteínu nsp10 a jeho skrátenej a mutovanej verzie .....	41
4.2.4	Aktivitná exonukleázová esej .....	41
5	Výsledky .....	43
5.1	Príprava plazmidov mutovaných verzií nsp14 a nsp10 .....	43
5.2	Expresia a izolácia proteínov .....	43
5.3	Aktivitné eseje .....	47
5.3.1	Nemutované verzie nsp14 a nsp10 .....	47
5.3.2	Mutované verzie nsp14 a nsp10 .....	59
6	Diskusia .....	64
7	Súhrn .....	68
8	Zoznam použitej literatúry .....	69

# 1 Úvod

Koronavírusy (CoVs, z angl. coronaviruses) predstavujú skupinu príbuzných obalených RNA vírusov infikujúcich vtáky a cicavce, vrátane človeka. Patria do rádu *Nidovirales*, čeľadi *Coronaviridae* a podčeľadi *Orthocoronavirinae*, ktorá je rozdelená do rodov *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* a *Delatacoronavirus*. Všetky známe ľudské koronavírusy patria do rodov *Alphacoronavirus* a *Betacoronavirus*.

Koronavírusy majú nesegmentovaný genóm tvorený lineárnou molekulou RNA v pozitívnej forme, ktorá je vo vírusovej kapside naviazaná na nukleokapsidový proteín. Predstavujú najväčšie známe RNA vírusy s veľkosťou genómu, u niektorých druhov, presahujúcou 30 kb. Na 5' konci ich genómu sa nachádza 5' čiapočka (z angl. 5' cap) a na 3' konci štruktúra poly(A) koniec (z angl. poly(A) tail), čo dáva ich genómu veľkú podobnosť s hosťateľskými mRNA molekulami. Kódujúca oblasť je na oboch koncoch ohraničená netranslatovanými úsekmi (UTR, z angl. untranslated region) tvoriacimi niekoľko špecifických sekundárnych štruktúr dôležitých pre reguláciu transkripcie a translácie. Asi dve tretiny kódujúcej oblasti sú tvorené génmi kódujúcimi 15 až 16 neštruktúrnych proteínov dôležitých pre správny priebeh replikačného cyklu. Zvyšná tretina pozostáva z génov pre štruktúrne proteíny, umožňujúce vznik nových vírusových častíc a génov doplnkových proteínov, ktoré sú pre replikáciu neesenciálne ale výrazne prispievajú k virulencii vírusu.

Virióny koronavírusov sú sférické s priemerom 80-120 nm. Sú obalené lipidickou membránou získanou z hosťateľských membrán. Na povrchu ich vírusových častíc sa nachádzajú typické výbežky dlhé asi 20 nm tvorené „proteínom spike“, tiež označovaným ako proteín S, slúžiace na prichytenie vírusových častíc na receptory na povrchu hosťateľských buniek. Proteín S nesie tiež fúziu doménu, ktorá je dôležitá pre splynutie vírusovej membrány s hosťateľskou a uvoľnenie genómu vírusu do cytozolu hosťateľskej bunky. Po rozpoznaní receptoru na povrchu hosťateľskej bunky dochádza k vstupu genómu vírusu do cytozolu buď priamo splynutím vírusovej membrány s cytoplazmatickou membránou hosťateľskej bunky alebo prostredníctvom receptorom sprostredkovanej endocytózy vírusovej častice a následnému splynutiu vírusovej membrány s membránou endozómu. Po uvoľnení genómu vírusu dochádza k translácii neštruktúrnych proteínov, tvorbe suborganel tvorených dvojmembránovými váčkami vznikajúcimi z membrán endoplazmatického retikula, v ktorých následne prebieha replikácia vírusového genómu a vznik subgenómových RNA, umožňujúcich

tvorbu štruktúrnych a doplnkových proteínov. Po replikácii a vzniku štruktúrnych proteínov dochádza k vzniku nových viriónov a ich následnému uvoľneniu z hostiteľskej bunky.

Koronavírusy infikujú veľké množstvo cicavcov a vtákov. U infikovaných jedincov spôsobujú široké spektrum ochorení, ako sú zápaly pľúc a respiračné infekcie, gastroenterické ochorenia, hepatitídy a infekcie nervového tkaniva. U ľudí spôsobuje väčšina ľudských koronavírusov mierne respiračné ochorenia, ako je nachladenie. Výnimkou sú tri koronavírusy: SARS-CoV (z angl. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus), MERS-CoV (z angl. Middle east respiratory syndrome-related coronavirus) a SARS-CoV-2 (z angl. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), objavené v posledných 20 rokoch, spôsobujúce vážne, až smrteľné respiračné ochorenia.

Pre koronavírusy je špecifická prítomnosť génu kódujúceho proteín s 3'-5' exonukleázovou enzymatickou aktivitou. Za jeho hlavnú úlohu sa považuje oprava chýb vznikajúcich počas replikácie genómu vírusovou RNA-dependentnou RNA polymerázou. Vzhľadom na veľkosť genómu koronavírusov, je u niektorých druhov táto funkcia pre replikáciu esenciálna. Prítomnosť génu kódujúceho exonukleázu je u RNA vírusov veľmi netypickým znakom.

## 2 Prehľad literatúry

### 2.1 Koronavírusy

#### 2.1.1 História

Prvé záznamy o popísaných zvieracích infekciách spôsobených koronavírusmi pochádzajú z prvej polovice 20. storočia. L. D. Bushnell a C. A. Brandly začiatkom tridsiatych rokov dvadsiateho storočia izolovali prvý koronavírus, spôsobujúci závažné respiračné ochorenie u sliepok, známy ako vírus infekčnej bronchitídy (IBV) (Bushnell & Brandly, 1933). V nasledujúcich rokoch boli objavené ďalšie zvieracie koronavírusy (zhrnuté v McIntosh, 1974). Prvé ľudské koronavírusy boli objavené začiatkom 60. rokov, kedy Tyrrell a Bynoe izolovali infekčné agens pasážovaním nazálnych odberov jedincov trpiacich nachladením v ľudských embryonálnych tracheálnych orgánových kultúrach. Vírus nazvali B814 (Tyrrell & Bynoe, 1966). V rovnakom období Hamre a Procknow izolovali infekčné agens zo študentov medicíny s prejavmi nachladenia. Izolovaný vírus nazvali 229E a testovaním zistili, že pôvodca infekcie je RNA vírus obalený lipidickou membránou, ktorý nie je podobný žiadnym vtedy známym RNA vírusom (Hamre & Procknow, 1966). V tomto období nebola zatiaľ známa podobnosť medzi objavenými koronavírusmi.

V druhej polovici šesťdesiatych rokov 20. storočia Almeida, v spolupráci s Tyrrell, pozorovali, využitím elektrónovej mikroskopie, vzorky vírusov B814 a 229E a porovnali ich s morfológiou častíc vírusu IBV infikujúceho vtáky. Vo všetkých vzorkách boli nájdené morfológicky veľmi podobné častice. Častice boli veľké 800 – 1200 Å (80 – 120 nm). Povrch častíc bol pokrytý výbežkami dlhými približne 200 Å (20 nm), ktoré boli tvorené úzkou stopkou a hlavicou o priemere približne 100 Å (10 nm) (Almeida & Tyrrell, 1967). McIntosh et al. v tomto období tiež izolovali infekčné agens z dýchacích ciest jedincov s prejavmi respiračného ochorenia, nazvané OC, ktoré bolo podobné vírusom IBV, 229E a B814 (K. McIntosh, Dees, et al., 1967).

Pojem koronavírusy bol prvýkrát použitý v roku 1968 pri popise novej skupiny RNA vírusov s morfológickou podobnosťou, ktoré sú odlišné od akýchkoľvek vtedy známych RNA vírusov (Cunningham; et al., 1968). Národným výborom pre taxonómiu vírusov (ICTV, z angl. International Committee on Taxonomy of Viruses) bol oficiálne uznaný názov rodu *Coronavirus* v roku 1971 a názov čeľade *Coronaviridae* v roku 1975 (Fenner & Maurin, 1976). Podrobnejším skúmaním koronavírusov bolo zistené, že príbuznosť medzi jednotlivými kmeňmi nebola vždy blízka, čo naznačovalo, že čeľaď *Coronaviridae* je pravdepodobne

relatívne rozsiahla a rozmanitá skupina obsahujúca veľké množstvo zatiaľ neobjavených vírusov. V nasledujúcich dekádach bolo objavené množstvo koronavírusov, napádajúcich potkany, myši, hydinu, psy, mačky a ďalšie cicavce a vtáky, spôsobujúcich širokú škálu ochorení ako je gastroenteritída, hepatitída, encefalitída, zápaly respiračného traktu a ďalšie ochorenia. Nové ľudské koronavírusy boli objavená relatívne nedávno. V roku 2003 bol objavený koronavírus SARS-CoV spôsobujúci ťažký akútny respiračný syndróm (SARS, z angl. Severe Acute Respiratory Syndrome) (Drosten et al., 2003, Ksiazek et al., 2003). V roku 2004 boli objavené ľudské koronavírusy (HCoV) NL63 (Lia van der Hoek et al., 2004) a HCoV HKU1 (Woo et al., 2005). Koronavírusy HCoV NL63 a HCoV HKU1 spôsobovali nachladenie a u zasiahnutých jedincov mali tieto infekcie prevažne mierny priebeh. O niekoľko rokov neskôr bol objavený MERS-CoV spôsobujúci závažné ochorenie Blízkovýchodný respiračný syndróm (MERS, z angl. Middle East Respiratory Syndrome) (Zaki et al., 2012) a v roku 2019 bol objavený posledný zatiaľ známy koronavírus SARS-CoV-2 spôsobujúci koronavírusové ochorenie 19 (COVID-19, z angl. Coronavirus disease 19) (Gorbalenya et al., 2020).

### 2.1.2 Klasifikácia

V súčasnosti sú koronavírusy zaradené do domény *Riboviria*, ríše *Orthornavirae*, kmeňa *Pisuviricota*, triedy *Pisoniviricetes*, rádu *Nidovirales*, podrádu *Cornidovirineae*, čeľadi *Coronaviridae* a podčeľadi *Orthocoronavirinae*, ktorá je rozdelená do rodov *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* a *Deltacoronavirus*.

<b>Doména</b>	<i>Riboviria</i>
<b>Ríša</b>	<i>Orthornavirae</i>
<b>Kmeň</b>	<i>Pisuviricota</i>
<b>Trieda</b>	<i>Pisoniviricetes</i>
<b>Rád</b>	<i>Nidovirales</i>
<b>Podrád</b>	<i>Cornidovirineae</i>
<b>Čeľad'</b>	<i>Coronaviridae</i>
<b>Podčeľad'</b>	<i>Orthocoronavirinae</i>
<b>Rod</b>	<i>Alphacoronavirus</i>
	<i>Betacoronavirus</i>
	<i>Gamacoronavirus</i>
	<i>Deltacoronavirus</i>

**Tabuľka 1:** Súčasná klasifikácia koronavírusov (<https://ictv.global/taxonomy/>).

Rod *Alphacoronavirus* je ďalej rozdelený do pätnástich podrodov, rod *Betacoronavirus* do podrodov *Embecovirus*, *Hibecovirus*, *Merbecovirus*, *Nobecovirus* a *Sarbecovirus*, rod *Gamacoronavirus* aj rod *Deltacoronavirus* je rozdelený do troch podrodov.

Alfakoronavírusy sú špecifické prítomnosťou génu kódujúceho neštruktúrny proteín 1 (nsp1) špecifickej veľkosti a sekvencie (Connor & Roper, 2007) a doplnkového génu kódujúceho špecifický membránový proteín (M) (Müller et al., 2010). Medzi alfakoronavírusy patria ľudské koronavírusy 229E a NL63 ako aj mnoho ďalších zvieracích koronavírusov infikujúcich primárne cicavce.

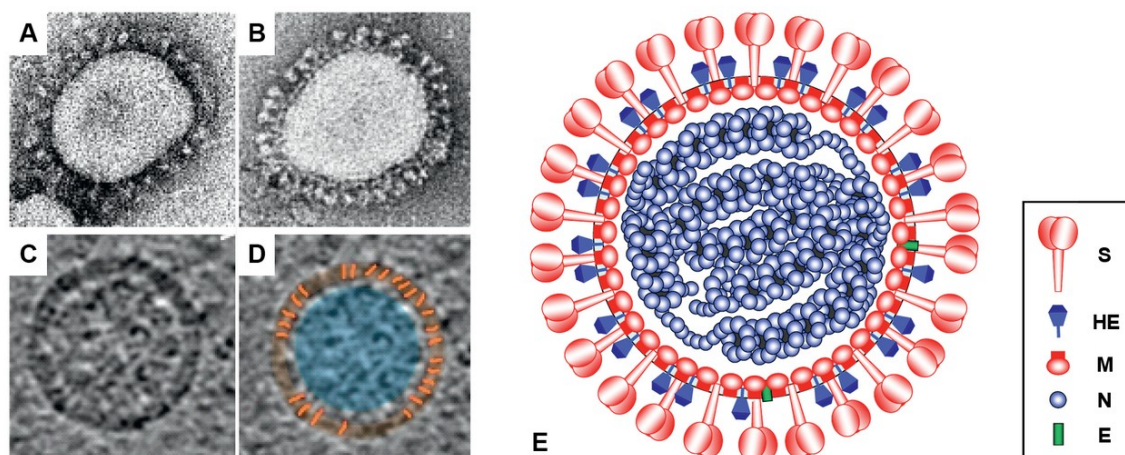
Pre betakoronavírusy je typická prítomnosť génu kódujúceho nsp1, ktorý sa líši vo veľkosti aj sekvencii od nsp1 alfakoronavírusov, ako aj prítomnosť špecifických doplnkových génov. Do rodu *Betacoronavirus* patria všetky zatiaľ známe ľudské koronavírusy spôsobujúce vážne, až smrteľné ochorenia: SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2. Medzi betakoronavírusy patria aj ďalšie zvieracie koronavírusy napádajúce primárne cicavce (zhrnuté v Woo et al., 2023).

Gamakoronavírusy sa vyznačujú neprítomnosťou génu, kódujúceho nsp1 a prítomnosťou špecifických doplnkových génov. Všetky gamakoronavírusy infikujú vtáky s výnimkou vírusu SW1 infikujúceho veľryby a delfíny (Mihindukulasuriya et al., 2008).

Deltakoronavírusy sú špecifické neprítomnosťou génu kódujúceho proteín nsp1 a prítomnosťou špecifického setu doplnkových génov. K deltakoronavírusom patria vírusy infikujúce primárne vtáky, s výnimkou koronavírusu HKU15 infikujúceho prasatá, ktorý bol nájdený aj u ľudí (Lednicky et al., 2021).

### **2.1.3 Morfológia**

Koronavírusy tvoria obvykle sférické častice s priemerom 80-120 nm o celkovej veľkosti 40 000 kDa. Virióny sú kryté lipidickou membránou hrubou 7-8 nm, čo je takmer dvakrát viac ako priemerná biologická membrána (Bárcena et al., 2009). Na povrchu viriónov sa nachádzajú výbežky dlhé asi 20 nm s úzkou stopkou a hlavicou s priemerom asi 10 nm (Almeida & Tyrrell, 1967) tvorené povrchovým S glykoproteínom. Niektoré koronavírusy majú na povrchu ďalšie výbežky dlhé 5-7 nm, ktoré tvorí glykoproteín hemaglutinín esteráza (HE) (Hurdiss et al., 2020).

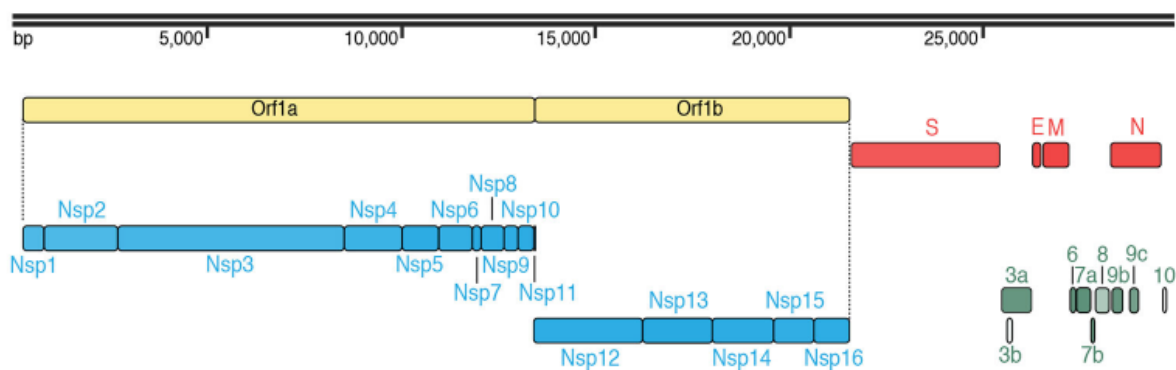


**Obrázok 1:** Morfológia koronavírusovej častice. A,B – snímky koronavírusových častíc pozorovaných elektrónovou mikroskopiou vytvorené metódou negatívneho farbenia. A – virión laboratórneho kmeňa A59 vírusu myšej hepatitídy (MHV) s chýbajúcou expresiou proteínu HE, B – virión rovnakého kmeňa MHV s opravenou expresiou proteínu HE. C,D – cryo-elektrónové tomografie viriónu MHV, C – samotná snímka, D – snímka C s vyznačenými štruktúrami. Oranžovou farbou označený lipidový obal so zvýraznenými nápadnými ryhami, modrou farbou označená nukleokapsidová oblasť. E – schematické zobrazenie koronavírusovej častice, S – spike proteín, HE – hemaglutinín esteráza, M – membránový proteín, N – nukleokapsidový proteín, E – obalový proteín (prevzaté z Genus, 2012).

## 2.1.4 Genóm

Genóm koronavírusov je tvorený nesegmentovanou jednovláknovou molekulou RNA v pozitívnej forme (obr. 2). Veľkosť genómu je v rozmedzí od 26,2 kb u vírusu HKU20 po 31.7 kb u vírusu SW1, čo predstavuje najväčší genóm u všetkých známych RNA vírusov (zhrnuté v Woo et al., 2010). Na 5' konci sa nachádza 5' čiapočka tvorená metylovaným guanínom a na 3' poly (A) koniec tvorený segmentom niekoľkých desiatok adenínov. Kódujúca oblasť je na 5' aj 3' konci ohraničená netranslatovanou oblasťou (UTR, z angl. untranslated region) tvorenou niekoľkými slučkami regulujúcimi replikáciu a transláciu RNA (Fehr & Perlman, 2015). Genóm koronavírusov pozostáva z variabilného množstva (6-11) otvorených čítacích rámcov (Orfs, z angl. Open reading frames). Dve tretiny vírusovej RNA zaberá Orf1ab, translatovaný do dvoch polyproteínov pp1a a pp1ab, ktorý kóduje 15-16 neštruktúrnych proteínov. Ostatné Orfs kódujú jednotlivé štruktúrne a doplnkové proteíny (Guo et al., 2020). Obvykle je kódujúca oblasť štruktúrovaná nasledovne: 5'-Orf1ab-proteín S („spike“ proteín)-proteín E (obalový proteín, z angl. envelope)-proteín M (membránový proteín, z angl. membrane)-proteín N (nukleokapsidový proteín, z angl.

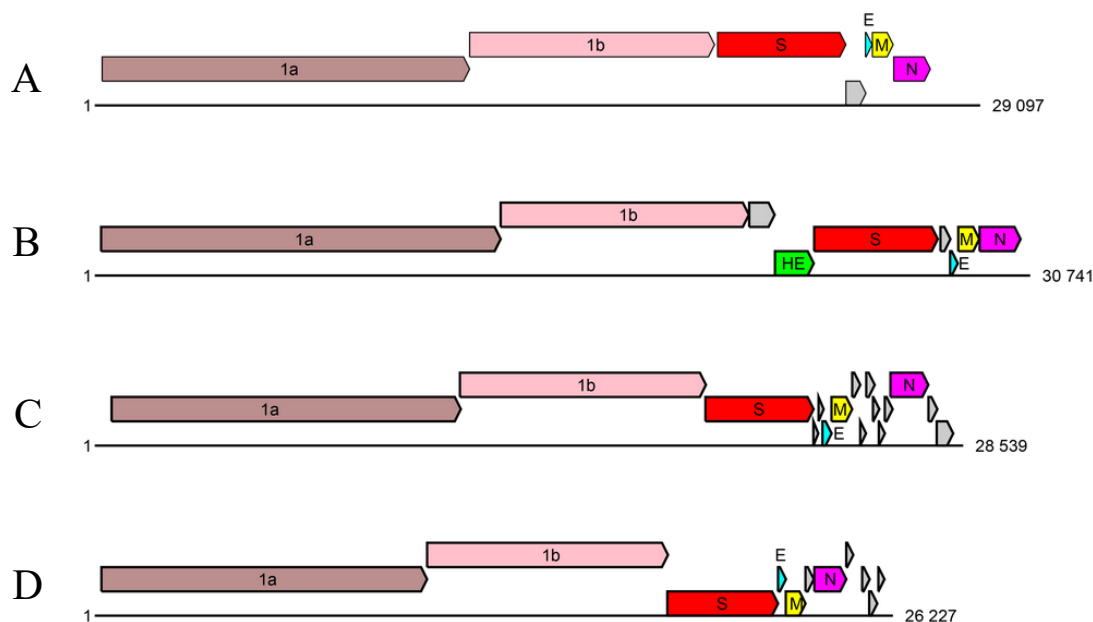
nucleocapside)-3'. Na začiatku niektorých génov sa nachádza tiež transkripčná regulačná sekvencia (TRS, z angl. Transcription regulatory sequence) dôležitá pre proces templátovej zámény počas transkripcie RNA.



**Obrázok 2:** Schematické zobrazenie kódujúcej oblasti genómu koronavírusu SARS-CoV-2. Orf1a a Orf1b – otvorené čítacie rámce tvorené génmi kódujúcimi neštruktúrne proteíny, Nsp1-16 – gény kódujúce neštruktúrne proteíny, S – gén kódujúci proteín spike, E – gén kódujúci obalový proteín, M – gén kódujúci membránový proteín, N – gén kódujúci nukleokapsidový proteín. Zelenou farbou sú označené gény kódujúce doplnkové proteíny, čiernou farbou je označená veľkostná škála v počte báz (upravené podľa Gordon et al., 2020).

Prítomnosť génov kódujúcich doplnkové proteíny je veľmi variabilná medzi jednotlivými skupinami koronavírusov (obr. 3) (zhrnuté v Woo et al., 2010).





**Obrázok 3:** Schematické zobrazenie otvorených čítacích rámcov (Orfs) u vybraných koronavírusov. 1a, 1b – Orf neštruktúrnych proteínov; HE, S, E, M, N – Orf štruktúrnych proteínov; sivé šípky – Orf doplnkových proteínov; číslom označená veľkosť genómu. A – alfakoronavírus AMALF infikujúci netopiere, B – ľudský koronavírus OC43 patriaci medzi betakoronavírusy, C – vtáčí gamakoronavírus CB17, D – vtáčí deltakoronavírus HKU20 (upravené podľa Woo et al., 2023).

### 2.1.5 Vírusové proteíny

Proteínový obal tvoria tri základné štruktúrne proteíny: spike (S) glykoproteín, obalový (E) proteín a membránový (M) proteín v molárnych pomeroch E:S:M približne 1:20:300 (Godet et al., 1992). Najviac viditeľný je glykoproteín S tvoriaci, pre koronavírusy typické, výbežky na povrchu častíc. U niektorých betakoronavírusov sa ale vyskytuje ešte štvrtý povrchový glykoproteín hemaglutinín esteráza (HE) (zhrnuté v De Groot, 2006). Proteín S je vo väčšine prípadov zodpovedný za väzbu na receptor hostiteľskej bunky (Collins et al., 1982), aj keď u ľudského koronavírusu NL63 má túto úlohu pravdepodobne proteín M (Naskalska et al., 2019).

Glykoproteín S je veľký transmembránový proteín s N-koncom na vonkajšej strane a C-koncom na vnútornej strane častice. Typické výbežky na povrchu viriónov koronavírusov sú tvorené homotrimérou štruktúrou proteínu S (Song et al., 2004). Veľkosť monomérmého proteínu S je 128-160 kDa, po N-glykosylácii sa táto veľkosť zvýši na 150-200 kDa (zhrnuté v Masters, 2006). Proteín S pozostáva z veľkej ektodomény, transmembránovej domény,

s jedným transmembránovým úsekom, a krátkej endogénnej časti. Ektodoména je zložená z S1 podjednotky, tvoriacej hlavicu a S2 podjednotky, tvoriacej stopku, ktoré sú v priebehu vzniku častice proteoliticky štiepené. Po štiepení sú podjednotky S1 a S2 nekovalentne spojené. U alfa-koronavírusov k tomuto štiepeniu nedochádza a monomér proteínu S zostáva v neštiepenej forme. Na S1 podjednotke sa nachádza doména pre väzbu bunkového receptora, zatiaľ čo S2 podjednotka je zodpovedná za fúziu vírusovej lipidickej membrány s hostiteľskou membránou (zhrnuté v Lalchhandama, 2020).

Proteín M je najfrekvencovanejšie zastúpený štruktúrny proteín v koronavírusovej častici (Godet et al., 1992), dávajúci viriónu sférický tvar. Jeho neglykosylovaná forma má veľkosť 25 až 30 kDa, podlieha ale mnohonásobnej glykosylácii (Locker et al., 1992). Pozostáva z N-terminálnej ektodomény, troch transmembránových úsekov a C-terminálnej domény orientovanej do vnútra častice. Proteínová sekvencia M proteínu je relatívne významne konzervovaná u príbuzných druhov koronavírusov ale odlišná medzi málo príbuznými druhmi (zhrnuté v Masters, 2006).

Proteín E je malý, integrálny membránový proteín o veľkosti 8,4 až 12 kDa. Pozostáva z krátkej hydrofilnej N-koncovej časti, veľkej hydrofóbnej transmembránovej časti a dlhšej C-koncovej hydrofilnej časti. Transmembránová hydrofóbna časť obsahuje aspoň jeden oligomerujúci amfipatický alfa-helixový úsek, formujúci iónový kanál (zhrnuté v Schoeman & Fielding, 2019). Počas replikačného cyklu vírusu je proteín E v bunke produkovaný vo veľkom množstve ale len malá časť je vložená do vznikajúcich viriónov (Venkatagopalan et al., 2015). Jeho presná funkcie nie je úplne známa, ale vytvorenie rekombinantných koronavírusov s chýbajúcim génom kódujúcim proteín E viedlo k ochromeniu maturácie a výraznému zníženiu titrov vírusu (DeDiego et al., 2007, Ortego et al., 2007), čo poukazuje na dôležitosť proteínu E pre správnu maturáciu a tvorbu vírusovej častice.

U niektorých betakoronavírusov sa na povrchu častíc nachádzajú ďalšie, menšie výbežky, dlhé 5 až 7 nm, tvorené hemaglutinín esterázou (HE). Veľkosť HE je okolo 400 aminokyselín, má niekoľko glykosylačných miest a vo virióne tvorí homodiméry. Konkrétna funkcia resp. funkcie nie sú úplne známe ale niekoľko štúdií poukazuje na jej dôležitosť pri vstupe vírusovej častice do hostiteľskej bunky (zhrnuté v De Groot, 2006).

Vo vnútri viriónu sa nachádza nukleokapsidový proteín N. Jeho veľkosť sa pohybuje v rozmedzí 43 až 50 kDa (zhrnuté v Masters, 2006). S genómovou RNA vírusu tvorí ribonukleoproteínový komplex. Vďaka veľkému množstvu serínu je proteín fosforylovaný

(Stohlman & Lai, 1979). Je zložený z N-koncovkej a C-koncovkej domény, ktoré sú schopné viazať RNA (Kuo & Masters, 2013). Proteín N viaže tiež neštruktúrny proteín 3 (nsp3) (Hurst et al., 2013) a proteín M (Sturman et al., 1980). Tieto interakcie sú potrebné pre správny prechod replikačným cyklom a tvorbu nových viriónov.

Všetky štruktúrne proteíny vznikajú zo samostatných otvorených čítacích rámcov (Orfs). Neštruktúrne proteíny (nsps) koronavírusov sú rozdelené do dvoch Orfs: Orf1a a Orf1b. Nsps vznikajú ako dve polyproteíny (pp): kratší pp1a tvorený proteínmi nsp1 až nsp11 a dlhší pp1ab tvorený proteínmi nsp1 až nsp16 s chýbajúcim nsp11, ktorý je kvôli programovanému ribozomálnemu posunu (PRF, z angl. programmed ribosomal frameshifting) vynechaný. Samostatné nsp vznikajú proteolitickým štiepením polyproteínov vírusovými proteázami nsp3 a nsp5 (zhrnuté v Kung et al., 2022). Jednotlivé koronavírusové nsp a ich zatiaľ známe a odhadované funkcie sú uvedené v tabuľke 2.

<b>Neštruktúrny proteín</b>	<b>Funkcia</b>
<b>Nsp1*</b>	Antagonista IFN
	Degradácia hostiteľských mRNA
	Inhibícia translácie
	Zastavenie bunkového cyklu
<b>Nsp2</b>	Asociovaný s RTC, presná funkcia zatiaľ neznáma
<b>Nsp3</b>	Papain-like proteáza PL1 <sup>pro</sup> – štiepenie polyproteínov
	Papain-like proteáza PL2 <sup>pro</sup> – štiepenie polyproteínov, deubiquitinačný enzým
	ADP-ribóza-1''-fosfát fosfohydroláza
	Väzba RNA, väzba proteínu N
	Antagonista INF
	Formovanie DMV
<b>Nsp4</b>	Formovanie DMV
<b>Nsp5</b>	3C-like proteáza 3CL <sup>pro</sup> – štiepenie polyproteínov
<b>Nsp6</b>	Formovanie DMV
<b>Nsp7</b>	Väzba ssRNA
	Podjednotka holoenzýmu RdRp
<b>Nsp8</b>	Podjednotka holoenzýmu RdRp
	(Pravdepodobne) primáza, tvorba komplexu s nsp7

	(Pravdepodobne) 3'-koncová adenylyltransferáza
<b>Nsp9</b>	Asociovaný s RTC, zahrnutý v tvorbe 5' čiapočky
	(Pravdepodobne) väzba ssRNA
<b>Nsp10</b>	Asociovaný s RTC, kofaktor pre nsp14 exonukleázovú a nsp16 metytransferázovú aktivitu
	Regulácia PRF
<b>Nsp11</b>	Neznáma
<b>Nsp12</b>	RdRp
<b>Nsp13</b>	Helikáza
	RNA 5'-trifosfatáza
<b>Nsp14</b>	3'-5' exoribonukleáza
	Guanín-N7-metyltransferáza – tvorba 5' čiapočky
<b>Nsp15</b>	Uridylát-špecifická endoribonukleáza
<b>Nsp16</b>	Ribóza-2'-O-methyltransferáza – tvorba 5' čiapočky

**Tabuľka 2:** Koronavírusové neštruktúrne proteíny (nsp) a ich známe a odhadované funkcie. IFN – interferón, RTC – replikázový/transkriptázový komplex (z angl. Replicase/transcriptase complex), DMV – dvojmembránový váčok, RdRp – RNA dependentná RNA polymeráza, PRF – programovaný ribozomálny posun. \* – neprítomný u gamakoronavírusov a deltakoronavírusov (upravené podľa Woo et al., 2023).

Doplňkové proteíny, vznikajúce zo samostatných Orf, sú najviac variabilné vo veľkosti, sekvencii alebo vôbec ich prítomnosti medzi rôznymi koronavírusmi. Tieto proteíny obvykle nie sú esenciálne pre replikáciu a vznik vírusových častíc, majú ale dôležitú úlohu vo virulencii daného vírusu. Doplňkové proteíny obvykle interagujú so zložkami hostiteľských buniek a ovplyvňujú tak mechanizmy imunitnej odpovede a ďalších bunecných ciest vedúcich k ochrane pred vírusovými infekciami, ako sú autofágia a apoptóza, čím prispievajú k patogenéze vírusu (zhrnuté v Hurtado-Tamayo et al., 2023).

## 2.1.6 Replikačný cyklus

### 2.1.6.1 Vstup viriónu do bunky

Prvým krokom, spúšťajúcim replikačný cyklus, je zachytenie vírusovej častice na povrch hostiteľskej bunky. Za tento proces je u väčšiny koronavírusov zodpovedný proteín S. Súčasťou S1 podjednotky proteínu S je receptor väzbová doména (RBD, z angl. Receptor binding

domain) viažuca bunkový receptor. RBD doména sa môže nachádzať na N-konci S1 podjednotky, ako to je u MHV (Kubo et al., 1994) alebo na C-konci S1 podjednotky, ako to je u ľudských koronavírusov (HCoV, z angl. Human coronaviruses) HCoV-229E (Bonavia et al., 2003), HCoV-HKU1 (Qian et al., 2015), HCoV-NL63 (Lin et al., 2008) SARS-CoV (Wong et al., 2004) a MERS-CoV (N. Wang et al., 2013). Interakcia medzi RBD proteínu S a bunkovými receptormi určuje druhovú aj tkanivovú špecificitu daného koronavírusu (tab. 3).

<b>Rod</b>	<b>Druh</b>	<b>Bunkový tropizmus</b>	<b>Bunkový receptor</b>
<b>Alfakoronavírusy</b>	NL63	Alveolárne bunky typu I a typu II, endoteliálne bunky, riasinkové bronchiálne bunky	ACE2
	229E	Alveolárne epiteliálne bunky typu I, alveolárne makrofágy	APN
	TGEV	Neriasinkové bronchiálne bunky	APN
<b>Betakoronavírusy</b>	OC43	Epiteliálne a neuronálne bunky	9-O-acetylovaná sialová kyselina
	HKU1	Epiteliálne bunky dýchacích ciest, alveolárne epiteliálne bunky typu II	9-O-acetylovaná sialová kyselina
	MHV	Leukocyty, epiteliálne a endoteliálne bunky	CEACAM1
	MERS-CoV	Endoteliálne bunky	DPP4
	SARS-CoV	Alveolárne bunky typu I a typu II, endoteliálne bunky, riasinkové bronchiálne bunky	ACE2
	SARS-CoV-2	Alveolárne bunky typu I a typu II, endoteliálne bunky, riasinkové bronchiálne bunky	ACE2

**Tabuľka 3:** Rozpoznávaný bunkový receptor a najčastejší bunkový tropizmus vybraných alfa a beta koronavírusov. ACE2 – angiotenzín-konvertujúci enzým 2 (z angl. Angiotensin-converting enzyme 2), APN – aminopeptidáza N, CEACAM1 – Bunková adhézna molekula 1 súvisiaca s karcinoembryonálnym antigénom (z angl. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1), DPP4 – dipeptidyl peptidáza 4 (upravené podľa Wędrowska et al., 2020).

Po naviazaní RBD proteínu S na receptor dochádza k proteolitickému štiepeniu proteínu S, pričom dôjde k oddeleniu podjednotky S1, nesúcej RBD, od fúznej podjednotky S2 (Belouzard et al., 2009). Na vstup vírusovej častice do cytosolu je potrebné druhé proteolitické štiepenie proteínu S v mieste S2' vo vnútri S2 podjednotky, za ktoré je obvykle zodpovedná transmembránová serínová proteáza 2 (TMPRSS2, z angl. transmembrane serine protease 2), katepsínová alebo iná hostiteľská proteáza (Kleine-Weber et al., 2018). Týmto štiepením dochádza k odhaleniu fúzneho peptidu, nesúceho hydrofóbne úseky, ktorý následne tvorí oligomerný alfa-helikálny komplex v antiparalelnom usporiadaní (Bosch et al., 2003). Tvorba tohto komplexu vedie k splynutiu bunkovej membrány a vírusového lipidického obalu a uvoľneniu genómu vírusu do cytosolu. Fúzia vírusového obalu a bunkovej membrány môže prebehnúť priamo medzi vírusom a cytoplazmatickou membránou alebo medzi vírusom a membránou endozómu, po jeho acidifikácii (zhrnuté v Y. Wang et al., 2020).

#### **2.1.6.2 Tvorba neštruktúrnych proteínov**

Po uvoľnení vírusového genómu do cytosolu hostiteľskej bunky dochádza k translácii génov kódujúcich neštruktúrne proteíny (nsp), nachádzajúcich sa v Orf1a a Orf1b. Transláciou tohto úseku dochádza k tvorbe dvoch polyproteínov (pp): pp1a, nesúceho nsp1-11 a pp1ab, nesúceho nsp1-16 s chýbajúcim proteínom nsp11. Pp1ab vzniká vďaka programovanému ribozomálnemu posunu (PRF), ku ktorému dochádza na základe prítomnosti pseudoslučkovej sekundárnej štruktúry, ktorá, v niektorých prípadoch, zastaví translatujúci ribozóm na špecifickej sekvenci, čo vedie k jeho posunu a zmene čítacieho rámca (Baranov et al., 2005). Pp1a a pp1ab sú následne štiepené vírusovými proteázami na jednotlivé nsp. Proteín nsp3 predstavujúci Papain-like proteázu zodpovedá za štiepenie proteínov nsp1, nsp2 a nsp3 (zhrnuté v Mielech et al., 2014). Zvyšné nsp vznikajú štiepením vírusových polyproteínov proteínom nsp5, predstavujúcim hlavnú vírusovú 3C-like proteázu (Anand et al., 2002).

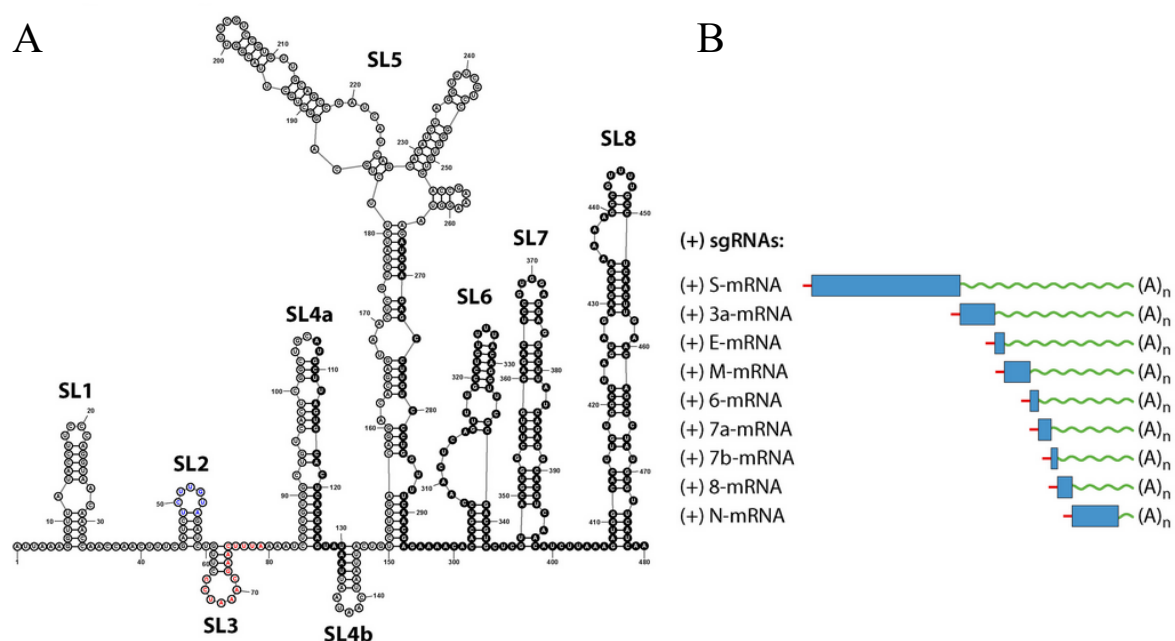
Niektoré nsp vytvárajú replikázovo-transkriptázový komplex (RTC) potrebný na syntézu vírusových RNA zahŕňajúcu replikáciu a transkripciu sub-genómových RNA molekúl, zatiaľ čo iné nsp sa zúčastňujú vzniku bunkových suborganel a tým tvorby vhodného prostredia pre procesy replikácie a transkripcie vírusovej RNA. Proteíny nsp7-11 majú skôr podporné úlohy

pre vírusovú replikáciu a transkripciu, ako je tvorba RNA primerov, väzba a ochrana ssRNA alebo sú dôležitým kofaktorom pre enzýmy RTC. Proteíny nsp12-16 predstavujú hlavné enzýmy, potrebné pre procesy RTC, ako je RNA-dependentná RNA polymeráza, helikáza, pre koronavírusy typická exoribonukleáza a metyltransferázy, potrebné pre tvorbu 5' čiapočky. Proteíny nsp3-6 obsahujú rozsiahle hydrofóbne oblasti, zúčastňujú sa tvorby dvojmembránových váčkov, odvodených od endoplazmatického retikula a sú teda esenciálne pre tvorbu vhodného prostredia pre priebeh procesov RTC (zhrnuté v Neuman et al., 2014). Proteín nsp1 je dôležitý pre reguláciu translácie bunkových a vírusových mRNA. Viaže 18S rRNA a zabraňuje zloženie ribozómu na mRNA. Nsp1 je z väzby s 18S rRNA uvoľnený po rozpoznaní špecifickej štruktúry na 5' konci RNA vírusu a tým umožňuje špecificky tvorbu vírusových RNA (Banerjee et al., 2020).

### **2.1.6.3 Replikácia a transkripcia**

Po vzniku neštruktúrnych proteínov (nsp) a tvorbe replikázovo-trankriptázového komplexu (RTC) dochádza k produkcii genómovej a niekoľkých subgenómových vírusových RNA. Subgenómové RNA (sgRNA) fungujú ako mRNA pre tvorbu štruktúrnych a doplnkových proteínov. Genómová aj subgenómové RNA vznikajú z intermediátov v negatívnej forme. Všetky sgRNA nesú 3' koncovú sekvenciu zhodnú s genómovou RNA a časť netranslatovanej oblasti 5' konca genómu – 5' vedúcu sekvenciu (z angl. 5' Leader sequence), potrebnú pre umožnenie translácie vírusovej sgRNA (zhrnuté v Y. Wang et al., 2020). V UTR oblasti na 5' konci sa nachádzajú špecifické sekundárne štruktúry formujúce slučky (SL, z angl. stem-loop), ktoré majú regulačnú funkciu. V regulácii translácie vírusových sgRNA má dôležitú úlohu 5' vedúca oblasť obsahujúca SL1 a SL2. Tieto slučky sú rozpoznané proteínom nsp1, naviazaným na 18S rRNA ribozómu. Po rozpoznaní SL1 a SL2 dochádza k uvoľneniu proteínu nsp1 z väzby s ribozómom a umožneniu priebehu translácie (Banerjee et al., 2020). Negatívne formy sgRNA vznikajú prerušovanou RNA syntézou, v ktorej sú dôležité transkripčné regulačné sekvencie (TRS). TRS sú dlhé asi 15 nukleotidov a nachádzajú sa vo veľmi blízkom okolí génov kódujúcich väčšinu štruktúrnych a doplnkových proteínov (D. Wang et al., 2021). Vznik negatívnej formy sgRNA začína prepisom 3' konca pôvodného genómového vlákna RNA-dependentnou RNA polymerázou (RdRp). V okamihu, kedy RdRp dôjde k TRS sekvencii určitého génu, môže polymeráza buď ďalej pokračovať v syntetizovaní reťazca negatívnej formy sgRNA alebo preskočiť, vďaka komplementárnemu párovaniu TRS daného génu s TRS vedúcej sekvencie (TRS-L), na TRS vedúcu sekvenciu na 5' konci genómu a vytvoriť tak negatívnu formu sgRNA nesúcu 5' vedúcu oblasť. Mechanizmom prerušovanej

syntézy môžu koronavírusy vytvárať rôzne dlhé sgRNA s 5' vedúcou oblasťou, nesúcou SL1 a SL2, ktoré sú potrebná pre umožnenie translácie vírusových sgRNA (Sun et al., 2021). Pozitívne formy sgRNA následne vznikajú neprerušovaným prepisom negatívnych foriem sgRNA.



**Obrázok 4:** A: 5' UTR oblasť genómu koronavírusu SARS-CoV-2, kmeň Wuhan-Hu-1. SL1 až SL8 – slučky, červenou farbou označená TRS vedúcej sekvencie. B: subgenómové RNA tvorené vírusom SARS-CoV-2, kmeň Wuhan-Hu-1. Červenou farbou označená 5' TRS vedúcej sekvencie (upravené podľa Kung et al., 2022).

#### 2.1.6.4 Skladanie a uvoľnenie nových viriónov

Poslednými krokmi replikačného cyklu koronavírusov je zloženie nových viriónov a ich následné uvoľnenie z hostiteľskej bunky. Hlavnými zložkami tohto procesu sú štruktúrne proteíny S, M, E a N. Proteíny S, M a E sú translatované, vložené do endoplazmatického retikula (ER) a sekrečnou dráhou presunuté do intermediárneho kompartmentu endoplazmatického retikula a golgiho aparátu (ERGIC, z angl. endoplasmic-reticulum–Golgi intermediate compartment), kde dochádza k väzbe genómovej RNA vírusu, naviazanej na proteín N, k membráne ERGIC a tvorbe viriónov (zhrnuté v de Haan & Rottier, 2005). Hlavným proteínom pre tvorbu vírusových častíc je proteín M, ktorý je zastúpený v najväčšom množstve a interaguje s väčšinou štruktúrnych proteínov. Pre formovanie viriónov je esenciálna prítomnosť proteínu E, ktorý je zastúpený v najmenšom množstve vo výsledných časticiach. Jedna z jeho funkcií je zabránenie agregácie proteínu M do nerozpustných komplexov



(Boscarino et al., 2008) a bez jeho prítomnosti nedochádza k tvorbe prázdnych vírusových častíc (VLPs, z angl. Virus-like particles) (Bos et al., 1996). U niektorých koronavírusov je na tvorbu viriónov dostačujúca prítomnosť proteínov M a E (Vennema et al., 1996), u iných je potrebný aj proteín N (Siu et al., 2008). Proteín S je tiež vkladajú do viriónov, jeho prítomnosť ale nie je esenciálna pre ich tvorbu. Väzba proteínu M s proteínom N naviazaným na genómovú RNA vedie k dokončeniu formovania vírusových častíc. Následne prechádzajú virióny do golgiho aparátu a trans-Golgiho siete (TGN, z angl. Trans-Golgi network), kde dochádza k štiepeniu proteínu S na podjednotky S1 a S2, ktoré ďalej interagujú nekovalentne. U niektorých koronavírusov sú maturované virióny následne uvoľnené z hostiteľskej bunky, za využitia lyzozomálneho transportu (Ghosh et al., 2020).

## 2.2 SARS-CoV-2

Koronavírus spôsobujúci ťažký akútny respiračný syndróm (SARS-CoV-2, z angl. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) je ôsmy a najnovšie objavený ľudský koronavírus identifikovaný začiatkom roku 2020. Je pôvodcom globálnej pandémie koronavírusového ochorenia 19 (COVID-19, z angl. Coronavirus disease 19), tvoriaceho rozsiahle respiračné infekcie (Wu et al., 2020, Zhu et al., 2020). Patrí medzi betakoronavírusy, podrod Sarbecovirus a je zaradený medzi SARS-príbuzné koronavírusy (Gorbalenya et al., 2020). Veľkosť jeho genómu je 29.9 kb a jeho organizácia je zhodná s typickým genómom betakoronavírusov. Asi dve tretiny genómu sú tvorené génmi kódujúcimi 16 neštruktúrnych proteínov nsp1-16, zvyšná tretina je tvorená génmi kódujúcimi štruktúrne proteíny S, M, E, N a génmi kódujúcimi 9 doplnkových proteínov. Sekvencia genómu SARS-CoV-2 je 79% zhodná s koronavírusom SARS-CoV a 50% zhodná s koronavírusom MERS-CoV. Aminokyselinová sekvencia štruktúrnych proteínov SARS-CoV-2 je, s výnimkou proteínu S, viac ako 90% zhodná so sekvenciou štruktúrnych proteínov vírusu SARS-CoV a sekvencia väčšiny neštruktúrnych proteínov SARS-CoV-2 zdieľa 85% zhodu so sekvenciou nsp koronavírusu SARS-CoV (J. F. Chan et al., 2020, Lu et al., 2020). Proteín S SARS-CoV-2 je dlhší ako proteín S príbuzných koronavírusov a zdieľa okolo 77% zhodu aminokyselinovej sekvencie s koronavírusmi ľudí a cibetiek, a 75-97% zhodu s koronavírusmi netopierov patriacimi do rovnakého podrodu (zhrnuté v Hu et al., 2021). SARS-CoV-2 viaže na povrchu hostiteľskej bunky, rovnako ako SARS-CoV, receptor angiotenzín-konvertujúci enzým 2 (ACE2) (Hoffmann et al., 2020). Okrem ľudského ACE2 rozpoznáva s rôznou účinnosťou aj ACE2 u prasiat, fretiek, makakov rhesus, cibetiek, šupinatcov, mačiek, králikov, psov a ďalších zvierat (Chandrashekar et al., 2020, Shi et al., 2020, Zhao et al., 2020), čo poukazuje na relatívne široký

rozsah potenciálnych hostiteľov. Pre vstup vírusových častíc do hostiteľskej bunky je, ako u mnohých ďalších koronavírusov, potrebné proteolytické štiepenie proteínu S, ktoré je sprostredkované hostiteľskými proteázami (Hoffmann et al., 2020, Shang et al., 2020). Najbližším známym príbuzným vírusu SARS-CoV-2 je koronavírus RaTG13, infikujúci netopiere, s 96,2% zhodou v celogenómovej sekvencii. Vo všetkých otvorených čítacích rámcoch (Orfs), vrátane proteínu S, zdieľa vírus RaTG13 so SARS-CoV-2 viac ako 90% podobnosť. Ďalšími blízkymi príbuznými sú netopierí koronavírus RmYN02, s 93,3% genómovou zhodou a 97,2% zhodou v génoch tvoriacich Orf1a a Orf1b (Hong Zhou et al., 2020) a, s čiastočne menšou zhodou, koronavírusy ZC45 a ZXC21 vyskytujúce sa tiež u netopierov (zhrnuté v Hu et al., 2021). Existencia blízko príbuzných koronavírusov vyskytujúcich sa u netopierou naznačuje, že netopiere pravdepodobne predstavujú rezervoár pre SARS-CoV-2 (Lau et al., 2020). Ďalšie SARS-CoV-2 príbuzné koronavírusy s takmer identickou receptor väzbovou doménou (RBD) boli objavené u šupinatcov. Na rozdiel od netopierov, u šupinatcov infikovaných koronavírusmi boli pozorované histopatologické a klinické prejavy ochorenia, čo naznačuje, že šupinatce nie sú rezervoárom týchto koronavírusov ale skôr medzihostiteľom (Xiao et al., 2020). Napriek rozsiahlym výskumom, zatiaľ nebol určený prechodný hostiteľ, spôsob prenosu vírusu na človeka ani konkrétny priamy predchodca koronavírusu SARS-CoV-2.

## 2.3 Nsp14

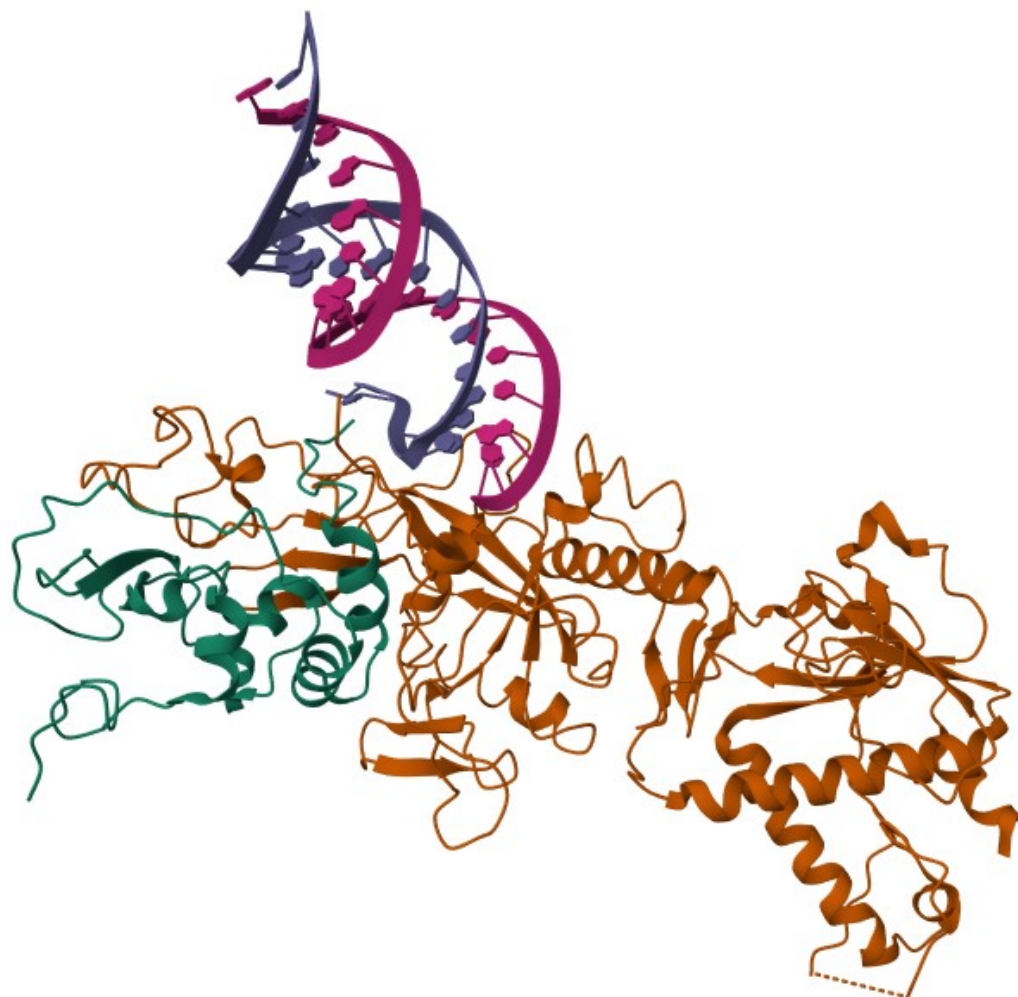
Neštruktúrny proteín 14 (nsp14) je štrnásty neštruktúrny proteín koronavírusov. Je kódovaný génom nachádzajúcim sa v Orf 1b. Vzniká ako súčasť polyproteínu pp1ab, z ktorého je vyštiepený hlavnou koronavírusovou 3C-like proteázou predstavujúcou proteín nsp5 (Anand et al., 2002). Nsp14 má dve domény: N-koncovú exonukleázovú doménu (ExoN) s 3'-5' exoribonukleázovou aktivitou a C-koncovú metyltransferázovú doménu s N7-guanín metyltransferázovou aktivitou, zúčastňujúcou sa tvorby 5' čiapočky na 5' konci vírusovej RNA. (Minskaia et al., 2006, Chen et al., 2009). Veľkosť nsp14 je asi 60 kDa, pričom približne polovicu zaberá ExoN doména a zvyšnú polovicu metyltransferázová doména. Tieto domény sú prepojené krátkym spájacím úsekom bez špecifickej sekundárnej štruktúry. Hlavnou funkciou exonukleázovej domény je opravná aktivita počas replikácie genómu. Vzhľadom na vysokú chybovosť RNA polymeráz a rozsiahlu veľkosť genómu koronavírusov je u niektorých druhov esenciálna a jej neprítomnosť je pre vírus letálna (Minskaia et al., 2006, Ogando et al., 2020), u iných druhov je neesenciálna ale jej neprítomnosť výrazne ovplyvňuje presnosť replikácie (Eckerle et al., 2007, 2010).

ExoN doména proteínu nsp14 je na základe sekvenčnej podobnosti zaradená medzi DEDDh/DEEDh exonukleázy. Názov tejto skupiny exonukleáz je odvodený od aminokyselín prítomných v konzervovaných aktívnych miestach, v ktorých sa vyskytujú tri kanonické motívy: D90, E92 (motív I), D243 alebo E191 (motív II) a D273 (motív III). (zhrnuté v Ogando et al., 2019). Štruktúra jadra ExoN je tvorená pretočeným beta-listom ohraničeným piatimi alfa-helixovými štruktúrami. ExoN proteínu nsp14 tvorí tiež dva motívy zinkového prstu a väzbové miesto pre neštruktúrny proteín 10 (nsp10). Motív zinkového prstu 2 sa nachádza v blízkosti aktívneho miesta a jeho pravdepodobná funkcia je katalýza exonukleázovej reakcie, zatiaľ čo motív zinkového prstu 1 je pravdepodobne dôležitý pre štruktúrnu stabilitu proteínu nsp14 (Ma et al., 2015) a pravdepodobne tiež ovplyvňuje väzbu proteínu nsp10 (Ogando et al., 2020). Na fungovanie enzymatickej aktivity ExoN domény je v aktívnom mieste, viažucom RNA, potrebná prítomnosť dvoch  $Mg^{2+}$  iónov. Jeden z nich slúži na aktiváciu molekuly vody potrebnej na nukleofilnú substitúciu exonukleázovej reakcie a druhý umožňuje odchod produktu reakcie (Ma et al., 2015). Ďalším dôležitým prvkom pre fungovanie exonukleázovej aktivity je väzba nsp10. ExoN doména dokáže hydrolyzovať jednovláknovú aj dvojitú RNA v smere 3' k 5' ale nedokáže štiepiť DNA. Bazálne fungovanie exonukleázovej aktivity nevyžaduje prítomnosť kofaktoru nsp10 ale pri väzbe nsp10 dochádza k 35-násobnému zvýšeniu aktivity (Bouvet et al., 2012). Zmena aktivity je spôsobená výrazne odlišnou konformáciou časti nsp14 obsahujúcej väzbové miesto pre nsp10. Väčšina oblasti viažucej nsp10, obsahujúca hydrofóbne aminokyseliny, je v jeho neprítomnosti zložená do jadra ExoN domény. Toto zloženie výrazne mení aktívne miesto a sťažuje prístup substrátu (Imprachim et al., 2023).

## 2.4 Nsp10

Neštruktúrny proteín 10 je malý proteín o veľkosti asi 15 kDa. Vyskytuje sa špecificky u vírusov, keďže nebol nájdený žiaden podobný ekvivalent u prokaryot ani eukaryot. Má dva motívy zinkových prstov. Jeden z nich sa nachádza blízko N konca, druhý v dlhej C-terminálnej slučkovej oblasti (Rogstam et al., 2020). Nemá enzymatickú aktivitu a jeho funkcia je pravdepodobne aktivácia a zvyšovanie efektivity enzymatických aktivít iných vírusových nsps. Viaže proteín nsp14 a výrazne tým zvyšuje exonukleázovú aktivitu ExoN domény, pričom jeho väzba pravdepodobne nemá vplyv na metyltransferázovú aktivitu nsp14 (Chen et al., 2009). Interaguje tiež s proteínom nsp16 a aktivuje jeho 2'-O-metyltransferázovú aktivitu (Bouvet et al., 2010). Nsp10 je schopný viazať nukleové kyseliny, čo pravdepodobne tiež prispieva k stabilizácii substrátu a zefektívneniu enzymatickej aktivity ďalších nsp, s ktorými interaguje

(Matthes et al., 2006). Jeho neprítomnosť je pre replikáciu koronavírusov letálna (Donaldson et al., 2007).



**Obrázok č. 5:** Štruktúra neštruktúrnych proteínov nsp14 a nsp10 koronavírusu SARS-CoV-2 v komplexe s dsRNA (PDB: 7N0B), zachytená pomocou kryo-elektrónovej mikroskopie. Oranžovou farbou je označený proteín nsp14, zelenou farbou proteín nsp10, ružovou farbou je označené štiepené vlákno dsRNA a fialovou farbou neštiepené vlákno dsRNA (Liu et al., 2021).

### 3 Ciele práce

Cieľom tejto diplomovej práce bolo charakterizovať exonukleázovú aktivitu koronavírusového proteínu nsp14 a jeho interakciu s proteínom nsp10.

- Príprava expresných vektorov nesúcich mutované verzie nsp14 (E191A; H268A, D273A) a mutovanú verziu nsp10FL (T5A)
- Expresia nemutovaných aj mutovaných proteínov v bakteriálnom expresnom systéme využívajúcom baktérie *E. coli*
- Purifikácia všetkých verzií proteínov
- Charakterizácia exonukleázovej aktivity nemutovanej nsp14 v prítomnosti nsp10FL, nsp10sh a v neprítomnosti nsp10
- Charakterizácia exonukleázovej aktivity mutovaných verzií nsp14 v prítomnosti nsp10FL a nemutovanej nsp14 v prítomnosti mutovanej verzie nsp10

## 4 Materiál a metódy

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Prístroje

Aparatúra a zdroj pre vertikálnu elektroforézu PowerPac Basic	Bio-Rad
Aparatúra a zdroj pre horizontálnu elektroforézu EV 231	Consort
Centrifúga Allegra X-15R	Beckman Coulter
Centrifúga Avanti J-26S XPI	Beckman Coulter
Centrifúga Avanti J-30I	Beckman Coulter
Centrifúga Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Centrifúga Centrifuge 5418	Eppendorf
FPLC systém ÄKTA purifier	GE Healthcare Life Sciences
Inkubátor Incubating Mini Shaker	VWR
Inkubátor Innova 44R	New Brunswick Scientific
Inkubátor Petriho misiek IPP 400	Memmert
Kolóna pre gélovú chromatografiu Superdex™ 75 16/600 pg	GE Healthcare Life Sciences
Laminárny box Clean air	Telstar
Laserový skener Amershan Typhon imager RGB	GE Healthcare Life Sciences
Sonikátor Q700	QSonica Sonicatitors
Spektrofotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
Termoblok SBH130D	Stuart
Termocykler Professional TRIO Thermocycler	Biometra
UV-fotoaparát Quantum ST4-1100	Vilbert Lourmat
Vortex Gene 2	Scientific Industries
Zahrievacia vodná kúpeľ JB Aqua 2 Plus	Grant
Zdroj pre vertikálnu elektroforézu PowerPac HV	Bio-Rad

### 4.1.2 Laboratórne pomôcky

Centrifugačné kyvety Oak Ridge	Sigma
Centrifugačné skúmavky	Kartell, Carl Roth
Koncentrátor Macrosep® Advance Centrifugal Device 30K	Pall Corporation
Koncentrátor Macrosep® Advance Centrifugal Device 3K	Pall Corporation
Laboratórne sklo	Simax
PCR mikroskúmavky	Scientific Specialties Inc
Pipety	Gilson

### 4.1.3 Chemikálie

Agaroza pre DNA elektroforézu	SERVA
Akrylamid/bisakrylamid 40% Rotiphorese gel 40 (19:1)	Carl Roth
Ampicilín	Carl Roth
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich
DNA štandard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
DTT (1,4-Dithiotreitol)	Thermo Fisher Scientific
EDTA (kyselina etyléndiamín tetraoctová)	Carl Roth
Ethidium bromid	Carl Roth
Glycerol anhydrous G.R.	Lach-ner
HEPES	Carl Roth
Chlorid horečnatý (MgCl <sub>2</sub> )	Lach-ner
Chlorid Sodný (NaCl)	Lach-ner
IPTG (Isopropyl β-D-1- thiogalaktopyranozid)	Thermo Fisher Scientific
Izopropanol	Penta chemicals
Močovina	Penta chemicals
NiNTA agaroza	Thermo Fisher Scientific
Persíran amonný	Carl Roth

Proteínový štandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa	Thermo Fisher Scientific
SDS (Dodecylsírán sodný)	Carl Roth
TCEP (Tris(2-karboxyetyl)fosfin)	Thermo Fisher Scientific
TEMED	Carl Roth
β -merkaptoetanol	Sigma-Aldrich

#### 4.1.4 Pufry a roztoky

5× nanášací pufoer pre SDS-PAGE elektroforézu	60 mM Tris (pH 6,8); 25% glycerol; 2,9% SDS; 714 mM BME; 0,1% bromfenolová modrá
EB	10 mM Tris (pH 8,0)
Elučný pufoer	50 mM Tris (pH 8,0); 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 300 mM imidazol; 300 mM NaCl; 3 mM BME; 10% (V/V) glycerol
Farbiaci roztok Coomassie Brilliant Blue	3 mM Coomassie Brilliant Blue R250; 1,5 M CH <sub>3</sub> COOH; 50% (V/V) metanol
Lyzačný pufoer	50 mM Tris (pH 8,0); 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 mM imidazol; 300 mM NaCl; 3 mM BME; 10% (V/V) glycerol
N3	4,2 M Guanidium hydrochlorid, 0,9 M KAc, pH 4,8
Nanášací pufoer pre DNA elektroforézu	6× DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific
NiNTA aktivačný pufoer	100 mM NiCl <sub>2</sub>
NiNTA čistiaci roztok	50 mM EDTA; 500 mM NaCl
P1	50 mM Tris (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 mg/ml RNAsa A
P2	200 mM NaOH, 1% (V/V) SDS
PB	5 M Guanidinium hydrochlorid, 30% (V/V) isopropanol
PE	10 mM Tris (pH 7,5), 80 % ethanol



Pufor na gélovú chromatografiu	25 mM Tris ( pH 7,4); 4 mM MgCl <sub>2</sub> ; 150 mM NaCl; 1 mM TCEP; 10% (V/V) glycerol
Pufor pre SDS elektroforézu	25 mM Tris NaCl, 0,25 M glycin, 0,1 % (w/w) SDS, pH 8,8
Reakčný pufor	200 mM HEPES (pH 7,5); 1 M NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM DTT
T4 Ligačný pufor	5× Rapid Ligation pufor, Thermo Scientific
Zastavovací pufor	8 M močovina; 50 mM EDTA; 1,5× TBE

#### 4.1.5 Enzýmy

2× Phusion Flash PCR master mix	Thermo Scientific
5× T4 DNA ligáza	Thermo Scientific
SUMO proteáza	Pripravená v laboratóriu

#### 4.1.6 Médiá

LB	Carl Roth
LB Agar	Carl Roth

#### 4.1.7 Bakteriálne kmene

<i>Escherichia coli</i> DH5α	New England BioLabs
<i>Escherichia coli</i> BL21 CodonPlus(DE3)-RIL	Agilent

#### 4.1.8 Oligonukleotidy

<b>Mutácie proteínu nsp14</b>	E191A	fw	GCACTGACCAGCATGAAATAC
	E191A	rev	[phos]AAAACCATGTGCCACAGAAC
	H268A, D273A	fw	GCAGTTGCAAGCTGTGCAGCAATTATGACCCG TTGTCTG
	H268A, D273A	rev	[phos]TGCATTACCATGAACCTGAC
<b>Mutácie proteínu nsp10FL</b>	T5A	fw	GCAGAAGTTCCTGCAAATAGCACCGTTCTG
	T5A	rev	[phos]TGCGTTACCAGCTCCACCAATC

**Tabuľka 4:** Sekvencie primerov využitých na mutáciu proteínov nsp14 a nsp10FL.

<b>SUMOSeq</b>	CTTAAGATTCTTGTACGACGGT
----------------	------------------------

**Tabuľka 5:** Sekvencia sekvenačného primeru SUMOSeq.

<b>Templátové vlákno na tvorbu dsRNA/dsRNA MM</b>	AUAUAACUAAAUCUCACAUAGC
<b>Primer na tvorbu dsRNA</b>	Cy5-GCUAUGUGAGAUUAAGUUAU
<b>Primer na tvorbu dsRNA MM</b>	Cy5-GCUAUGUGAGAUUAAGUUA <b>G</b>
<b>Primer ssRNA</b>	Cy5-GCUAUGUGAGAUUAAGUUAU

**Tabuľka 6:** Sekvencie oligonukleotidov použitých na aktivitné eseje. U templátového vlákna hrubým písmom vyznačený 5' presah, u primeru na tvorbu dsRNA MM červenou farbou vyznačená báza tvoriaca nesprávne párovanie vo výslednej dsRNA MM.

## 4.2 Metódy

### 4.2.1 Príprava plazmidov mutovaných verzií nsp14, nsp10 a skrátenej verzie nsp10

#### 4.2.1.1 Návrh primerov na prípravu mutovaných verzií nsp14 a nsp10

Primery boli navrhnuté v programe A Plazmid Editor (ApE). Ako templát na prípravu mutovaných verzií proteínu nsp14 a nsp10 bol použitý plazmid pSUMO nesúci gén kódujúci proteín nsp14 (pSUMO\_nsp14), respektíve gén kódujúci proteín nsp10 plnej dĺžky (pSUMO\_nsp10FL). pSUMO plazmid je plazmid odvodený od komerčného plazmidu pHIS2 s ampicilínovou rezistenciou, ktorý nesie 8 histidínov (HisTag) vo fúzii so Sumo kotvou (SumoTag, z angl. Small Ubiquitine-like Modifier), ktoré slúžia ako purifikačná a solubilizačná kotva. Priame (fw, z angl. Forward) primery na prípravu mutantov nsp14 a nsp10FL s jednou mutáciou niesli na 5' konci zámenu prvého, pôvodného tripletu za triplet kódujúci alanín (tab. 7). Priamy primer na prípravu verzie nsp14 nesúcej dve mutácie niesol v smere od 5' konca zámenu prvého a šiesteho pôvodného tripletu za triplet kódujúci alanín (tab. 7). Na 5' koniec všetkých spätných (rev, z angl. Reverse) primerov bol pridaný fosfát. Sekvencie všetkých primerov sú uvedené v kapitole 4.1.8. Navrhnuté primery boli vytvorené firmou Microsynth a doručené v lyofilizovanej forme.

Proteín	Primer	Pozícia tripletu	Pôvodný triplet	Pôvodná AK	Nový triplet	Nová AK
Nsp14	E191A fw	1.	GAA	Kyselina glutamová	GCA	Alanín
	H268A, D273A fw	1.	CAT	Histidín	GCA	Alanín
		6.	GAT	Kyselina asparagová	GCA	Alanín
Nsp10FL	T5A fw	1.	ACA	Treonín	GCA	Alanín

**Tabuľka 7:** Zámény pôvodných tripletov za nové v priamych primeroch na prípravu mutovaných verzií proteínov nsp14 a nsp10FL. AK – aminokyselina.

#### 4.2.1.2 Príprava plazmidu skrátenej verzie nsp10

Plazmid nesúci gén kódujúci skrátenú verziu proteínu nsp10 bol vytvorený RNDr. Evou Žileckou, Ph.D.. Bol použitý rovnaký pSUMO plazmid, obsahujúci HisTag, SumoTag a ampicilínovú rezistenciu, ako v kapitole 4.2.1.1. Gén bol na 5' konci skrátený o sekvenciu kódujúcu 9 aminokyselín a na 3' konci o sekvenciu kódujúcu 8 aminokyselín. Skrátená verzia nsp10 (nsp10sh) bola vytvorená na základe porovnania sekvencie nsp10FL vírusu SARS-CoV-2 s nsp10 vírusu SARS-CoV so zverejnenou štruktúrou v proteínovej databáze. Koncové časti, ktoré neboli v štruktúre nsp10 vírusu SARS-CoV viditeľné boli odstránené.

#### 4.2.1.3 PCR mutagenéza

Plazmid pSUMO\_nsp14, resp. pSUMO\_nsp10 bol nariadený v pomere 1:500 sterilnou dH<sub>2</sub>O. Výsledné množstvo plazmidovej DNA v 20 µl PCR reakčnej zmesi bolo okolo 0,3 ng. Priame aj spätné primery v lyofilizovanej forme boli rozpustené v sterilnej dH<sub>2</sub>O na koncentráciu 100 µmol/l, časť z oboch primerov bola nariadená na 10 µmol/l. Následne bola v mikroskúmavke vytvorená zmes podľa tab. 8.

Objem [µl]	Zložka
10	2× Phusion flash PCR Master Mix
8	Plazmid (nariadený 1:500)
1	Primer fw (konc. 10 µmol/l)
1	Primer rev (konc. 10 µmol/l)

**Tabuľka 8:** Zloženie reakčnej zmesi na prípravu plazmidov nesúcich mutované formy génov nsp14 a nsp10FL PCR mutagenézou.

Mikroskúmavka s pripravenou zmesou bola vložená do termocykleru a PCR reakcia prebehla podľa tab. 10. Hodnoty teploty nasadenia primerov a času elongácie u jednotlivých PCR reakcií sú uvedené v tab. 9.

Templát	Primery	Teplota nasadania primerov [°C]	Čas elongácie [min:s]
pSUMO_nsp14	E191A fw	58,2	02:00
	E191A rev		
pSUMO_nsp14	H268A, D273A fw	61,1	02:00
	H268A, D273A rev		
pSUMO_nsp10FL	T5A fw	68,2	01:40
	T5A rev		

**Tabuľka 9:** Teplota nasadania primerov a čas elongácie jednotlivých PCR reakcií.

Teplota [°C]	Čas [min:s]	Opakovanie
98.0	00:10	1×
98.0	00:01	41×
Tab. 9	00:05	
72.0	Tab. 9	
72.0	00:10	1×
18.0	∞	1×

**Tabuľka 10:** Priebeh PCR reakcie na vytvorenie plazmidov nesúcich mutovanú formu génov nsp14 a nsp10FL.

#### 4.2.1.4 Agarózová elektroforéza

Na overenie úspešného prebehnutia PCR mutačnej reakcie bola využitá horizontálna elektroforéza s agarózovým géлом. Bol použitý 1% agarózový gél obsahujúci etidium bromid (EtBr), napätie 300 V, čas 15 – 30 minút. Elektroforéza prebehla v TAE pufre. Na vizualizáciu nukleových kyselín na agarózovom géle po prebehnutí elektroforézy bol použitý UV fotoaparát Quantum ST4-1100.

#### 4.2.1.5 Prečistenie PCR produktu

Na prečistenie PCR produktu od zvyšných zložiek PCR reakcie bol použitý QIAquick PCR Purification Kit. K zmesi po prebehnutí PCR reakcie bolo pridané päťnásobné objemové množstvo pufre PB. QIAquick kolóna bola vložená do zbernej mikroskúmavky. Na zachytenie DNA bol prenesený celý objem PCR zmesi s pridaným PB pufrom na QIAquick kolónu, ktorá

bola následne centrifugovaná pri 15 000 g, izbovej teplote (RT, z angl. room temperature), 1 minútu. Zachytený roztok v zbernej mikroskúmavke bol zahodený. Na QIAquick kolónu s naviazanou DNA bolo nanosených 750 µl PE pufru na premytie a kolóna bola následne opäť centrifugovaná pri 15 000 g, RT, 1 minútu. Roztok zo zbernej mikroskúmavky bol opäť zahodený. Na odstránenie zvyškov etanolu, ktorý je hlavnou zložkou PE pufru, bola kolóna centrifugovaná znovu 1 minútu pri 15 000 g, RT. Kolóna QIAquick bola vložená do čistej mikroskúmavky. Na uvoľnenie DNA z kolóny bolo do stredu QIAquick kolóny pridaných 50 µl pufru EB a kolóna bola centrifugovaná pri 15 000 g, RT, 1 minútu. Získaná lineárna DNA ako produkt PCR reakcie bola hneď ligovaná alebo skladovaná pri -20 °C.

#### **4.2.1.6 Stanovenie koncentrácie DNA**

Koncentrácia DNA bola určená spektrofotometricky pomocou Thermo Scientific NanoDrop 1000 – Prodigy Scientific. Ako slepá vzorky bola použitá voda.

#### **4.2.1.7 Ligačná reakcia**

Na uzavretie lineárnej DNA vzniknutej pri PCR reakcii bola použitá ligačná reakcia, pri ktorej došlo k spojeniu fosfátovej skupiny na 5' konci molekuly s hydroxylovou skupinou na jej 3' konci. V mikroskúmavke bola vytvorená ligačná zmes zmiešaním 6,2 µl lineárnej DNA s 1,5 µl 5× T4 ligačného pufru, 0,3 µl T4 ligázy a 7 µl sterilnej vody. Vytvorená zmes bola inkubovaná pri laboratórnej teplote 1 hodinu. Výsledná ligovaná DNA bola následne vložená do baktérií *E. coli* DH5-α alebo skladovaná pri -20°C.

#### **4.2.1.8 Zmnoženie plazmidu v bunkách *E. coli* DH5-α**

Na získanie väčšieho množstva plazmidovej DNA bola využitá produkcia plazmidovej DNA v bunkách *E. coli* DH5-α. Kompetentné bunky *E. coli* DH5-α boli rozmrazené na ľade. K 100 µl bunkovej suspenzie bolo pridaných 8 µl ligačnej zmesi obsahujúcej ligovanú plazmidovú DNA. Suspenzia bola inkubovaná 15 minút na ľade. Bunková suspenzia bola vystavená teplotnému šoku o teplote 42°C po dobu 45 sekúnd a následne bola inkubovaná na ľade 1 minútu. K suspenzii bolo pridaných 500 µl LB média a ďalej bola inkubovaná pri 37°C asi 45 minút. Po inkubácii bola bunková suspenzia nanosená na agarozové misky obsahujúce ampicilín v konečnej koncentrácii 100 mg/l a inkubovaná pri teplote 37°C cez noc.

#### **4.2.1.9 Nízkoobjemová príprava plazmidovej DNA**

Vybrané samostatné kolónie boli sterilnou špičkou prenesené z agarozovej misky do 5 ml LB média obsahujúceho ampicilín v konečnej koncentrácii 100 mg/l. Suspenzia bola

inkubovaná pri 37°C za stáleho trepania pri 220 ot/min (Inkubátor Incubating Mini Shaker, VWR) cez noc. Ďalší deň bola suspenzia centrifugovaná pri 4500 g, 5 minút, 4°C. Plazmidová DNA bola následne izolovaná pomocou súpravy QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN (QIAGEN, 2012).

#### **4.2.1.10 Sekvenovanie DNA**

Na overenie správneho priebehu mutagenézy bola využitá sekvenácia. Bola vytvorená sekvenačná reakcia obsahujúca okolo 4,1 ng plazmidovej DNA a sekvenačný primer SUMOseq o výslednej koncentrácii 2,5  $\mu\text{mol/l}$ . Sekvencia sekvenačného primeru je uvedená v kapitole 4.1.8. Sekvenácia Sangerovou metódou bola prevedená firmou SEQme.

### **4.2.2 Príprava proteínu nsp14 a jeho mutovaných verzii**

#### **4.2.2.1 Transformácia kompetentných buniek *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIL**

Kompetentné bunky *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIL (ďalej len *E. coli* RIL) boli rozmrazené na ľade. K 100  $\mu\text{l}$  bunkovej suspenzie bol pridaný 1  $\mu\text{l}$  plazmidovej DNA nesúcej gén kódujúci požadovanú formu proteínu nsp14. Suspenzia bola inkubovaná 15 minút na ľade. Bunková suspenzia bola vystavená teplotnému šoku o teplote 42 °C po dobu 45 sekúnd, následne bolo pridaných 500  $\mu\text{l}$  LB média a ďalej bola inkubovaná pri 37 °C asi 45 minút. Po inkubácii bola suspenzia prenesená do 100 ml LB média obsahujúceho ampicilín v konečnej koncentrácii 100 mg/l. Pripravené inokulum bolo následne inkubované pri 37 °C za stáleho trepania pri 220 ot/min (Inkubátor Incubating Mini Shaker, VWR) cez noc.

#### **4.2.2.2 Expresia proteínu v *E. coli* RIL**

Bolo pripravených 12  $\times$  1 l LB média. Každý liter LB média bol obohatený o  $\text{MgCl}_2$  o výslednej koncentrácii 1 mmol/l,  $\text{ZnSO}_4$  o výslednej koncentrácii 40 mmol/l a ampicilín o výslednej koncentrácii 100 mg/l. Do každého litra média bolo následne pridaných 8 ml pripraveného inokula. Takto pripravené médiá boli inkubované pri 37 °C za stáleho trepania pri 220 ot/min (Inkubátor Innova 44R, New Brunswick Scientific) a spektrofotometricky bola pozorovaná ich optická denzita pri vlnovej dĺžke 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ). Po dosiahnutí  $\text{OD}_{600} = 1$  boli bunkové suspenzie ochladené v ľadovej kúpeli a inkubované pri 4 °C v chladovej miestnosti po dobu 20 minút za občasného miešania. Následne bolo do každého litra bunkovej suspenzie pridané IPTG o výslednej koncentrácii 1 mmol/l a suspenzie boli inkubované pri 18 °C za stáleho trepania pri 220 ot/min (Inkubátor Innova 44R, New Brunswick Scientific) cez noc.

#### 4.2.2.3 Lýza bakteriálnych buniek

Pripravená bunková suspenzia bola prenesená do uzatvárateľných centrifugačných kyviet a bola centrifugovaná pri 6000 g, 8 minút, 4 °C. Supernatant bol zahodený. Pelet bol rozpustený v lyzačnom pufre v objeme asi 15 ml lyzačného pufru na 1 l pôvodnej bunkovej suspenzie. Rozpustený pelet bol podrobený sonikácii pri amplitúde 80, 8 minút, 1 s impulz, 5 s pauza. Po prebehnutí sonikácie bol bunkový lyzát centrifugovaný pri 30 000 g, 20 minút, 4 °C. Pelet bol zahodený a supernatant bol buď okamžite použitý v ďalších krokoch purifikácie, alebo bol skladovaný pri -80 °C.

#### 4.2.2.4 Izolácia proteínu – afinitná chromatografia

Agarozová matrica nesúca naviazanú kyselinu nitrilotrioctovú (NTA) bola na kolóne dôkladne premytá vodou. Ďalej bol pridaný roztok 100 mM NiCl<sub>2</sub> v množstve asi jedného objemu kolóny, čím došlo k naviazaniu iónov niklu na NTA (Ni-NTA). Ni-NTA bola opäť dôkladne premytá vodou a následne premytá lyzačným pufrom. Premytá Ni-NTA bola pridaná k supernatantu získanému v kapitole 4.2.2.3 v množstve asi 10 ml roztoku Ni-NTA na 40 ml supernatantu a zmes bola za stáleho miešania (rolovania) inkubovaná pri 4 °C asi 1 hodinu, pričom došlo k naviazaniu proteínu pomocou afinitnej kotvy HisTag na Ni-NTA. Po inkubácii bola zmes centrifugovaná pri 500 g, 3 minúty, 4 °C, supernatant bol zahodený, Ni-NTA rezín s naviazaným proteínom bol resuspendovaný v 40 ml lyzačného pufru a znovu centrifugovaný pri 500 g, 3 minúty, 4 °C. Tento krok premývania bol opakovaný 5-krát. Po premytí bol Ni-NTA rezín s naviazaným proteínom prenesený na kolónu, znovu premytý lyzačným pufrom a proteín zachytený na Ni-NTA bol uvoľnený pridaním elučného pufru obsahujúceho imidazol o koncentrácii 300 mmol/l.

#### 4.2.2.5 Štiepenie purifikačnej kotvy a dialýza

Dialýza prebehla v 1 l čerstvo pripraveného lyzačného pufru. K eluovanému proteínu bolo pridaných 100 µl SUMO proteázy o koncentrácii 1 mg/ml a zmes bola prenesená do dialyzačnej membrány o veľkosti pórov 12 až 14 kDa (príprava nsp14) alebo 6 až 10 kDa (príprava nsp10), ktorá bola predtým premytá vodou a lyzačným pufrom. Dialýza a štiepenie purifikačnej kotvy prebehlo súbežne za stáleho miešania pri 4 °C cez noc.

#### 4.2.2.6 Overenie úspešnosti štiepenia purifikačnej kotvy

Úspešnosť štiepenia purifikačnej kotvy bola overená použitím denaturačnej proteínovej elektroforézy (SDS-PAGE). 10 µl proteínovej vzorky bolo zmiešaných s 2 µl 5× vzorkového pufru na SDS-PAGE. Bol použitý 10% polyakrylamidový gél (príprava nsp14) alebo 15%



polyakrylamidový gél (príprava nsp10), pri 200 V resp. 220 V, 40 – 60 minút. Zloženie 10% gélu je uvedené v tab. 11 a zloženie 15% gélu v tab. 12. Po prebehnutí elektroforézy bol gél prenesený do nádoby obsahujúcej farbiaci roztok Coomassie Brilliant Blue, krátko zahriaty a za stáleho pohybu inkubovaný pri laboratórnej teplote asi 3 minúty. Následne bol odstránený farbiaci roztok, gél bol niekoľkokrát premytý vodou, ponorený vo vode bol zahriaty na bod varu vody a inkubovaný pri laboratórnej teplote za stáleho pohybu do odfarbenia.

Zložka	Zaostrovací gél	Separáčny gél
Tris-HCl	125 nmol/l (pH 6,8)	375 nmol/l (pH 8,8)
Akrylamid/bisakrylamid (37,5:1)	4 % (V/V)	10 % (V/V)
SDS	0,1 % (W/V)	0,1 % (W/V)

**Tabuľka 11:** Zloženie 10% polyakrylamidového gélu na SDS-PAGE.

Zložka	Zaostrovací gél	Separáčny gél
Tris-HCl	125 nmol/l (pH 6,8)	375 nmol/l (pH 8,8)
Akrylamid/bisakrylamid (37,5:1)	4 % (V/V)	15 % (V/V)
SDS	0,1 % (W/V)	0,1 % (W/V)

**Tabuľka 12:** Zloženie 15% polyakrylamidového gélu na SDS-PAGE.

#### 4.2.2.7 Reverzná afinitná chromatografia

Matrica s NTA bola pripravená rovnako ako v kapitole 4.2.2.4. Ni-NTA bola pridaná k proteínovej zmesi po prebehnutí dialýzy a inkubovaná za stáleho pohybu pri 4 °C po dobu asi 1 hodiny. Po inkubácii bola zmes prenesená na kolónu, pričom bol zachytený roztok obsahujúci proteín nezachytený na Ni-NTA.

#### 4.2.2.8 Gélová permeačná chromatografia

Na prečistenie získaného proteínu bola využitá gélová permeačná chromatografia, pri ktorej dochádza k rozdeleniu zložiek roztoku na základe veľkosti. Kolóna Superdex 75 16/600 prep grade bola premytá filtrovanou HPLC vodou a ekvilibrovaná pufrom na gélovú chromatografiu. Roztok proteínu bol centrifugovaný pri 5 000 g, 5 minút, 4 °C a pomocou injekčnej striekačky nanosený do nanášacej slučky. Maximálny tlak kolóny je 0,5 MPa. Gélová

chromatografia prebehla pri prietoku 0,9 ml/min. Frakcie boli zachytávané do 96 jamkovej platničky po 1,5 ml. V priebehu bola sledovaná absorbanca pri vlnovej dĺžke 254 nm, 280 nm a vodivosť prechádzajúceho roztoku.

#### **4.2.2.9 Odber výsledných frakcií**

Frakcie so zvýšenou absorbancom pri 254 nm a 280 nm boli analyzované pomocou SDS-PAGE rovnakým spôsobom ako v kapitole 4.2.2.6. Na základe SDS-PAGE analýzy boli frakcie obsahujúce čistý proteín spojené a koncentrované na koncentráciu 20  $\mu\text{mol/l}$  a vyššiu. Zakoncentrovaný proteín bol rozdelený do niekoľkých mikroskúmaviek v potrebnom objeme, zamrazený na suchom ľade a skladovaný pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2.3 Príprava proteínu nsp10 a jeho skrátenej a mutovanej verzie**

#### **4.2.3.1 Transformácia kompetentných buniek *E. coli* RIL**

Bolo pripravených 10 ml inokula postupom zhodným s postupom prípravy nsp14 uvedenom v kapitole 4.2.2.1.

#### **4.2.3.2 Expresia proteínu v *E. coli* RIL**

Bolo pripravených  $2 \times 1$  l LB média rovnakým spôsobom ako v kapitole 4.2.2.2. Do každého litra média bolo pridaných 5 ml pripraveného inokula. V ďalšom postupe bol vynechaný krok chladenia bakteriálnych suspenzií a po dosiahnutí  $\text{OD}_{600} = 0,6 - 0,8$  bolo do každého litra bunkovej suspenzie pridané IPTG o výslednej koncentrácii 300  $\mu\text{mol/l}$ . Ďalší postup prípravy proteínu nsp10, jeho mutovanej a skrátenej verzie je zhodný s postupom prípravy proteínov nsp14 popísaným v kapitolách 4.2.2.2 – 4.2.2.9.

### **4.2.4 Aktivitná exonukleázová esej**

#### **4.2.4.1 Príprava reakčných zložiek**

Proteíny nsp14 a nsp10 boli rozmrazené. Proteín nsp14 bol nariedený pufrom na gélovú chromatografiu na koncentráciu 10  $\mu\text{mol/l}$  a proteín nsp10 bol nariedený rovnakým pufrom na koncentráciu 50  $\mu\text{mol/l}$ . Jednovláknová RNA (ssRNA), vyrobená firmou Microsynth a dodaná v lyofilizovanej forme, bola rozpustená vo vode ošetrenej dietyl pyrokarbonátom (DEPC). Dvojvláknová RNA (dsRNA) bola vytvorená spojením dvoch ssRNA oligonukleotidov, jedného značeného fluorescenčnou značkou Cyanín 5 (Cy5), ktorý slúži ako primer, a druhého, komplementárneho, bez fluorescenčnej značky, slúžiaceho ako templát. Primer aj templát o koncentrácii 10  $\mu\text{mol/l}$  boli v prítomnosti NaCl o koncentrácii 50 mmol/l zahriate na  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minút a samovoľne ochladené na laboratórnu teplotu. dsRNA MM (z angl. mismatch) bola pripravená rovnakým spôsobom s využitím Cy5 značeného primeru s

nesprávnym párovaním na poslednom páre báz. dsRNA a dsRNA MM zdieľajú rovnaké templátové vlákno, ktoré tvorí dvojnukleotidový presah na 5' konci. Sekvencie použitých RNA sú uvedené v kapitole 4.1.8.

#### **4.2.4.2 Pribeh eseje**

V laminárnom boxe bola vytvorená reakčná zmes obsahujúca RNA o koncentrácii 0,05  $\mu\text{mol/l}$  a proteíny nsp14 a nsp10 v pomere koncentrácií 1:4. Koncentrácia nsp14 sa pohybovala od 0,1 do 0,6  $\mu\text{mol/l}$ . Reakčná zmes bola inkubovaná pri 37 °C 30 minút. Polovica reakčnej zmesi bola odobraná do mikroskúmavky obsahujúcej zastavovací pufo, zvyšná polovica bola znova inkubovaná pri 37 °C ďalších 30 minút. Po inkubácii bol k druhej polovici reakčnej zmesi pridaný zastavovací pufo a vzorky po 30 aj 60 minútovej inkubácii boli zahriate na 95 °C po dobu 10 minút.

#### **4.2.4.3 Denaturačná elektroforéza**

Na rozdelenie fragmentov RNA podľa veľkosti po prebehnutí exonukleázovej reakcie bola využitá vertikálna elektroforéza v 20 % denaturačnom polyakrylamidovom géle, ktorý obsahoval 20 % akrylamidovej/bisakrylamidovej zmesi (19:1) a močovinu o koncentrácii 8 mol/l. Elektroforéza prebehla v TBE pufre pri 600 V, 23 minút.

#### **4.2.4.4 Vizualizácia**

Po prebehnutí elektroforézy bol gél nasnímaný pri žiarení o vlnovej dĺžke 635 nm fluorescenčným skenerom Amershan Typhon imager RGB.

#### **4.2.4.5 Vyhodnotenie**

Skeny gélov boli vyhodnotené v programe ImageQuant TL. Získané dáta boli spracované do grafov programom GraphPad Prism 8 s využitím funkcie jednofázového rozkladu.

## 5 Výsledky

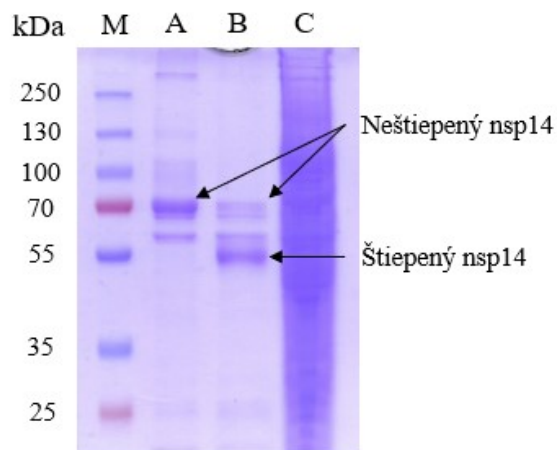
### 5.1 Príprava plazmidov mutovaných verzií nsp14 a nsp10

Mutačnou PCR reakciou použitím špecificky navrhnutých primerov boli z divokých kmeňov génov pre nsp14 a nsp10, vložených do plazmidov, vytvorené ich mutované verzie, ktoré na 5' konci obsahujú histidínovú kotvu, umožňujúcu jednoduchú purifikáciu, v kombinácii so Sumo kotvou zvyšujúcou solubilitu. Horizontálnou elektroforézou v agarózovom géle bolo overené úspešné prebehnutie PCR reakcie. Pohyblivosť vzoriek odpovedala veľkosti lineárneho pSUMO vektoru s vloženými génmi pre nsp14 resp. nsp10. Lineárne PCR produkty boli prečistené, zacyklené ligačnou reakciou, zmnožené v baktériách *E. coli* DH5- $\alpha$  a vysiate na agarózovú platňu. Následne bola prevedená selekcia náhodných kolónií, ktoré boli rozmnožené v tekutom LB médiu a vyizolovaná plazmidová DNA bola podrobená sekvenčnej analýze. Na základe výsledkov sekvenčnej analýzy boli vybrané vzorky plazmidov nesúce správnu mutáciu.

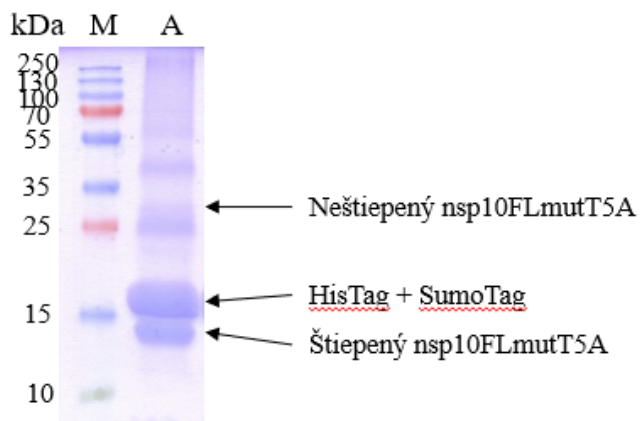
### 5.2 Expresia a izolácia proteínov

Na prípravu proteínov bol využitý bakteriálny expresný systém využívajúci baktérie *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIL (ďalej len *E. coli* RIL). Plazmid s rezistenciou na ampicilín, nesúci gén požadovanej formy proteínu nsp14 resp. nsp10 bol transformovaný do *E. coli* RIL. Expresia požadovaných proteínov prebehla po indukcii IPTG.

Bakteriálne bunky boli lyzované a proteín bol z bunkového lyzátu izolovaný afinitnou chromatografiou. Histidínova kotva na N konci proteínu bola naviazaná na nikelnaté ióny imobilizované na NTA agarózovej matrici (Ni-NTA). Proteín zachytený na Ni-NTA bol uvoľnený pridaním pufru obsahujúceho vysokú koncentráciu imidazolu, ktorá bola následne odstránená dialýzou. Súbežne s dialýzou prebehlo aj štiepenie histidínovej kotvy a Sumo kotvy pomocou SUMO proteázy. Úspešné prebehnutie štiepenia bolo overené použitím SDS-PAGE proteínovej elektroforézy. Zobrazený je gél prípravy nemutovanej verzie nsp14 (obr. 5) a gél prípravy mutovanej verzie nsp10FLmutT5A (obr. 6).



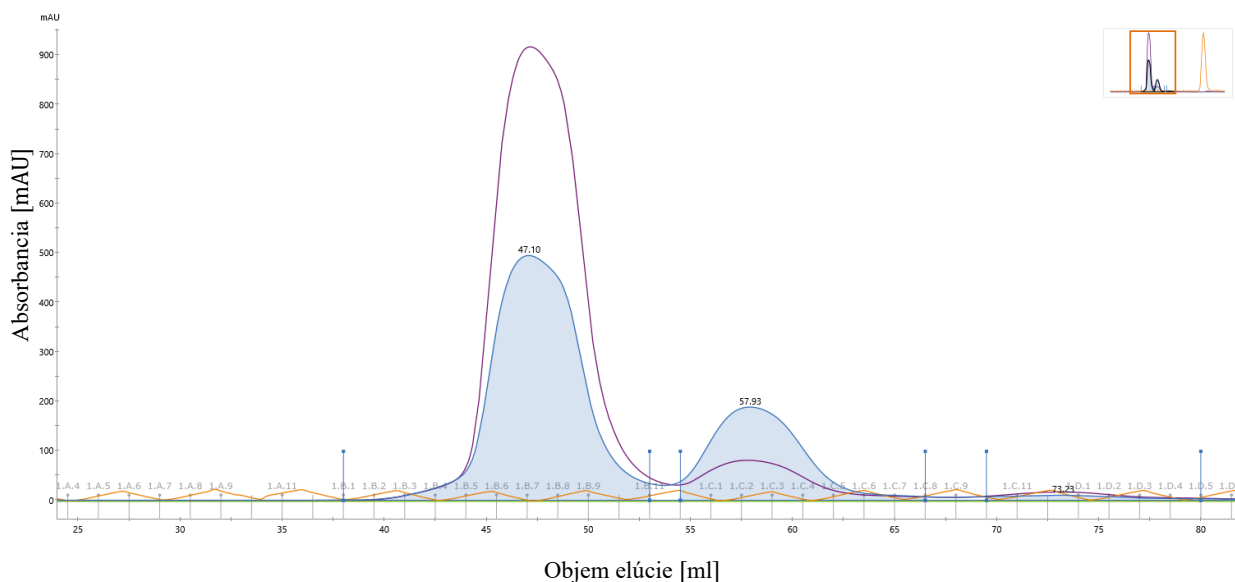
**Obrázok 5:** SDS-PAGE elektroforéza nemutovanej verzie proteínu nsp14. 10% polyakrylamidový gél, 200 V, 40 minút. M – štandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, A – nsp14 s kotvou SumoTag a histidínovou kotvou (HisTag), B – nsp14 po odštiepení HisTag a SumoTag, C – vzorka bunkového lyzátu po prebehnutí afinitnej chromatografie obsahujúca proteíny nezachytené na Ni-NTA.



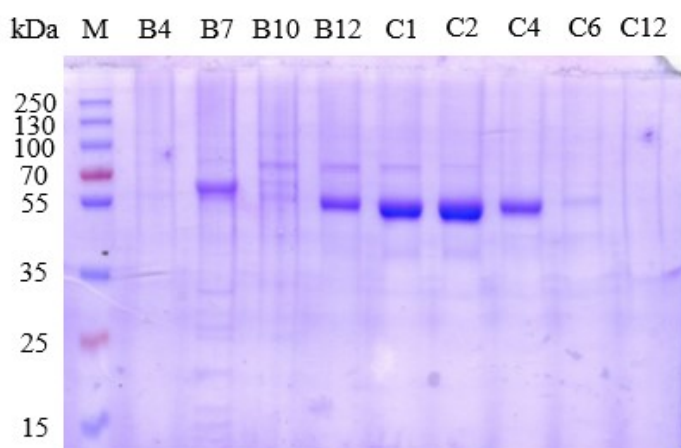
**Obrázok 6:** SDS-PAGE elektroforéza mutovanej verzie proteínu nsp10FLmutT5A. 15% polyakrylamidový gél, 220 V, 40 minút. M – štandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, A – vzorka po prebehnutí štiepenia SUMO proteázou obsahujúca neštiepenú formu nsp10FLmutT5A, štiepenú formu nsp10FLmutT5A a odštiepený fragment obsahujúci SumoTag a HisTag.

Proteín bol následne prečistený gélovou permeačnou chromatografiou. Uvedený je opäť chromatogram nemutovného proteínu nsp14 (obr. 7) a chromatogram mutovanej verzie nsp10FLmutT5A (obr. 9). Po prebehnutí gélovej permeačnej chromatografie boli získané frakcie podrobené analýze SDS-PAGE elektroforézou. Na obrázku 8 je zobrazený gél

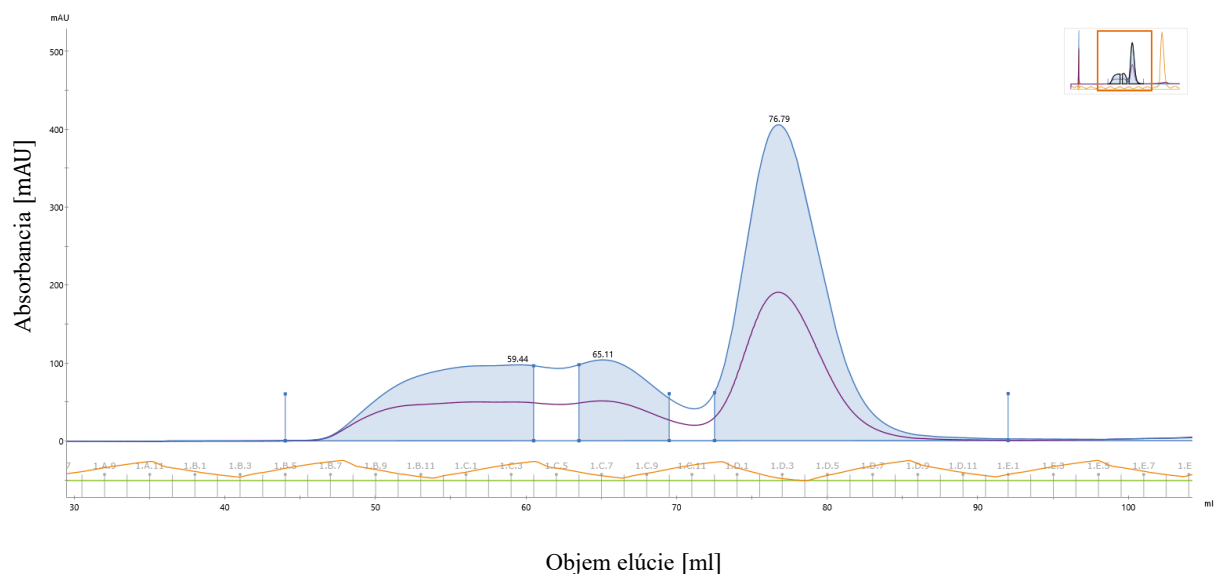
vybraných frakcií proteínu nsp14, zachované boli frakcie C1 až C5 a na obrázku 10 je zobrazený gél vybraných frakcií proteínu nsp10FLmutT5A, zachované boli frakcie C12 až D7.



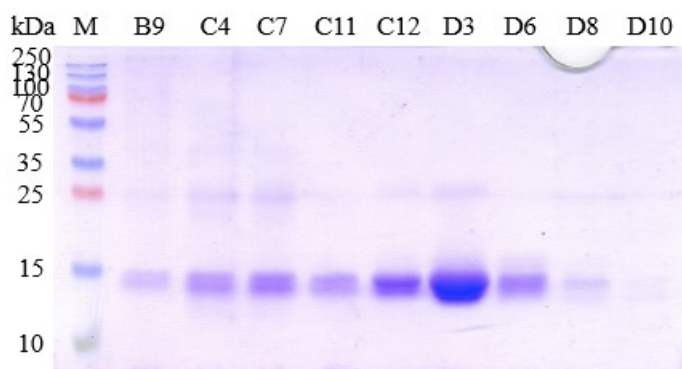
**Obrázok 7:** Priebeh gélovej permeačnej chromatografie nemutovanej verzie proteínu nsp14. Použitá kolóna Superdex™ 75 16/600 prep grade. Prvý vrchol predstavuje agregát nsp14 s nukleovými kyselinami, druhý vrchol predstavuje chcený proteín. Fialovou farbou označená absorbancia pri vlnovej dĺžke 254 nm, modrou farbou označená absorbancia pri 280 nm, žltou farbou označená vodivosť, číslom označená pozícia frakcie v zbernej platničke.



**Obrázok 8:** SDS-PAGE elektroforéza vybraných frakcií proteínu nsp14 po prebehnutí gélovej permeačnej chromatografie. 10% polyakrylamidový gél, 200 V, 40 minút. M – štandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, B4 až C12 – vybrané frakcie označené podľa pozície v zbernej platničke.



**Obrázok 9:** Priebeh gélovej permeačnej chromatografie mutovanej verzie proteínu nsp10FLmutT5A. Použitá kolóna Superdex™ 75 16/600 prep grade. Prvý, široký vrchol predstavuje agregát nsp10FLmutT5A s nukleovými kyselinami a ďalšími zachytenými nečistotami, druhý vrchol predstavuje chcený proteín. Fialovou farbou označená absorbancia pri vlnovej dĺžke 254 nm, modrou farbou označená absorbancia pri 280 nm, žltou farbou označená vodivosť, číslom a písmenom označená pozícia frakcie v zbernej platničke.



**Obrázok 10:** SDS-PAGE elektroforéza vybraných frakcií proteínu nsp10FLmutT5A po prebehnutí gélovej permeačnej chromatografie. 15% polyakrylamidový gél, 220V, 40 minút. M – štandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, B9 až D10 – vybrané frakcie označené podľa pozície v zbernej platničke.

## 5.3 Aktivitné eseje

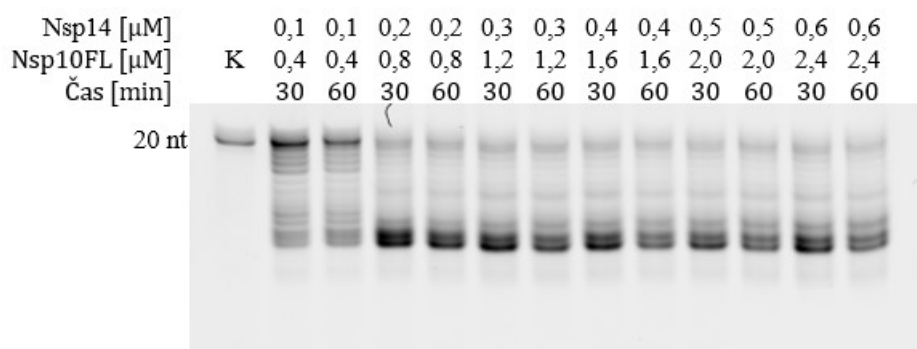
Aktivita vytvorených verzií proteínov nsp14 a nsp10 bola charakterizovaná použitím *in vitro* esejí využívajúcich ako substrát jednovláknovú RNA, dvojvláknovú RNA a dvojvláknovú RNA s nesprávnym párovaním v pozícii posledného páru báz na 3' konci štiepeného vlákna. Koncentrácia proteínu nsp10 bola vždy štvornásobne vyššia ako koncentrácia proteínu nsp14. Vzorky esejí boli analyzované horizontálnou elektroforézou využívajúcou 20 % polyakrylamidové gély s močovinou o koncentrácii 8 mol/l, ktoré boli následne analyzované fluorescenčným skenerom Amershan Typhon imager RGB. Enzymatická aktivita exonukleázy nsp14 bola vyhodnotená ako úbytok pôvodného substrátu v priebehu reakcie.

### 5.3.1 Nemutované verzie nsp14 a nsp10

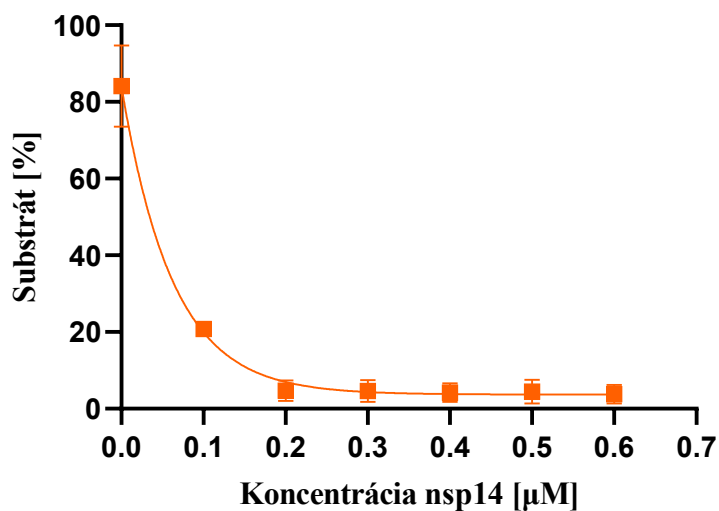
#### 5.3.1.1 Reakcie s dsRNA

Využitím *in vitro* aktivitnej esej bolo pozorované štiepenie dsRNA proteínom nsp14 v prítomnosti jeho kofaktoru nsp10 plnej dĺžky (nsp10FL) (obr. 11, 12), skrátenej verzie nsp10 (nsp10sh) (obr. 13, 14) a bez prítomnosti nsp10 (obr. 15, 16). Sekvencie templátu a primeru tvoriacich dsRNA sú uvedené v kapitole 4.1.8. V obr. 17 je uvedené porovnanie aktivity štiepenia dsRNA proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10FL, nsp10sh a v neprítomnosti nsp10 v 60 minútovom priebehu reakcie.

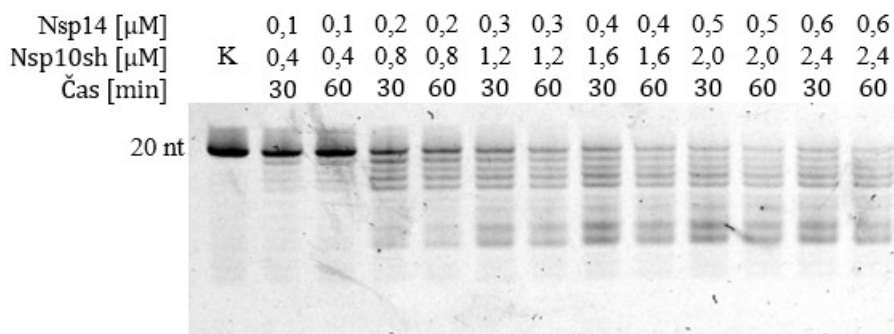




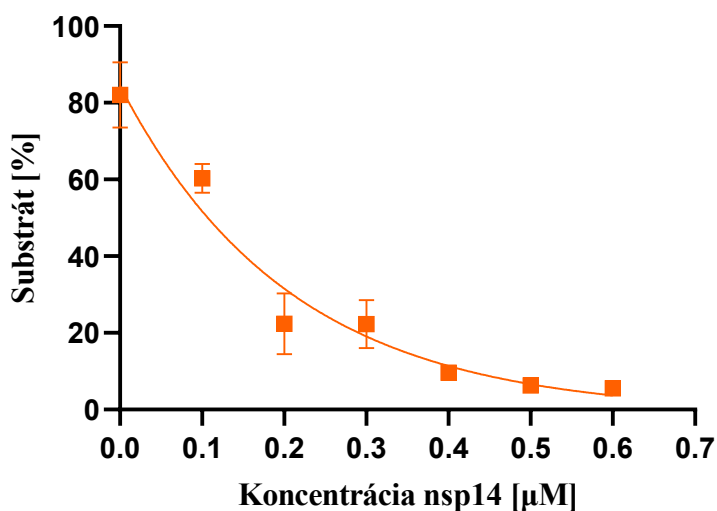
**Obrázok 11:** Gél horizontálnej elektroforézy eseje pozorujúcej štiepenie substrátu **dsRNA** proteínom nsp14 v prítomnosti proteínu nsp10FL. Číslom v hornej časti gélu je označená koncentrácia proteínov nsp14, nsp10FL a čas priebehu reakcie. K – negatívna kontrola reakcie neobsahujúca nsp14 ani nsp10.



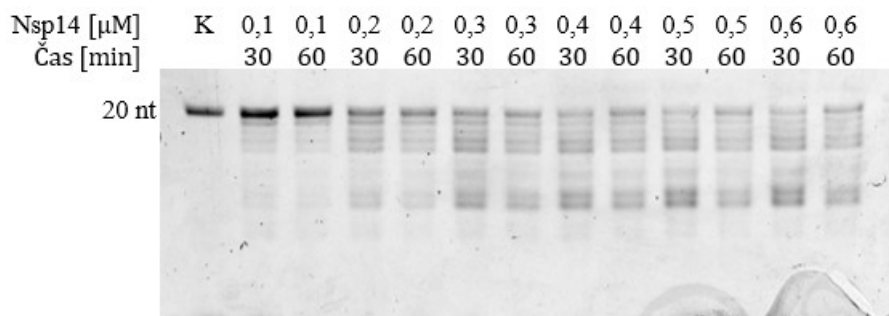
**Obrázok 12:** Grafické zobrazenie štiepenia **dsRNA** proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10FL v 60 minútovom časovom intervale priebehu reakcie.



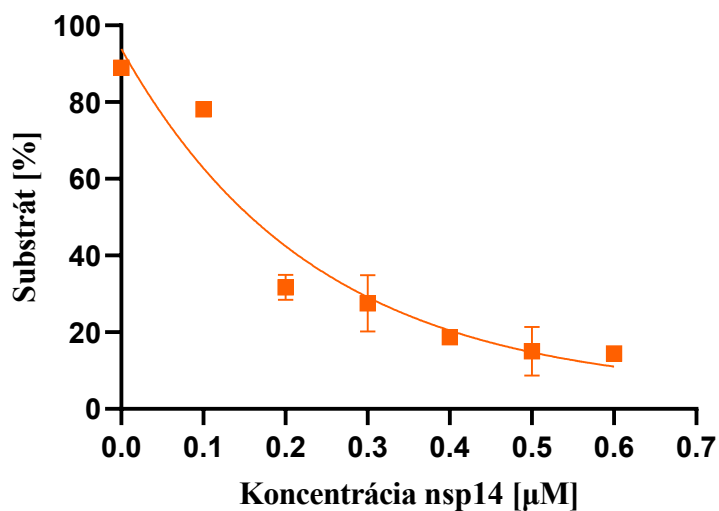
**Obrázok 13:** Gél horizontálnej elektroforézy eseje štiepiacej substrát **dsRNA** proteínom nsp14 v prítomnosti proteínu nsp10sh. Číslom v hornej časti gélu je označená koncentrácia proteínov nsp14, nsp10sh a čas priebehu reakcie. K – negatívna kontrola reakcie neobsahujúca nsp14 ani nsp10.



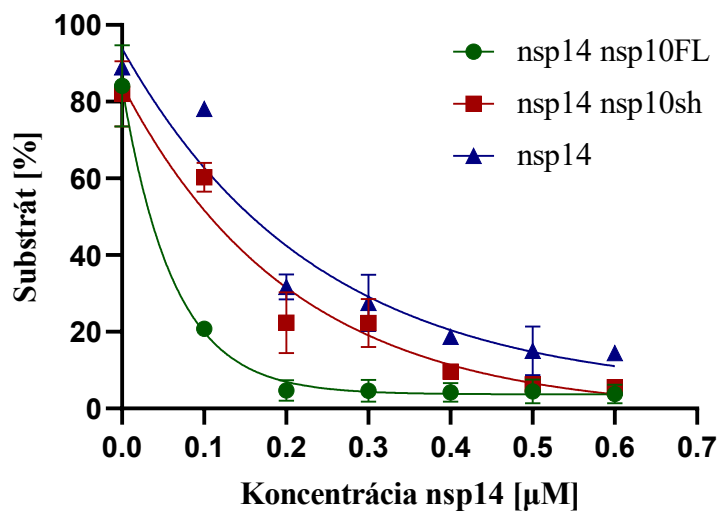
**Obrázok 14:** Grafické zobrazenie štiepenia **dsRNA** proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10sh v 60 minútovom časovom intervale priebehu reakcie.



**Obrázok 15:** Gél horizontálnej elektroforézy eseje štiepiacej substrát **dsRNA** proteínom nsp14 v neprítomnosti proteínu nsp10. Číslom v hornej časti gélu je označená koncentrácia proteínu nsp14 a čas priebehu reakcie. K – negatívna kontrola reakcie neobsahujúca nsp14 ani nsp10.



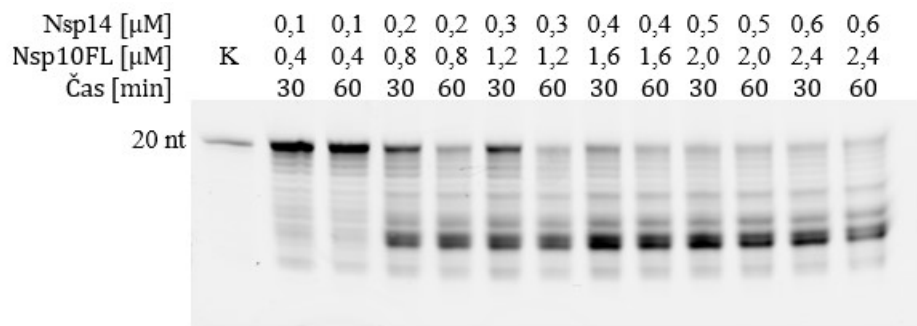
**Obrázok 16:** Grafické zobrazenie štiepenia **dsRNA** proteínom nsp14 v neprítomnosti nsp10 v 60 minútovom časovom intervale priebehu reakcie.



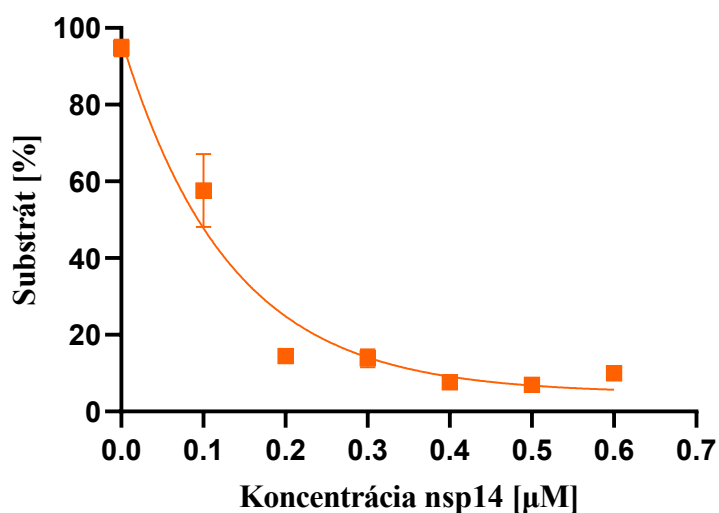
**Obrázok 17:** Grafické porovnanie aktivity štiepenia **dsRNA** proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10FL, nsp10sh a v neprítomnosti nsp10 v 60 minútovom intervale priebehu reakcie.

### 5.3.1.2 Reakcie s dsRNA MM

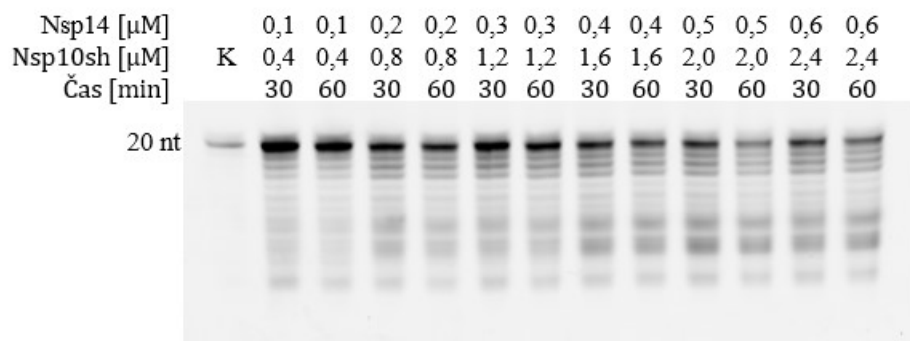
Využitím *in vitro* aktivitnej eseje bolo pozorované štiepenie dvojvláknovej RNA s nesprávnym párovaním v pozícii posledného páru báz na 3' konci štiepeného vlákna (dsRNA MM) proteínom nsp14 v prítomnosti jeho kofaktoru nsp10FL (obr. 18, 19), nsp10sh (obr. 20, 21) a bez prítomnosti nsp10 (obr. 22, 23). Sekvencie templátu a primeru tvoriacich dsRNA MM sú uvedené v kapitole 4.1.8. V obr. 24 je uvedené porovnanie aktivity štiepenia dsRNA MM proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10FL, nsp10sh a v neprítomnosti nsp10 v 60 minútovom priebehu reakcie. Obr. 25 zobrazuje porovnanie aktivity štiepenia dsRNA a dsRNA MM proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10FL v 60 minútovom priebehu reakcie.



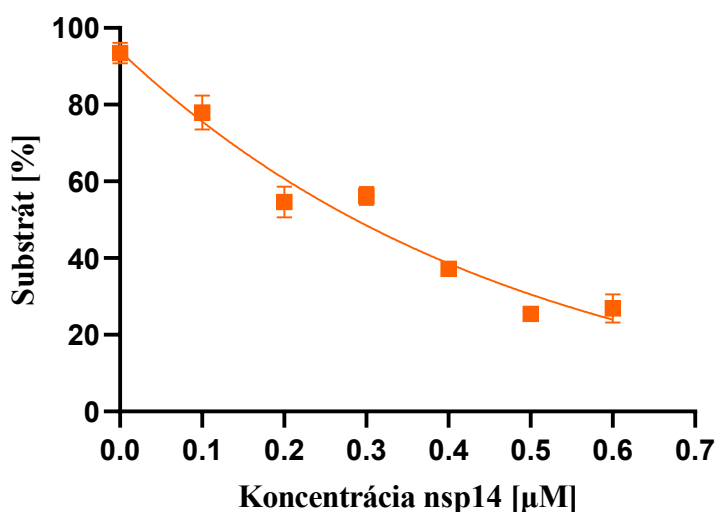
**Obrázok 18:** Gél horizontálnej elektroforézy eseje štiepiacej substrát **dsRNA MM** proteínom nsp14 v prítomnosti proteínu nsp10FL. Číslom v hornej časti gélu je označená koncentrácia proteínov nsp14, nsp10FL a čas priebehu reakcie. K – negatívna kontrola neobsahujúca proteíny nsp14 a nsp10FL.



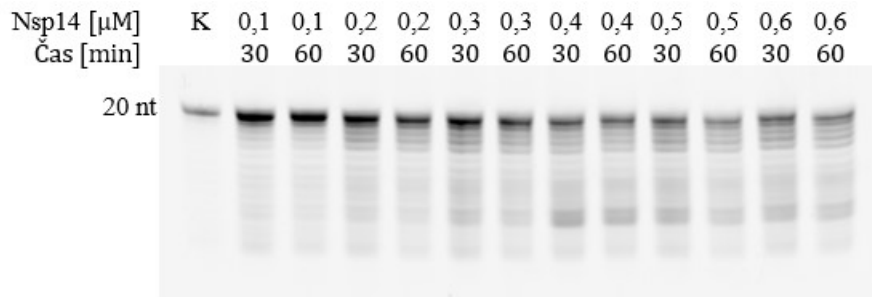
**Obrázok 19:** Grafické zobrazenie štiepenia **dsRNA MM** proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10FL v 60 minútovom časovom intervale priebehu reakcie.



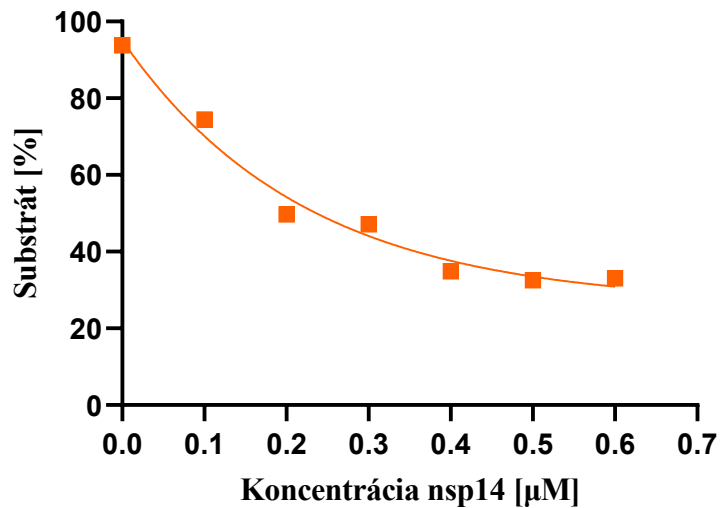
**Obrázok 20:** Gél horizontálnej elektroforézy eseje štiepiacej substrát **dsRNA MM** proteínom nsp14 v prítomnosti proteínu nsp10sh. Číslom v hornej časti gélu je označená koncentrácia proteínov nsp14, nsp10sh a čas priebehu reakcie. K – negatívna kontrola reakcie neobsahujúca nsp14 ani nsp10.



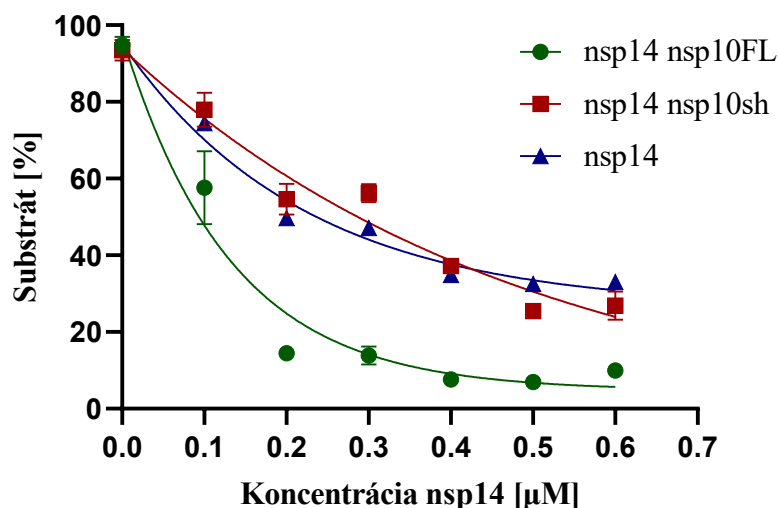
**Obrázok 21:** Grafické zobrazenie štiepenia **dsRNA MM** proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10sh v 60 minútovom časovom intervale priebehu reakcie.



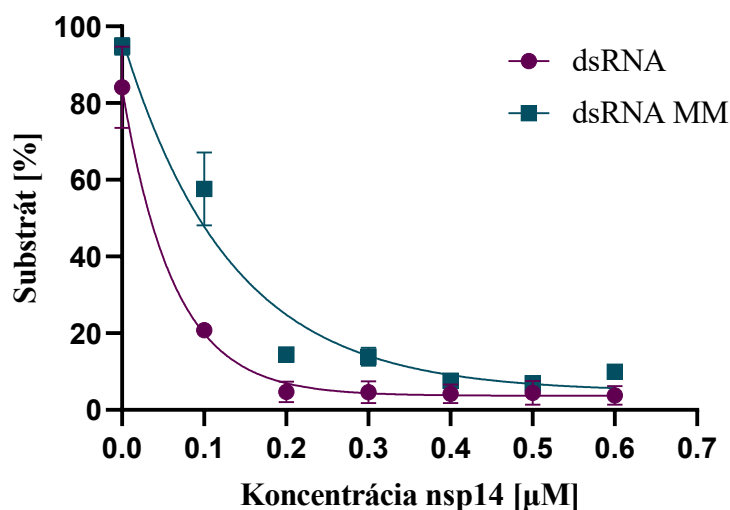
**Obrázok 22:** Gél horizontálnej elektroforézy eseje štiepiacej substrát **dsRNA MM** proteínom nsp14 v neprítomnosti proteínu nsp10. Číslo v hornej časti gélu je označená koncentrácia proteínu nsp14 a čas priebehu reakcie. K – negatívna kontrola reakcie neobsahujúca nsp14 ani nsp10.



**Obrázok 23:** Grafické zobrazenie štiepenia **dsRNA MM** proteínom nsp14 v neprítomnosti nsp10 v 60 minútovom časovom intervale priebehu reakcie.



**Obrázok 24:** Grafické porovnanie aktivity štiepenia dsRNA MM proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10FL, nsp10sh a v neprítomnosti nsp10 v 60 minútovom intervale priebehu reakcie.



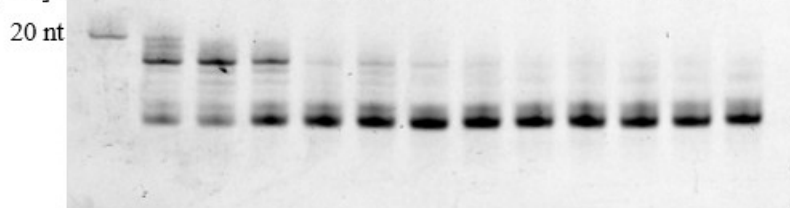
**Obrázok 25:** Grafické porovnanie aktivity štiepenia dsRNA a dsRNA MM proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10FL v 60 minútovom intervale priebehu reakcie.

### 5.3.1.3 Reakcie s ssRNA

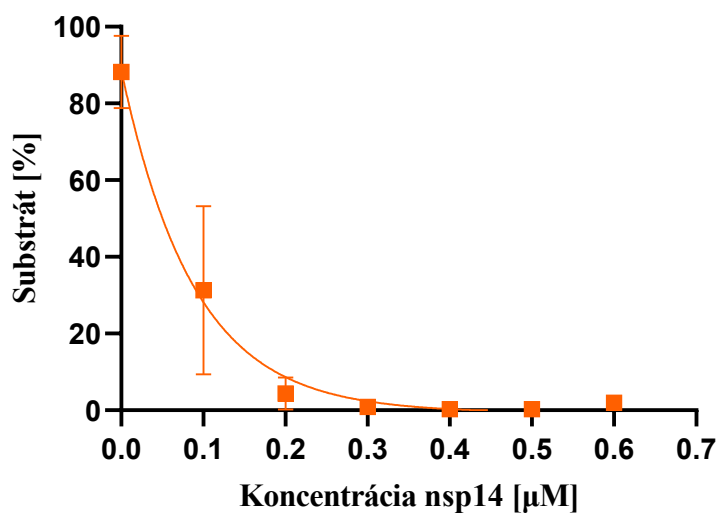
Využitím *in vitro* aktivitnej eseje bolo pozorované štiepenie jednovláknovej RNA (ssRNA) proteínom nsp14 v prítomnosti jeho kofaktoru nsp10FL (obr. 26, 27), nsp10sh (obr. 28, 29) a bez prítomnosti nsp10 (obr. 30, 31). Sekvencia ssRNA je uvedená v kapitole 4.1.8. V obr. 32 je uvedené porovnanie aktivity štiepenia ssRNA proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10FL, nsp10sh a v neprítomnosti nsp10 v 60 minútovom priebehu reakcie.



Nsp14 [ $\mu\text{M}$ ]		0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6
Nsp10FL [ $\mu\text{M}$ ]	K	0,4	0,4	0,8	0,8	1,2	1,2	1,6	1,6	2,0	2,0	2,4	2,4
Čas [min]		30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60

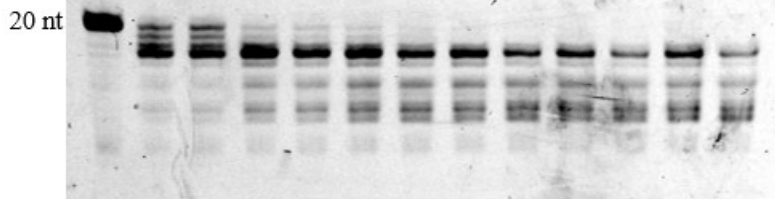


**Obrázok 26:** Gél horizontálnej elektroforézy eseje pozorujúcej štiepenie substrátu **ssRNA** proteínom **nsp14** v prítomnosti proteínu **nsp10FL**. Číslom v hornej časti gélu je označená koncentrácia proteínov **nsp14**, **nsp10FL** a čas priebehu reakcie. K – negatívna kontrola reakcie neobsahujúca **nsp14** ani **nsp10**.

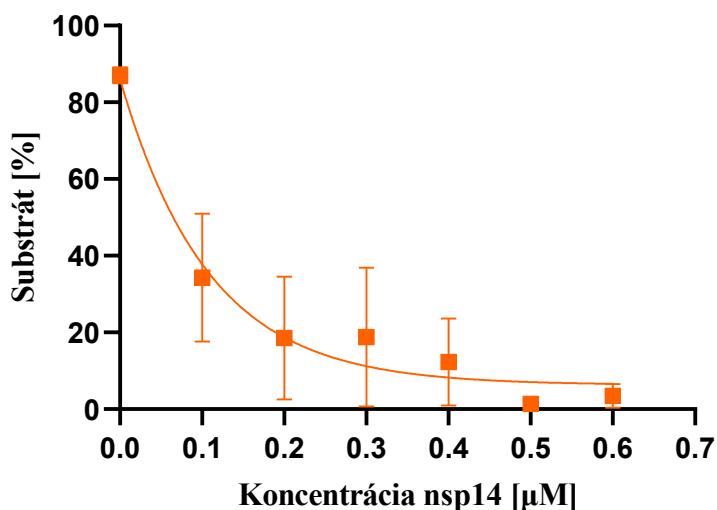


**Obrázok 27:** Grafické zobrazenie štiepenia **ssRNA** proteínom **nsp14** v prítomnosti **nsp10FL** v 60 minútovom časovom intervale priebehu reakcie.

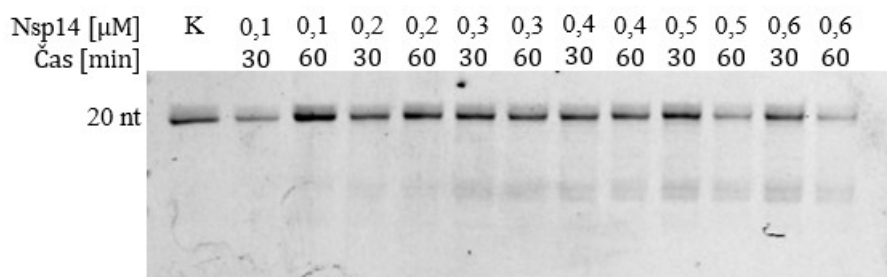
Nsp14 [ $\mu\text{M}$ ]		0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6
Nsp10sh [ $\mu\text{M}$ ]	K	0,4	0,4	0,8	0,8	1,2	1,2	1,6	1,6	2,0	2,0	2,4	2,4
Čas [min]		30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60



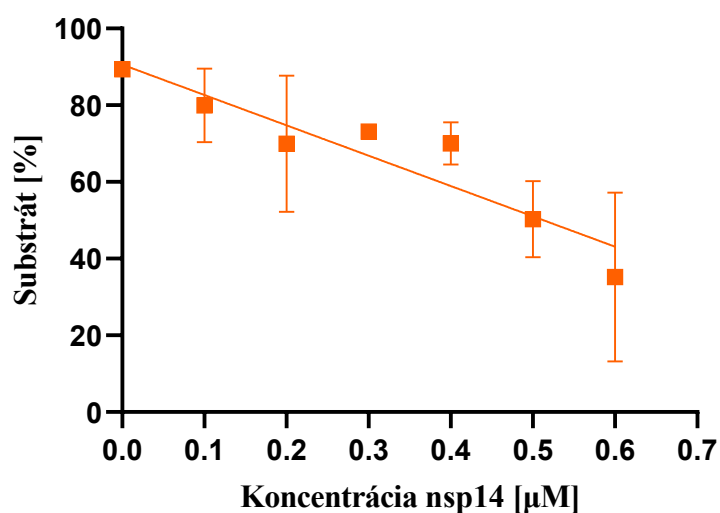
**Obrázok 28:** Gél horizontálnej elektroforézy eseje pozorujúcej štiepenie substrátu **ssRNA** proteínom nsp14 v prítomnosti proteínu nsp10sh. Číslom v hornej časti gélu je označená koncentrácia proteínov nsp14, nsp10sh a čas priebehu reakcie. K – negatívna kontrola reakcie neobsahujúca nsp14 ani nsp10.



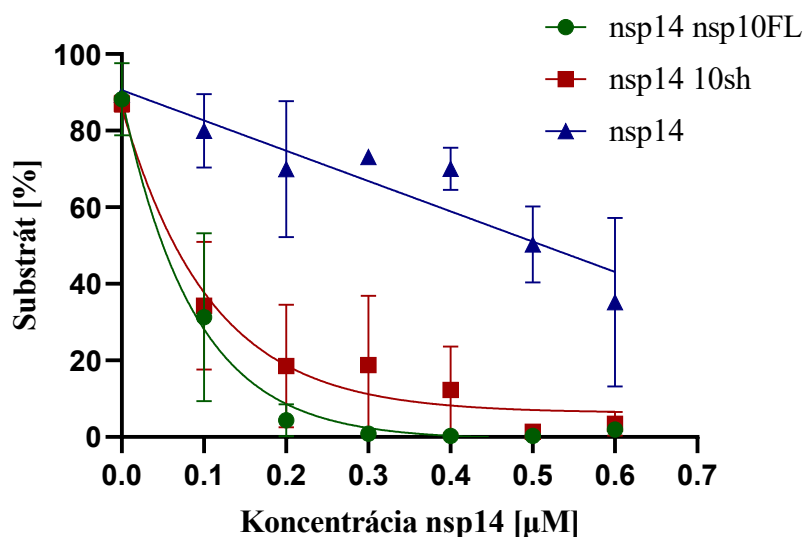
**Obrázok 29:** Grafické zobrazenie štiepenia **ssRNA** proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10sh v 60 minútovom časovom intervale priebehu reakcie.



**Obrázok 30:** Gél horizontálnej elektroforézy eseje pozorujúcej štiepenie substrátu **ssRNA** proteínom nsp14 v neprítomnosti proteínu nsp10. Číslom v hornej časti gélu je označená koncentrácia proteínu nsp14 a čas priebehu reakcie. K – negatívna kontrola reakcie neobsahujúca nsp14 ani nsp10.



**Obrázok 31:** Grafické zobrazenie štiepenia **ssRNA** proteínom nsp14 v neprítomnosti nsp10 v 60 minútovom časovom intervale priebehu reakcie.



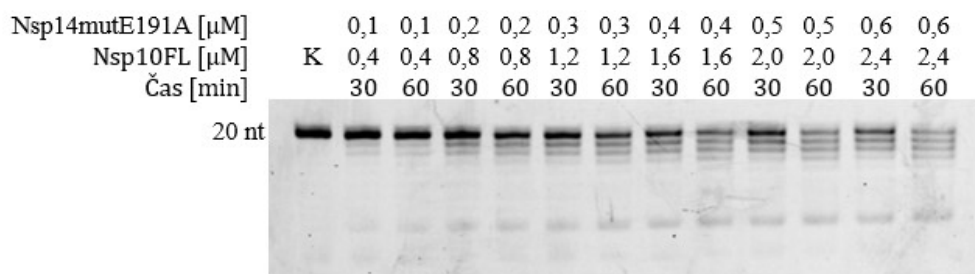
**Obrázok 32:** Grafické porovnanie aktivity štiepenia ssRNA proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10FL, nsp10sh a v neprítomnosti nsp10 v 60 minútovom intervale priebehu reakcie.

### 5.3.2 Mutované verzie nsp14 a nsp10

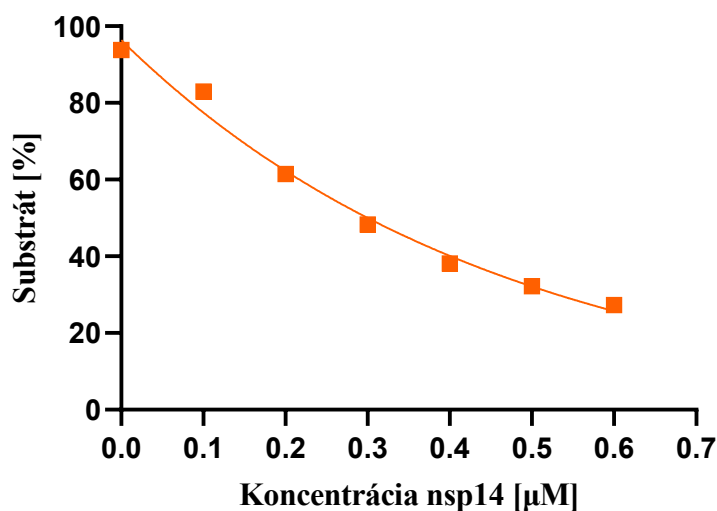
Aktivitné eseje boli prevedené s dsRNA ako substrátom. V prípade mutovaných verzií proteínu nsp14 prebehli v prítomnosti nsp10FL.

#### 5.3.2.1 Nsp14mutE191A

Exonukleázová aktivita mutovanej verzie proteínu nsp14 so zámennou kyseliny glutamovej za alanín v pozícii 131 (nsp14mutE191A) bola pozorovaná využitím *in vitro* aktivitnej eseje (obr. 33, 34). Reakcia prebehla v prítomnosti proteínu nsp10FL. Ako substrát bola použitá dsRNA.



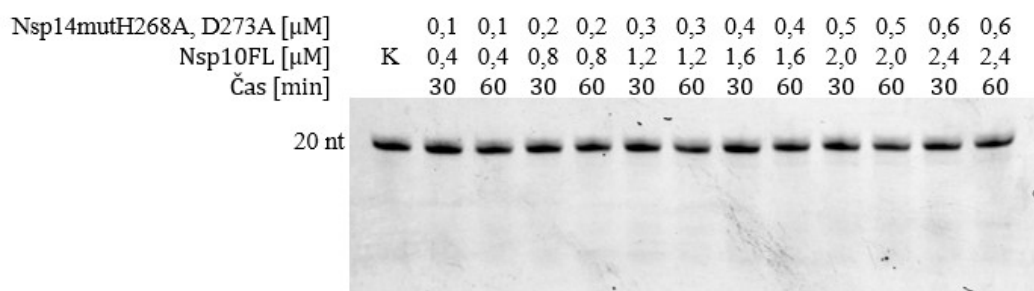
**Obrázok 33:** Gél horizontálnej elektroforézy eseje pozorujúcej štiepenie substrátu **dsRNA** proteínom nsp14mutE191A v prítomnosti proteínu nsp10FL. Číslom v hornej časti gélu je označená koncentrácia proteínov nsp14mutE191A, nsp10FL a čas priebehu reakcie. K – negatívna kontrola reakcie neobsahujúca nsp14 ani nsp10.



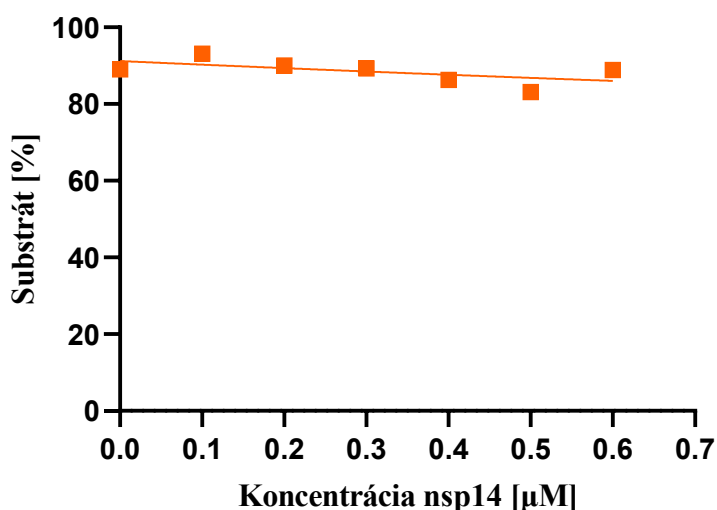
**Obrázok 34:** Grafické zobrazenie štiepenia **dsRNA** proteínom nsp14mutE191A v prítomnosti nsp10FL v 60 minútovom časovom intervale priebehu reakcie.

### 5.3.2.2 Nsp14mutH268A, D273A

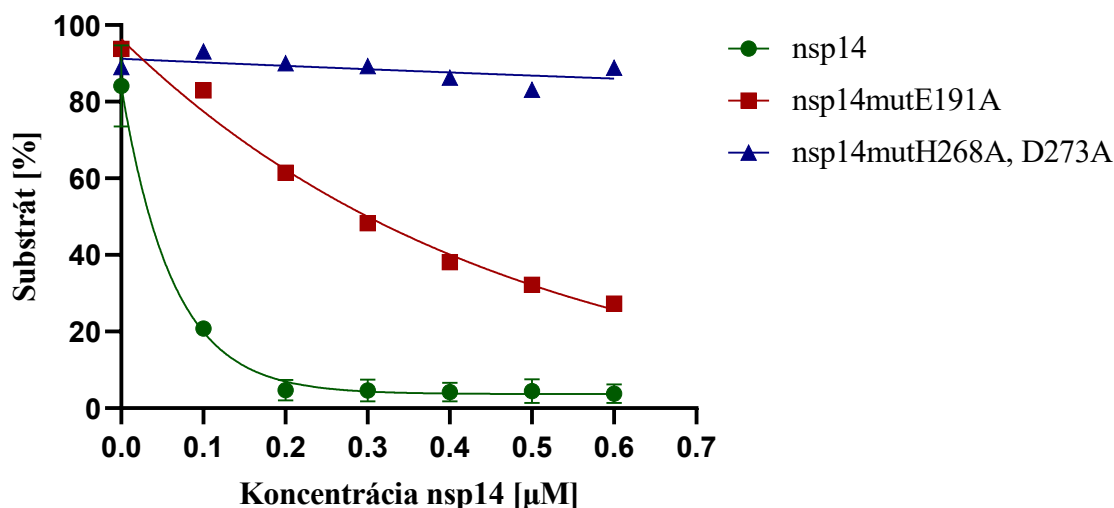
Exonukleázová aktivita mutovanej verzie proteínu nsp14 so zámenou histidínu za alanín v pozícii 268 a kyseliny asparagovej za alanín v pozícii 273 (nsp14mutH268A, D273A) bola pozorovaná využitím *in vitro* aktivitnej eseje (obr. 35, 36). Reakcia prebehla v prítomnosti proteínu nsp10FL. Ako substrát bola použitá **dsRNA**. Obr. 37 zobrazuje porovnanie aktivít proteínu nsp14 a jeho mutovaných verzií v 60 minútovom časovom intervale prebiehajúcich reakcií.



**Obrázok 35:** Gél horizontálnej elektroforézy eseje pozorujúcej štiepenie substrátu **dsRNA** proteínom nsp14mutH268A, D273A v prítomnosti proteínu nsp10FL. Číslo v hornej časti gélu je označená koncentrácia proteínov nsp14mutH268A, D273A, nsp10FL a čas priebehu reakcie. K – negatívna kontrola reakcie neobsahujúca nsp14 ani nsp10.



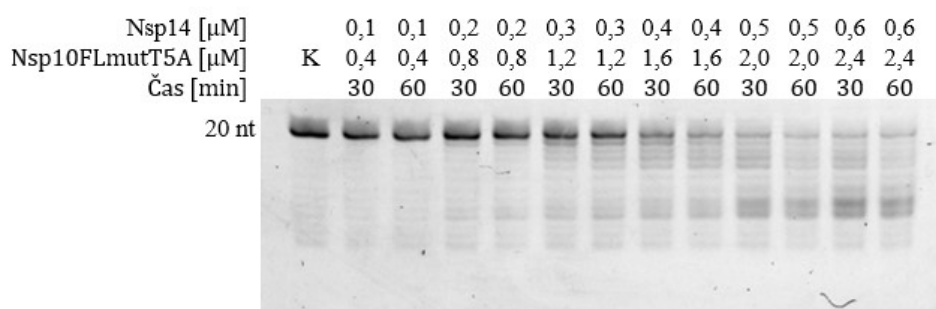
**Obrázok 36:** Grafické zobrazenie štiepenia **dsRNA** proteínom nsp14mutH268A, D273A v prítomnosti nsp10FL v 60 minútovom časovom intervale priebehu reakcie.



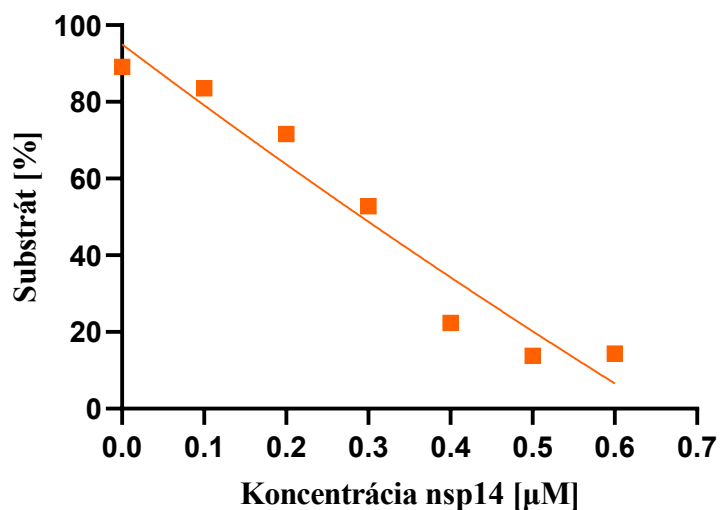
**Obrázok 37:** Grafické porovnanie aktivity štiepenia **dsRNA** proteínom nsp14 a jeho mutovanými verziami v prítomnosti nsp10FL v 60 minútovom intervale priebehu reakcie.

### 5.3.2.3 Nsp10FLmutT5A

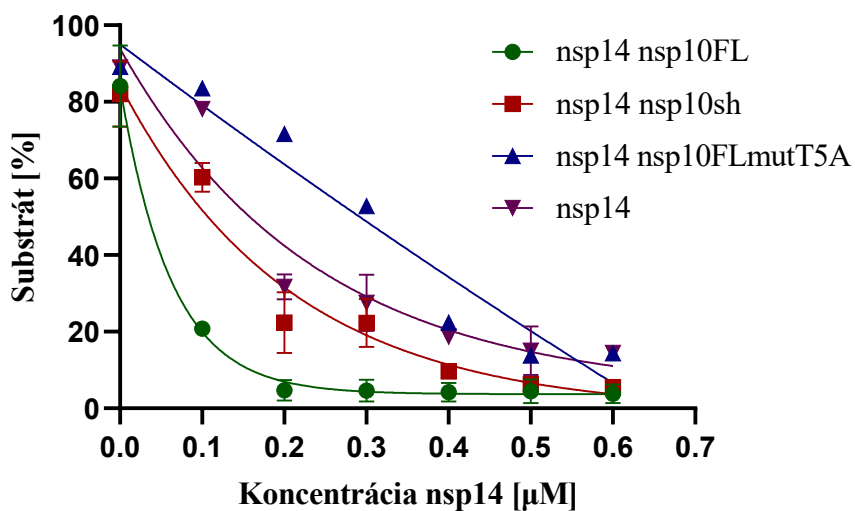
Exonukleázová aktivita proteínu nsp14 v prítomnosti mutovanej verzie proteínu nsp10 so zámienou treonínu za alanín v pozícii 5 (nsp10FLmutT5A) bola pozorovaná využitím *in vitro* aktivitnej eseje (obr. 38, 39). Ako substrát bola použitá **dsRNA**. V obr. 40 je zobrazené porovnanie štiepenia dsRNA proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10FL, nsp10sh, nsp10FLmutT5A a v neprítomnosti nsp10.



**Obrázok 38:** Gél horizontálnej elektroforézy eseje pozorujúcej štiepenie substrátu **dsRNA** proteínom nsp14 v prítomnosti mutovaného proteínu nsp10FLmutT5A. Číslom v hornej časti gélu je označená koncentrácia proteínov nsp14, nsp10FLmutT5A a čas priebehu reakcie. K – negatívna kontrola reakcie neobsahujúca nsp14 ani nsp10.



**Obrázok 39:** Grafické zobrazenie štiepenia dsRNA proteínom nsp14 v prítomnosti mutovaného proteínu nsp10FLmutT5A v 60 minútovom časovom intervale priebehu reakcie.



**Obrázok 40:** Grafické porovnanie aktivity štiepenia dsRNA proteínom nsp14 v prítomnosti nsp10FL, nsp10sh, nsp10FLmutT5A a v neprítomnosti nsp10 v 60 minútovom intervale priebehu reakcie.



## 6 Diskusia

Neštruktúrny proteín 14 (nsp14) u koronavírusov je zložený z dvoch enzymaticky aktívnych domén. Jeho N koncová doména nesie 3'-5' exoribunukleázovú aktivitu vyštiepujúcu nukleotidy, ktoré boli RNA-dependentnou RNA polymerázou nesprávne zaradené do novo vznikajúceho reťazca a slúži tak ako opravný mechanizmus počas replikácie genómu. Dôležitým kofaktorom pre exonukleázovú aktivitu proteínu nsp14 je ďalší koronavírusový neštruktúrny proteín, nsp10. Exonukleáza nsp14 patrí medzi DEDDh/DEEDh exonukleázy s konzervovanými aminokyselinami D90, E92, E191, H268, D273 v aktívnom mieste enzýmu. Na charakterizáciu významu jednotlivých aminokyselín boli vytvorené mutované verzie proteínu nsp14. Vplyv kofaktora nsp10 na exonukleázovú aktivitu nsp14 bol overený vytvorením nsp10 plnej dĺžky, jeho mutovanej verzie a verzie nsp10 skrátenej o koncové úseky. Skrátená verzia nsp10 bola vytvorená na základe porovnania sekvencie nsp10FL zo SARS-CoV-2 s publikovanou štruktúrou nsp10 zo SARS-CoV, v ktorej koncové úseky neboli viditeľné a preto boli odstránené. Mutant nsp10FLmutT5A bol použitý na charakterizáciu vplyvu N koncovej časti proteínu nsp10 na exonukleázovú aktivitu nsp14, pretože aminokyseliny 1-8 tvoria kontakt s aktívnym miestom nsp14. Oba vírusové proteíny a ich mutované verzie boli pripravené v bakteriálnom expresnom systéme využívajúcom bakteriálny kmeň *E. coli* RIL.

Všetky verzie proteínu nsp10 boli pripravené v relatívne vysokej koncentrácii štandardným spôsobom. V príprave proteínu nsp14 boli čiastočne upravené kroky na zvýšenie výťažku. V porovnaní s prípravou verzií proteínu nsp10 bol výťažok tvorby verzií proteínu nsp14 aj napriek čiastočnej modifikácii postupu výrazne nižší. Jednou z možných príčin nízkeho výťažku prípravy proteínu nsp14 je jeho exonukleázová aktivita, ktorá môže byť vo vysokých koncentráciách proteínu pre produkčné baktérie toxická. Na základe profilu permeačnej chromatografie je možné pozorovať, že počas prípravy verzií oboch vírusových proteínov dochádza k určitému stupňu oligomerizácie a vzniku komplexov s nukleovými kyselinami pochádzajúcimi z produkčných baktérií, čo ďalej znižuje výsledný výťažok produkcie, keďže frakcie obsahujúce takéto komplexy boli zahodené. U verzií proteínu nsp14 je tvorba komplexov s nukleovými kyselinami výrazne vyššia. Pre proteín nsp10 je oligomerizácia v roztoku prirodzená (Rogstam et al., 2020) a tvorba komplexov s nukleovými kyselinami je spôsobená prítomnosťou RNA väzbových domén u oboch proteínov. Pridanie nukleázy pred lyzovaním produkčných buniek by mohlo viesť k zníženiu tvorby komplexov vírusových proteínov s nukleovými kyselinami a ďalšou optimalizáciou produkcie

a purifikácie proteínov by pravdepodobne bolo možné docieľiť vyšších výťažkov. Pridanie nukleázy by ale mohlo ovplyvniť výsledky aktivných esejí, preto v purifikácii nebola použitá. V našom prípade boli proteíny vyprodukované v dostatočnej koncentrácii a čistote a ďalšia optimalizácia postupov ich prípravy nebola potrebná.

Enzymatická aktivita exonukleázy nsp14 bola overená *in vitro* aktivnými esejami pozorujúcimi štiepenie jednovláknovej RNA, dvojevláknovej RNA a dvojevláknovej RNA s nesprávnym párovaním báz, ako substrátu. Aktivitné eseje prebehli v rôznej variácii pripravených verzií proteínov nsp14 a nsp10. Podľa očakávaní, nsp14 štiepila jednovláknovú aj dvojevláknovú RNA. Exonukleázová aktivita viedla k vzniku rebríčku štiepných produktov líšiacich sa o jeden nukleotid. Pomer jednotlivých štiepných produktov nebol rovnaký, pričom niektoré vznikali s vyššou frekvenciou ako iné. To poukazuje na preferenciu exonukleázy nsp14 na prítomnosť konkrétneho nukleotidu na 3' konci štiepeného vlákna, čo sa zhoduje s výsledkami štúdie charakterizujúcej exonukleázu nsp14 koronavírusu SARS-CoV (Minskaia et al., 2006).

Vzhľadom na to, že za hlavnú funkciu exonukleázy nsp14 je považovaná oprava nesprávne zaradených nukleotidov počas replikácie vírusového genómu, bola prevedená aktivná esej využívajúca dsRNA s nesprávnym párovaním na prvom páre báz na 3' konci štiepeného vlákna (dsRNA MM) mimikujúca nesprávne zaradenú bázu počas replikácie. Podľa očakávaní, dsRNA MM bola štiepená proteínom nsp14 (obr. 18-24), čo sa zhoduje s výsledkami štúdie nsp14 koronavírusu SARS-CoV (Bouvet et al., 2012). Čiastočne neočakávaným výsledkom bolo, že dsRNA MM bola štiepená o niečo horšie ako identická dsRNA so správnym párovaním (obr. 25). Podľa vyššie spomenutej štúdie by malo byť štiepenie dsRNA MM s jednou nepárujúcou bázou na konci ekvivalentné so štiepením plne komplementárnej dsRNA (Bouvet et al., 2012). Aktivitu štiepenia dsRNA MM je potrebné overiť ďalšími esejami. Na základe prevedených experimentov nie je možné určiť substrátovú preferenciu exonukleázy nsp14. Na určenie preferencie by bolo potrebné navrhnuť kompetitívnu esej s rozdielne značenými dsRNA aj dsRNA MM zároveň v jednej reakcii, čo je otázkou ďalších experimentov.

Význam špecifických aminokyselín v aktívnom mieste nsp14 bol overený vytvorením mutovaných verzií proteínu nsp14. Nsp14mutE191A niesla zámenu kyseliny glutamovej v pozícii 191 za alanín a nsp14mutH268A, D273A niesla dvojité zámene histidínu v pozícii 268 a kyseliny asparagovej v pozícii 273 za alanín. Takéto zámene by mali viesť k zrušeniu

funkčnosti danej aminokyseliny ale nemali by výrazne ovplyvniť celkovú štruktúru proteínu. U proteínu nsp14mutE191A došlo k štiepeniu dsRNA (obr. 33, 34) ale v porovnaní s aktivitou nemutovanej verzie bola aktivita nsp14mutE191A výrazne znížená (obr. 37). Kyselina glutamová sa v pozícii 191 podieľa na koordinácii jedného z dvoch iónov  $Mg^{2+}$  esenciálnych pre enzymatickú aktivitu exonukleázy nsp14 (Ma et al., 2015) a jej zámena za alanín výrazne znižuje schopnosť viazať ión  $Mg^{2+}$  v danom mieste, čo vedie k negatívnemu ovplyvneniu exonukleázovej aktivity. Tento výsledok sa nezhoduje úplne s výsledkami štúdiu proteínu nsp14mutE191A v dostupných publikáciách, kde touto mutáciou dochádza k úplnému utlmeniu exonukleázovej aktivity (Ma et al., 2015, Liu et al., 2021). Tento rozdiel je pravdepodobne spôsobený rozdielnou koncentráciou proteínu nsp14mutE191A použitou v jednotlivých štúdiách, pričom je z výsledkov tejto práce zjavné, že s rastúcou koncentráciou proteínu rastie aj výsledná aktivita. Proteín nsp14mutH268A, D273A mal veľmi nízku enzymatickú aktivitu, keďže k štiepeniu substrátu pri nízkych koncentráciách proteínu nedochádzalo a u vyšších koncentrácií proteínu dochádzalo k štiepeniu len minimálne (obr. 35, 36). Tieto aminokyseliny sa tiež podieľajú na koordinácii jedného z esenciálnych  $Mg^{2+}$  iónov a ich zámena za alanín teda vedie k výraznému zníženiu exonukleázovej aktivity.

Dôležitosť proteínu nsp10 pre enzymatickú aktivitu exonukleázovej domény nsp14 bola overená vytvorením mutovanej verzie nsp10 plnej dĺžky (nsp10FL) so zamenou treonínu v pozícii 5 za alanín (nsp10FLmutT5A) a skrátenej verzie (nsp10sh) s chýbajúcim úsekom na oboch koncoch proteínu. Aktivita nsp14 bola sledovaná v prítomnosti nsp10FL, nsp10sh a v neprítomnosti proteínu nsp10 v esejach štiepiacich ssRNA, dsRNA a dsRNA MM. Podľa očakávaní, najvyššiu aktivitu mala exonukleáza nsp14 v prítomnosti nsp10FL (obr. 17, 24 s 32). V neprítomnosti nsp10 stále dochádzalo k štiepeniu substrátu, enzymatická aktivita nsp14 bola ale výrazne nižšia (obr. 17, 24 a 32). To je spôsobené rozdielom konformácie proteínu nsp14, kedy v neprítomnosti nsp10 je časť nsp14, ktorá obsahuje väzbovú doménu pre nsp10, zložená do priestoru väzbového miesta pre RNA a tým dochádza k jeho čiastočnému uzavretiu (Imprachim et al., 2023). Aktivita proteínu nsp14 v prítomnosti nsp10sh bola v prípade dsRNA a dsRNA MM takmer rovnaká ako jeho aktivita v neprítomnosti nsp10 (obr. 17 a 24). U ssRNA bola aktivita štiepenia pôvodného substrátu veľmi podobná tej v prítomnosti nsp10FL (obr. 32), líšila sa ale vo frekvencii vzniku jednotlivých štiepných produktov, pričom v reakcii s nsp10FL dochádzalo k vzniku krátkych produktov pri nižšej koncentrácii proteínov. Jedným z dôvodov vyššej aktivity štiepenia ssRNA v prítomnosti nsp10sh môže byť vytvorenie špecifickej konformácie nsp14 vo väzbe skrátenej nsp10sh, ktorá je odlišná od tej vo väzbe s nsp10FL.

Takáto konformácia čiastočne uzatvára väzbové miesto pre RNA a sťažuje prístup väčšej, dvojvláknovej RNA, zatiaľ čo väzba jednovláknovej RNA, ktorá je v porovnaní s dsRNA menšia, nie je tak výrazne zasiahnutá. Na analýzu frekvencie vzniku jednotlivých štiepných produktov nie je použitá esej v momentálnej forme vhodná, po úprave štiepenej RNA, predĺžení času priebehu elektroforézy alebo úprave dĺžky polyakrylamidového gélu by pravdepodobne mohla byť na takúto analýzu v budúcom výskume použitá. Najnižšiu enzymatickú aktivitu mala exonukleáza nsp14 v prítomnosti mutovanej verzie proteínu nsp10FLmutT5A, ktorá bola v nízkych koncentráciách proteínov nižšia, ako jej aktivita v neprítomnosti nsp10. Toto zhoršenie exonukleázovej aktivity by mohlo byť opäť vysvetlené tvorbou špecifickej konformácie komplexu nsp14 s nsp10FLmutT5A, ktorá blokuje RNA väzbové miesto viac ako samotná nsp14 bez prítomnosti nsp10.

Výsledky tejto práce sa vo väčšine prípadov zhodujú s dostupnou publikovanou literatúrou zaoberajúcou sa exonukleázou nsp14 z koronavírusov SARS-CoV a SARSCoV-2. Na dôkladnejšiu charakterizáciu enzymatickej aktivity exonukleázy nsp14 a jej závislosti na nsp10 bude potrebné v ďalšom výskume modifikovať niektoré aktuálne použité a zaviesť niektoré nové metódy.

## 7 Súhrn

- Expresné vektory nesúce mutované verzie proteínov nsp14 (E191A; H268A, D273A) a nsp10 (T5A) boli úspešne pripravené
- Divoké kmene (wt, z angl. wild-type) proteínov nsp14 a nsp10FL, ich mutované verzie, ako aj skrátená verzia nsp10 (nsp10sh) boli pripravené v bakteriálnom expresnom systéme využívajúcom baktérie *E. coli* a následne prečistené využitím afinitnej a gélovej permeačnej chromatografie
- Exonukleázová aktivita nsp14 wt v prítomnosti nsp10FL, nsp10sh, nsp10mutT5A a v neprítomnosti nsp10 bola charakterizovaná *in vitro* aktivnými esejami využívajúcimi ssRNA, dsRNA a dsRNA MM ako substrát. Získané výsledky poukazujú na pravdepodobne rozdielne konformácie nsp14 v prítomnosti nsp10FL, nsp10sh, nsp10mutT5A a v neprítomnosti nsp10
- Exonukleázová aktivita mutovaných verzií nsp14 v prítomnosti nsp10FL bola charakterizovaná *in vitro* aktivnými esejami využívajúcimi dsRNA ako substrát. Eseje mutovaných verzií nsp14 potvrdzujú významnosť jednotlivých aminokyselín na príslušných pozíciách v aktívnom mieste exonukleázy.

## 8 Zoznam použitej literatúry

- Almeida, J. D., & Tyrrell, D. A. J. (1967). The Morphology of Three Previously Uncharacterized Human Respiratory Viruses that Grow in Organ Culture Department of Medical Microbiology, St Thomas 's Hospital Medical School, *Journal of General Virology*, 175–178.
- Anand, K., Palm, G. J., Mesters, J. R., Siddell, S. G., Ziebuhr, J., & Hilgenfeld, R. (2002). Structure of coronavirus main proteinase reveals combination of a chymotrypsin fold with an extra  $\alpha$ -helical domain. *EMBO Journal*, 21(13), 3213–3224. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf327>
- Banerjee, A. K., Blanco, M. R., Bruce, E. A., Honson, D. D., Chen, L. M., Chow, A., Bhat, P., Ollikainen, N., Quinodoz, S. A., Loney, C., Thai, J., Miller, Z. D., Lin, A. E., Schmidt, M. M., Stewart, D. G., Goldfarb, D., De Lorenzo, G., Rihn, S. J., Voorhees, R. M., ... Guttman, M. (2020). SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. *Cell*, 183(5), 1325–1339.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.004>
- Baranov, P. V., Henderson, C. M., Anderson, C. B., Gesteland, R. F., Atkins, J. F., & Howard, M. T. (2005). Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-CoV genome. *Virology*, 332(2), 498–510. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.11.038>
- Bárcena, M., Oostergetel, G. T., Bartelink, W., Faas, F. G. A., Verkleij, A., Rottier, P. J. M., Koster, A. J., & Bosch, B. J. (2009). Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(2), 582–587. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805270106>
- Belouzard, S., Chu, V. C., & Whittaker, G. R. (2009). Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5871–5876. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809524106>
- Bonavia, A., Zelus, B. D., Wentworth, D. E., Talbot, P. J., & Holmes, K. V. (2003). Identification of a Receptor-Binding Domain of the Spike Glycoprotein of Human Coronavirus HCoV-229E. *Journal of Virology*, 77(4), 2530–2538. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.4.2530-2538.2003>
- BOS, E. C. W., LUYTJES, W., MEULEN, H. VAN DER, KOERTEN, H. K., & SPAAN, W. J. M. (1996). The Production of Recombinant Infectious DI-Particles of a Murine Coronavirus in the Absence of Helper Virus. *Virology*, 218(1), 52–60. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0165>
- Boscarino, J. A., Logan, H. L., Lacny, J. J., & Gallagher, T. M. (2008). Envelope Protein Palmitoylations Are Crucial for Murine Coronavirus Assembly. *Journal of Virology*, 82(6), 2989–2999. <https://doi.org/10.1128/jvi.01906-07>
- Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A. M., & Rottier, P. J. M. (2003). The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *Journal of Virology*, 77(16), 8801–8811. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003>
- Bouvet, M., Debarnot, C., Imbert, I., Selisko, B., Snijder, E. J., Canard, B., & Decroly, E. (2010). In vitro reconstitution of sars-coronavirus mRNA cap methylation. *PLoS*

- Pathogens*, 6(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000863>
- Bouvet, M., Imbert, I., Subissi, L., Gluais, L., Canard, B., & Decroly, E. (2012). RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(24), 9372–9377. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201130109>
- Bushnell, L. D., & Brandly, C. A. (1933). Laryngotracheitis in Chicks. *Poultry Science*, 12(1), 55–60. <https://doi.org/10.3382/ps.0120055>
- Chan, J. F., Kok, K., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K.-W., Yuan, S., & Yuen, K.-Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>
- Chandrashekar, A., Liu, J., Martino, A. J., McMahan, K., Mercad, N. B., Peter, L., Tostanosk, L. H., Yu, J., Maliga, Z., Nekorchuk, M., Busman-Sahay, K., Terry, M., Wriji, L. M., Ducat, S., Martine, D. R., Atyeo, C., Fischinger, S., Burk, J. S., Sleil, M. D., ... Barou, D. H. (2020). SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science*, 369(6505), 812–817. <https://doi.org/10.1126/science.abc4776>
- Chen, Y., Cai, H., Pan, J., Xiang, N., Tien, P., Ahola, T., & Guo, D. (2009). Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3484–3489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808790106>
- Collins, A. R., Knobler, R. L., Powell, H., & Buchmeier, M. J. (1982). Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology*, 119(2), 358–371. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(82\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(82)90095-2)
- Connor, R. F., & Roper, R. L. (2007). Unique SARS-CoV protein nsp1: bioinformatics, biochemistry and potential effects on virulence. *Trends in Microbiology*, 15(2), 51–53. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.12.005>
- Cunningham, J. D. A. D. M. B. C. H., McIntosh, D. H. M. S. H. L. M. K., & Tyrrell, D. A. J. (1968). Virology: Coronaviruses. *Nature*, 220(5168), 650–650. <https://doi.org/10.1038/220650b0>
- De Groot, R. J. (2006). Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. *Glycoconjugate Journal*, 23(1–2), 59–72. <https://doi.org/10.1007/s10719-006-5438-8>
- de Haan, C. A. M., & Rottier, P. J. M. (2005). Molecular Interactions in the Assembly of Coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 64(January), 165–230. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(05\)64006-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(05)64006-7)
- DeDiego, M. L., Álvarez, E., Almazán, F., Rejas, M. T., Lamirande, E., Roberts, A., Shieh, W.-J., Zaki, S. R., Subbarao, K., & Enjuanes, L. (2007). A Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus That Lacks the E Gene Is Attenuated In Vitro and In Vivo. *Journal of Virology*, 81(4), 1701–1713. <https://doi.org/10.1128/jvi.01467-06>
- Donaldson, E. F., Sims, A. C., Graham, R. L., Denison, M. R., & Baric, R. S. (2007). Murine Hepatitis Virus Replicase Protein nsp10 Is a Critical Regulator of Viral RNA Synthesis.

*Journal of Virology*, 81(12), 6356–6368. <https://doi.org/10.1128/jvi.02805-06>

- Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.-R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A. M., Berger, A., Burguière, A.-M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.-C., Müller, S., ... Doerr, H. W. (2003). Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 348(20), 1967–1976. <https://doi.org/10.1056/nejmoa030747>
- Eckerle, L. D., Becker, M. M., Halpin, R. A., Li, K., Venter, E., Lu, X., Scherbakova, S., Graham, R. L., Baric, R. S., Stockwell, T. B., Spiro, D. J., & Denison, M. R. (2010). Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathogens*, 6(5), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000896>
- Eckerle, L. D., Lu, X., Sperry, S. M., Choi, L., & Denison, M. R. (2007). High Fidelity of Murine Hepatitis Virus Replication Is Decreased in nsp14 Exoribonuclease Mutants. *Journal of Virology*, 81(22), 12135–12144. <https://doi.org/10.1128/jvi.01296-07>
- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In H. J. Maier, E. Bickerton, & P. Britton (Eds.), *Coronaviruses: Methods and Protocols* (pp. 1–23). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1)
- Fenner, F., & Maurin, J. (1976). The classification and nomenclature of viruses. *Archives of Virology*, 51(1–2), 141–149. <https://doi.org/10.1007/bf01317843>
- Genus, F. G. (2012). *F amily. Table 1*, 395–404. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00068-9>
- Ghosh, S., Dellibovi-Ragheb, T. A., Kerviel, A., Pak, E., Qiu, Q., Fisher, M., Takvorian, P. M., Bleck, C., Hsu, V. W., Fehr, A. R., Perlman, S., Achar, S. R., Straus, M. R., Whittaker, G. R., de Haan, C. A. M., Kehrl, J., Altan-Bonnet, G., & Altan-Bonnet, N. (2020).  $\beta$ -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell*, 183(6), 1520–1535.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.039>
- Godet, M., L'Haridon, R., Vautherot, J., & Laude, H. (1992). TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology*, 188(2), 666–675. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90521-P](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90521-P)
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K. M., O'Meara, M. J., Rezelj, V. V., Guo, J. Z., Swaney, D. L., Tummino, T. A., Hüttenhain, R., Kaake, R. M., Richards, A. L., Tutuncuoglu, B., Foussard, H., Batra, J., Haas, K., Modak, M., ... Krogan, N. J. (2020). A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, 583(7816), 459–468. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>
- Guo, Y.-R., Cao, Q.-D., Hong, Z.-S., Tan, Y.-Y., Chen, S.-D., Jin, H.-J., Tan, K.-S., Wang, D.-Y., & Yan, Y. (2020). The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus



- disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Military Medical Research*, 7(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0>
- Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 121(1), 190–193. <https://doi.org/10.3181/00379727-121-30734>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hong Zhou, Xing Chen, Tao HU, Alice C. Hughes, B, Y., & Shi, W. (2020). A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARSCoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Current Biology*, 30(January), 2196–2293. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7211627/pdf/main.pdf>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Hurdiss, D. L., Drulyte, I., Lang, Y., Shamorkina, T. M., Pronker, M. F., van Kuppeveld, F. J. M., Snijder, J., & de Groot, R. J. (2020). Cryo-EM structure of coronavirus-HKU1 haemagglutinin esterase reveals architectural changes arising from prolonged circulation in humans. *Nature Communications*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18440-6>
- Hurst, K. R., Koetzner, C. A., & Masters, P. S. (2013). Characterization of a Critical Interaction between the Coronavirus Nucleocapsid Protein and Nonstructural Protein 3 of the Viral Replicase-Transcriptase Complex. *Journal of Virology*, 87(16), 9159–9172. <https://doi.org/10.1128/jvi.01275-13>
- Hurtado-Tamayo, J., Requena-Platek, R., Enjuanes, L., Bello-Perez, M., & Sola, I. (2023). Contribution to pathogenesis of accessory proteins of deadly human coronaviruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13(May), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1166839>
- Imprachim, N., Yosaatmadja, Y., & Newman, J. A. (2023). Crystal structures and fragment screening of SARS-CoV-2 NSP14 reveal details of exoribonuclease activation and mRNA capping and provide starting points for antiviral drug development. *Nucleic Acids Research*, 51(1), 475–487. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1207>
- Kleine-Weber, H., Elzayat, M. T., Hoffmann, M., & Pöhlmann, S. (2018). Functional analysis of potential cleavage sites in the MERS-coronavirus spike protein. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34859-w>
- Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A.-E., Humphrey, C. D., Shieh, W.-J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., ... Anderson, L. J. (2003). A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 348(20), 1953–1966. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030781>
- Kubo, H., Yamada, Y. K., & Taguchi, F. (1994). Localization of neutralizing epitopes and the

- receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *Journal of Virology*, 68(9), 5403–5410. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.9.5403-5410.1994>
- Kung, Y.-A., Lee, K.-M., Chiang, H.-J., Huang, S.-Y., Wu, C.-J., & Shih, S.-R. (2022). Molecular Virology of SARS-CoV-2 and Related Coronaviruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 86(2). <https://doi.org/10.1128/membr.00026-21>
- Kuo, L., & Masters, P. S. (2013). Functional Analysis of the Murine Coronavirus Genomic RNA Packaging Signal. *Journal of Virology*, 87(9), 5182–5192. <https://doi.org/10.1128/jvi.00100-13>
- Lalchhandama, K. (2020). The chronicles of coronaviruses: the electron microscope, the doughnut, and the spike. *Science Vision*, 20(2), 78–92. <https://doi.org/10.33493/scivis.20.02.03>
- Lau, S. K. P., Luk, H. K. H., Wong, A. C. P., Li, K. S. M., Zhu, L., He, Z., Fung, J., Chan, T. T. Y., Fung, K. S. C., & Woo, P. C. Y. (2020). Possible Bat Origin of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerging Infectious Diseases*, 26(7), 1542–1547. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200092>
- Lednicky, J. A., Tagliamonte, M. S., White, S. K., Elbadry, M. A., Alam, M. M., Stephenson, C. J., Bonny, T. S., Loeb, J. C., Telisma, T., Chavannes, S., Ostrov, D. A., Mavian, C., Beau De Rochars, V. M., Salemi, M., & Morris, J. G. (2021). Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children. *Nature*, 600(7887), 133–137. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04111-z>
- Lia van der Hoek, Krzysztof Pyrc, Maarten F Jebbink, Wilma Vermeulen-Oost, Ron J M Berkhout2, Katja C Wolthers, Pauline M E Wertheim-van Dillen, Jos Kaandorp, Joke Spaargaren, & Ben Berkhout. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine*, 10(4), 368–373. <http://www.nature.com/naturemedicine>
- Lin, H. X., Feng, Y., Wong, G., Wang, L., Li, B., Zhao, X., Li, Y., Smaill, F., & Zhang, C. (2008). Identification of residues in the receptor-binding domain (RBD) of the spike protein of human coronavirus NL63 that are critical for the RBD-ACE2 receptor interaction. *Journal of General Virology*, 89(4), 1015–1024. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83331-0>
- Liu, C., Shi, W., Becker, S. T., Schatz, D. G., Liu, B., & Yang, Y. (2021). Structural basis of mismatch recognition by a SARS-CoV-2 proofreading enzyme. *Science*, 373(6559), 1142–1146. <https://doi.org/10.1126/science.abi9310>
- Locker, J. K., Griffiths, G., Horzinek, M. C., & Rottier, P. J. (1992). O-glycosylation of the coronavirus M protein. Differential localization of sialyltransferases in N- and O-linked glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 267(20), 14094–14101. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)49683-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)49683-X)
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Ma, Y., Wu, L., Shaw, N., Gao, Y., Wang, J., Sun, Y., Lou, Z., Yan, L., Zhang, R., & Rao, Z. (2015). Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10

- complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(30), 9436–9441. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508686112>
- Masters, P. S. (2006). The Molecular Biology of Coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 65(January), 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
- Matthes, N., Mesters, J. R., Coutard, B., Canard, B., Snijder, E. J., Moll, R., & Hilgenfeld, R. (2006). The non-structural protein Nsp10 of mouse hepatitis virus binds zinc ions and nucleic acids. *FEBS Letters*, 580(17), 4143–4149. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.061>
- McIntosh, K., Dees, J. H., Becker, W. B., Kapikian, A. Z., & Chanock, R. M. (1967). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(4), 933–940. <https://doi.org/10.1073/pnas.57.4.933>
- McIntosh, Kenneth. (1974). Coronaviruses: A Comparative Review. In *Current Topics in Microbiology and Immunology / Ergebnisse der Mikrobiologie und Immunitätsforschung* (pp. 85–129). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-65775-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-65775-7_3)
- Mielech, A. M., Chen, Y., Mesecar, A. D., & Baker, S. C. (2014). Nidovirus papain-like proteases: Multifunctional enzymes with protease, deubiquitinating and deISGylating activities. *Virus Research*, 194(January), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.025>
- Mihindukulasuriya, K. A., Wu, G., St. Leger, J., Nordhausen, R. W., & Wang, D. (2008). Identification of a Novel Coronavirus from a Beluga Whale by Using a Panviral Microarray. *Journal of Virology*, 82(10), 5084–5088. <https://doi.org/10.1128/jvi.02722-07>
- Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A. E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., & Ziebuhr, J. (2006). Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 5108–5113. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508200103>
- Müller, M. A., Van Der Hoek, L., Voss, D., Bader, O., Lehmann, D., Schulz, A. R., Kallies, S., Suliman, T., Fielding, B. C., Drosten, C., & Niedrig, M. (2010). Human coronavirus NL63 open reading frame 3 encodes a virion-incorporated N-glycosylated membrane protein. *Virology Journal*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-6>
- Naskalska, A., Dabrowska, A., Szczepanski, A., Milewska, A., Jasik, K. P., & Pyrc, K. (2019). Membrane Protein of Human Coronavirus NL63 Is Responsible for Interaction with the Adhesion Receptor. *Journal of Virology*, 93(19), 1–14. <https://doi.org/10.1128/jvi.00355-19>
- Neuman, B. W., Chamberlain, P., Bowden, F., & Joseph, J. (2014). Atlas of coronavirus replicase structure. *Virus Research*, 194(January), 49–66. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.004>
- Ogando, N. S., Ferron, F., Decroly, E., Canard, B., Posthuma, C. C., & Snijder, E. J. (2019). The Curious Case of the Nidovirus Exoribonuclease: Its Role in RNA Synthesis and Replication Fidelity. *Frontiers in Microbiology*, 10(August), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01813>

- Ogando, N. S., Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der Meer, Y., Bredenbeek, P. J., Posthuma, C. C., & Snijder, E. J. (2020). The Enzymatic Activity of the nsp14 Exoribonuclease Is Critical for Replication of MERS-CoV and SARS-CoV-2. *Journal of Virology*, *94*(23), 1–24. <https://doi.org/10.1128/jvi.01246-20>
- Ortego, J., Ceriani, J. E., Patiño, C., Plana, J., & Enjuanes, L. (2007). Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology*, *368*(2), 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.032>
- QIAGEN. (2012). QIAprep Spin Miniprep Kit. [Http://Www.Qiagen.Com/Products/Plasmid/QIAprepMiniprepSystem/QIAprepSpinMiniprepKit.aspx](http://www.qiagen.com/Products/Plasmid/QIAprepMiniprepSystem/QIAprepSpinMiniprepKit.aspx), February, 12–13.
- Qian, Z., Ou, X., Góes, L. G. B., Osborne, C., Castano, A., Holmes, K. V., & Dominguez, S. R. (2015). Identification of the Receptor-Binding Domain of the Spike Glycoprotein of Human Betacoronavirus HKU1. *Journal of Virology*, *89*(17), 8816–8827. <https://doi.org/10.1128/jvi.03737-14>
- Rogstam, A., Nyblom, M., Christensen, S., Sele, C., Talibov, V. O., Lindvall, T., Rasmussen, A. A., André, I., Fisher, Z., Knecht, W., & Kozielski, F. (2020). Crystal structure of non-structural protein 10 from severe acute respiratory syndrome coronavirus-2. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(19), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21197375>
- Schoeman, D., & Fielding, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology Journal*, *16*(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117>
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., ... Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, *368*(6494), 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
- Siu, Y. L., Teoh, K. T., Lo, J., Chan, C. M., Kien, F., Escriou, N., Tsao, S. W., Nicholls, J. M., Altmeyer, R., Peiris, J. S. M., Bruzzone, R., & Nal, B. (2008). The M, E, and N Structural Proteins of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Are Required for Efficient Assembly, Trafficking, and Release of Virus-Like Particles. *Journal of Virology*, *82*(22), 11318–11330. <https://doi.org/10.1128/jvi.01052-08>
- Song, H. C., Seo, M.-Y., Stadler, K., Yoo, B. J., Choo, Q.-L., Coates, S. R., Uematsu, Y., Harada, T., Greer, C. E., Polo, J. M., Pileri, P., Eickmann, M., Rappuoli, R., Abrignani, S., Houghton, M., & Han, J. H. (2004). Synthesis and Characterization of a Native, Oligomeric Form of Recombinant Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Glycoprotein. *Journal of Virology*, *78*(19), 10328–10335. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.19.10328-10335.2004>
- Stohlman, S. A., & Lai, M. M. (1979). Phosphoproteins of murine hepatitis viruses. *Journal of Virology*, *32*(2), 672–675. <https://doi.org/10.1128/jvi.32.2.672-675.1979>
- Sturman, L. S., Holmes, K. V., & Behnke, J. (1980). Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *Journal of Virology*, *33*(1), 449–462. <https://doi.org/10.1128/jvi.33.1.449-462.1980>

- Sun, L., Li, P., Ju, X., Rao, J., Huang, W., Ren, L., Zhang, S., Xiong, T., Xu, K., Zhou, X., Gong, M., Miska, E., Ding, Q., Wang, J., & Zhang, Q. C. (2021). In vivo structural characterization of the SARS-CoV-2 RNA genome identifies host proteins vulnerable to repurposed drugs. *Cell*, *184*(7), 1865-1883.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.008>
- Tyrrell, D. A., & Bynoe, M. L. (1966). Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet*, *1*(7428), 76–77. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(66\)92364-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(66)92364-6)
- Venkatagopalan, P., Daskalova, S. M., Lopez, L. A., Dolezal, K. A., & Hogue, B. G. (2015). Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. *Virology*, *478*(January), 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.005>
- Vennema, H., Godeke, G. J., Rossen, J. W. A., Voorhout, W. F., Horzinek, M. C., Opstelten, D. J. E., & Rottier, P. J. M. (1996). Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO Journal*, *15*(8), 2020–2028. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00553.x>
- Wang, D., Jiang, A., Feng, J., Li, G., Guo, D., Sajid, M., Wu, K., Zhang, Q., Ponty, Y., Will, S., Liu, F., Yu, X., Li, S., Liu, Q., Yang, X., Lou, Guo, M., Li, X., Chen, M., Shi, Z. L., ... Zhou, Y. (2021). The SARS-CoV-2 subgenome landscape and its novel regulatory features. *Molecular Cell*, *81*(10), 2135-2147.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.02.036>
- Wang, N., Shi, X., Jiang, L., Zhang, S., Wang, D., Tong, P., Guo, D., Fu, L., Cui, Y., Liu, X., Arledge, K. C., Chen, Y. H., Zhang, L., & Wang, X. (2013). Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Research*, *23*(8), 986–993. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.92>
- Wang, Y., Grunewald, M., & Perlman, S. (2020). Coronaviruses: An Updated Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods in Molecular Biology*, *2203*, 1–29. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0900-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0900-2_1)
- Wędrowska, E., Wandtke, T., Senderek, T., Piskorska, E., & Kopiński, P. (2020). Coronaviruses fusion with the membrane and entry to the host cell. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *27*(2), 175–183. <https://doi.org/10.26444/aaem/122079>
- Wong, S. K., Li, W., Moore, M. J., Choe, H., & Farzan, M. (2004). A 193-Amino Acid Fragment of the SARS Coronavirus S Protein Efficiently Binds Angiotensin-converting Enzyme 2. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(5), 3197–3201. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300520200>
- Woo, P. C. Y., Huang, Y., Lau, S. K. P., & Yuen, K. Y. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*, *2*(8), 1805–1820. <https://doi.org/10.3390/v2081803>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Chu, C., Chan, K., Tsoi, H., Huang, Y., Wong, B. H. L., Poon, R. W. S., Cai, J. J., Luk, W., Poon, L. L. M., Wong, S. S. Y., Guan, Y., Peiris, J. S. M., & Yuen, K. (2005). Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *Journal of Virology*, *79*(2), 884–895. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.2.884-895.2005>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J.,

- Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Xiao, K., Zhai, J., Feng, Y., Zhou, N., Zhang, X., Zou, J. J., Li, N., Guo, Y., Li, X., Shen, X., Zhang, Z., Shu, F., Huang, W., Li, Y., Zhang, Z., Chen, R. A., Wu, Y. J., Peng, S. M., Huang, M., ... Shen, Y. (2020). Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature*, 583(7815), 286–289. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2313-x>
- Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814–1820. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1211721>
- Zhao, X., Chen, D., Szabla, R., Zheng, M., Li, G., Du, P., Zheng, S., Li, X., Song, C., Li, R., Guo, J.-T., Junop, M., Zeng, H., & Lin, H. (2020). Broad and Differential Animal Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor Usage by SARS-CoV-2. *Journal of Virology*, 94(18), 1–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.00940-20>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>
- Woo, P.C.Y., de Groot, R.J., Haagmans, B., Lau, S.K.P., Neuman, B.W., Perlman, S., Sola, I., van der Hoek, L., Wong, A.C.P. and Yeh, S.-H. (2023): ICTV Virus Taxonomy Profile: *Coronaviridae* 2023, *Journal of General Virology* (in press)