

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra Biochemie

---

Studijní program: Biochemie  
Studijní obor: Biochemie



Bc. VERONIKA KÚDELOVÁ

## Strukturní a funkční charakterizace inhibice flavivirové methyltransferasy

Structural and functional characterization of a flaviviral methyltransferase

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Praha, 2021



## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....  
Veronika Kúdelová



## **ABSTRAKT**

Do středu zájmů velkého množství vědeckých skupin se v poslední době čím dál tím více dostávají virové agens. Neopomenutelnou a světově hojně rozšířenou skupinou těchto virů jsou flaviviry, mezi které se řadí např. virus Zika, viry horečky Dengue, virus klíšťové encefalitidy či virus západonilské horečky. Mezi těmito viry panuje značná diverzita, nicméně lze nalézt velmi konzervované proteiny, které se vyskytují napříč celým tímto virovým rodem. Největším a nejvíce konzervovaným proteinem kódovaným flaviviry je nestrukturní protein NS5, který se skládá ze dvou domén: metyltransferasové (MTasy) a RNA-dependenční RNA-polymerázové domény (RdRp). MTasa umožňuje viru díky methylaci jeho genomu iniciovat translaci a zároveň i maskovat jeho RNA před imunitním systémem hostitele. Blokadou aktivního místa tohoto enzymu malou molekulou by se dala zastavit virová infekce nejen u jednoho viru, ale, vzhledem k vysoké konzervovanosti MTas, i u všech dalších virů rodu flavivirus.

Tato diplomová práce se zabývá právě zmíněnou MTasou proteinu NS5, konkrétně u viru západonilské horečky (WNV). Po navržení insertu, který kóduje doménu WNV MTasy, jeho amplifikaci a ligaci do plasmidu, byl expresí a následnou purifikací připraven rekombinantní protein WNV MTasy. Následně byly vytvořeny komplexy proteinu s malými molekulami (ligandy MTasy), u kterých byly měřeny a porovnávány teplotní stability. Dále bylo přistoupeno ke krystalizaci MTasy v komplexu s inhibitorem sinefunginem a k optimalizaci krystalizace. Tento postup bude možné v budoucnu využít pro testování různých malých molekul, které by mohly působit inhibičně na flavivirové MTasy, čímž by dokázaly zastavit infekci způsobenou těmito viry.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Methyltransferasa (MTasa), virus západonilské horečky (WNV), flaviviry, SAM/SAH-vazebné místo, malé molekuly, methylace virové RNA, regulace virové infekce



## **ABSTRACT**

Recently, non-cellular viral agents became the focus of a large number of scientific groups. A prominent and widespread group of these viruses are flaviviruses, which include, for example, Zika virus, Dengue fever virus, tick-borne encephalitis virus and West Nile virus. There is a considerable diversity among these viruses, however, highly conserved proteins can be found throughout this viral genus. The largest and most conserved protein encoded by flaviviruses is the nonstructural NS5 protein. Its N-terminal domain bears the methyltransferase (MTase) activity. Thanks to the methylation of its genome, it allows the virus to initiate translation and at the same time mask it from the host's immune system. By blocking the active site of this enzyme with a small molecule, viral infection could be stopped not only in one flavivirus, but, due to the high conservation of MTases, in all other flaviviruses.

This diploma thesis deals with the aforementioned MTase domain of the NS5 protein, specifically of the West Nile virus (WNV). After designing an insert encoding the WNV MTase domain, amplifying it and ligating it into the vector, the MTase domain was prepared by a recombinant expression, followed by purification. Subsequently, complexes of the protein with small molecules (MTase ligands) were formed, in which the temperature stabilities were measured and compared. Furthermore, crystallization of a complex of WNV MTase with its inhibitor sinefungin was performed and subsequent crystallization optimization was conducted. In the future, the protocol presented here could be used to test various small molecules that could inhibit flaviviral MTases, thereby stopping the infection caused by these viruses.

## **KEYWORDS**

Methyltransferase (MTase), West Nile virus (WNV), flaviviruses, SAM / SAH-binding site, small molecules, methylation of viral RNA, regulation of viral infection

[IN CZECH]





## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. et Mgr. Evženu Bouřovi, Ph.D. Stejně díky patří odborné konzultantce Petře Kraččíkové, Ph.D., bez jejíž tvrdé práce, velice cenných rad, trpělivosti a ochoty během práce v laboratoři i sepisování výsledků bych svou diplomovou práci nenapsala.

Tímto bych ráda poděkovala i svým kolegům laboratoře skupiny Evžena Bouři v ÚOCHB za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí a za veškerou pomoc nejen s mou závěrečnou prací.

V neposlední řadě chci poděkovat svému partnerovi a rodině, kteří mi byli po celou dobu neuvěřitelnou podporou, a díky kterým jsem se dostala až sem.



# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	13
<b>1 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>15</b>
1.1 Flaviviry.....	15
1.1.1 Virus západonilské horečky (WNV).....	16
1.1.2 Genom flavivirů.....	17
1.1.3 Flavivirové proteiny .....	18
1.1.3.1 N-terminální doména nestrukturního proteinu 5 – methyltransferasa .....	20
1.2 Methylace jako posttranskripční modifikace eukaryotní mRNA .....	22
1.3 Methylace flavivirového genomu .....	23
1.4 Přetrvávající hrozba flavivirů – WNV .....	27
1.4.1 Vakcinace.....	27
1.4.2 Diagnostika.....	28
1.4.3 Současná léčba a prevence .....	28
1.4.4 Zajímavé cíle terapeutického zásahu .....	29
<b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>33</b>
<b>3 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>34</b>
3.1 Použité chemikálie.....	34
3.1.1 Enzymy .....	35
3.1.2 Primery a templáty .....	35
3.1.3 Roztoky, pufry, média a sady .....	35
3.1.4 Složení gelů .....	37
3.2 Použité přístroje a pomůcky .....	37
3.3 Použité metody .....	39
3.3.1 Příprava bakteriálního plasmidu pro produkci WNV MTasy.....	39
3.3.1.1 Amplifikace insertu polymerasovou řetězovou reakcí .....	39
3.3.1.2 Horizontální agarosová elektroforesa .....	39
3.3.1.3 Purifikace PCR produktu.....	40
3.3.1.4 Transformace buněk <i>E. coli</i> DH5α plasmidem pSumo a jeho produkce.....	40
3.3.1.5 Izolace pSumo plasmidu z bakterií.....	40
3.3.1.6 Štěpení pSumo a kontrola produktu agarosovou elektroforesou .....	40
3.3.1.7 Izolace plasmidu z agarosového gelu .....	41
3.3.1.8 Ligace insertu do plasmidu a následná transformace buněk <i>E. coli</i> DH5α.....	41
3.3.1.9 „Colony PCR“ a následná agarosová elektroforesa produktů .....	41
3.3.1.10 Minipreparace a izolace DNA z vybraných kolonií .....	42
3.3.1.11 Sekvence vybraných plasmidových DNA .....	42
3.3.2 Produkce a purifikace MTasy proteinu NS5 viru západonilské horečky .....	43
3.3.2.1 Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.....	43
3.3.2.2 Exprese rekombinantního proteinu v kompetentních buňkách .....	43

3.3.2.3	Izolace proteinu z bakteriální kultury .....	43
3.3.2.4	Afinitní vsádková chromatografie .....	43
3.3.2.5	Dialýsa a štěpení poly-histidinové kotvy proteasou Ulp1 .....	44
3.3.2.6	Reversní afinitní chromatografie .....	44
3.3.2.7	Gelová permeační chromatografie .....	44
3.3.2.8	Diskontinuální elektroforesa v denaturačním prostředí SDS (SDS-ELFO).....	45
3.3.2.9	Převedení WNV MTasy do jiného pufru .....	45
3.3.3	Diferenční skenovací fluorimetrie.....	45
3.3.3.1	Příprava komplexů .....	45
3.3.3.2	Měření změn teplot tání komplexů .....	45
3.3.4	Krystalizace proteinu .....	46
3.3.4.1	Příprava komplexu methyltransferasy s ligandem.....	46
3.3.4.2	Krystalizace metodou visící kapky .....	46
3.3.4.3	Optimalizace krystalizace metodou visící kapky s krystalizačními jádry .....	46
3.3.4.4	Krystalizace metodou sedící kapky .....	47
3.3.4.5	Krystalizace metodou sedící kapky s krystalizačními jádry.....	47
3.3.4.6	Optimalizace krystalizace metodou sedící kapky.....	47
3.3.4.7	Krystalizace metodou sedící kapky s aditivy .....	48
3.3.4.8	Krystalizace proteinu v CHES pufru metodou sedící kapky .....	48
3.3.4.9	Krystalizace metodou visící kapky .....	48
3.3.4.10	Krystalizace metodou visící kapky s krystalizačními jádry .....	48
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>49</b>
4.1	Příprava bakteriálního plasmidu pro produkci MTasy WNV .....	49
4.2	Produkce a purifikace methyltransferasy proteinu NS5 WNV .....	50
4.3	Měření teplotních stabilit komplexů methyltransferasy s ligandy .....	54
4.4	Krystalizace proteinového komplexu WNV MTasy s inhibitorem .....	55
<b>5</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>67</b>
	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>69</b>

## SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

+/-ssRNA	pozitivní/negativní jednořetězcová ribonukleová kyselina
A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	absorbance roztoku při vlnové délce 260 nebo 280 nm [mAU]
AMK	aminokyselina/y
AMP	antibiotikum ampicilin
ATPasa	adenosintrifosfatasa
CIAP	telecí střevní alkalická fosfatasa (z anglického „Calf Intestinal Alkaline Phosphatase“)
DENV	virus horečky dengue
DSF	diferenční skenovací fluorimetrie
dsRNA	dvouřetězcová ribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	bakterie <i>Escherichia coli</i>
e <sub>280</sub>	extinční koeficient proteinu při vlnové délce 280 nm [M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ]
EC <sub>50</sub>	poloviční účinná (efektivní) dávka
ELFO	elektroforesa
GMP	guanosinmonofosfát
gRNA	genomová ribonukleová kyselina
GTasa	guanylyltransferasa
GTP	guanosintrifosfát
HCV	virus hepatitidy C
IFIT	efektory vrozené imunity inhibující virovou replikaci (z anglického „Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats“)
JEV	virus japonské encefalitidy (z anglického „Japanese encephalitis virus“)
kb	kilobase – jednotka délky úseku nukleových kyselin
mRNA	informační/mediátorová ribonukleová kyselina
MTasa	methytransferasa
NCRs	nekódující oblasti flavivirového genomu (z anglického „noncoding regions“)
NIs	inhibitory, které tvoří nukleotidové či nukleosidové analogy
NNIs	inhibitory, které tvoří nenukleotidové analogy
NS	nestrukturní protein flaviviru
NTP(s)	nukleosid trifosfát(y)
OD600	optická densita buněčné suspenze při vlnové délce 600 nm
ORF	otevřený čtecí rámec (z anglického „open reading frame“)

PCR	polymerasová řetězová reakce (z anglického „Polymerase chain reaction“)
RdRp	RNA-dependentní-RNA polymerasa
RNA	ribonukleová kyselina (z anglického „ribonucleic acid“)
rpm	otáčky za minutu (z anglického „revolutions per minute“)
RT-PCR	polymerasová řetězová reakce s reversní transkripcí
RTPasa	RNA trifosfatasa (z anglického „RNA 5'-triphosphatase“)
$\sigma$	konduktivita roztoku [mS/cm]
$\sigma_T$	směrodatná odchylka teploty [°C]
SAH	S-adenosylhomocystein (produkt methylační reakce, též AdoHcy)
SAM	S-adenosylmethionin (substrát pro methyltransferasy, též AdoMet)
SDS-ELFO	elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SV	slepý vzorek
$T$	teplota [°C]
$t$	čas [s]
TBEV	virus klíšťové encefalitidy (z anglického „tick-borne virus“)
$V$	objem [nl, $\mu$ l či ml]
WNV	virus západonilské horečky (z anglického „West Nile virus“)
YFV	virus žluté zimnice (z anglického „Yellow Fever Virus“)
ZIKV	virus Zika

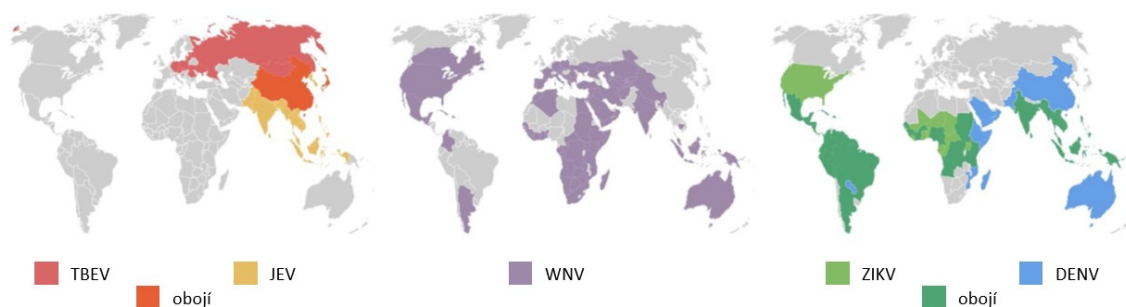
# 1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

Viry rodu *Flavivirus* patří mezi důležité lidské patogeny a způsobují celosvětově řadu rozšířených onemocnění jak už s různou mírou závažnosti, tak s odlišnými zdravotními symptomy. Tato diplomová práce se zaměřuje na strukturní a funkční charakterizaci zvolené methyltransferasy jako potenciální cíl vývoje nových širokospektrých virostatik<sup>1</sup>. Ztráta enzymové aktivity u methyltransferasy zabraňuje infekci organismu způsobenou virulentními viry. Vzhledem k vysoké konzervovanosti tohoto enzymu napříč flaviviry<sup>2</sup> by se dala daná virostatika aplikovat taktéž na ostatní zástupce rodu.

## 1.1 Flaviviry

*Flavivirus* je jedním ze tří rodů spadajících do rodiny *Flaviviridae* (z latinského „flavus“ neboli „žlutý“), která získala název po jednom ze svých zástupců – viru žluté zimnice (YFV)<sup>3</sup>. Spolu s ním se do této rodiny řadí i rod *Pestivirus* (zástupcem je např. virus způsobující onemocnění skotu zvané Bovinní virová diarrhoea) a rod *Hepacivirus* (zástupcem je např. virus Hepatitidy C). Členové této virové rodiny spolu sdílí podobnosti v morfologii virionu, organizaci genomu a strategii replikace, naopak jejich biologická aktivita je velmi variabilní. Krom zmíněného viru žluté zimnice patří mezi typické představitele flavivirů i viry horečky dengue (DENV), virus klíšťové encefalidity (TBEV), virus západonilské horečky (WNV) či virus Zika (ZIKV) a další<sup>1</sup>.

Flaviviry se označují také jako arboviry, protože více jak 50 virů tohoto rodu je přenášeno členovci (z anglického „arthropod-borne virus“ tedy „virus přenášený členovci“)<sup>1</sup>. Díky této skutečnosti jsou flavivirová onemocnění celosvětově hojně rozšířena (viz Obr. 1.1)<sup>4</sup>. Flaviviry, které jsou spojeny s infekčními onemocněními savců, se kategorizují do dvou skupin: viry přenášené komáry a viry přenášené klíšťaty.



**Obr. 1.1 Distribuce flavivirových onemocnění ve světě:** virus klíšťové encefalidity (TBEV) růžově, virus japonské encefalidity (JEV) žlutě, oba viry (TBEV a JEV) dohromady, virus západonilské horečky (WNV) fialově, virus Zika (ZIKV) světle zeleně, viry horečky dengue (DENV) modře a oba viry (ZIKV a DENV) tmavě modře. Převzato a upraveno<sup>4</sup>.

Flaviviry přenášené klíšťaty (anglicky „tick-borne“) jsou blízce příbuzná, monofyletická skupina se společnými antigenními vlastnostmi (sérotypem) navzdory výrazným rozdílům mezi jednotlivými nemocemi, které viry způsobují<sup>5</sup>. Mezi zástupce patří např. nejznámější TBEV. Na druhou stranu flaviviry přenášené komáry (anglicky „mosquito-borne“) mají mezi sebou daleko větší diverzitu. Typickými zástupci jsou YFV, WNV, JEV (virus japonské encefalitidy), DENV a ZIKV. Těmito onemocněními trpí až jedna třetina světové populace nejčastěji v tropickém a subtropickém podnebném pásu.

Flaviviry je také možné klasifikovat podle jejich patogenity<sup>6</sup>. Virus západonilské horečky se spolu s JEV, virem St. Louis encefalitidy a virem ZIKA řadí mezi neurotropní viry, které jsou schopné překonat hematoencefalickou bariéru, infikovat tak neurony a další mozkové buňky a způsobit encefalitidu. Hepatitida je naopak způsobena jinými viry, jako například YFV, které infikují primárně jaterní buňky. V neposlední řadě existují viry, které infikují endoteliální buňky a tím způsobují hemoragické (krvácivé) projevy – mezi zástupce řadíme např. DENV. Ačkoli jsou jednotlivé viry značně orgánově specifické a jejich působením dochází k typickému onemocnění či syndromu, lze je nalézt i v jiných tělních buňkách (mononukleární leukocytech, dendritických buňkách a dalších)<sup>7</sup>.

Šíření flavivirů a jejich vektorů je v dnešní době ovlivněno drastickými globálními změnami<sup>7</sup>. Vzhledem k rychle expandující lidské populaci dochází vlivem větší mobility k rozšiřování onemocnění do neendemických oblastí, čímž bezprostředně hrozí globální zdravotní problémy. V současné době existují vakcíny proti některým zástupcům flavivirů, nicméně ne proti všem. Navíc ne každý člověk, ať už z různých důvodů, může být očkovan. Další možností snížení počtu nakažených je časté používání repelentu, čímž dojde ke snížení přenosu viru z členovců na člověka.

### 1.1.1 Virus západonilské horečky (WNV)

Virus západonilské horečky (z anglického „West Nile virus“) byl poprvé izolován v roce 1937 ze vzorku krve ženy trpící horečkami, která žila v oblasti Západního Nilu v severní Ugandě<sup>8</sup>. V padesátých letech minulého století se ohnisky nákazy staly i středomořské země včetně Egypta a Izraele. Během této doby a následujících desetiletí se ukázalo, že primárními přenašeči tohoto onemocnění jsou komáři rodu *Culex* a že se virus může vyskytovat u ptáků (hlavně vran) a i jiných savců (koní). Virus západonilské horečky se dále šířil po celém Středním východě a Evropě, kde způsoboval komplikace v podobě encefalitidy a úmrtí. Prvním výrazně postihnutým městem byla rumunská Bukurešť. V létě roku 1999 se západonilská horečka poprvé objevila také v Severní Americe ve městě New York, kde došlo k nakažení nejen lidí, ale byl pozorován i větší úhyn ptáků a koní v okolí města důsledkem právě tohoto onemocnění<sup>9</sup>. V následujícím desetiletí došlo k masivnímu rozšíření viru po celé Americe, po podstatné části Asie a také do Austrálie, což



dokazuje, že je západonilská horečka infekční onemocnění, které se velmi efektivně a nekontrolovatelně šíří nejen mezi savci (lidskou populaci nevyjímaje), ale i mezi ptáky. Zatím nejvyšší nárůst tohoto onemocnění byl v Evropě zaznamenán v roce 2018, kdy bylo v 11 zemích nahlášeno přes 1 500 infikovaných jedinců; i přes nižší množství nakažených se virus po Evropě stále rozšiřuje<sup>10</sup>.

Jak už bylo řečeno, WNV se přenáší především komáry<sup>11</sup>. Výjimečnými způsoby přenosu mohou být orgánové transplantace, transfuse, vertikální přenos během těhotenství, porodu a kojení, nebo neopatrná manipulace s infikovanými vzorky bez ochranných pomůcek. Ptáci slouží viru jako mezipositel, a proto u nich dochází k velké virémii a amplifikaci viru, který je pak dále přenášen. Člověk a další savci tvoří pro WNV konečné hostitele.

Až 80 % jedinců infikovaných virem západonilské horečky se jeví asymptomaticky<sup>11</sup>. Pokud je onemocnění doprovázeno symptomy, mohou se vyskytovat po 3 až 14 dnech od expozice horečky, únavy, bolesti hlavy a těla, nevolnosti a zvracení, zvětšení lymfatických uzlin a výjimečně i vyrážka. Protože se u většiny lidí neprojevují příznaky, jsou odhady, že se závažné neuroinvasivní onemocnění vyskytuje pouze u 1 ze 150 nakažených, přičemž rizikovými faktory mohou být věk (nad 50 let), diabetes závislý na insulinu, vysoký krevní tlak nebo imunosuprese. Příznaky pacientů se závažným onemocněním lze dělit do tří, částečně se překrývajících, skupin: meningitida (bolesti hlavy, ztuhlost šíje), encefalitida (desorientace, strnulost, kóma, křeče) a akutní ochablá paralýza (poliomyelitida s častou přítomností třesu, myoklonus, parkinsonismus či ataxie a atrofie končetin). Pacienty s těžkým průběhem onemocnění mohou postihnout i závažné respirační problémy vyžadující mechanickou ventilaci<sup>12</sup>. Horečnaté stavy – doprovázené bolestmi hlavy, bolestí těla nebo kloubů, zvracením, průjmy či vyrážkami – které se projeví u 1 z 5 nakažených, jsou léčeny primárně podpůrnou léčbou (infuse a léky proti bolesti). Zpravidla dojde k úplnému uzdravení; únava nebo slabost však mohou přetrvávat týdny až měsíce<sup>13</sup>.

### 1.1.2 Genom flavivirů

Společným znakem těchto virů je pozitivní jednořetězcové vlákno RNA, dlouhé 10 až 11 kb, které tvoří jejich genom. Genomová RNA (gRNA) je infekční kvůli pozitivní polaritě, která kóduje virové proteiny nezbytné pro replikaci RNA<sup>14</sup>. Vlákno obsahuje jak na 5'-, tak na 3'-konci nekódující oblasti (NCRs), které vytváří specifickou sekundární strukturu, jež je zodpovědná za regulaci replikace a translace genomu<sup>3,15</sup>. Flaviviry, na rozdíl od pestivirů a hepaticvirů, vytváří jedinečnou, subgenovou nekódující RNA, která je odvozena od 3' NCR. Tato nukleová kyselina činí virovou gRNA rezistentní vůči nukleasám, je esenciální pro replikaci viru v buňce a zároveň moduluje patogenitu u zvířat<sup>16</sup>. Na rozdíl od buněčné mRNA není u flavivirů 3'-konec polyadenylovaný<sup>17</sup>. Naopak 5'-konec je opatřen strukturou zvanou „čepička typu 1“ obdobně jako

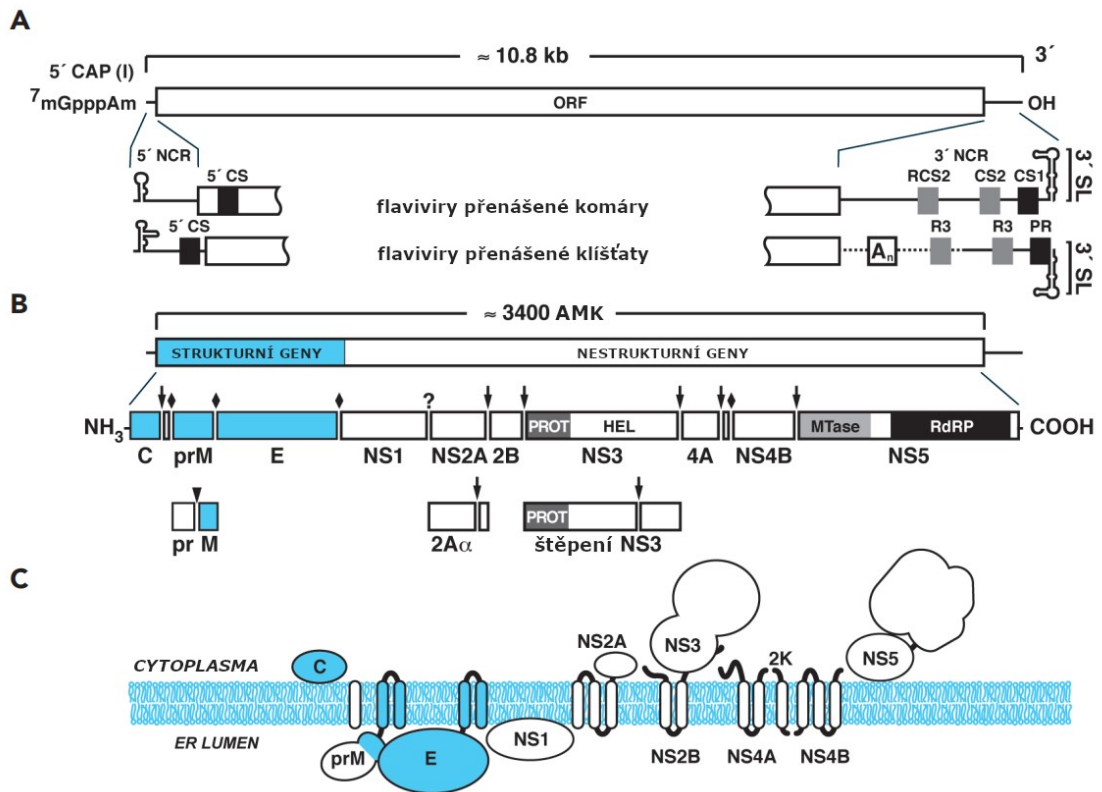
u obratlovců (viz kapitola 1.2, str. 22). U flavivirů byla také pozorována další methylace, která dala za vznik struktury „čepičky typu 2“ na 5'-konci RNA<sup>3</sup>.

Mezi nekódující oblasti je vložený otevřený čtecí rámec (ORF), jenž je překládán do jednoho velkého, virového polyproteinu<sup>18</sup>. Kupříkladu u WNV je jeho délka 3433 aminokyselin. Tento polyprotein je během translace, ale i po ní, upravován virovými a buněčnými proteasami na 3 strukturní (C, M, E) a 7 nestrukturních proteinů (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5 – viz dále)<sup>14</sup> (Obr. 1.1.3, str. 19).

### 1.1.3 Flavivirové proteiny

Štěpení dlouhého polypeptidu probíhá ko-translačně, ale i post-translačně, a podílí se na něm jak proteasy virové, tak buněčné proteasy hostitele<sup>3</sup>. Hostitelské signální peptidasy jsou zodpovědné za štěpení mezi C/prM, prM/E, E/NS1 a 2K/NS4B. Serinové proteasy kódované virem – NS3 protein v komplexu s NS2B – štěpí vazby mezi NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K a NS4B/NS5 (viz Obr. 1.1.3, str 19). Krom štěpení virových proteinů může docházet také ke štěpení hostitelských proteinů komplexem NS3 s NS2B proteinem, což pravděpodobně přispívá k rozvoji neuropatogenních procesů<sup>19</sup>. Štěpení mezi proteiny NS1/NS2A zprostředkovává neznámá buněčná proteasa<sup>20</sup>.

Strukturní proteiny nacházející se na 5'-konci zahrnují kapsidový protein (C), premembránový protein (prM) v nezralých virionech nebo membránový protein (M) ve zralých virionech a hlavní obalový protein (E)<sup>3,21</sup> (viz Obr. 1.1.3, str. 19). Kapsidový protein je velmi bazický: N- a C- koncové oblasti obsahují nabitě aminokyseliny, zatímco vnitřní hydrofobní část proteinu zprostředkovává asociaci membrány. Prekurzor C proteinu (anchC) obsahuje C-koncovou hydrofobní kotvu, která slouží jako signální peptid pro translokaci prM do endoplasmatického retikula (ER). Poté následuje štěpení hydrofobní kotvy z anchC, které je nezbytné pro vznik membránového proteinu M z premembránového glykoproteinu prM v ER. Glykosylovaný protein prM je štěpen furinem, což je enzym pocházející z trans-Golgiho komplexu, a slouží jako jeden z konečných regulátorů vzniku virionu. Kapsidový protein viru je zodpovědný za ochranu virové RNA a zároveň stimuluje produkci hostitelské caspasy 9, čímž v buňce vyvolává proces apoptosy. Obalový protein E je ze všech flavivirových proteinů nejvíce imunogenní: jako hlavní povrchový protein virionu zprostředkovává vazbu receptoru a membránovou fúzi. To ho činí zajímavým terapeutickým cílem nejen pro vývoj vakcín, ale zároveň i pro návrh léčiv proti flavivirům. U řady flavivirů obsahuje protein E konzervované N-vazebné glykosylační místo, které může či nemusí být glykosylováno. Jeho správné skládání, stabilizace při nízkém pH a sekrece závisí na koexpresi s proteinem prM.



**Obr. 1.1.3 Genom, strukturální a funkční proteiny flavivirů.** **A)** Genom flavivirů s RNA elementy velkého zhruba 11 kb je členěn na 5' - a 3' - nekódující oblasti (NCR), mezi které je vložen otevřený čtecí rámec (ORF). Odlišnost mezi jednotlivými flaviviry je převážně v sekvencích NCR. **B)** Vzniklý protein se skládá ze strukturálních (znázorněny modře: C, prM a E) a nestrukturálních (znázorněny bíle: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5) proteinů. Pomocí proteolytických enzymů – ♦ hostitelská proteasa, ↓ virová serinová proteasa, furin nebo příbuzná proteasa (trojúhelník), ? neznámá proteasa - dochází ke štěpení. Pod genomem jsou znázorněny prekurzory jednotlivých proteinů a jejich štěpné funkční produkty. **C)** Uspořádání štěpených, flavivirových proteinů v membráně endoplasmatického retikula (ER). Převzato a upraveno<sup>3</sup>.

C'-konec polyproteinu obsahuje sedm nestrukturálních proteinů: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5<sup>14</sup>. Tyto proteiny se primárně podílejí na replikaci virové RNA a jsou součástí replikačního komplexu. Kromě zmíněných se ve flavivirovém genomu vyskytuje ještě 2 K peptid, který překlenuje membránu ER mezi proteiny NS4A a NS4B. Většina NS proteinů u WNV je multifunkční; proteiny NS1, NS3 a NS5 jsou velké a výrazně konzervované. Naopak NS2A, NS2B, NS4A a NS4B jsou relativně malé a hydrofobní transmembránové proteiny, u nichž zatím není známa enzymová aktivita, nicméně jsou esenciální pro vznik aktivního replikačního komplexu<sup>22,23</sup>. Nestrukturální protein NS1 se vyskytuje jako rozpustný lipoproteinový hexamer se třemi dimerními podjednotkami. Tyto podjednotky jsou zásadní pro efektivní replikaci viru díky schopnosti „uniknout“ imunitnímu systému hostitele prostřednictvím inhibice aktivátorů komplementu<sup>24</sup>. Díky interakcím glykoproteinu NS1 s NS4A je umožněna replikace virové RNA<sup>25</sup>. Protein NS2A má naopak u YFV svou podstatnou roli při sestavování nebo uvolňování infekčních virových částic<sup>26</sup>. U YFV bylo objeveno, že NS2B vytváří komplex s NS3 a je tak

důležitým kofaktorem proteasové aktivity NS3<sup>27</sup>. Multifunkční protein NS3 se uplatňuje jako serinová proteasa (v komplexu se zmíněným NS2B), 5'-RNA trifosfatasa, nukleosid trifosfatasa a RNA helikasa<sup>28</sup>. Díky aktivitě RNA trifosfatasy patří NS3 spolu s NS5 proteinem mezi kritické enzymy vytvářející strukturu čepičky na 5'-konci virové RNA<sup>29,30</sup>. Protein NS5 má jak RNA-dependentní-RNA polymerasovou aktivitu<sup>31</sup>, tak GTasovou a methytransferasovou aktivitu, tedy se podílí na methylaci struktury na 5'-konci (čepička)<sup>32</sup>. Při flavivirové infekci vzniká z původní genomové +ssRNA komplementární vlákno -ssRNA, které může sloužit opět jako templát pro syntézu genomu RNA viru<sup>14</sup>. I proto je syntéza flavivirové RNA nesymetrická: +ssRNA je produkována v 10 až 100násobném přebytku oproti -ssRNA<sup>33</sup>.

### 1.1.3.1 N-terminální doména nestrukturního proteinu 5 – methyltransferasa

Nestrukturní protein NS5 je největším a nejvíce konzervovaným proteinem kódovaným flaviviry<sup>2</sup>. Skládá se z N-terminální methyltransferasy a C-terminální RNA-dependentní-RNA polymerasy (RdRP), které jsou navzájem spojené desetiaminokyselinovým linkerem<sup>34</sup>. NS5 (v komplexu spolu s NS3) má díky vazebnému místu pro GTP zároveň i funkci guanylyltransferasy (GTasy), která má klíčovou roli při připojování guanosinové čepičky k virovému genomu<sup>35</sup>.

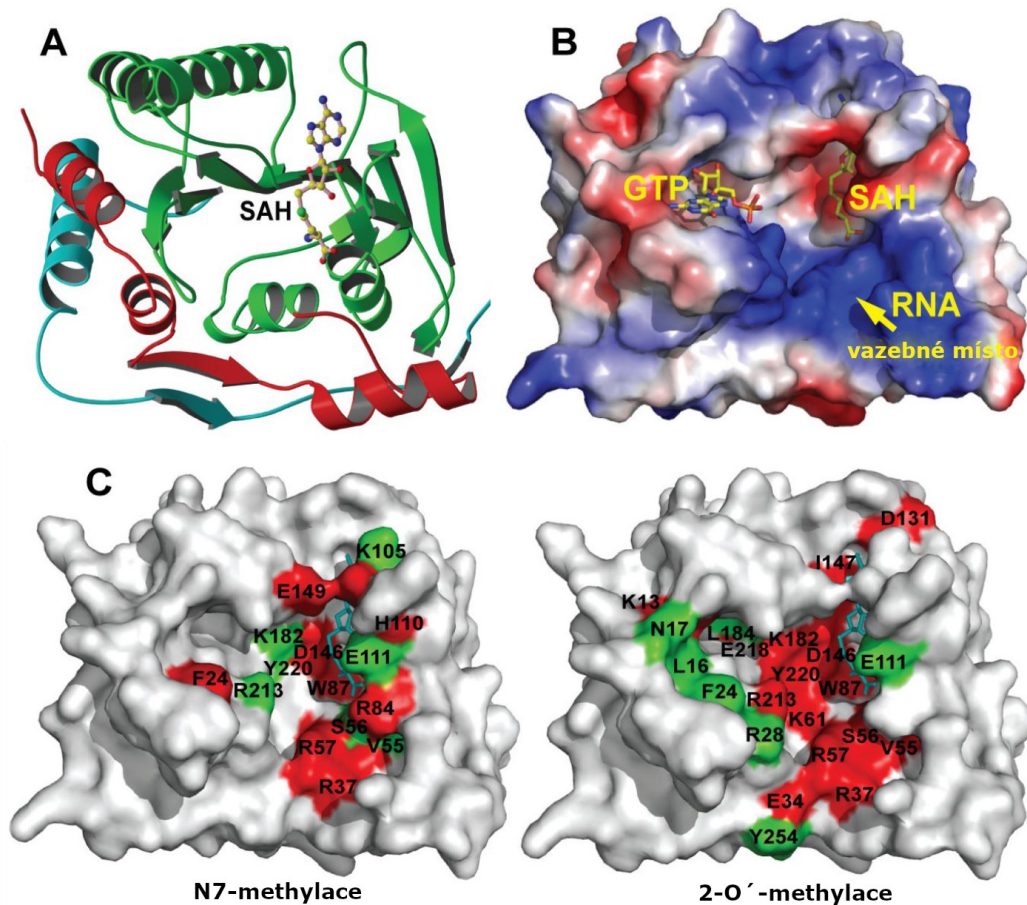
Struktura methyltransferasy NS5 byla vyřešena již u řady flavivirů. Konzervovaná struktura všech známých flavivirových MTas obsahuje tři motivy: N-koncový motiv; základní motiv, který obsahuje strukturní ohyb typický pro téměř všechny SAM-dependentní MTasy; a C-koncový motiv (viz Obr. 1.1.3.1 A), str. 21)<sup>36</sup>. Vazebná místa pro molekuly SAM/SAH, GTP a RNA se nachází na povrchu enzymu a jsou konzervovaná napříč flaviviry<sup>37</sup>.

SAM/SAH-vazebné místo MTas obsahuje buď molekulu S-adenosylmethioninu (SAM) nebo S-adenosylhomocysteinu (SAH) v závislosti na průběhu methylační reakce. U krystalové struktury MTasy YFV odpovídá elektronová hustota v tomto vazebném místě směsi molekul SAM a SAH; oba tyto ligandy jsou spolu-purifikovány s rekombinantními proteiny, které byly exprimovány v *E. coli*<sup>38</sup>. Krom výše uvedených může toto aktivní místo vázat taktéž jiné analogy přirozených ligandů. Například sinefungin (viz kap. 1.1.4, str. 29), analog SAM, působí mechanismem kompetitivní vazby do SAM/SAH-vazebného místa jako inhibitor obou methylací<sup>37</sup>.

Dalším konzervovaným místem MTasy je GTP-vazebné místo. Studie WNV MTasy ukázaly, že rezidua v této vazebné kapse jsou selektivně důležitá pro 2'-O-methylaci, nikoli však pro N7-methylaci. Při vazbě GTP do daného vazebného místa dochází k přednostní inhibici 2'-O-methylace před N7-methylací<sup>37</sup>. Vazba GTP zamezuje navázání malých RNA s methylovanou čepičkou, které jsou substráty pro 2'-O-methylaci<sup>39</sup>. Obdobně, jako tomu bylo

u SAM, byl i zde nalezen strukturní analog GTP, kterým je ribavirin-5'-trifosfát (viz kap. 1.1.4, str. 29). Ten působí inhibičně v GTP-vazebném místě MTasy a brání průběhu 2-O'-methylace<sup>40</sup>.

Na enzymu MTasy lze nalézt ještě jednu konzervovanou oblast, kterou tvoří velké množství pozitivně nabitých postranních skupin aminokyselin – tzv. zdánlivé RNA-vazebné místo. Mnohé mutagenetické studie MTasy viru západonilské horečky prokázaly, že basická rezidua v těchto místech jsou zodpovědná za oba dva typy výše zmíněných methylací. Tyto aminokyseliny lze proto rozdělit do čtyř skupin: 1) aminokyseliny nezbytné pro oba typy methylace; 2) aminokyseliny důležité pouze pro N7-methylaci; 3) aminokyseliny esenciální pouze pro 2-O'-methylaci; a 4) aminokyseliny nepodílející se na žádné z methylací<sup>37</sup>. Veškerá aktivní a konzervovaná místa jsou zobrazena a popsána v následujícím obrázku.



**Obr. 1.1.3.1 Struktura flavivirové methyltransferasy.** A) Stuháková reprezentace krystalové struktury MTasy WNV. Barevně vyznačeny jsou tři motivy: N-koncový motiv červeně, základní motiv zeleně a C-koncový motiv modře. Navázaná molekula SAH je zobrazena kuličkovo-tyčinkovou strukturou (žlutě uhlík, červeně kyslík, modře dusík a zeleně síra). B) Zobrazení povrchu MTasy WNV pomocí elektrostatického potenciálu: pozitivně nabitá rezidua jsou zobrazena modře, neutrální bíle a negativně nabitá červeně. Dále jsou vyznačena konzervovaná místa: GTP-vazebné místo s navázanou molekulou GTP; SAM/SAH-vazebné místo s navázanou molekulou SAH; a RNA-vazebné místo, které je složeno z negativně nabitých postranních řetězců aminokyselin. C) Aminokyseliny zodpovědné za N7-methylaci (vlevo) a 2-O'-methylaci (vpravo). Rezidua, jejichž mutací dochází k velkému snížení aktivity, jsou obarvena červeně; rezidua ovlivňující aktivitu v menší míře jsou obarvena zeleně. Převzato a upraveno<sup>36</sup>.

Dalším zajímavým motivem je tetraedr K-D-K-E, který je konzervovaný napříč nejrůznějšími MTasami, včetně těch flavivirových<sup>32</sup>. V primární sekvenci jsou od sebe rezidua velmi vzdálená; v trojrozměrné struktuře se však vyskytují ve velmi těsné blízkosti. Tyto aminokyseliny jsou kruciální při 2'-O-methylaci<sup>41</sup>, nicméně díky mutagenetickým studiím motivu K<sub>61</sub>-D<sub>146</sub>-K<sub>182</sub>-E<sub>218</sub> MTasy WNV se zjistilo, že jedna z aminokyselin (D<sub>146</sub>) je esenciální také pro N7-methylaci<sup>42</sup>. Další studie ukázaly, že se zmíněný tetraedr částečně vyskytuje mezi oblastmi N7- a 2'-O-methylace, které se překrývají. To naznačuje, že se lysin v pozici 182 u WNV přímo podílí na deprotonaci hydroxylové skupiny ribosy při 2'-O-methylaci<sup>32,43</sup>.

## 1.2 Methylace jako posttranskripční modifikace eukaryotní mRNA

Produkty RNA polymerasy II jsou během syntézy v jádře buňky modifikovány přidáním struktury zvané „čepička“ [m7G(5')pppX-RNA] na počáteční basi (zde znázorněno jako X) 5'-konce RNA<sup>44,45</sup>. Této reakce se v buňkách účastní řada enzymů: RNA trifosfatasa, guanylyltransferasa, N7-guanin MTasa a 2'-O MTasa. Díky RNA trifosfatase (RTPase) je nejprve na 5'-konci RNA hydrolyzován  $\gamma$ -fosfát, čímž vznikne substrát difosfát-RNA [pp(5')X-RNA]. Enzym guanylyltransferasa (GTasa) následně katalyzuje dvoukrokovou reverzibilní reakci adice GMP na substrát, čímž vznikne guanosinová čepička [G(5')pppX-RNA]. Po napojení guanosinmonofosfátu k RNA dochází k první methylaci pomocí methyltransferasy na N7 pozici vloženého guaninu – donorem methylové skupiny je S-adenosyl-L-methionin (SAM) – a vzniká struktura, tzv. čepička „typu 0“ [m7G(5')pppX-RNA]. Obdobně díky druhé methylaci hydroxylové skupiny nyní předposlední base (tzv. 2'-O-methylaci) enzymem 2'-O MTasou dochází ke vzniku čepičky „typu 1“ [m7G(5')pppX<sup>m</sup>-RNA]<sup>45</sup>.

Methylace guanosinové čepičky je zásadní děj, ke kterému dochází zpravidla krátce po zahájení transkripce<sup>46</sup>. Dokud nedojde k připojení methylové skupiny na čepičku, nemůže pokračovat RNA polymerasa II v syntese RNA. Regulačními faktory mohou být látky, které zvyšují aktivitu methyltransferasy nebo modifikují interakce mezi methyltransferasou a RNA polymerasou II. U kvasinek byly jako regulátory pozorovány: donor methylové skupiny SAM; enzym *cdc34* (konjugující s ubikvitinem), který interaguje s methyltransferasou *Abd1*, jejími represory či koaktivátory<sup>47</sup>; nukleární transportér importin  $\alpha$  interagující s methyltransferasou<sup>48</sup>. Krom výše zmíněných mohou regulaci methylace mRNA čepičky ovlivnit i nejrůznější buněčné signální kaskády. Díky vysoké konzervovanosti methyltransferas napříč nejrůznějšími eukaryotickými organismy a skutečnosti, že savčí methyltransferasa může *in vivo* nahradit methyltransferasu z kvasinky, je patrné, že regulátory, které jsou u daných druhů exprimovány, fungují ekvivalentně<sup>49</sup>.

Struktura RNA čepičky vzniklá N7-methylací je esenciálním efektozem metabolismu mRNA, který je důležitý pro řadu procesů, jako je např. stabilita a degradace mRNA, ale i sestřih,

polyadenylace 3'-konce nebo export mRNA ven z buněčného jádra<sup>46</sup>. Na druhé straně 2'-O-methylace slouží organismu k rozpoznání cizorodé ribonukleové kyseliny<sup>50</sup>.

### 1.3 Methylace flavivirového genomu

V poměrně nedávné době bylo zjištěno, že modifikace RNA hrají velmi významnou roli jako regulátory buněčné genové exprese<sup>51</sup>. Většina virů má na genomu strukturu čepičky typu 1, která je totožná s čepičkou buněčné mRNA a pro viry krucální při infekci hostitele<sup>1</sup>. Protože se však spousta RNA virů replikuje v cytoplasmě, a tudíž se nemohou dostat do jádra, musely se viry adaptovat a vytvořit si vlastní enzymový aparát, který umožní methylaci virového genomu. U flavivirů hraje klíčovou roli při infekci methylace vlastní RNA virovými enzymy<sup>52,53</sup>. Nedávné studie ovšem potvrdily, že genom flaviviru může být methylován i hostitelskými MTasami, což má opět významné důsledky pro infekci<sup>1</sup>.

Nezbytnost methylace flavivirové čepičky je dána přinejmenším třemi vzájemně se nevylučujícími důvody:

1. ochrana ribonukleotidové kyseliny před exonukleasami,
2. iniciační faktor při translaci virového genomu,
3. ochrana před imunitním systémem hostitele.

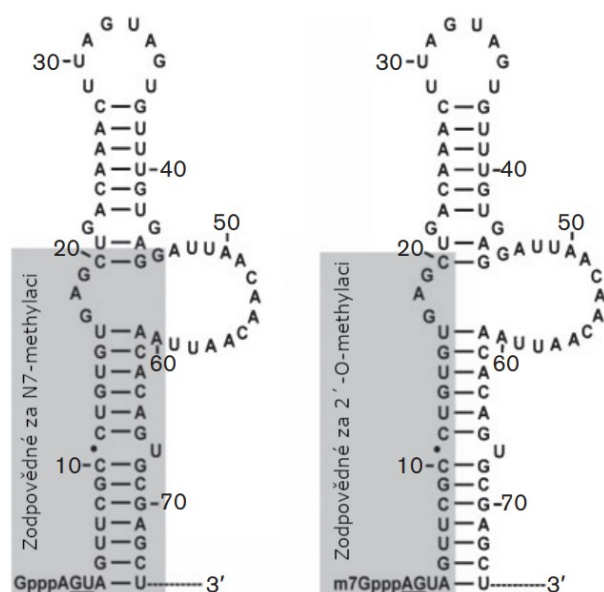
ad 1. V první řadě, struktura čepičky jako taková slouží k ochraně ribonukleové kyseliny před 5'→3' exonukleasovou aktivitou a pravděpodobně hraje významnou roli v prevenci rozpadu virové RNA. Nicméně není naprosto jasné, jak významnou roli má methylovaná čepička při stabilizaci ribonukleové kyseliny. Studie poukazují na fakt, že lidský protein Dcp2, který odstraňuje čepičku, nemůže působit na RNA substrát bez N7-methylace<sup>54</sup>. Methylace tedy ve skutečnosti umožňuje odstranění čepičky, což je předpoklad k rozpadu nukleové kyseliny. I přes tato fakta je možné, že methylace čepičky činí zatím neznámým mechanismem flavivirové genomu rezistentní vůči buněčným RNasam<sup>53</sup>.

ad 2. Dalším důvodem nepostradatelnosti methylace je její role při stimulaci iniciace virové translace. Kanonický protein eIF4E, který je nezbytný pro translaci většiny buněčných mRNA díky své schopnosti vytvořit komplex ribosomální podjednotky S40 spolu s jejími iniciačními faktory<sup>55</sup>, váže s daleko vyšší afinitou virovou m7GpppA-RNA než GpppA-RNA<sup>56</sup>. Existuje však řada vodítek, která naznačují možnosti iniciace translace nekanonickým způsobem: studie z roku 2006 poukazuje na fakt, že u replikonu WNV zvyšuje m7GpppA-RNA translaci pouze dvakrát oproti GpppA-RNA (porovnáme-li bezčepičkovou RNA pppA-RNA a GpppA-RNA, dochází v tomto případě až k 25-inásobnému navýšení translace)<sup>42</sup>. Další indicií bylo u studií s DENV snížení translace v důsledku vypnutí genu *eIF4E* v případě virového genomu pouze o 10 %, zatímco u buněčného genomu o 60 %<sup>57</sup>. Tyto studie naznačují, že by flaviviry

k iniciaci své translace mohly využívat nekanonickou cestu, která je minimálně závislá na přítomnosti methylované čepičky.

ad 3. Posledním hypotetickým důvodem methylace flavivirové čepičky by mohla být ochrana před rozpoznávacími buněčnými faktory, které rozeznávají organismu-cizí nukleové kyseliny a iniciují obrannou imunitní reakci<sup>50</sup>. Díky všem těmto skutečnostem je MTasa důležitým a zajímavým terapeutickým cílem.

Flavivirová methyltransferasa má na rozdíl od buněčné dvě jedinečné vlastnosti: zaprvé, buněčná N7-guanin a 2-O'-methylace je katalyzována dvěma různými MTasovými enzymy (viz kapitola 1.2, str. 22), zatímco u flavivirů zprostředkovává obě methylace jediný enzym NS5 MTasy. Zadruhé, buněčná MTasa katalyzuje methylaci mRNA čepičky bez ohledu na sekvenci RNA, kdežto flavivirová MTasa je unikátní, protože přednostně methyluje čepičku virové RNA (methylace je závislá na virové sekvenci a struktuře)<sup>42,58</sup>. Je tomu tak proto, že virová RNA má na svém nekódujícím 5'-konci typickou smyčku (viz Obr. 1.3a). Ta obsahuje guanin a uracil (na pozicích 2 a 3) nezbytné pro N7-methylaci a adenin, guanin (na pozicích 1 a 2) a minimální délku virové RNA 20 nukleotidů, které umožňují 2'-O-methylaci<sup>58</sup>. Následující posloupnost nukleotidů této struktury není podstatná.



**Obr. 1.3a 5'-koncová, nekódující oblast flavivirového genomu zodpovědná za methylaci čepičky.**

Pro WNV je zde vyobrazena struktura smyčky na 5'-konci virové RNA, která má délku 74 nukleotidů<sup>43</sup>.

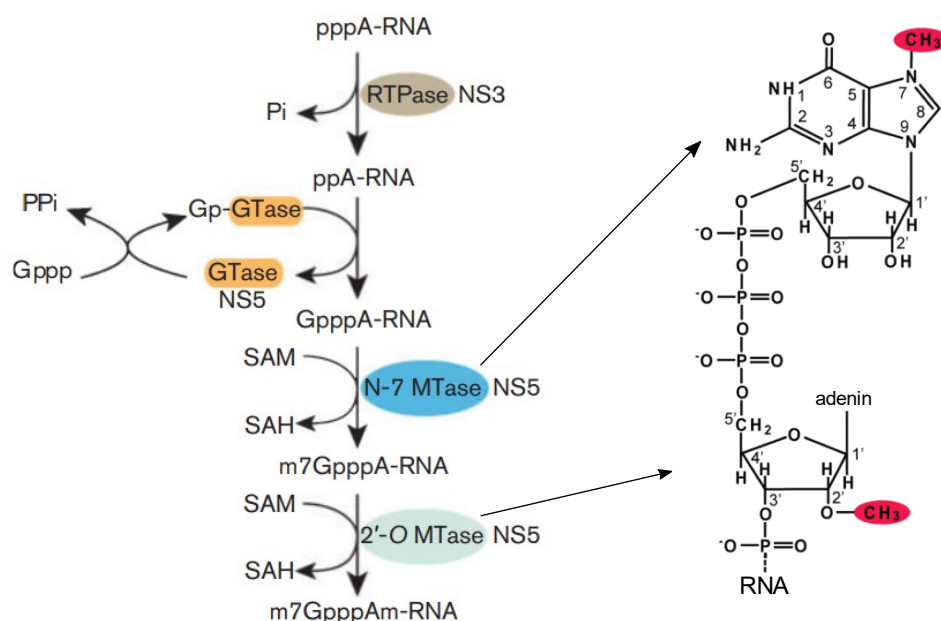
Šedé oblasti zde znázorňují regiony zodpovědné za N7-methylaci (vlevo) a 2'-O-methylaci (vpravo).

Důležité nukleotidy jsou podtržené. Převzato a upraveno<sup>52</sup>.

Proces methylace začíná obdobně, jako je tomu u eukaryotických buněk: 5'- $\gamma$ -fosfát je hydrolyticky odstraněn pomocí NS3 proteinu (ten zde zastává roli RNA trifosfatasy) a poté následuje připojení guanosinové čepičky pomocí proteinového komplexu NS5 (spolu s NS3) s enzymovou aktivitou GTasy (vazba GMP z GTP na 5'-koncový fosfát RNA)<sup>35</sup>. Nakonec



methylace vložené čepičky (N7-methylace guaninu) pomocí SAM dá vznik struktury čepičky typu 0 a pomocí 2'-O-methylace adeninu genomové RNA (substrátem je zde opět SAM) vznikne čepička typu 1 (viz Obr. 1.3b). V tomto případě je ovšem za obě methylace zodpovědný jediný enzym: MTasa NS5 proteinu<sup>42</sup>.



**Obr. 1.3b Proces připojení guanosinové čepičky a následná methylace flavivirového genomu.**

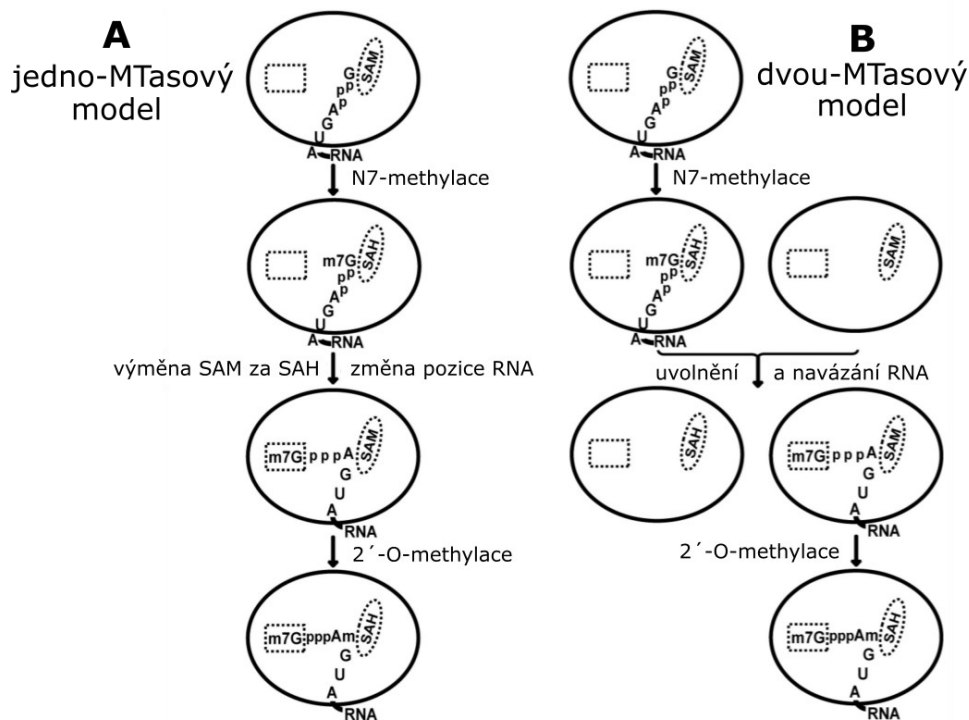
U virového genomu nejprve dochází k hydrolyze fosfátu na 5'-konci (enzymová aktivita RTPasy proteinu NS3), poté k připojení guanosinové čepičky (vzniklé z GTP) pomocí GTasové aktivity NS5 proteinu a nakonec k postupné, dvoukrokové methylaci jedním enzymem: MTasou proteinu NS5. Místa na virové RNA methylovaná SAM jsou červeně zvýrazněna. Převzato a upraveno<sup>36,52</sup>.

V *in vitro* experimentech typ methylace flavivirové MTasy závisí na hodnotě pH: v případě N7-methylace je pH optimum 7,0, zatímco u 2'-O-methylace se pohybuje optimální pH v silně basické oblasti (nad hodnotou pH 9,0)<sup>43</sup>. Kinetické *in vitro* studie WNV naopak prokazují značnou substrátovou specifitu pro oba typy methylace. Pokud je jako substrát přítomna GpppA-RNA, proběhne N7-methylace; je-li jako substrát přítomna m7GpppA-RNA (struktura čepičky typu 0), dochází následně k 2'-O-methylaci<sup>59</sup>. Tato preference určuje pořadí methylačních reakcí virové RNA pomocí flavivirové MTasy.

Mechanismus N7-methylace přidaného guaninu je odlišný od 2'-O-methylace ribosy na následujícím adenosinu<sup>43,60,61</sup>. Při N7-methylaci naznačuje struktura Ecm1 N7 MTasy mechanismus tzv. „in-line“ reakce: během methylace nejsou pozorovány žádné přímé kontakty mezi enzymem a útočícím nukleofilním atomem N7-guaninu na RNA, donorem methylové skupiny SAM nebo sírou z odstupující molekuly SAH. Katalýza v tomto případě probíhá díky těsné blízkosti a správné orientaci obou substrátů v aktivním místě MTasy<sup>60</sup>. Naopak v případě 2'-O-methylace naznačují strukturální a mutagenetické studie VP39 a RrmJ 2'-O MTasy, že katalýza probíhá pomocí S<sub>N</sub>2 reakce: konzervovaný tetraedr KDKE zprostředkuje deprotonaci

cílové OH-skupiny na ribose adenosinu, ta poté nukleofilně napadá metylovou skupinu SAM, dochází k přenosu methyly a vzniku  $\text{SAH}^{41,61}$ .

Existují dva modely (viz Obr. 1.3c) molekulárních přesunů jednotlivých substrátů během methyloci: V obou modelech figuruje MTasa s navázaným substrátem SAM<sup>36</sup>. K tomuto substrátu poté přichází N7-guanin substrátu GpppA-RNA, dochází k methyloci a vzniku m7GpppA-RNA a SAH. V prvním modelu, tzv. jedno-MTasovém modelu (anglicky „Single-MTase model“), po N7-methyloci odstupuje produkt SAH a na jeho místo je navázána nová molekula SAM. Zároveň dochází ke změně pozice u m7GpppA-RNA, kdy je 5'-konec RNA přemístěn a částečně zanořen do vazebného místa pro GTP v MTase. Alternativně se u dvou-MTasového modelu („Double-MTase model“) po N7-methyloci uvolní RNA produkt ze SAH-vazebného místa první MTasy a naváže se do GTP-vazebného místa druhé MTasy s již navázaným substrátem SAM. Poté u obou modelů dochází k 2'-O-methyloci ribosy adenosinu na 5'-konci virové RNA a následnému uvolnění struktury čepičky typu 1 (m7GpppA<sup>m</sup>-RNA).



**Obr. 1.3c Modely molekulárních přesunů během methyloci u flavivirové MTasy. A)**

V jedno-MTasovém modelu dojde nejprve k umístění 5'-konce RNA do blízkosti substrátu SAM; po methyloci proběhne výměna SAH za SAM a zároveň přesun 5'-konce RNA do GTP-vazebného místa MTasy a následně proběhne i druhá methyloci. **B)** Začátek je stejný, jako u (A); po N7-methyloci odstupuje m7GpppA-RNA z první MTasy a dojde k navázání virové RNA do GTP-vazebného místa druhé MTasy a obdobně proběhne druhá methyloci. Flavivirová methyltransferasa je zde vyobrazena v podobě plné elipsy, vazebné místo pro SAM/SAH jako tečkovaná elipsa, vazebné místo pro GTP jako tečkovaný obdélník, virovou RNA reprezentuje 5'-koncevá část WNV (GpppAGUA-RNA). Převzato a upraveno<sup>36</sup>.

Jak již bylo zmíněno dříve, N7-methylace je pro metabolismus vzniklé RNA esenciální. Methylace pomocí 2'-O MTasy však není pro flavivirovou infekci úplně bezvýznamná. U WNV byl vytvořen virový mutant bez schopnosti 2'-O-methylace, kterým byly nakaženy myši. U těchto myší bylo pozorováno oproti divokému typu viru, že dochází k potlačení virové infekce<sup>62</sup>. Pozdější studie ukázaly, že pomocí interferon-indukovaných buněčných proteinů IFIT1 a IFIT2 (také známých jako ISG56 a ISG54) je rozeznávána čepička typu 0 a důsledkem toho dochází k inhibici následné translace kvůli blokaci přístupu iniciačních faktorů<sup>63</sup>. Absence 2'-O-methylace tedy umožňuje buňkám díky rodině proteinů IFIT detekovat cizorodou RNA a omezit její následnou translaci. Z výsledků je tedy patrné, že aktivita 2'-O MTasy je sice důležitá, ale nikoli esenciální jako aktivita N7 MTasy, při reprodukci WNV<sup>43</sup>.

Porovnáním jednotlivých genomů WNV, které obsahovaly různě methylované struktury čepičky, anebo neobsahovaly čepičku žádnou (pppA-RNA), se zjistilo následující:

1. guaninová čepička je nezbytná pro translaci RNA;
2. N7-methylace zvyšuje efektivitu translace;
3. 2'-O-methylace nikterak nepřispívá k virové translaci<sup>36</sup>.

## 1.4 Přetrvávající hrozba flavivirů – WNV

### 1.4.1 Vakcinace

V současné době stále neexistuje žádná vakcína proti viru západonilské horečky pro lidi; podařilo se ovšem vyvinout vakcínu pro koně<sup>11</sup>. Provádí se řada klinických testů vhodných kandidátů, nicméně žádná účinná látka se zatím neblíží schválení<sup>64</sup>. Obecně může být několik důvodů, proč nebyla vakcína proti tomuto flaviviru vyvinuta: problémy s návrhy vhodné látky, která by umožnila získání imunity; obavy o bezpečnost; obtíže s návrhem klinických testů nebo ekonomické důvody.

Vyvolání protektivních imunitních odpovědí je možné díky nejrůznějším imunizačním technologiím<sup>64</sup>. V případě současných flavivirových vakcín se používají různé postupy. Vakcína proti viru žluté zimnice (YFV) obsahuje oslabený vir, zatímco vakcíny proti TBEV a JEV vyvolávají imunizaci organismu pomocí inaktivovaných patogenů. Tyto vakcíny jsou dlouhodobě užívané a vykazují dobrou snášenlivost. Naopak nově vyvinutá vakcína proti DENV (legalizovaná pouze v několika zemích) vyvolala značnou diskusi o své bezpečnosti. Vakcína CYD-TDV je navržena proti všem čtyřem hlavním sérotypům DENV a obsahuje geneticky modifikovaný virus YFV, který je schopný exprimovat strukturní proteiny DENV prM a E. Rozsáhlé klinické studie účinnosti ovšem odhalily malé, avšak významné zvýšení rizika hospitalizace u naivních jedinců bez rezistence; naopak ti, kteří již přišli do kontaktu s DENV, byli chráněni proti jakémukoli DENV onemocnění po dobu pěti let<sup>65</sup>. Přesné důvody těchto

pozorování však dosud nejsou známy. Jediná WNV vakcína, která prošla druhou fází klinických testů, funguje na podobné bázi, jako výše zmíněná CYD-TDV. Lze tedy předpokládat, že současná nedostupnost WNV vakcíny je zapříčiněna probíhajícími testy, které řeší problémy u vakcíny proti DENV.

### 1.4.2 Diagnostika

Onemocnění se diagnostikuje detekcí protilátek IgM např. proti WNV<sup>66</sup>. Pomocí metody ELISA se identifikují specifické protilátky v séru nebo mozkomíšním moku. Specifické IgM protilátky se obvykle objevují do 3 až 8 dnů po projevu onemocnění a přetrvávají zhruba 3 měsíce (v některých případech až jeden rok). Přítomnost těchto protilátek tedy může poskytovat důkaz o probíhajícím či prodělaném onemocnění WNV.

Positivní výsledek testování nemusí nutně znamenat, že pacient prodělal právě tuto nemoc. Kvůli tzv. křížové reaktivitě protilátek po infekci jinými flaviviry by měly být všechny vzorky s pozitivními výsledky, jež byly získány těmito testy, postoupeny plak-redukčnímu neutralizačnímu testu protilátek, který se provádí v referenčních laboratořích. Díky těmto testům lze určit konkrétní infekční flavivirus, anebo v případě WNV potvrdit akutní infekci porovnáním změn titru neutralizačních protilátek ve vzorcích séra odebraných s odstupem dvou až tří týdnů.

Kromě zmíněných se provádí i další diagnostické metody, jako např. virové kultury, molekulární testy detekce virové RNA (RT-PCR) nebo imunohistochemie. Imunohistochemická detekce virových antigenů v tkáních během prvního týdne od nástupu příznaků u pacientů po transplantaci, trpících zhoubnými nádory či diabetes, obvykle koreluje se smrtí<sup>12</sup>.

Protilátky WNV IgG jsou obecně detekovány krátce po IgM protilátkách a v těle přetrvávají až řadu let<sup>66</sup>. Přítomnost IgG protilátek je tedy jen důkazem prodělané infekce a nemůže sloužit jako akutní diagnostický ukazatel onemocnění.

### 1.4.3 Současná léčba a prevence

V současné době stále neexistují žádná léčiva onemocnění DENV, WNV a dalších flavivirů. Například léčba západonilské horečky je primárně podpůrná, kdy je u infikovaného jedince snaha aktivovat jeho imunitní systém, aby se dokázal vypořádat s onemocněním. V případě těžších průběhů spojených s neurotickými problémy může být vyžadována mechanická ventilace nebo intravenózní výživa<sup>11</sup>.

Nezbytná preventivní opatření se odvíjí od možností způsobu přenosu<sup>67</sup>. V případě oblastí s vysokým výskytem tohoto onemocnění je třeba se chránit proti komárům, ať už užitím repelentu, vhodného oblečení, které maximálně zakrývá pokožku nebo ochranných sítí proti hmyzu. Při manipulaci s uhynulými zvířaty použití vhodných ochranných pomůcek (rukavice)

snižuje riziko nakažení. U dárců krve se vzorky testují na přítomnost WNV; v případě dárcovství orgánů však není toto testování dostatečně důsledné. Použitím larvicidů a eliminací nádob se stojatými vodami je možné omezit rozmnožování komárů a tím snížit možnost nákazy nejen virem západonilské horečky.

#### 1.4.4 Zajímavé cíle terapeutického zásahu

Riziko infekčních onemocnění, která způsobuje virus západonilské horečky, globálně roste. Efektivní protivirová léčba se zaměřuje jak na virové cíle (strukturní a nestrukturní proteiny viru), tak na proteiny hostitele, které se podílí na infekci nebo replikaci WNV<sup>19</sup>. V dnešní době probíhá řada studií a výzkumů, které se zabývají identifikací specifických diagnostických ukazatelů WNV, vývojem rekombinantních protilátek a peptidů, interferencemi RNA a malých molekul s nejrůznějšími částmi viru; avšak, jak už bylo zmíněno mnohokrát, stále ještě nebyl nalezen účinný lék či vakcína<sup>21,68</sup>.

V minulosti se soustředil výzkum hlavně na virovou proteasu<sup>19</sup>. V dnešní době se vývoj flavivirových inhibitorů orientuje spíše na další virové enzymy, jako jsou např. RdRp či MTasa. Zajímavým cílem, jak ukázal vývoj inhibitoru NS5A u HCV, by také mohly být nestrukturní proteiny bez enzymatických aktivit (NS2A, NS4A a NS4B). Krom inhibitorů na bázi malých molekul se nesmí opomenout ani hledání terapeutických protilátek, které by v budoucnu mohly léčit infekce WNV.

Pozornost vývoje léků proti flavivirům se zaměřila především na dva nestrukturní proteiny NS3 a NS5, které jsou zodpovědné za enzymatickou aktivitu potřebnou k replikaci virového genomu a následné zpracování polypeptidů<sup>69</sup>. Při *in silico* screeningu byla nalezena látka ivermectin, která účinně inhibuje funkci helikasy u NS3 proteinu a tím brání rozvolňování virové dsRNA u WNV<sup>70</sup>. Ivermectin je v současné době schválený širokospektrální lék proti parazitickým onemocněním. Bylo dokonce prokázáno, že inhibuje replikaci virů DENV pravděpodobně interferencí s nukleární translokací proteinu NS5. K použití tohoto léku proti flavivirům je však potřeba udělat ještě řadu studií nejen na *in vivo* zvířecích modelech, ale také potvrdit přímé účinky látky na replikaci viru a tvorbu rezistence proti ivermectinu<sup>19</sup>.

Protein NS5 je největším a zároveň nejvíce konzervovaným proteinem v rodě *Flavivirus* a skládá se z N-koncové MTasy a GTasy a C-koncové RdRp. Obě enzymatické jednotky tohoto proteinu vážou do svých aktivních míst nukleové kyseliny. Nukleotidové nebo nukleosidové inhibitory (NIs) se tedy jeví jako ideální kandidáti v boji proti řadě flavivirových onemocnění. Použití těchto inhibitorů při léčbě onemocnění DENV ale i dalších je podpořeno úspěšnou léčbou chronické hepatitidy C a dalšími úspěchy v léčbě HIV onemocnění za použití NIs k inhibici RdRp<sup>71</sup>. Zatím nejvyšší účinnost vykazují nukleosidové inhibitory v podobě monofosfátových

proléčiv. Právě první fosforylace je ve většině případů krucální pro vznik trifosfátu na nukleosidu a umožnění následné replikace viru. Hlavním důvodem klinického selhání je však nepředvídatelná toxicita, která je při *in vitro* experimentech nezjistitelná.

WNV MTasa methyluje virovou DNA pomocí N7- a 2'-O-methylace na konečný produkt čepičky typu 1. Defekt v N7-methylaci je pro virus letální, zatímco defekt v 2'-O-methylaci snižuje replikaci viru a může tak sloužit u myši jako ochrana před divokým typem WNV<sup>43</sup>. Enzym MTasy poskytuje hned několik aktivních míst – GTP-vazebné místo, místo pro navázání RNA a SAM/SAH-vazebné místo – jejichž blokaci lze celý enzym inhibovat.

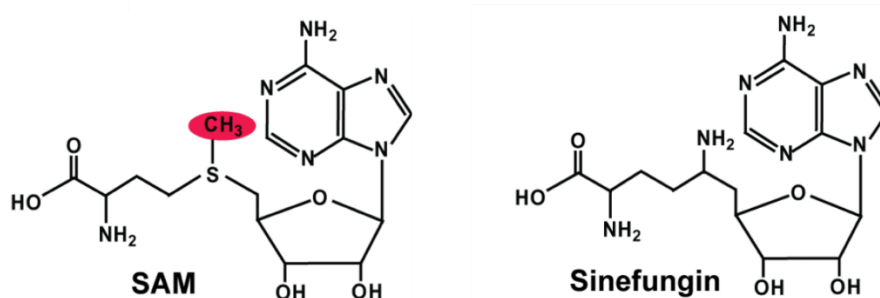
Vazebné místo pro molekulu GTP je, stejně jako ostatní aktivní místa MTasy, vysoce konzervované napříč flaviviry. Jeho rezidua jsou selektivně důležitá pro 2'-O-methylaci<sup>36</sup>. Vazba GTP do tohoto aktivního místa enzymu brání navázání malých molekul RNA s methylovanou čepičkou, které slouží jako substráty pro 2'-O-methylaci<sup>39</sup>. Byl nalezen strukturní analog GTP – ribavirin 5'-trifosfát – který inhibuje 2'-O-methylaci u DENV-2 MTasy díky vazbě do GTP-vazebného místa enzymu<sup>40</sup>. Ribavirin má mimo jiné i řadu dalších antivirových mechanismů: vyčerpání intracelulárních zásob GTP (inhibicí IMP dehydrogenasy metabolitem ribavirinu), inhibici aktivity virové polymerasy metabolitem ribavirinu, inhibici virové či buněčné GTasy a indukci katastrofické chyby zapříčiněné akumulací mutací virového genomu<sup>72</sup>. Nejpravděpodobnější důvodem inhibice se však stále jeví blokace GTP-vazebného místa pro m7Gppp čepičku virové RNA při 2'-O-methylaci<sup>39</sup>.

V případě RNA-vazebného místa se jedná spíše o oblast s vysokým výskytem pozitivně nabitých postranních skupin AMK (viz Obr. 1.1.3.1B, str. FG), která je zodpovědná jak za N7-methylaci, tak 2'-O-methylaci<sup>37</sup>. Tato oblast se označuje také jako nízkoafinitní vazebné místo, které se nachází v blízkosti SAM/SAH-vazebného místa. Nalezení inhibitorů RNA-vazebného místa je velmi náročné vzhledem k velkému množství kontaktních míst enzymu s ribonukleovou kyselinou. Proto byla vytvořena krátká RNA s čepičkou (GpppAGUp), která se vážala do zdánlivého RNA-vazebného místa během N7-methylace<sup>73</sup>. Na základě těchto strukturních výsledků byly pomocí *in silico* vyhledávání nalezeny tři syntetické sloučeniny, které byly *in vitro* testovány na MTase. Jako nejlepší inhibitor se ve studii jevila aurintrikaboxylová kyselina (ATA), jejíž inhibiční účinky již byly zaznamenány u viru lidské imunodeficiency (HIV) nebo viru chřipky<sup>73</sup>. Byly objeveny také specifické inhibitory selektivní pouze pro flavivirovou MTasu, nikoli však pro MTasu hostitelskou. Jednou z těchto látek je nukleosidový analog značený jako GRL-003, jenž je schopný inhibovat aktivitu pouze flavivirové MTasy<sup>74</sup>. Jeho selektivita je pravděpodobně dána substitučními skupinami inhibitoru, které se nachází v blízkosti SAM-vazebné kapsy enzymu.

SAM/SAH-vazebné místo každé flavivirové MTasy obsahuje jednu molekulu SAH, která je spolu s enzymem purifikována. Přeměna SAH-vazebného místa na SAM-vazebné a zpět je

dána aktuálním krokem methylační reakce. Jako inhibitor v tomto aktivním místě může působit sinefungin (SIN) – analog substrátu SAM, ve kterém je methylová skupina nahrazena aminoskupinou a atom síry nahrazen atomem uhlíku (viz Obr. 1.4.4). Díky kompetitivní vazbě sinefunginu do SAM/SAH-vazebného místa inhibuje tato molekula oba typy methylace<sup>37</sup>. Stejná studie také uvádí, že je SIN schopný úplně potlačit replikaci WNV v buněčné kultuře. Inhibiční účinky má SIN bohužel i na některé SAM-vazebné, hostitelské enzymy; kvůli své toxicitě tedy nemůže být použit jako terapeutikum. Krystalová struktura MTasy WNV se SIN navíc odhalila další kapsu, která navazuje na SAM/SAH-vazebné místo, a je také konzervovaná napříč známými strukturami MTas různých flavivirů. Tato navazující kapsa se však nevyskytuje u jiných SAM-vazebných proteinů, a proto by mohla být řešením při hledání selektivních, netoxických inhibitorů flavivirových MTas i flavivirů celkově<sup>75,76</sup>.

Virtuální screening a následné *in vitro* a buněčné testy objevily další sloučeniny, které by mohly sloužit jako flavivirové inhibitory<sup>76,77</sup>. Dvě z těchto sloučenin (NSC306711 a NSC610930) inhibovaly hned několika flavivirových MTas a v případě buněk BHK-21 byly relativně netoxické<sup>76</sup>.



**Obr. 1.4.4** Struktura přirozeného substrátu MTasy S-adenosyl-L-methioninu a inhibitoru sinefunginu. Methylová skupina molekuly SAM, která se během methylační reakce váže na 5'-konec RNA, je barevně vyznačena. Převzato a upraveno<sup>36</sup>.

Se zajímavým nápadem přišla koncem roku 2020 výzkumná skupina Bena Geoffreya, která vytvořila program pro automatizaci nalezení sloučenin, které by se mohly stát potenciálními léky proti WNV a DENV<sup>78</sup>. Jejich program, vytvořený v programovacím jazyce python, porovnává data z database chemických sloučenin PubChem a aplikuje na ně algoritmy, pomocí kterých se snaží najít tzv. „lead drugs“. Takto získané sloučeniny jsou automaticky podrobovány *in silico* modelování, čímž se výrazně urychluje celý proces vývoje léčiva.

Vědci se také snaží kontrolovat a snížit šíření virového vektoru komáry<sup>69</sup>. To by mohlo být umožněno například pomocí bakterie *Wolbachia*. U komárů rodu *Aedes aegypti*, kteří byli infikováni vybranými kmeny této endosymbiotické bakterie, docházelo ke snížení replikace DENV a ZIKV díky rychlé degradaci virové RNA v cytoplasmě. Rozšíření těchto komárů

v endemických oblastech by mohlo redukovat nebo dokonce naprosto eliminovat přenos flavivirů. Další možností jsou geneticky upravení komáři, kteří jsou odolní vůči DENV či ZIKV infekci díky protivirové imunitní odpovědi.



## 2 CÍLE PRÁCE

---

- > Příprava expresního plasmidu methyltransferasy viru západonilské horečky
- > Bakteriální exprese konstruktů MTasy
- > Purifikace cílového proteinu
- > Měření změn teplot tání komplexů MTasy s malými molekulami
- > Krystalizace komplexů WNV methyltransferasy s malými molekulami
- > Difrakční experiment a vytvoření strukturního modelu komplexů proteinu s malými molekulami

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Použité chemikálie

1,2-bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Carl Roth (Německo)
1,4-dithiothreitol (DTT)	Carl Roth (Německo)
2-(cyklohexylamino)ethansulfonová kyselina (CHES)	Fisher Scientific (USA)
2-merkaptoethanol ( $\beta$ -MeEtOH)	Carl Roth (Německo)
(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin) ethansulfonová kyselina (HEPES)	Fisher Scientific (USA)
Agarosa pro DNA elektroforesu	SERVA (Německo)
Akrylamid / Bisakrylamid	Carl Roth (Německo)
Ampicilin sodná sůl (AMP)	Carl Roth (Německo)
Coomassie Brilliant Blue G 250	Sigma-Aldrich (USA)
Dialysační membrána Membra-Cel MD34 (MWCO 14000)	Carl Roth (Německo)
Dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Penta (ČR)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (USA)
Dodecylsíran sodný (SDS)	Carl Roth (Německo)
Ethidium bromid	Carl Roth (Německo)
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)	Carl Roth (Německo)
Glukosa	Penta (ČR)
Glycerol	Lach-Ner (ČR)
Hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Penta (ČR)
Chloramfenikol (CAM)	Carl Roth (Německo)
Chlorid hořečnatý ( $\text{MgCl}_2$ )	Penta (ČR)
Kvasničný extrakt	Carl Roth (Německo)
Laktosa	Carl Roth (Německo)
Octová kyselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	Penta (ČR)
Peroxodisíran amonný ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ )	Carl Roth (Německo)
Proteinová barva SYPRO Orange	Sigma-Aldrich (USA)
Síran amonný ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	Carl Roth (Německo)
Standard DNA Gene Ruler 1 kb Plus	Thermo Scientific (USA)
Standard proteinový PageRuler Plus (10 – 250 kDa)	Thermo Scientific (USA)
Talon Ni-NTA Resin	Thermo Scientific (USA)

TEMED	Carl Roth (Německo)
Trizma base (Tris-Cl)	Sigma-Aldrich (USA)
Trypton	Carl Roth (Německo)

### 3.1.1 Enzymy

Endonukleasa <i>BamHI</i>	Thermo Scientific (USA)
Endonukleasa <i>XhoI</i>	Thermo Scientific (USA)
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (2×)	Thermo Scientific (USA)
Proteasa Ulp1	připravena v laboratoři
Polymerační směs 2x PCRBIO Taq Mix Red	PCR Biosystems (UK)
T4 DNA ligasa	Thermo Scientific (USA)
Telecí střevní alkalická fosfatasa (CIAP)	Invitrogen (USA)

### 3.1.2 Primery a templáty

Flavivirový NS5 DNA templát v plasmidu	EVAg (Francie)
Přímý primer WNV-start5AK	Generi Biotech (ČR)
5' CAG ACG GAT CCC GCA CTT TAG GTG AGG TTT GG 3'	
Zpětný primer pSUMO seq/1	Generi Biotech (ČR)
5' CTT AAG ATT CTT GTA CGA CGG T 3'	
Zpětný primer T7 (STO 720)	Generi Biotech (ČR)
5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3'	
Zpětný primer WNV	Merck (Německo)
5' CAT ATC TCG AGC TAA ACG GCG CGC GTG CCA 3'	

### 3.1.3 Roztoky, pufry, média a sady

1 000× koncentrovaný roztok ampicilinu (AMP)	
100 mg/ml Ampicilin sodná sůl (rozpuštěno ve vodě), 50% (v/v) ethanol	
1 000× koncentrovaný roztok chloramfenikolu (CAM)	
34 mg/ml Chloramfenikolu (rozpuštěno v ethanolu), 70% (v/v) ethanol	
20× koncentrovaný fosfátový pufr	
1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O, 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
50× koncentrovaný 5052 (+ 100mM MgCl <sub>2</sub> )	
25% glycerol, 2,5% glukosa, 10% laktosa	

## Barvicí roztok pro gely SDS-ELFO

3mM Coomassie Brilliant Blue, 1,5M octová kyselina, 50% (v/v) methanol

## Dialyzační pufr

viz lyační pufr

## Eluční pufr (afinitní chromatografie)

50mM Tris (pH 8,0), 500mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 3mM  $\beta$ -MeEtOH,  
300mM imidazol

## Ekvilibrační pufr (afinitní chromatografie)

viz lyační pufr

## HEPES pufr bez glycerolu (gelová permeační chromatografie)

10mM HEPES (pH 7,5), 500mM NaCl, 5mM DTT

## HEPES pufr s 10% glycerolem (gelová permeační chromatografie)

10mM HEPES (pH 7,5), 500mM NaCl, 5mM DTT, 10% (w/v) glycerol

## CHES pufr

25 mM CHES, pH 9,5; 800mM NaCl; 10% (w/v) glycerol; 5mM DDT,  
0,02% (w/v)  $\text{NaN}_2$

## Komerční krystalizační aditiva

The Angstrom Additive Screen MD1-100	Molecular Dimensions (USA)
--------------------------------------	----------------------------

## Komerční krystalizační roztoky

JCSG I – IV	Qiagen (Německo)
Morpheus	Molecular Dimensions (USA)
ProPlex	Molecular Dimensions (USA)
SG1 Screen	Molecular Dimensions (USA)

LB agar dle Lennox	P-Lab (ČR)
--------------------	------------

LB médium dle Lennox	P-Lab (ČR)
----------------------	------------

Ligační pufr T4 DNA (10x konc.)	NEB (USA)
---------------------------------	-----------

## Lyační pufr

50mM Tris (pH 8,0), 500mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 3mM  $\beta$ -MeEtOH,  
20mM imidazol

Restrikční pufr 10 $\times$ FastDigest Green Buffer	Thermo Scientific (USA)
---	-------------------------

Sady pro purifikaci DNA	Qiagen (Německo)
-------------------------	------------------

QIAprep Spin Miniprep Kit

QIAquick PCR Purification Kit

QIAquick Gel Extraction Kit

**TAE pufr**

40mM Tris; 20mM CH<sub>3</sub>COOH, 1mM; EDTA; pH 8,0

**Tris-glycinový pufr pro SDS elektroforesu**

25mM Tris NaCl, 0,25M glycin, 0,1% (w/w) SDS, pH 8,8

Vzorkový pufr pro DNA-ELFO 6x DNA Loading Dye Thermo Scientific (USA)

Vzorkový pufr pro SDS-ELFO 4x Roti Load 1 Carl Roth (Německo)

**ZY médium (autoindukční)**

1% (w/v) trypton; 0,5% (w/v) kvasničný extrakt; 2,8mM glukosa; 6mM laktosa; 0,5% (v/v) glycerol; 1mM MgCl<sub>2</sub>; 25mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**3.1.4 Složení gelů****Agarosový gel**

1% (v/v) agarosa; 0,01% (v/v) ethidium bromid; rozpuštěno v TAE pufru

**Separální gel SDS elektroforesy**

375mM Tris-Cl (pH 8,8); 15% (w/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5 : 1); 0,1% (w/v) SDS; 0,001% (v/v) TEMED; 0,05% (w/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

**Zaostřovací gel SDS elektroforesy**

125mM Tris-Cl (pH 6,8); 4% (v/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5 : 1); 0,1% (w/v) SDS; 0,005% (v/v) TEMED; 0,05% (w/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

**3.2 Použité přístroje a pomůcky**

Analytické váhy Adventure Pro AV264C	Ohaus (USA)
Aparatura Elektroforéza PROfessional IV	P-Lab (ČR)
Centrifuga 5418 R, rotor FA-45-18-11	Eppendorf (Německo)
Centrifuga Allegra X – 15 R, rotor SX4750A	Beckman Coulter (USA)
Centrifuga Avanti J-26S XPI, rotor JLA-9.1000	Beckman Coulter (USA)
Centrifuga Avanti J-30I, rotor JA-30.50 Ti	Beckman Coulter (USA)
Homogenizátor dle Dounceho	P-Lab (ČR)
Chromatografický systém ÄKTA pure	Cytiva (USA)
Kolona HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	GE Healthcare (USA)
Kolona HiTrap 5ml Desalting	GE Healthcare (USA)
Koncentrátor Macrosep (MWCO 3 000)	Pall Corporation (USA)
Koncentrátor Microsep (MWCO 3 000)	Pall Corporation (USA)
Koncentrátor Vivaspin 500 (MWCO 10 000)	Sartorius AG (Německo)

Krystalizační destičky Intelli-Plate 96-2 Shallow Well	ARI (USA)
Krystalizační skříčka (silikonizované, 22 mm)	Hampton research (USA)
Magnetická míchačka ARE	VELP (Itálie)
Mikroskop Olympus SZX10, objektiv DF PL 2×	Olympus (Japonsko)
Mikroskop UV fluorescenční Uvex-M	JANSi (USA)
Mikropipetovací robot Mosquito Crystal	TTP Labtech (GB)
DSF Mikroobjemová destička (384 jamek)	Thermo Scientific (USA)
Míchačka válcová TubeRoller R3005	Benchmark Scientific (USA)
PCR cyklér ProfessionalTRIO	Biometra (Německo)
Předvážky EMB 2000-2	KERN & SOHN (Německo)
Sběrač frakcí Fraction Collector F9-C	Cytiva (USA)
Sonikátor Q700 se sonikační sondou CL-334	QSonica (USA)
Souprava pro SDS elektroforesu	Bio-Rad (USA)
Spektrofotometr BioPhotometer plus	Eppendorf (Německo)
Spektrofotometr Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific (USA)
Světelný termocyklér LightCycler 480 Instrument II	Roche (Švýcarsko)
Termostat IPP 400	Memmert (Německo)
Třepačka Incubating Mini Shaker	VWR (ČR)
Třepačka s inkubátorem Innova 44	New Brunswick Scient. (USA)
UV fotodokumentační box Quantum ST4-1100	Vilbert Lourmat (Francie)
Vodní lázeň JB Aqua 2 Plus	Grant Instruments (GB)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (USA)
Zdroj pro DNA elektroforesu Consort EV231	Carl Roth (Německo)
Zdroj pro SDS elektroforesu PowerPac Basic	Bio-Rad (USA)

### 3.3 Použité metody

#### 3.3.1 Příprava bakteriálního plasmidu pro produkci WNV MTasy

##### 3.3.1.1 Amplifikace insertu polymerasovou řetězovou reakcí

S využitím polymerasové řetězové reakce (PCR) byla amplifikována DNA kódující 262-AMK dlouhou doménu<sup>43</sup> methyltransferasy nestrukturního proteinu 5 viru západonilské horečky (viz Obr. 4.2a, str. 50). Jako templát sloužila flavivirová NS5 DNA v expresním plasmidu. K amplifikaci insertu byly použity oligonukleotidové primery se štěpnými místy pro endonukleasy *BamHI* a *XhoI*. Sekvence primerů a štěpná místa restričních endonukleas jsou zobrazena v Obr. 4.1a na straně 49. Složení reakční směsi pro PCR je uvedeno v Tab. 1, termální profil PCR reakce potom v Tab. 2. Ověření délky produktů reakce proběhlo pomocí agarosové elektroforesy (viz dále).

**Tab. 1** Reakční směs pro PCR insertu.

Složka	V (μl)
2× Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	10
DNA templát (1 : 500)	8
10 μM přímý primer WNV-start5AK	1
10 μM zpětný primer	1

**Tab. 2** Termální profil PCR insertu.

Krok	T (°C)	t (s)	Počet cyklů
1	98,0	10	1
2	98,0	1	36
3	64,0	5	
4	72,0	15	
5	72,0	10	1
6	10,0	–	1

##### 3.3.1.2 Horizontální agarosová elektroforesa

Agarosový gel (1%) by připraven dle složení v kapitole 3.1.3 na straně 35. Výsledný roztok byl zahřát, aby došlo k rozpuštění agarosy. Do jamek gelu byly nanášeny 2 μl DNA standardu a 4 μl roztoku, který obsahoval 2 μl vzorkového pufru pro DNA-ELFO a 2 μl vzorku z PCR směsi. Elektroforesa probíhala v TAE pufru v horizontálním uspořádání za konstantního napětí 300 V po dobu 14 minut. Výsledky elektroforesy byly vizualizovány v UV fotodokumentačním boxu.

### 3.3.1.3 Purifikace PCR produktu

Produkt PCR byl přečištěn za použití silikagelové mikrokolonky pomocí sady QIAquick PCR Purification Kit<sup>79</sup>. Ke vzorku byl přidán PB pufr v pětinasobném objemu oproti vzorku. Tato směs byla kvantitativně převedena na mikrokolonku umístěnou ve sběrné mikrozkuhavce a centrifugována (centrifuga 5418 R, rotor FA-45-18-11) 1 minutu při 14 000× g. Na kolonku bylo pipetováno 750 µl PE pufru a postup centrifugace se opakoval. Kolonka byla ještě jednou centrifugována, aby došlo k úplnému odstranění PE pufru ze silikagelu. Po centrifugaci byla kolonka přendána do nové mikrozkuhavky, na kolonu bylo nanášeno 30 µl elučního pufru EB a následně byla ponechána 1 minutu inkubovat při pokojové teplotě. Poté proběhla opět centrifugace a PCR produkt byl eluován do čisté mikrozkuhavky.

### 3.3.1.4 Transformace buněk *E. coli* DH5α plasmidem pSumo a jeho produkce

Buňky *Escherichia coli* DH5α byly ponechány rozmraznout na ledě. K 50 µl těchto buněk byl přidán 1 µl plasmidu pSumo. Po 20minutové inkubaci směsi na ledu byly buňky transformovány metodou tepelného šoku: 42 °C po dobu 45 sekund. Poté byly buňky opět přendány na led. Po 3minutové inkubaci byl k roztoku přidán 1 ml sterilního LB média a buněčná směs byla inkubována na třepačce při 37 °C a 220 rpm 45 minut. Po kultivaci bylo k buňkám přidáno 7 ml sterilního LB média a 8 µl 1 000× koncentrovaného roztoku antibiotika ampicilinu (AMP). Roztok byl inkubován přes noc při 37 °C a 220 rpm na třepačce.

### 3.3.1.5 Izolace pSumo plasmidu z bakterií

Plasmid byl z bakteriálních buněk izolován pomocí sady QIAprep Spin Miniprep Kit<sup>80</sup>. Noční kultura byla nejprve centrifugována (centrifuga Allegra X – 15 R) 10 minut při 5 200× g a 4 °C. Supernatant byl odebrán a bakteriální peleta byla resuspendována v 250 µl pufru P1 s RNasou A. Tato směs byla převedena do 1,5ml mikrozkuhavky a ke vzorku bylo dále přidáno 250 µl pufru P2. Obsah uzavřené mikrozkuhavky byl šestkrát promíchán otočením. Poté bylo přidáno 350 µl pufru N3, mikrozkuhavka byla obdobně promíchána několikanásobným otočením, a poté stočena 10 min při 13 000× g. Supernatant z mikrozkuhavky byl převeden na silikagelovou mikrozkuhavku ve sběrné mikrozkuhavce a centrifugován 1 minutu při 14 000× g. Na kolonku bylo nanášeno 500 µl PB pufru a purifikace probíhala obdobně jako v kapitole 3.3.1.3. Plasmid pSumo byl eluován 40 µl elučního pufru EB do čisté mikrozkuhavky.

### 3.3.1.6 Štěpení pSumo a kontrola produktu agarosovou elektroforesou

K 10 µl purifikovaného plasmidu byl přidán 1 µl proteasy *BamHI*, 1 µl proteasy *XhoI*, 1,5 µl 10× koncentrovaného restričního pufru, 1,4 µl sterilní vody a 0,1 µl CIAp. Restriční směs byla ponechána 45 minut při 37 °C v termostatu.



Pro ověření správného štěpení vybranými restriktivními endonukleasami byla provedena horizontální agarosová elektroforesa obdobně, jako v kapitole 3.3.1.2, str. 39. Na gel byl nanesen DNA standard (2 µl) a dva vzorky, které obsahovaly 7,5 µl restriktivní směsi a 1,5 µl vzorkového pufru pro DNA-ELFO. Elektroforesa probíhala opět 14 minut při konstantním napětí 300 V. Výsledek byl opět vizualizován pod UV světlem.

### 3.3.1.7 Izolace plasmidu z agarosového gelu

Izolace plasmidu byla provedena pomocí sady QIAquick Gel Extraction Kit<sup>81</sup>. Pod UV světlem byly z agarosového gelu vyříznuty a zváženy pruhy obsahující plasmid pSumo. K těmto vzorkům byl přidán trojnásobný objem pufru QG (100 mg gelu ~ 100 µl) a celá směs byla inkubována po dobu 10 minut při 50 °C v termostatu. Během inkubace byl roztok každé 3 minuty krátce vortexován, aby došlo k rozpuštění veškerého gelu. Poté byl k roztoku přidán isopropanol v množství jednoho objemu vyříznutého gelu a směs byla promíchána. Tato směs byla následně převedena na silikagelovou mikrokolonku ve sběrné mikrozkuhavce a centrifugována 1 minutu při 14 000× g. Sběrná mikrozkuhavka byla vyprázdněna a na mikrokolonku bylo naneseo 500 µl QG pufru. Centrifugace se opakovala a prošlý roztok byl opět odstraněn. Na kolonku bylo naneseo 750 µl pufru PE a postupováno stejně jako v kapitole 3.3.1.3 na straně 40. Purifikovaný plasmid byl eluován 30 µl EB pufru.

### 3.3.1.8 Ligace insertu do plasmidu a následná transformace buněk *E. coli* DH5α

Ligační směs o objemu 15 µl byla připravena následovně: k 5,5 µl roztoku insertu obsahujícího gen pro MTasu viru WNV, bylo přidáno 0,7 µl purifikovaného vektoru pSumo, 1,5 µl 10× koncentrovaného ligačního pufru, 7 µl sterilní vody a 0,3 µl ligasy T4. Tato směs byla ponechána při pokojové teplotě 45 minut.

Buňky *E. coli* DH5α byly rozmrazeny na ledě. K 50 µl bakterií byly přidány 3 µl ligační směsi a vzorek byl ponechán 20 minut inkubovat na ledě. Poté následoval 45sekundový tepelný šok při 42 °C ve vodní lázni a ihned poté byly buňky opět umístěny na 3 minuty na led. Ke vzorku bylo přidáno 500 µl sterilního LB média a ponecháno inkubovat 45 minut na třepačce při 37 °C a 220 rpm. Poté byla celá buněčná směs převedena na Petriho misku s LB agarem a antibiotikem AMP, rozetřena sterilní skleněnou hokejkou a ponechána v termostatu přes noc při teplotě 37 °C.

### 3.3.1.9 „Colony PCR“ a následná agarosová elektroforesa produktů

Pro 8 vybraných kolonií byla vytvořena zásobní PCR směs podle Tab. 3. Ta byla následně rozalíkovávána do osmi 0,5ml mikrozkuhovek po 17 µl. Pomocí špičky pipety byla vždy sterilně odebrána část biomasy jedné vybrané kolonie a přenesena do mikrozkuhavky s PCR směsí. Mikrozkuhavky byly vloženy do PCR cykléru, kde proběhla amplifikace podle kroků v Tab. 4.

**Tab. 3 Zásobní reakční směs pro PCR z kolonií.**

Složka	V (μl)
Polymerační směs 2x PCRBIO Taq Mix Red	70
Sterilní voda	60
10 μM přímý primer WNV-start5AK	5
10 μM zpětný primer T7 (STO 720)	5

**Tab.4 Termální profil PCR z kolonií.**

Krok	T (°C)	t (s)	Počet cyklů
1	94,0	120	1
2	95,0	15	36
3	61,0	15	
4	72,0	15	
5	10,0	–	1

Po proběhnutí PCR byla provedena horizontální agarosová elektroforesa všech osmi vzorků obdobně jako v kapitole 3.3.1.2, str. 39. Výsledek byl opět vizualizován pomocí UV světla ve fotoboxu.

### 3.3.1.10 Minipreparace a izolace DNA z vybraných kolonií

Ze vzorků byly vybrány podle výsledků agarosové elektroforesy (viz Obr. 4.1c, str. 50) 3 kolonie. Tyto kolonie byly přeneseny do zkumavek s 6 ml sterilního LB média spolu s 6 μl 1 000× koncentrovaného AMP a inkubovány přes noc při 37 °C a 220 rpm na třepáčkách.

Druhý den byla z každého vzorku izolována DNA podle sady QIAprep Spin Miniprep Kit<sup>80</sup> obdobně jako v kapitole 3.3.1.5 na str. 40. Po eluci byla změřena koncentrace purifikované plasmidové DNA při vlnové délce 260 nm.

### 3.3.1.11 Sekvence vybraných plasmidových DNA

Vzorky pro sekvenaci byly připraveny podle návodu firmy SEQme<sup>82</sup>. Složení vzorků zobrazuje Tab. 5. Takto připravené vzorky osekvenovala firma SEQme metodou Sangerova sekvenování.

**Tab. 5 Složení vzorků pro sekvenaci.**

Složka	V (μl)
Plasmid (80 ng·μl <sup>-1</sup> )	6,5
Sterilní voda	1,0
10 μM zpětný primer pSumo seq/1	2,5

### 3.3.2 Produkce a purifikace MTasy proteinu NS5 viru západonilské horečky

#### 3.3.2.1 Transformace kompetentních buněk *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL

Kompetentní buňky *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL byly ponechány rozmraznout na ledě a k 50  $\mu$ l této buněčné směsi byl přidán 1,5  $\mu$ l plasmidu klonu 2 (*k2*) nesoucího gen pro MTasu proteinu NS5 viru západonilské horečky. Dále bylo postupováno obdobně jako při transformaci buněk *E. coli* DH5 $\alpha$  v kapitole 3.3.1.4 na str. 40.

#### 3.3.2.2 Exprese rekombinantního proteinu v kompetentních buňkách

Do šesti dvoulitrových Erlenmayerových baněk s 1 litrem obohaceného autoindukčního média ZY (viz Tab. 6) bylo přidáno po 5 ml noční buněčné kultury. Baňky byly následně umístěny na třepačky (37 °C a 220 rpm) a poté byla měřena hodnota optické density buněčné suspenze při vlnové délce 600 nm (OD<sub>600</sub>). Jakmile dosáhla hodnoty 0,8, byla snížena teplota kultivace na 18 °C a roztoky byly na třepačce ponechány inkubovat při této teplotě přes noc.

**Tab. 6 Složení obohaceného média ZY pro kultivaci bakteriální kultury.**

Složka	V (ml)
ZY médium	1 000
20× koncentrovaný fosfátový pufr	50
50× koncentrovaný roztok 5052 (+ 100mM MgCl <sub>2</sub> )	20
1 000× koncentrovaný AMP	1
1 000× koncentrovaný CAM	1

#### 3.3.2.3 Izolace proteinu z bakteriální kultury

Buňky byly po produkci centrifugovány (centrifuga Avanti J-26S XPI, rotor JLA-9.1000) 6 minut při 4 °C a otáčkách 6 000× g. Supernatant byl odstraněn a bakteriální peleta oddělena od stěn kyvety pomocí 60 ml lysačního pufru. K dezintegraci buněk na ledu byl použit homogenizátor dle Dounceho. Buněčná suspenze byla dále sonikována na ledě: amplituda 60, doba trvání pulsu byla 1 sekunda, doba bez pulsu 3 sekundy – celkový čas pulsování byl 6 minut. Bakteriální lysát byl následně opět centrifugován (centrifuga Avanti J-30I, rotor JA-30.50 Ti) 30 minut při 4 °C a otáčkách 30 000× g.

#### 3.3.2.4 Afinitní vsádková chromatografie

Supernatant po centrifugaci byl spolu s Ni-NTA nosičem, který byl promyt ekvilibračním pufrům, převeden do 50ml zkumavek a inkubován na válcové míchačce 20 minut při 4 °C. Zkumavky byly následně centrifugovány 3 minuty při 4 °C a 1 620 rpm na centrifuze Allegra X – 15 R s rotorem SX4750A. Supernatant byl opatrně odstraněn, k nosiči s navázaným proteinem v každé

zkumavce bylo přidáno 40 ml ekvilibračního pufru a celá směs byla opakovaným otáčením krátce promíchána. Zkumavky byly opět stáčeny za stejných podmínek a supernatant obdobně odstraněn. Tento postup byl proveden třikrát. Po posledním odstranění supernatantu byl obsah všech zkumavek převeden do jedné a naposledy stočen 3 minuty při 4 °C a 1 620 rpm. Promytý nosič s navázaným proteinem byl kvantitativně převeden do skleněné kolony a proteiny z něj eluovány 10 ml elučního pufru. Z 5 µl roztoku proteinů, 7 µl sterilní vody spolu s 4 µl 4× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-ELFO byl vytvořen vzorek pro analýzu pomocí SDS-ELFO.

### 3.3.2.5 Dialýsa a štěpení poly-histidinové kotvy proteasou Ulp1

K eluovanému roztoku byl přidán stejný objem (10 ml) ekvilibračního pufru, aby se snížila koncentrace imidazolu a proteinu a nedocházelo ke spontánní precipitaci proteinů. Ke směsi byl přidán jeden alikvot (50 µl) roztoku proteasy Ulp1 (koncentrace 1 mg/ml). Celý roztok byl převeden do celulosové dialýsační membrány a dialýsován proti 5 litrům dialýsačního pufru přes noc při 4 °C.

### 3.3.2.6 Reversní afinitní chromatografie

Po štěpení byl z roztoku odebrán vzorek 5 µl a upraven obdobným způsobem jako v kapitole 3.3.2.4 (str. 43) k analýze pomocí SDS-ELFO. Roztok proteinu byl následně převeden do 50ml zkumavky a centrifugován 10 minut při 5 200× g a 4 °C (centrifuga Allegra X – 15 R, rotor SX4750A), aby došlo k oddělení případných vyprecipitovaných proteinů. Supernatant byl poté spolu s ekvilibrovaným nosičem Ni-NTA převeden do čisté 50ml zkumavky a ponechán 15 minut inkubovat na válcové míchačce při 4 °C. Po inkubaci byla směs kvantitativně převedena na skleněnou kolonu a protein byl rovnou eluován do připravené zkumavky.

### 3.3.2.7 Gelová permeační chromatografie

Posledním purifikačním krokem, kdy došlo k finálnímu přečištění flavivirové methyltransferasy proteinu NS5 viru západonilské horečky, byla gelová permeační chromatografie pomocí kolony HiLoad 16/600 Superdex 75 pg na chromatografickému systému ÄKTA pure se sběračem frakcí.

Před nanesením vzorku na systém byl roztok nejprve zakoncentrován pomocí koncentrátorů (MWCO 3 000) na chlazené (4 °C) centrifuze Allegra X – 15 R s rotorem SX4750A na konečný objem dvakrát 4 ml. První vzorek byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu (puftrem HEPES bez glycerolu) z 5ml smyčky a při konstantním průtoku 1 ml/min byly jímány frakce o objemu 1,5 ml. Z vybraných frakcí (viz Obr. 4.2c, str. 52) byly odebrány vzorky pro analýzu pomocí SDS-ELFO (příprava vzorků viz kapitola 3.3.2.4, str. 43).

Druhý vzorek byl nanesen na tentýž systém, který byl ovšem ekvilibrován puftrem HEPES s 10% (v/v) glycerolem. Z vybraných frakcí (viz Obr. 4.2e, str. 53) byly opět odebrány vzorky

pro SDS-ELFO analýzu. U obou vzorků byla změřena a zaznamenána koncentrace proteinu methytransferasy pomocí spektrofotometru Nanodrop ND-1000.

### 3.3.2.8 Diskontinuální elektroforesa v denaturačním prostředí SDS (SDS-ELFO)

Pro elektroforetickou separaci byl použit 15% separační gel a 4% zaostřovací gel (viz kapitola 3.1.3, str. 35). Do jamek gelu byly nanесeny 3  $\mu\text{l}$  proteinového standardu a po 12  $\mu\text{l}$  od každého vzorku (viz dříve). Elektroforesa probíhala za konstantního napětí 180 V na gel (o rozměrech 8,5 $\times$ 7,5 $\times$ 0,1 cm) v prostředí Tris-glycinového pufru. Jakmile vzorek zaputoval do separačního gelu, bylo napětí zvýšeno na 200 V na jeden gel. Po proběhnutí elektroforesy byla provedena vizualizace separovaných proteinů obarvením v barvicím roztoku a následným odbarvením v destilované vodě.

### 3.3.2.9 Převedení WNV MTasy do jiného pufru

Pomocí odsolovací kolony HiTrap 5ml Desalting byla na systému ÄKTA pure se sběračem frakcí převedena část roztoku WNV MTasy z HEPES pufru bez glycerolu do CHES pufru se složením: 25mM CHES, pH 9,5; 800mM NaCl; 10% (w/v) glycerol; 5mM DDT a 0,02% (w/v)  $\text{NaN}_2$ . Protein byl poté zakoncentrován na 500 $\mu\text{l}$  koncentrátorech a u vzorku byla změřena a zaznamenána koncentrace proteinu MTasy pomocí spektrofotometru Nanodrop ND-1000.

## 3.3.3 Diferenční skenovací fluorimetrie

Užitím metody diferenční skenovací fluorimetrie (DSF) byla porovnáována teplotní stabilita methyltransferasy a jejích komplexů s malými molekulami.

### 3.3.3.1 Příprava komplexů

Byly připraveny roztoky komplexů proteinu s ligandem SAM, SAH a SIN v triplikátech. Roztoky obsahovaly vždy 3 $\mu\text{M}$  protein, 500 $\mu\text{M}$  ligand a 1 $\times$  koncentrovanou proteinovou barvu SYPRO Orange. Vzhledem ke světlocitlivosti barvy byly roztoky chráněny proti světlu hliníkovou fólií. Dále byly připraveny dva slepé vzorky (SV): první, který místo ligandu obsahoval pufr, ve kterém byl protein uchovávan; a druhý, ve kterém byl ligand nahrazen DMSO. Do mikroobjemové, 384-jamkové destičky bylo pipetováno třikrát po 10  $\mu\text{l}$  od každého vzorku a SV. Destička byla následně stočena na centrifuze Allegra X – 15 R a rotorem SX4750A při 1 000 rpm 3 minuty.

### 3.3.3.2 Měření změn teplot tání komplexů

Destička byla umístěna do světelného termocykleru s nástavcem 384 SHS. Měření teplotních stabilit komplexů probíhalo při teplotách 30 až 70  $^{\circ}\text{C}$ . Výsledky jsou zaznamenány v Obr. 4.3a a v Tab. 7 na str. 55.

### 3.3.4 Krystalizace proteinu

#### 3.3.4.1 Příprava komplexu methyltransferasy s ligandem

Koncentrace purifikovaného proteinu v obou pufrech (HEPES pufr bez glycerolu a s 10% glycerolem) činila 6,5 mg/ml, což odpovídá molární koncentraci 120  $\mu$ M. K roztokům methyltransferasy byl přidán roztok sinefunginu (SIN) o koncentraci 10 mM tak, aby byla výsledná koncentrace sinefunginu ve směsi 1 mM. Takto byly vytvořeny zásobní roztoky proteinu s ligandem (jeden obsahující 10% glycerol a druhý bez glycerolu), které byly dále použity ke krystalizaci komplexu methyltransferasy se sinefunginem.

#### 3.3.4.2 Krystalizace metodou visící kapky

Byly připraveny krystalizační roztoky následujícího složení: 0,1M citronan sodný, pH 5,6; 5% (w/v) isopropanol a PEG 4000 o koncentraci 13 %, 14 % a 15 % (w/v)<sup>43</sup>. Na 22mm krycí sklíčka byly vytvořeny 2 sady kapek po dvou kapkách. První sada (protein v pufru s 10% glycerolem) obsahovala jednu kapku s 2  $\mu$ l roztoku proteinu se SIN a 2  $\mu$ l roztoku podmínky a druhou kapku s 1,3  $\mu$ l roztoku proteinu se SIN a 2,7  $\mu$ l roztoku podmínky. Obdobně byly vytvořeny kapky i pro druhou sadu, kde byl protein v HEPES pufru bez obsahu glycerolu. Sklíčka byla opatrně přemístěna nad 1ml rezervoár podmínky. Krystalizace probíhala ve visící kapce metodou difuze par při teplotě 20 °C.

#### 3.3.4.3 Optimalizace krystalizace metodou visící kapky s krystalizačními jádry

Pro krystalizaci s krystalizačními jádry metodou tzv. seedingu byly použity proteinové sferulity (viz Obr. 4.4a, str. 56) z podmínky uvedené v předešlé kapitole 3.3.4.2. Do sterilní mikroskopické s 50  $\mu$ l roztoku obsahující 0,1M citronan sodný, pH 5,6; 5% (w/v) isopropanol a 17% (w/v) PEG 4000 (roztok identický s krystalizační podmínkou, ve které se vytvořily krystaly, s koncentrací precipitantu o 10 % vyšší) byl převeden roztok s krystaly z jamky krystalizační destičky. Směs byla opakovaně vortexována a promíchávána pipetou, aby došlo k rozbití krystalů, a následně ředěna 10 000 $\times$  výše zmíněným roztokem.

Podmínka, v níž sferulity vyrostly, byla optimalizována následujícím postupem: byla vytvořena sada roztoků s různými hodnotami pH soli citronanu sodného a různými koncentracemi precipitantu PEG 4000. Roztoky obsahovaly vždy 5% (w/v) isopropanol a dále 13%; 15%; 17% a 19% (w/v) PEG 4000 a 0,1M citronan sodný o pH 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8 a 6,0. Následně byla provedena krystalizace metodou visící kapky se seedingem. Bylo postupováno obdobně jako v kapitole 3.3.4.2 s tím rozdílem, že byla vytvořena vždy pouze jedna kapka od každé sady: 2  $\mu$ l roztoku proteinu se SIN; 1,75  $\mu$ l podmínky a 0,25  $\mu$ l 10 000 $\times$  ředěného roztoku pro seeding.

#### 3.3.4.4 Krystalizace metodou sedící kapky

Do krystalizačních destiček, ve kterých byly rozpipetovány po 70  $\mu$ l komerční krystalizační roztoky, byl pomocí mikropipetovacího robota Mosquito nanesen komplex methyltransferasy se sinefunginem. Ke 200 nl komplexu proteinu – v pufru HEPES s 10% glycerolem nebo bez glycerolu – se sinefunginem bylo přidáno 200 nl krystalizačního roztoku. Krystalizace probíhala v sedící kapce metodou difuze par při teplotě 20 °C. Aby nedocházelo k úniku par, a aby bylo možné sledovat narůstající krystaly světelným mikroskopem Olympus SZX10, byly destičky přelepeny průhlednou lepicí fólií.

#### 3.3.4.5 Krystalizace metodou sedící kapky s krystalizačními jádry

Pro krystalizaci s krystalizačními jádry metodou tzv. cross-seedingu byly použity krystaly (viz Obr. 4.4d, str. 58) z podmínky 0,2M MgCl<sub>2</sub>; 0,1M Tris, pH 8,5 a 20% (w/v) PEG 8000. Do sterilní mikrozkušavky s 50  $\mu$ l roztoku obsahující 0,2M MgCl<sub>2</sub>; 0,1M Tris, pH 8,5 a 22% (w/v) PEG 8000 (roztok identický s krystalizační podmínkou, ve které se vytvořily krystaly, s koncentrací precipitantu o 10 % vyšší) byl převeden roztok s krystaly z jamky krystalizační destičky. Směs byla opakovaně vortexována s keramickou kuličkou a promýchávána pipetou, aby došlo k rozbití krystalů, a následně ředěna 10 000 $\times$  výše zmíněným pufrem. Roztok pro hetero-cross-seeding byl vytvořen obdobně jako pro cross-seeding, akorát s krystaly proteinu DENV MTasy (získané od Petry Kraččíkové, Ph.D.), které se vytvořily ve stejné podmínce, jako proteinové krystaly WNV MTasy v komplexu se sinefunginem.

Pomocí pipetovacího robota, obdobně jako v kapitole 3.3.4.4, byly vytvořeny kapky obsahující 200 nl proteinu se sinefunginem, 160 nl komerční krystalizační podmínky a navíc 40 nl 10 000 $\times$  ředěného roztoku pro cross-seeding nebo hetero-cross-seeding. Krystalizace opět probíhala v sedící kapce metodou difuze par při teplotě 20 °C.

#### 3.3.4.6 Optimalizace krystalizace metodou sedící kapky

V kapce (viz Obr. 4.4d, str. 58), s podmínkou obsahující 0,2M MgCl<sub>2</sub>; 0,1M Tris, pH 8,5 a 20% (w/v) PEG 8000, byly pozorovány drobné krystalové jehlice. Podmínka byla optimalizována následujícím postupem: byla vytvořena sada roztoků s různými hodnotami pH soli (Tris) a různými koncentracemi precipitantu (PEG 8000). Roztoky obsahovaly vždy 0,2M MgCl<sub>2</sub> a dále 15%; 17%; 20% a 22% (w/v) PEG 8000 a 0,1M Tris o pH 8,1; 8,3; 8,5; 8,6; 8,7 a 8,9. Následně byla provedena krystalizace metodou sedící kapky jako v kapitole 3.3.4.4. Ke každé podmínce byly vytvořeny dvě kapky: první obsahovala pouze 200 nl proteinu se SIN a 200 nl krystalizační podmínky; druhá pak 200 nl proteinu se sinefunginem, 160 nl krystalizační podmínky a navíc 40 nl 10 000 $\times$  ředěného roztoku pro hetero-cross-seeding (viz kap. 3.3.4.5).

### 3.3.4.7 Krystalizace metodou sedící kapky s aditivu

Krystalizační podmínka, ve které vyrostly krystalové jehlice – 0,2M MgCl<sub>2</sub>; 0,1M Tris, pH 8,5 a 20% (w/v) PEG 8000 – byla rozpipetována do 96-jamkové krystalizační destičky po 72 μl a ke každé jamce bylo dále přidáno 8 μl od každého krystalizačního aditiva. Následoval stejný postup jako v kapitole 3.3.4.4 na předešlé straně. Byly vytvořeny dvě kapky: obě obsahovaly protein MTasy se SIN spolu s podmínkou v poměru 1 : 1. V první kapce bylo 200 nl proteinu s ligandem a 200 nl podmínky, v druhé 400 nl MTasy se SIN a stejné množství podmínky.

### 3.3.4.8 Krystalizace proteinu v CHES pufru metodou sedící kapky

Komplex proteinu WNV MTasa, který byl převeden z HEPES pufru bez glycerolu do CHES pufru, byl připraven obdobně jako v kapitole 3.3.4.1, str. 46. Dále bylo postupováno stejně, jako v kapitole 3.3.4.4, str. 47.

### 3.3.4.9 Krystalizace metodou visící kapky

Byly použity stejné krystalizační roztoky jako v kapitole 3.3.4.6, str. 47. Následně byl připraven roztok proteinu (v pufru s 10% glycerolem) se SIN tak, aby byla výsledná koncentrace SIN v roztoku 1mM. Na 22mm krycí sklička byly vytvořeny tři kapky tak, že první obsahovala 1 μl roztoku proteinu se SIN a 1 μl roztoku podmínky; druhá kapka 0,7 μl roztoku proteinu se SIN a 1,3 μl roztoku podmínky a třetí kapka 0,5 μl roztoku proteinu se SIN a 1,5 μl roztoku podmínky. Sklička byla opatrně přemístěna nad 1ml rezervoár podmínky. Krystalizace probíhala ve visící kapce metodou difuze par při teplotě 20 °C.

### 3.3.4.10 Krystalizace metodou visící kapky s krystalizačními jádry

Opět byly použity stejné krystalizační roztoky jako v kapitole 3.3.4.6, str. 47 a dále bylo postupováno podobně jako v kapitole 3.3.4.9 s tím rozdílem, že byly vytvořeny čtyři kapky. První kapka obsahovala 1 μl roztoku proteinu se SIN a 1 μl roztoku podmínky; druhá kapka pak 1 μl roztoku proteinu se SIN, 0,5 μl roztoku podmínky a 0,5 μl 10 000× ředěného roztoku pro seeding; třetí kapka 1 μl roztoku proteinu se SIN, 1 μl roztoku podmínky a 0,5 μl 10 000× ředěného roztoku pro seeding; a čtvrtá kapka 2 μl roztoku proteinu se SIN, 1,75 μl roztoku podmínky a 0,25 μl 10 000× ředěného roztoku pro seeding.

Roztoky pro seeding byly připraveny z krystalů dvou podmínek (viz Obr. 4.4g, str. 61). Krystaly z jedné podmínky byly převedeny do 50 μl pufru o složení 0,2M MgCl<sub>2</sub> 24% (w/v) PEG 8000 a 0,1M Tris o pH 8,1 a krystaly z druhé podmínky do obdobného pufru, který obsahoval 0,1M Tris o pH 8,7. Tyto roztoky byly poté 10 000× ředěny daným pufrům.



## 4 VÝSLEDKY

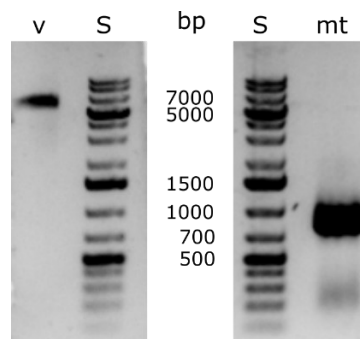
### 4.1 Příprava bakteriálního plasmidu pro produkci MTasy WNV

Amplifikace insertu obsahujícího sekvenci 262-AMK domény<sup>43</sup> MTasy nestrukturního proteinu 5 viru západonilské horečky (viz. Obr. 4.2a, str. 50) proběhla pomocí polymerázové řetězové reakce. Použité oligonukleotidové primery spolu se štěpnými místy pro restriční endonukleasy jsou zobrazeny v Obr. 4.1a. Ověření délky amplifikovaného insertu pomocí agarosové elektroforesy je zobrazeno v Obr. 4.1b – vpravo. Získané produkty PCR reakce byly nakonec purifikovány pomocí sady QIAquick PCR Purification Kit.



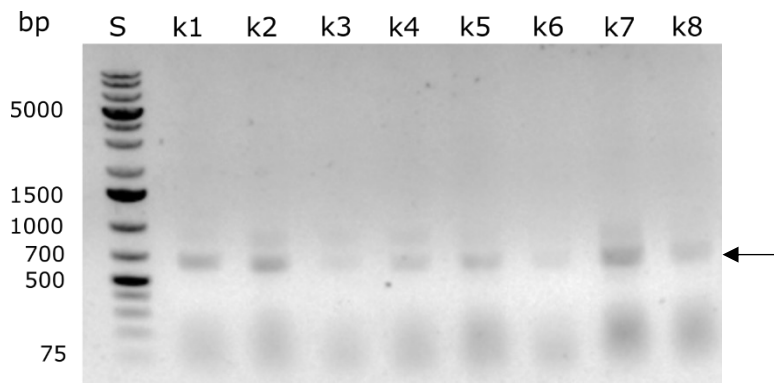
**Obr. 4.1a** Sekvence oligonukleotidových primerů methyltransferasy NS5 proteinu WNV. Barevně je zvýrazněn stop kodon a štěpná místa pro restriční endonukleasy *Bam*HI a *Xho*.

Plasmid pSumo, do kterého měl být insert vložen, byl připraven transformací buněk *E. coli* DH5 $\alpha$  plasmidem pSumo. Po produkci byl plasmid z bakterií izolován pomocí sady QIAprep Spin Miniprep Kit. Následně proběhlo štěpení restričními endonukleasami, které bylo ověřeno opět horizontální agarosovou elektroforézou – viz Obr. 4.1b – vlevo. Poté byl plasmid z gelu izolován sadou QIAquick Gel Extraction Kit a purifikován obdobně, jako výše zmíněný insert. Dříve purifikovaný insert byl ligován do pSumo plasmidu a vzniklým plasmidem byly transformovány bakteriální buňky *E. coli* DH5 $\alpha$ . Tato bakteriální směs byla převedena na Petriho misku a ponechána inkubovat.



**Obr 4.1b** Výsledky agarosové elektroforesy v přítomnosti ethidium bromidu během přípravy plasmidu s insertem MTasy WNV. **Vlevo:** 1% gel agarosové ELFO: dráha v obsahuje amplifikovaný plasmid pSumo po štěpení restričními endonukleasami. **Vpravo:** 1% gel agarosové ELFO: dráha mt obsahuje gen pro MTasu NS5 proteinu WNV amplifikovaný pomocí PCR. DNA standard je zobrazen pod písmenem S, jeho hodnoty jsou uvedeny v párech basí (bp) vedle gelů.

Pro 8 vybraných kolonií byla provedena colony PCR a její výsledky jsou zaznamenány v Obr. 4.1c. Pro sekvenaci byly vybrány klony *k1*, *k2* a *k7*, u kterých byla provedena minipreparace a izolace DNA. Vzorky byly osekvenovány firmou SEQme a u klonů *k2* a *k7* se sekvenace 100% shodovala s navrženou sekvencí MTasy (viz Obr. 4.2a – modře zvýrazněná je AMK sekvence).



**Obr 4.1c** Výsledky agarosové elektroforezy v přítomnosti ethidium bromidu během přípravy plasmidu s insertem MTasy WNV. 1% gel agarosové ELFO: dráha *k1-k8* zobrazují PCR produkty vybraných bakteriálních klonů. Šipkou jsou označeny plasmidové DNA bakterií, které pravděpodobně obsahují kýžený insert. DNA standard je zobrazen pod písmenem *S* – jeho hodnoty jsou uvedeny v párech basí (bp) vedle gelů.

## 4.2 Produkce a purifikace metyltransferasy proteinu NS5 WNV

Pro produkci MTasy WNV byl vybrán plasmid klonu 2 (*k2*), kterým byly transformovány buňky *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Protein kódovaný insertem, který byl vložený do plasmidu, obsahoval sekvenci MTasy nestrukturního proteinu 5 viru západonilské horečky, poly-histidinovou kotvu na N-konci a aminokyselinovou sekvenci rozpoznávanou v terciální struktuře Ulp1 proteasou – viz Obr. 4.2a.

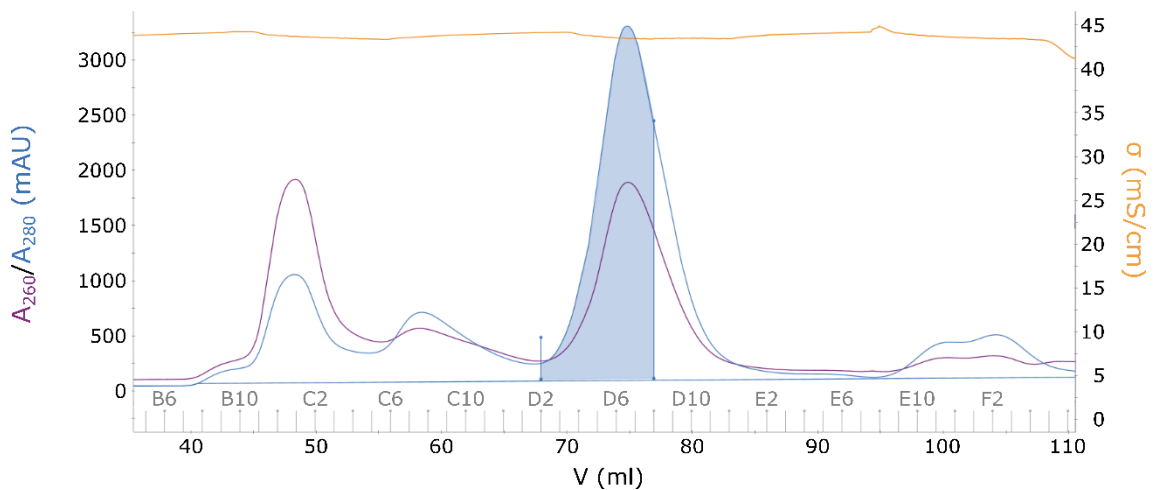
**MSHHHHHHHGMSDSEVNQEAKEPVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKR  
QKEMDSLRFlyDGIrIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGSRTLGEVWKERLNQMTKEEFTRY  
RKEAIEVDRSAAKHARKEGNVTGGHPVSRGTAKLRWLVERRFLEPVGKVIDLGCGRGGWCYYMAT  
QKRVQEVRGYTKGGPGHEEPQLVQSYGWNIVTMKSGVDVFYRPSECCDTLLCDIGESSSSAEVEEH  
RTIRVLEMVEDWLHRGPREFCVKVLCPYMPKVIKMELLQRRYGGGLVRNPLSRNSTHEMYWVSRA  
SGNVVHVSVMTSQVLLGRMEKRTWKGPQYEEDVNLGSGTRAV\***

**Obr. 4.2a** Aminokyselinová sekvence otevřeného čtecího rámce produkované MTasy (43 kDa). Oranžově je na N-konci zvýrazněna poly-histidinová kotva; růžově vizualizována sekvence AMK, kterou v podobě terciální struktury rozeznává proteasa Ulp1; modře je zvýrazněna MTasa NS5 proteinu viru západonilské horečky (30 kDa).

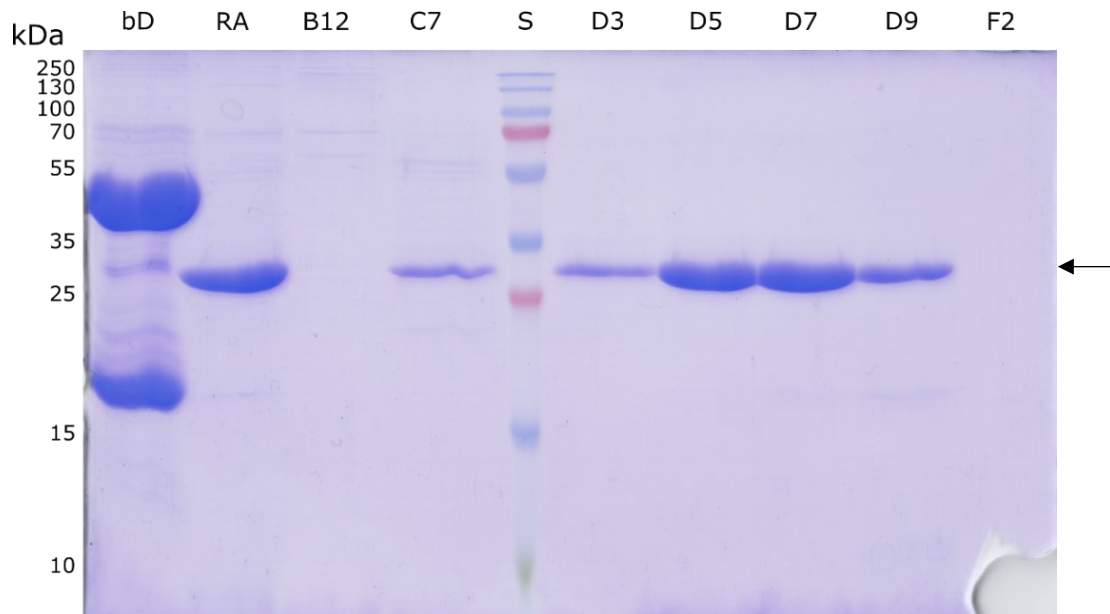
Noční kulturou těchto transformovaných buněk byla zaočkována ZY média, která byla inkubována při 37 °C do 0,8 hodnot OD600, kdy se teplota snížila na 18 °C. Následně proběhla izolace proteinu z bakteriální kultury pomocí lysis buněk, sonikace a centrifugace. Supernatant po

centrifugaci byl v prvním purifikačním kroku přečištěn pomocí afinitní vsádkové chromatografie a eluován pufrům s 300mM obsahem imidazolu. Z eluovaného roztoku byl odebrán vzorek pro analýzu pomocí SDS-ELFO. Roztok byl poté naředěn stejným objemem pufru s nízkým obsahem imidazolu (20mM) a dále byla přidána Ulp1 proteasa. Tento roztok byl při 4 °C dialysován proti dialyzačnímu pufru.

Po štěpení a dialýze byla provedena reverzní afinitní chromatografie, při které došlo k přečištění purifikované MTasy od štěpené poly-histidinové kotvy a Ulp1 proteasy, která taky obsahovala poly-histidinovou kotvu. Z eluovaného roztoku byl vytvořen vzorek pro analýzu pomocí SDS-ELFO. Proteinový roztok byl následně zakoncentrován a převeden pomocí gelové permeační chromatografie do HEPES pufru s 10% glycerolem (viz Obr. 4.2b a 4.2c, str. 52) nebo do HEPES pufru bez glycerolu (viz Obr. 4.2d na str. 52 a 4.2e na str. 53).

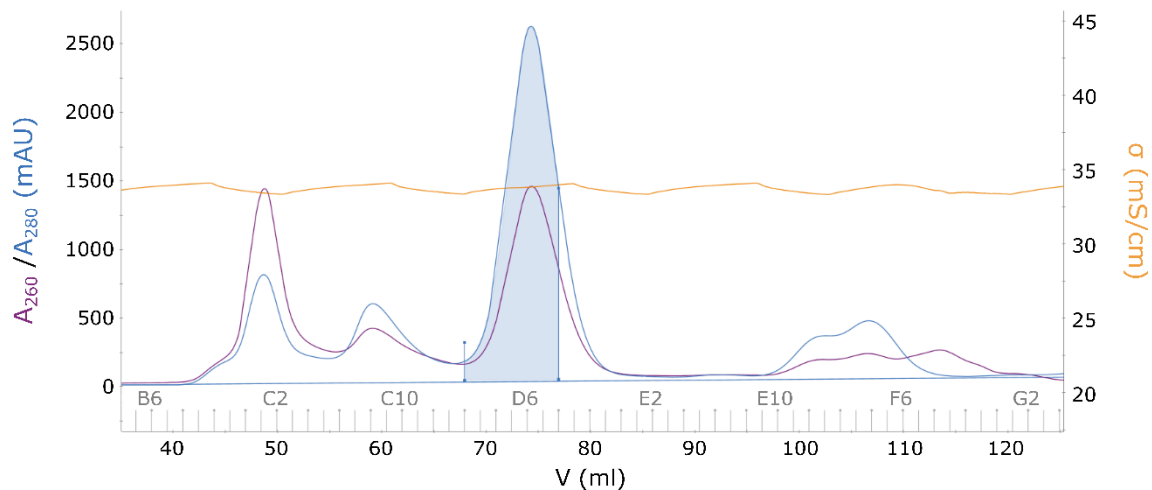


**Obr. 4.2b Záznam průběhu gelové permeační chromatografie (HEPES bez glycerolu).** Kolona HiLoad 16/600 Superdex 75 pg; 4 °C; 1 ml/s. Žlutá křivka značí konduktivitu  $\sigma$ , fialová křivka značí absorbanci při vlnové délce  $\lambda$  260 nm, modrá křivka značí hodnoty absorbance při vlnové délce  $\lambda$  280 nm; šedě jsou označeny jednotlivé eluované frakce. Modře je označena oblast frakcí, které byly na základě výsledku analýzy SDS-ELFO (Obr. 4.2c, str. 52) dále použity.

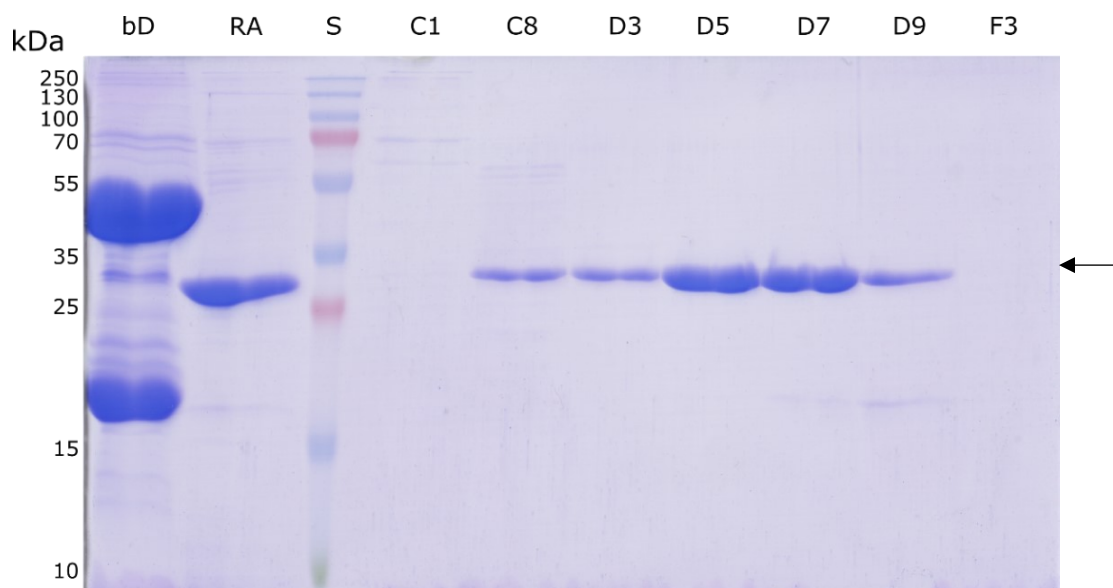


**Obr. 4.2c Průběh purifikace MTasy WNV až do konečného pufru HEPES bez glycerolu:**

15% polyakrylamidový gel elektroforesy v redukčním prostředí SDS. Dráha *bD* označuje proteinový roztok před dialýsou po afinitní chromatografii, dráha *RA* roztok po reversní afinitní chromatografii. Vzorky *B12* až *F2* (bez vzorku *S* – to je proteinový standard, hodnoty molekulových hmotností jsou uvedeny vlevo od gelu) tvoří jednotlivé vybrané frakce gelové permeační chromatografie podle Obr. 4.2b. na str. 51 Šipkou je označena pozice produkované methyltransferasy.



**Obr. 4.2d Záznam průběhu gelové permeační chromatografie (HEPES s 10% glycerolem).** Kolona *HiLoad 16/600 Superdex 75 pg*; 4 °C; 1 ml/s. Žlutá křivka značí konduktivitu  $\sigma$ , fialová křivka značí absorbanci při vlnové délce  $\lambda$  260 nm, modrá křivka značí hodnoty absorbance při vlnové délce  $\lambda$  280 nm; šedě jsou označeny jednotlivé eluované frakce. Modře je označena oblast frakcí, které byly na základě výsledku analýzy SDS-ELFO (Obr. 4.2e, str. 53) dále použity.

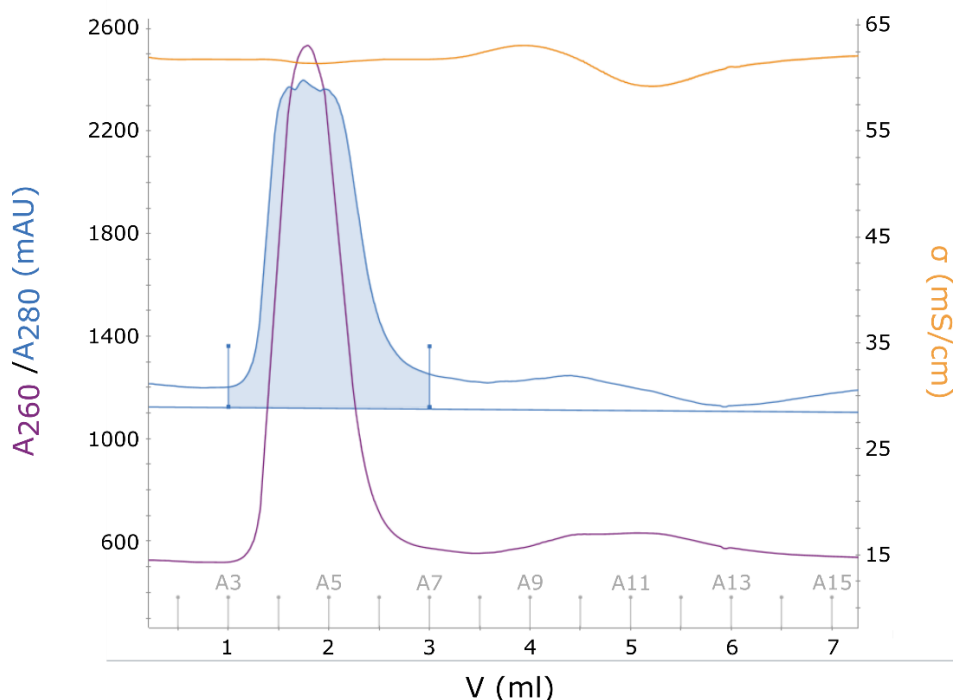


**Obr. 4.2e Průběh purifikace MTasy WNV až do konečného pufru HEPES s 10% glycerolem:**

15% polyakrylamidový gel elektroforezy v redukčním prostředí SDS. Dráha *bD* označuje proteinový roztok před dialysou po afinitní chromatografii, dráha *RA* roztok po reversní afinitní chromatografii. Dráha *S* obsahuje proteinový standard (hodnoty molekulových hmotností jsou uvedeny vlevo od gelu). Vzorky *C1* až *F3* tvoří jednotlivé vybrané frakce gelové permeační chromatografie podle Obr. 4.2d na str. 52. Šipkou je označena pozice produkované methyltransferasy.

K dalším pokusům s MTasou byly použity frakce *D2* až *D8* proteinu jak v HEPES pufru bez glycerolu (viz Obr. 4.2c, str. 52) tak v HEPES pufru s 10% glycerolem (viz Obr. 4.2e). Všechny pozdější frakce byly pravděpodobně kontaminovány zbytkovou Ulp1 proteasou (pás v oblasti molekulové hmotnosti mezi 15 a 25 kDa). Oba roztoky byly koncentrovány na chlazené centrifuze do finální koncentrace 6,5 mg/ml ( $e_{280}$  (MTasy) = 1,78 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>).

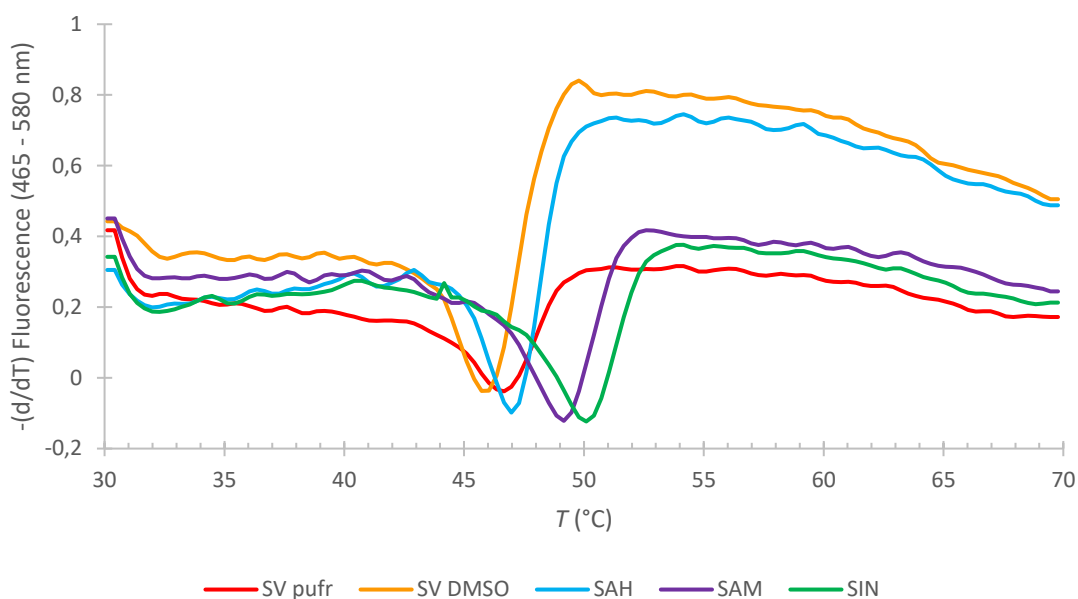
Část proteinu MTasy byla později převedena z HEPES pufru bez glycerolu do CHES pufru pomocí kolony HiTrap 5ml Desalting. Chromatografický záznam je v Obr. 4.2f, str. 54. Pro další experimenty byly použity frakce *A3* až *A7*. Protein byl koncentrován na finální koncentraci 8,3 mg/ml.



**Obr. 4.2f Chromatogram průběhu výměny pufru u WNV MTasy.** Kolona HiTrap 5ml Desalting; 4 °C; 2 ml/s. Žlutá křivka značí konduktivitu  $\sigma$ , fialová křivka značí absorbanci při vlnové délce  $\lambda$  260 nm, modrá křivka značí hodnoty absorbance při vlnové délce  $\lambda$  280 nm; šedě jsou označeny jednotlivé eluované frakce. Modře je označena oblast frakcí, které byly použity k dalším experimentům.

### 4.3 Měření teplotních stabilit komplexů methyltransferasy s ligandy

Z připraveného proteinu MTasy byly vytvořeny komplexy se třemi různými, malými molekulami: SAM, SAH a SIN. Od každého komplexu byl vytvořen technický triplikát. Každý vzorek obsahoval  $3\mu\text{M}$  protein,  $500\mu\text{M}$  ligand (malou molekulu) a  $1\times$  koncentrovanou proteinovou barvu SYPRO Orange. Dále byly připraveny dva slepé vzorky (SV): v prvním byla malá molekula nahrazena stejným objemem HEPES pufru s 10% glycerolem, ke druhému byl místo ligandu přidán roztok DMSO. Teplotní stability komplexů i všech ostatních vzorků byly měřeny při teplotách 30 až 70 °C (viz Obr. 4.3a, str. 55). Teploty tání vzorků jsou pak zobrazeny v tabulce 7 na straně 55.



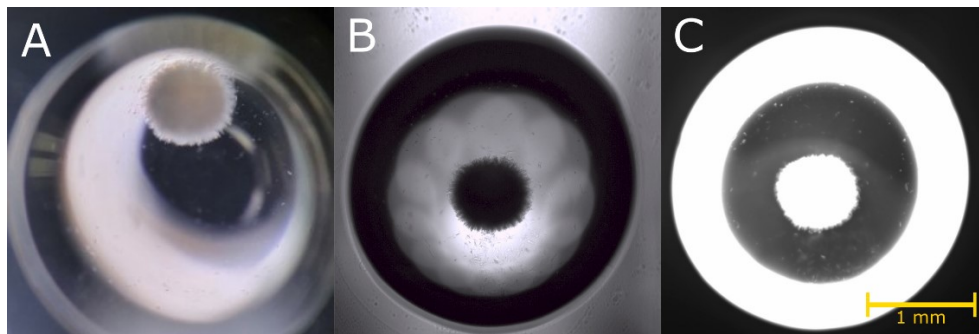
**Obr. 4.3a Graf teplotních stabilit MTasy a jejích komplexů.** Na ose  $x$  je znázorněna teplota  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), na ose  $y$  jsou vyneseny záporné hodnoty první derivace relativní intenzity fluorescence (465 – 580 nm) podle teploty  $T$ . Barevně jsou rozlišeny jednotlivé vzorky (viz legenda grafu), které reprezentují průměrné hodnoty první derivace relativních intenzit fluorescence daných triplikátů.

**Tab. 7 Teploty tání vzorků MTasy.**  $T_{M1}$  až  $T_{M3}$  zobrazují hodnoty teplot pro replikáty vzorku,  $\bar{T}_M$  značí průměrnou teplotu tání vzorku a  $\sigma_T$  je směrodatná odchylka teploty.  $SV$  je zkratka pro slepé vzorky.

Vzorek	$T_{M1}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{M2}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{M3}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\bar{T}_M \pm \sigma_T$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
SV pufr	46,66	46,97	46,35	$46,66 \pm 0,25$
SV DMSO	45,72	45,72	46,04	$45,82 \pm 0,15$
SAH	46,97	46,97	46,97	$46,97 \pm 0,00$
SAM	48,85	49,16	49,16	$49,05 \pm 0,15$
SIN	50,10	50,10	50,10	$50,10 \pm 0,00$

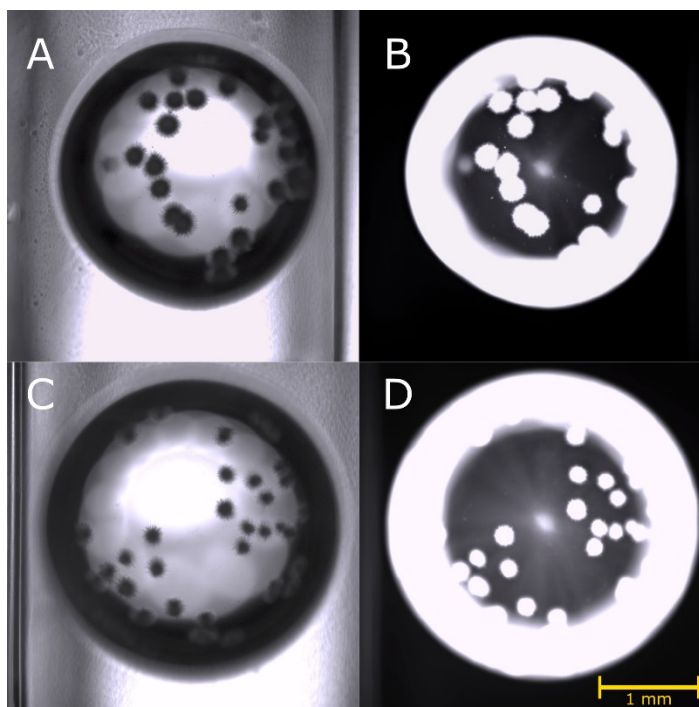
#### 4.4 Krystalizace proteinového komplexu WNV MTasy s inhibitorem

Krystalizace proteinu WNV MTasy v komplexu se SIN probíhala nejprve metodou difuze par ve visící kapce<sup>43</sup> (viz kap. 3.3.4.2, str. 46). Krystaly v podobě sferulitů (viz Obr. 4.4a, str. 56) se objevily během dvou dnů v krystalizační podmínce, která obsahovala 0,1M citronan sodný, pH 5,6; 5% (w/v) isopropanol a 15% (w/v) PEG 4000 a krystalizační podmínku s proteinem v poměru 1 : 1. Sferulity však není možné podrobit difrakčnímu experimentu, a proto bylo nutné krystalizační podmínku optimalizovat.



**Obr. 4.4a Proteinové sferulity** v podmínce 0,1M citronan sodný, pH 5,6; 5% (w/v) isopropanol a 15% (w/v) PEG 4000. Celkový objem 2  $\mu$ l tvořil proteinový komplex (protein + SIN) s podmínkou v poměru 1 : 1. **A)** Fotografie ze světelného mikroskopu, zvětšení 7 $\times$ ; **B)** a **C)** snímky z UV mikroskopu, zvětšení 5 $\times$ ; **C)** UV-snímek dokazující přítomnost proteinu.

Sferulity byly použity jako krystalizační jádra (pro seeding) během optimalizace krystalizace. Během ní byla připravena řada roztoků se složením: 5% (w/v) isopropanol a dále 13%; 15%; 17% a 19% (w/v) PEG 4000 a 0,1M citronan sodný o pH 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8 a 6,0. Kapky, ve kterých probíhala krystalizace, obsahovaly 2  $\mu$ l roztoku proteinu (v HEPES pufru bez glycerolu nebo s 10% glycerolem) se SIN; 1,75  $\mu$ l podmínky a 0,25  $\mu$ l 10 000 $\times$  ředěného roztoku pro seeding (viz kap. 3.3.4.3, str. 46). Po dvou dnech vznikly ve všech krystalizačních vzorcích opět sferulity (Obr. 4.4b). Postupem času nebyly zaznamenány další změny.

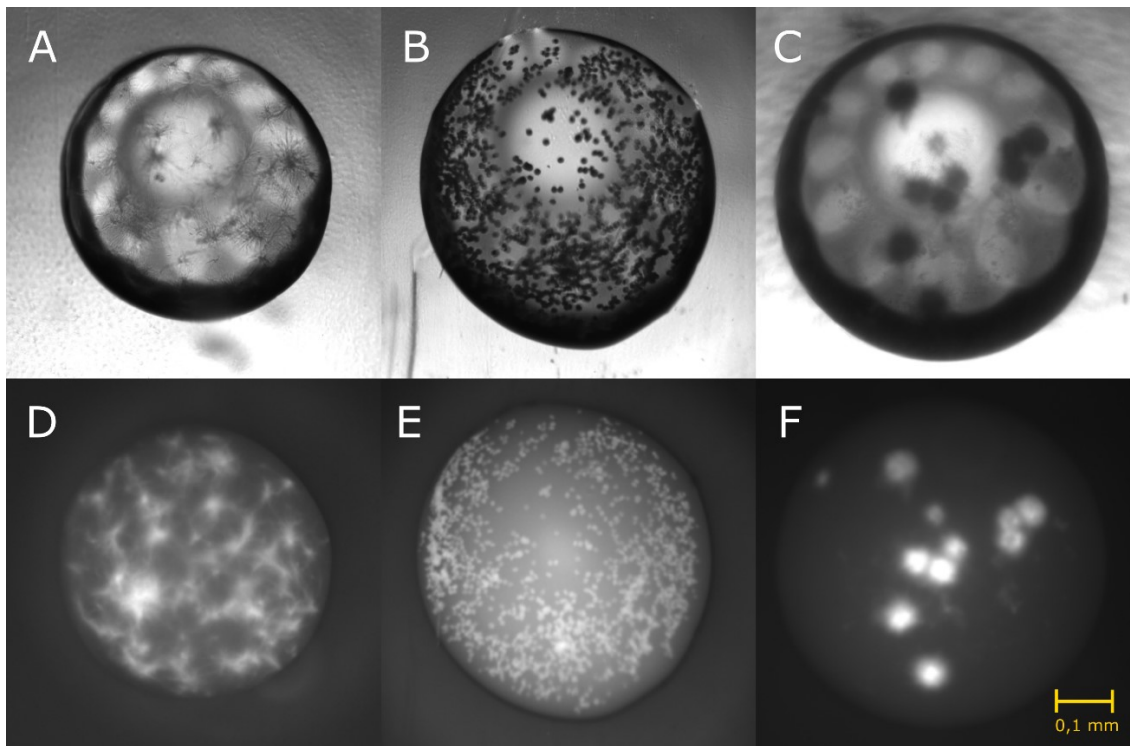


**Obr. 4.4b Proteinové sferulity** v podmínce 0,1M citronan sodný, pH 6,0; 5% (w/v) isopropanol a 13% (w/v) PEG 4000. Celkový objem 2  $\mu$ l tvořil proteinový komplex (protein + SIN) s podmínkou v poměru 1 : 1. Zvětšení snímků je 8 $\times$ . Snímky **A)** a **B)** obsahují protein v HEPES pufru bez glycerolu, snímky **C)** a **D)** protein v HEPES pufru s 10% glycerolem. **C)** a **D)**: UV-snímek dokazující přítomnost proteinu.



Protože došlo při optimalizaci opět ke vzniku neměřitelných krystalových sferulitů, bylo nutné otestovat i jiné krystalizační podmínky. Proto byl protein MTasy (jak v HEPES pufru bez glycerolu, tak s 10% glycerolem) spolu se sinefunginem (1mM) rozpipetován do řady nejrůznější komerčních krystalizačních roztoků v poměru 1 : 1 s krystalizační podmínkou.

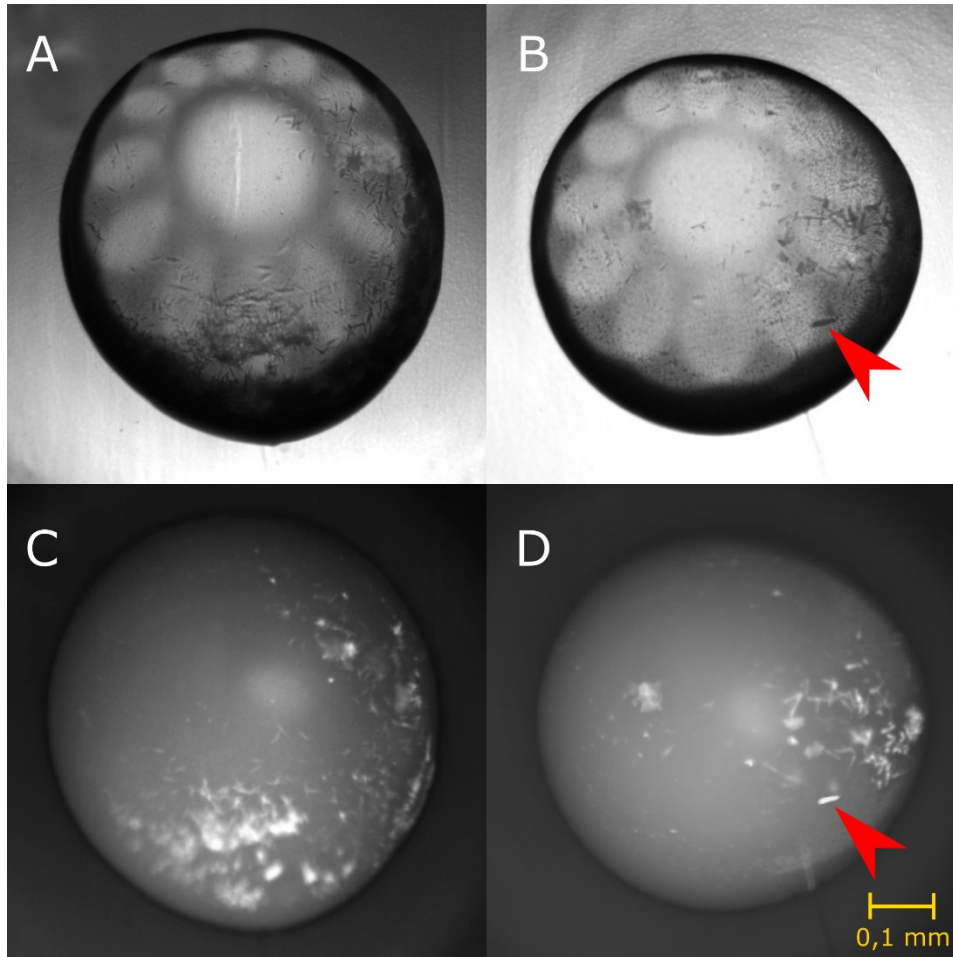
Po týdnu se objevila řada proteinových útvarů: v kapce MTasy v HEPES pufru s 10% glycerolem, obsahující v podmínce 1M sulfát amonný a 0,1M acetát sodný, pH 5,0, vznikly spojené proteinové jehlice (viz Obr. 4.4c A, D); v kapce komplexu MTasy v HEPES pufru bez glycerolu, která obsahovala podmínku s 0,2M MgCl<sub>2</sub>; 0,1M HEPES, pH 7,5 a 28% (v/v) PEG 400, se objevily malé sferulity (viz Obr. 4.4c B, E); a kapce MTasy v HEPES pufru bez glycerolu, obsahující podmínku s 0,1M fosfátem sodným, pH 6,5 a 12% (w/v) PEG 8000, se objevily velké sferulity (viz Obr. 4.4c C, F).



**Obr. 4.4c Proteinové útvary:** Celkový objem 400 nl tvořil proteinový komplex (protein + SIN) s podmínkou v poměru 1 : 1. Zvětšení snímků je 10× **A** a **D**) MTasy v HEPES pufru s 10% glycerolem + 1mM SIN, podmínka: 1M sulfát amonný a 0,1M acetát sodný, pH 5,0; **B**) a **E**) MTasy v HEPES pufru bez glycerolu + 1mM SIN, podmínka: 0,2M MgCl<sub>2</sub>; 0,1M HEPES, pH 7,5 a 28% (v/v) PEG 400; **C**) a **F**) MTasy v HEPES pufru bez glycerolu + 1mM SIN, podmínka: 0,1M fosfátem sodným, pH 6,5 a 12% (w/v) PEG 8000. Snímky **A**) až **C**) jsou foceny při viditelném světle, snímky **D**) až **F**) pod UV světlem.

V kapkách s podmínkou 0,2M MgCl<sub>2</sub>; 0,1M Tris, pH 8,5 a 20% (w/v) PEG 8000 vznikly krystaly jak v kapce, ve které byla MTasy v HEPES pufru bez glycerolu tak s 10% glycerolem (viz Obr. 4.4d, str 58). Vylovení většího krystalu (viz Obr. 4.4d B, D) a měření difrakce provedl

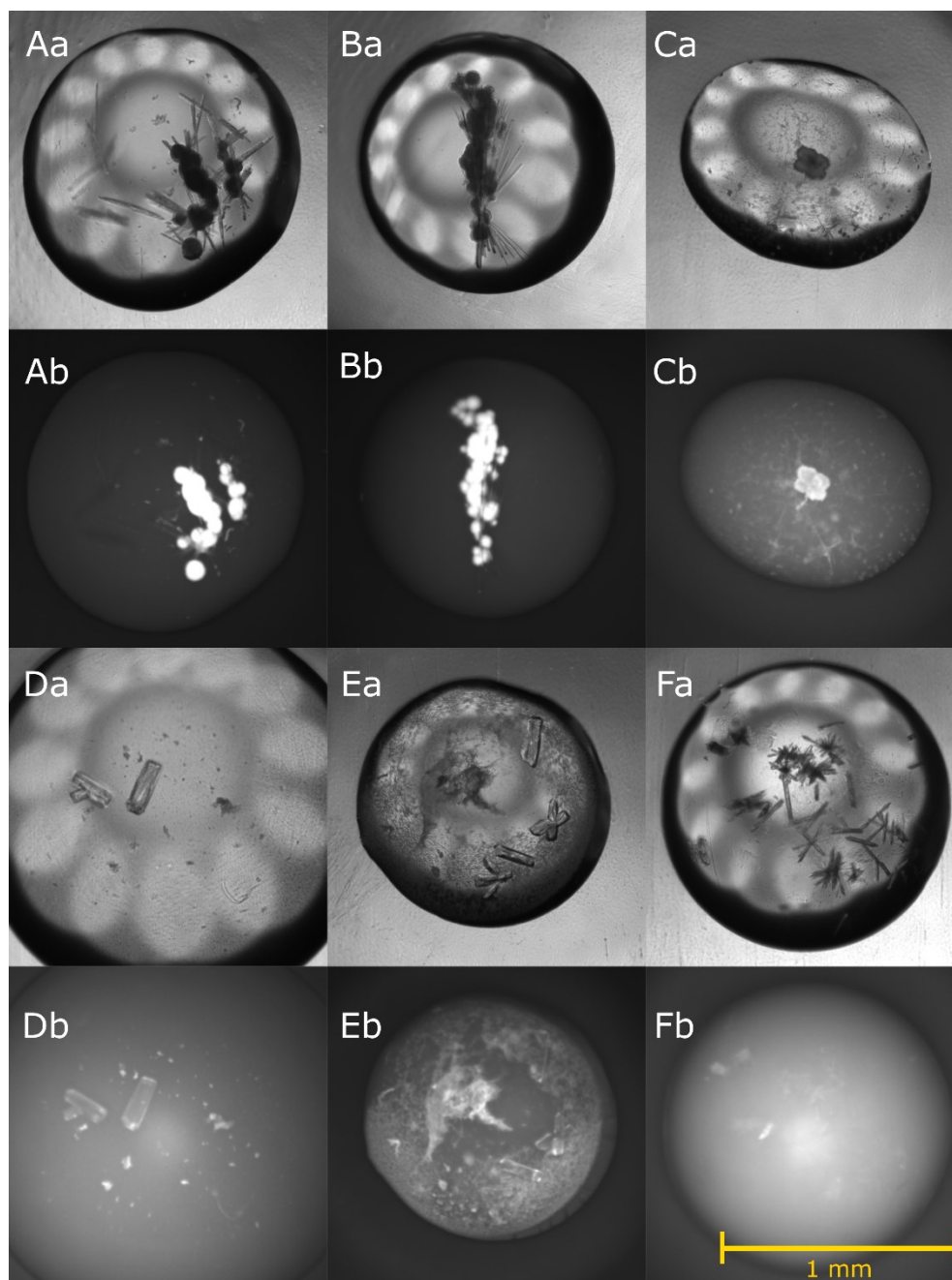
Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D. Difrakce však byla natolik slabá, že nebyla možnost naměřit difrakční data. Krystaly v kapce, v níž byla MTasa v HEPES pufru bez glycerolu, posloužily jako krystalizační jádra (cross-seed) pro další experiment.



**Obr. 4.4d Proteinové krystaly** v podmínce 0,2M MgCl<sub>2</sub>; 0,1M Tris, pH 8,5 a 20% (w/v) PEG 8000. Celkový objem 400 nl tvořil proteinový komplex (protein + SIN) s podmínkou v poměru 1 : 1. Zvětšení snímků je 10×. **A)** a **C)** MTasa v HEPES pufru bez glycerolu + 1mM SIN: tyto krystaly byly dále použity jako krystalizační jádra pro další experimenty. **A)** a **D)** MTasa v HEPES pufru s 10% glycerolem + 1mM SIN: krystal označený červenou šipkou byl vyloven a podroben difrakčnímu experimentu. Snímky **A)** a **B)** jsou foceny při viditelném světle, snímky **C)** až **D)** pod UV světlem.

Vzniklé krystaly byly použity jako krystalizační jádra pro další experimenty. Opět byly použity komerční sady krystalizačních podmínek. První kapka obsahovala 200 nl proteinu se SIN, 160 nl dané podmínky a 40 nl 10 000× ředěného roztoku pro cross-seeding (krystaly WNV MTasy); druhá kapka měla identické složení až na to, že bylo použito 40 nl 10 000× ředěného roztoku pro hetero-cross-seeding (krystaly DENV MTasy).

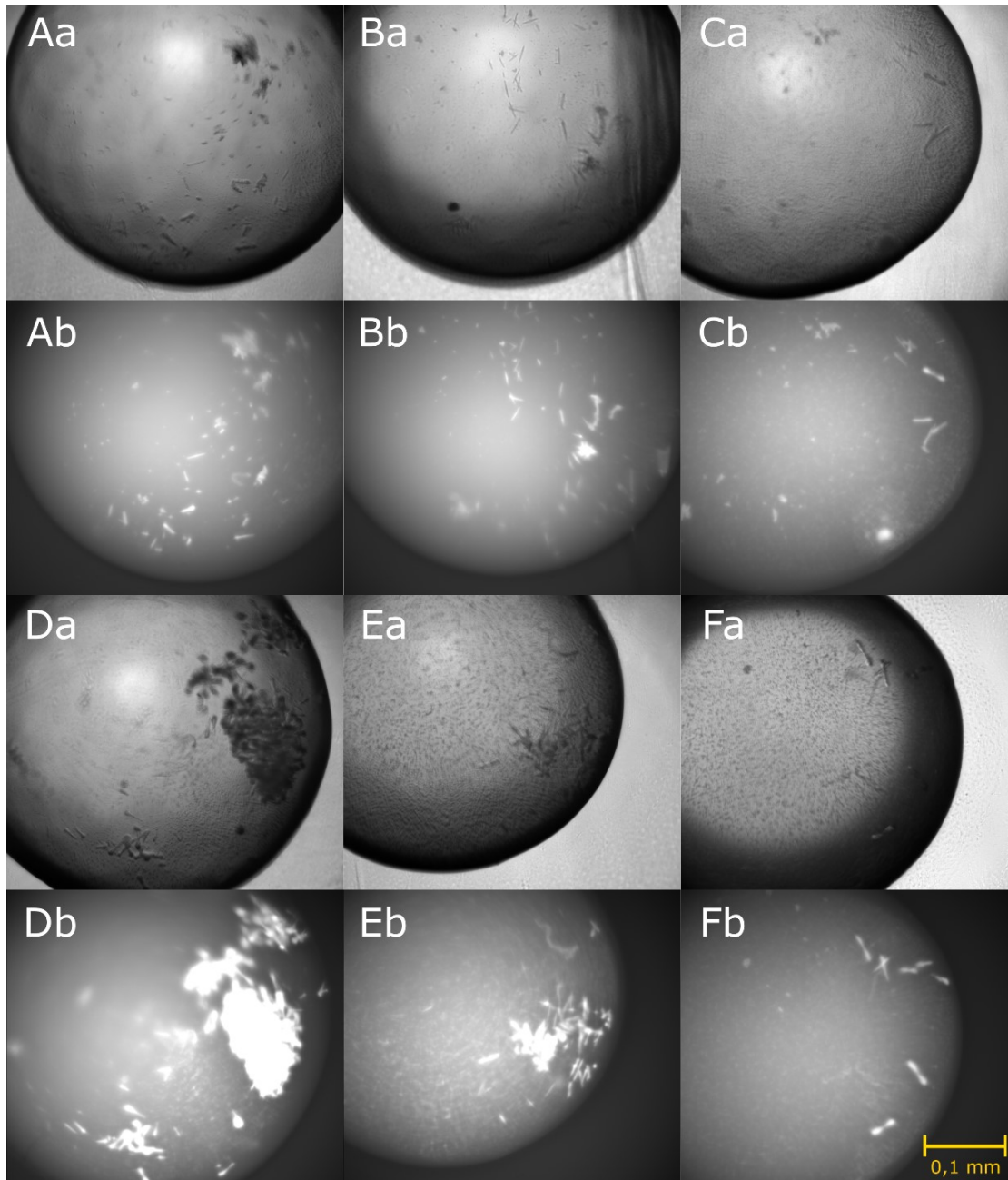
Po dvou dnech se v kapkách začaly objevovat krystaly solí, na kterých se v některých případech postupem času utvářely proteinové sferulity – viz Obr. 4.4e, str. 59. Během sedmi dnů narostly všechny útvary (jak solí, tak proteinové sferulity) do plné velikosti.



**Obr. 4.4e Krystaly soli a proteinu.** Zvětšení snímků 5×. Vzorky **A, D, E, F** obsahující krystalizační jádra z krystalů DENV MTasy (hetero-cross-seeding), vzorky **B a C** obsahující krystalizační jádra z krystalů WNV MTasy (cross-seeding) **A)** Podmínka: 0,2M hydrogenfosforečnan draselný a 20% (w/v) PEG 3350, **B)** podmínka: 0,2M hydrogenfosforečnan sodný a 20% (w/v) PEG 3350, **C)** podmínka: 0,1M kyselina citronová, pH 3,5, 1,6M sulfát amonný, výsledné pH 4,0, **D)** 0,1M Tris, pH 8,5, 8% (w/v) PEG 8000, **E)** 0,2M octan sodný, 0,1M Tris, pH 8,5, 30% (w/v) PEG 4000, **F)** 0,8M hydrogenfosforečnan draselný, 0,8M hydrogenfosforečnan sodný, 0,1M HEPES, pH 7,5. Snímky **Aa)** až **Fa)**: ze světelného mikroskopu; snímky **Ab)** až **Fb)** z UV-mikroskopu.

Podmínka obsahující 0,2M  $MgCl_2$ ; 0,1M Tris, pH 8,5 a 20% (w/v) PEG 8000 (viz Obr. 4.4d, str. 58), byla optimalizována. Byly připraveny roztoky obsahující vždy 0,2M  $MgCl_2$  a dále 15%; 17%; 20% a 22% (w/v) PEG 8000 a 0,1M Tris o pH 8,1; 8,3; 8,5; 8,6; 8,7 a 8,9. Jedna kapka

obsahovala MTasu (v HEPES pufru s 10% glycerolem) se SIN s podmínkou v poměru 1 : 1. Druhá kapka obsahovala 200 nl proteinu se SIN, 160 nl dané podmínky a 40 nl 10 000× ředěného roztoku pro hetero-seeding (s krystaly DENV MTasy). V několika podmínkách (0,2M MgCl<sub>2</sub>, 0,1M Tris o pH 8,1 a 8,3 a 17%; 20% a 22% (w/v) PEG 8000) v obou kapkách se po sedmi dnech objevily drobné krystalové jehlice (viz Obr. 4.4f), jejichž růst již dále nebyl pozorován.

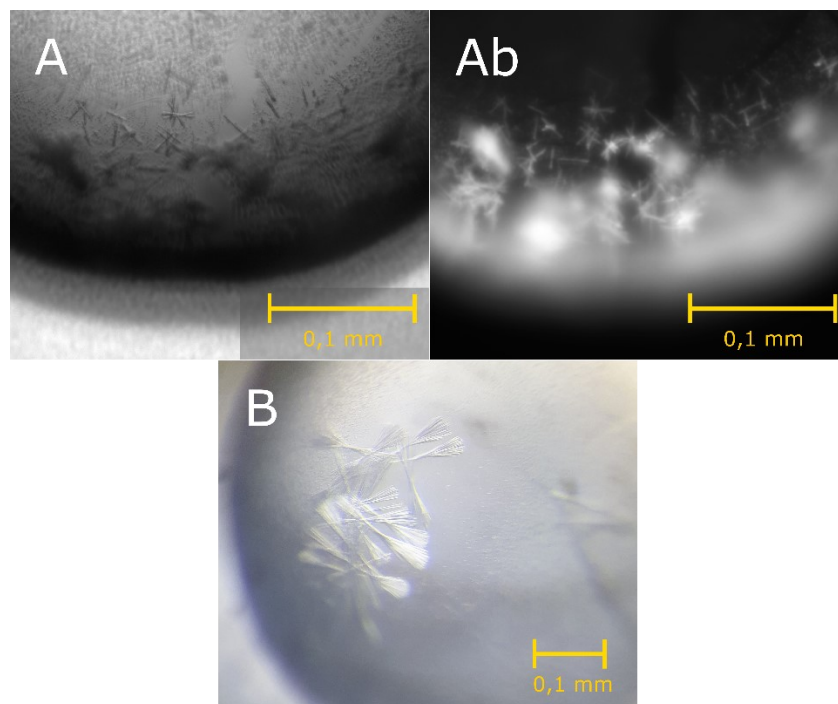


**Obr. 4.4f Proteinové krystaly** MTasy v HEPES pufru s 10% glycerolem. Zvětšení snímků je 10×. Všechny podmínky obsahovaly vždy 0,2M MgCl<sub>2</sub>, 0,1M Tris a PEG 8000. **A) až D)** kapky obsahují krystalizační jádra z krystalů DENV MTasy (hetero-seeding), **E) a F)** kapky neobsahují žádná krystalizační jádra. **A)** Podmínka: Tris, pH 8,1; 17% (w/v) PEG 8000. **B)** Podmínka: Tris, pH 8,3; 17% (w/v) PEG 8000. **C)** Podmínka: Tris, pH 8,1; 22% (w/v) PEG 8000. **D)** Podmínka: Tris, pH 8,3; 22% (w/v) PEG 8000. **E)** Podmínka: Tris, pH 8,3; 20% (w/v) PEG 8000. **F)** Podmínka: Tris, pH 8,3; 22% (w/v) PEG 8000. Snímky **Aa) až Fa)**: ze světelného mikroskopu; snímky **Ab) až Fb)** z UV-mikroskopu.

Krystalizační podmínka, v níž vyrostly krystaly MTasy – 0,2M MgCl<sub>2</sub>; 0,1M Tris, pH 8,5 a 20% (w/v) PEG 8000 – byla dále optimalizována. V 96-jamkové destičce byla do každé jamky přidána k podmínce aditiva. Byly připraveny vždy dvě kapky, přičemž v první bylo 200 nl roztoku proteinu se SIN a 200 nl podmínky s přidáním aditivem. Druhá kapka obsahovala 400 nl daného proteinového roztoku a stejné množství podmínky s aditivem. Ve většině podmínek však došlo pouze k precipitaci krystalizovaného proteinu; žádné proteinové krystaly nevznikaly.

Dále byl testován i jiný pufr, ve kterém by WNV MTasa mohla potenciálně lépe krystalizovat – CHES pufr. Ke 200 nl roztoku proteinu v CHES pufru se SIN bylo přidáno stejné množství komerční krystalizační podmínky. Avšak ani v jedné podmínce nebyl pozorován růst proteinových krystalů; opět docházelo pouze k precipitaci proteinu.

Dále byla testována krystalizace dané MTasy se svým ligandem opět metodou visící kapky. Byla použita optimalizace 0,2M MgCl<sub>2</sub>, dále 15%; 17%; 20% a 22% (w/v) PEG 8000 a 0,1M Tris o pH 8,1; 8,3; 8,5; 8,6; 8,7 a 8,9. Takto byly vytvořeny tři kapky. První obsahovala 1 μl roztoku proteinu se SIN a 1 μl roztoku podmínky; druhá kapka 0,7 μl roztoku proteinu se SIN a 1,3 μl roztoku podmínky; a třetí kapka 0,5 μl roztoku proteinu se SIN a 1,5 μl roztoku podmínky. Po pěti dnech začaly v roztoku vznikat u několika podmínek (0,2M MgCl<sub>2</sub>, 22% (w/v) PEG 8000 a 0,1M Tris o pH 8,1; 8,5; 8,6; 8,7 a 8,9) drobné proteinové krystaly, které se zvětšovaly až do sedmého dne; poté se jejich velikost už neměnila. Největší proteinové krystaly v plné velikosti jsou zobrazeny v Obr. 4.4g.



**Obr. 4.4g Proteinové krystaly ve visících kapkách.** Zvětšení 15× a 10×. Snímky proteinových krystalů v kapkách: 1 μl MTasy se SIN + 1 μl podmínky. **A)** Podmínka: 0,2M MgCl<sub>2</sub>, 22% (w/v) PEG 8000 a 0,1M Tris o pH 8,7; **B)** podmínka: 0,2M MgCl<sub>2</sub>, 22% (w/v) PEG 8000 a 0,1M Tris o pH 8,1. Snímky **A)** a **B)** foceny pod světelným mikroskopem; snímek **Ab)** je podmínka **A)** focena pod UV mikroskopem.

Pro optimalizaci krystalizace ve visících kapkách byla vytvořena krystalizační jádra z krystalů podmínky 0,2M MgCl<sub>2</sub>, 22% (w/v) PEG 8000 a 0,1M Tris o pH 8,1 a pH 8,7. Podmínky obsahovaly 0,2M MgCl<sub>2</sub>, dále 21%; 22%; 23% a 24% (w/v) PEG 8000 a 0,1M Tris o pH 8,1; 8,3; 8,5; 8,6; 8,7 a 8,9. Následně byly vytvořeny dvě sady kapek (každá s jinými krystalizačními jádry), které obsahovaly vždy 4 kapky: první obsahovala 1 μl roztoku proteinu se SIN a 1 μl roztoku podmínky; druhá pak 1 μl roztoku proteinu se SIN, 0,5 μl roztoku podmínky a 0,5 μl 10 000× ředěného roztoku pro seeding; třetí 1 μl roztoku proteinu se SIN, 1 μl roztoku podmínky a 0,5 μl 10 000× ředěného roztoku pro seeding; a čtvrtá kapka 2 μl roztoku proteinu se SIN, 1,75 μl roztoku podmínky a 0,25 μl 10 000× ředěného roztoku pro seeding. Ve všech kapkách všech podmínek nedošlo ke vzniku krystalů, docházelo pouze k precipitaci proteinu.

## 5 DISKUSE

Modifikace RNA hrají v regulaci buněčné genové exprese velmi významnou roli. Této skutečnosti využívají virové methyltransferasy, které se díky methylovanosti vlastní RNA na 5'-konci dokáží maskovat před imunitním systémem hostitele a zároveň iniciovat translaci vlastního genomu. Inhibicí enzymu MTasy vazbou vysoko-afinitního inhibitoru do aktivního místa by se dala zastavit virová infekce nejen u jednoho viru, ale, vzhledem k vysoké konzervovanosti MTas, i u všech dalších virů tohoto rodu.

Tato diplomová práce se zabývá methyltransferasovou doménou NS5, konkrétně u viru západonilské horečky (WNV). Na základě výsledků článku<sup>43</sup> byly vytvořeny oligonukleotidové primery. Součástí amplifikovaného insertu směrem od N-konce byla poly-histidinová kotva, k zachycení proteinu během purifikace při afinitní chromatografii, dále sekvence AMK, kterou v podobě terciální struktury rozeznává proteasa Ulp1, a nakonec samotná 262-AMK dlouhá oblast domény MTasy viru západonilské horečky (viz Obr. 4.2a, str. 50).

Po ligaci insertu do pSumo plasmidu byl vytvořen plasmid, jímž byly transformovány buňky *E. coli* DH5 $\alpha$ . Tyto buňky byly po nanesení na Petriho misku s antibiotikem inkubovány přes noc při 37 °C. Během této doby narostlo na misce několik málo velice malých kolonií, ze kterých byla následně provedena „colony PCR“, jejíž výsledek byl ověřen pomocí horizontální agarosové elektroforesy. V gelu agarosové ELFO (Obr. 4.1c, str. 50) je patrné, že vzhledem k nízké intenzitě pruhů, neprodukovaly transformované bakterie příliš velké množství plasmidu. To mohlo být zapříčiněno neoptimální transformací bakterií vlivem špatné teploty vodní lázně, ve které probíhal tepelný šok. Zpětně bylo zjištěno, že teploměr ukazoval vyšší teplotu, než jaká ve vodní lázni skutečně byla. Nedokonalá transformace mohla zapříčinit nižší rezistenci bakterií vůči antibiotiku a zároveň nižší produkci plasmidu. Nicméně u dvou (klon *k2* a *k7*) ze tří klonů se sekvenovaná nukleotidová sekvence 100% shodovala se sekvencí navrženou; proto byl klon *k2* použit k produkci proteinu WNV MTasy.

Po prvním purifikačním kroku (afinitní vsádkové chromatografii) byl produkován protein eluován elučním pufrem s 300mM imidazolem. Protože během dialyzy a štěpení poly-histidinové kotvy docházelo k masivní precipitaci proteinu vlivem vysoké koncentrace imidazolu, byl eluovaný roztok ihned ředěn stejným objemem ekvilibračního pufru (s 20mM imidazolem).

Po dialyze a štěpení poly-histidinové kotvy byl roztok proteinu přečištěn reverzní afinitní chromatografií, během které se na koloně zachytily štěpné produkty MTasy (obsahující poly-histidinovou kotvu) a případně další proteiny s histidinovou strukturou (zde i proteasa Ulp1). Posledním purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie. Dle chromatografií (Obr. 4.2b str. 51 a 4.2d str. 52) a polyakrylamidových gelů (Obr. 4.2c na str. 52 a Obr. 4.2e na str. 53) byly vybrány frakce, které obsahovaly nejméně kontaminovaný protein MTasy –

v případě vzorků *D9* u obou gelů je vidět, že vzniká pás mezi molekulovými hmotnostmi 15 a 25 kDa, který odpovídá velikosti zbytkové Ulp1 proteasy.

Finálním krokem bylo zakoncentrování roztoků MTasy na koncentraci 10 mg/ml. Toho bohužel nebylo dosaženo, protože při koncentraci zhruba 8 mg/ml začal protein samovolně precipitovat. Nejvyšší dosažená koncentrace bez precipitantů činila 6,5 mg/ml.

Část proteinu byla rovněž převedena do CHES pufru, aby mohly být testovány jiné podmínky krystalizace MTasy. V případě tohoto pufru se podařilo protein zakoncentrovat až na koncentraci 8,3 mg/ml.

Afinita ligandu k proteinu, respektive k jeho vazebnému místu, lze poměrově odhadnout mezi různými molekulami ligandu pomocí testu posunu teplot tání komplexu<sup>83</sup>. Díky diferenční skenovací fluorimetrii lze na základě signálu fluorescence zjistit teploty tání komplexů protein-ligand, které se zvyšují s rostoucí afinitou ligandu k vazebnému místu proteinu. V tomto pokusu byly měřeny komplexy MTasy spolu se svými přirozenými substráty (SAM a SAH) a inhibitorem (SIN). V grafu na straně 55 (viz Obr. 4.3a) jsou vidět posuny teplot tání jednotlivých komplexů v závislosti na rozdílných ligandech. Nejvyšší afinitu k MTase zde vykazuje inhibitor sinefungin ( $\bar{T}_M = 50,1$  – viz Tab. 7, str. 55).

Pro strukturní analýzu komplexu protein-ligand WNV MTasy pomocí difrakčního experimentu bylo nejprve nutné vytvořit měřitelné proteinové krystaly. Pro optimalizaci krystalizace byl vytvořen komplex WNV MTasy spolu s inhibitorem SIN. Bylo postupováno obdobně jako v případě krystalizace komplexu WNV MTasy se spolu-purifikovaným substrátem SAH<sup>43</sup> nebo přidaným inhibitorem SIN<sup>75</sup>. Během dvou dnů se v krystalizačních kapkách vytvořily proteinové sferulity. U těchto útvarů však není možné měřit jejich difrakci, a proto bylo nutné krystalizaci optimalizovat. Byla vytvořena sada podmínek s různými koncentracemi precipitantu a pH soli (viz kap. 3.3.4.3, str. 46). Do krystalizačních kapek byl, kromě roztoku proteinu s ligandem a podmínky, přidán navíc 10 000× ředěný roztok krystalizačních jader, který byl vytvořen ze vzniklých sferulitů (viz Obr. 4.4a, str. 56). V nových krystalizačních podmínkách však vznikly opět sferulity (Obr. 4.4b, str. 56), a proto bylo nutné otestovat i jiné krystalizační podmínky.

Pro testování různých komerčních krystalizačních podmínek byly použity 96-jamkové destičky (krystalizace formou sedící kapky) a automatizovaný pipetovací robot, aby bylo možné otestovat co největší množství podmínek. Vznikla celá řada proteinových útvarů: drobné sferulity, velké sferulity, jehlice ve shlucích i osamocené jehlice (viz. Obr. 4.4c str. 57 a Obr. 4.4d str. 58). Pro optimalizaci byly použity kapky s jednotlivými krystaly (Obr. 4.4d str. 58), které v následujících experimentech sloužily jako krystalizační jádra. Krystalizačními jádry v případě



hetero-cross-seedingu, byly krystaly DENV MTasy. Krystalizace s cross-seedingem a hetero-cross-seedingem byly opět testovány na různých komerčních krystalizačních podmínkách – výsledkem však byly opět proteinové sferulity, nebo velké krystaly solí (viz Obr. 4.4e str. 59).

Opět byla vytvořena sada krystalizačních podmínek, tentokrát optimalizovaná pro kapky obsahující izolované krystaly (Obr. 4.4d str. 58). U každé podmínky byly testovány dvě kapky: jedna obsahující pouze protein se SIN a podmínku, druhá, která navíc obsahovala roztok s krystalizačními jádery optimalizované podmínky. V tomto případě došlo ke vzniku krystalů v řadě podmínek (Obr. 4.4f, str. 60). Žádný z krystalů však stále nebylo možné podrobit difrakčnímu experimentu.

Pro růst větších izolovaných krystalů byla dále testována aditiva, která byla ředěna s podmínkou 0,2M MgCl<sub>2</sub>; 0,1M Tris, pH 8,5 a 20% (w/v) PEG 8000 podle doporučení výrobce. V tomto případě však krystaly nevznikly; v části podmínek došlo pouze k precipitaci proteinu.

Komerční krystalizační roztoky (podmínky) byly testovány také s proteinem WNV MTasy v CHES pufru. Výsledkem tohoto experimentu byly opět pouze precipitanty v části testovaných podmínek.

Dalším experimentem bylo testování krystalizace v sadě roztoků optimalizované podmínky ve visících kapkách. Byly vytvořeny kapky, kde v jedné byl protein s inhibitorem a podmínkou v poměru 1 : 1, v druhé v poměru 1 : 2 a ve třetí 1 : 3. V sadě podmínek s koncentrací 22% (w/v) PEG 8000 a v poměru 1 : 1 protein s ligandem ku podmínce, vznikaly krom precipitantů i proteinové krystaly (Obr. 4.4g, str. 61). Byly vytvořeny dvě sady kapek (viz kap. 3.3.4.10, str. 48) – avšak ani v jedné podmínce nedošlo k růstu proteinových krystalů.

Nepodařilo se najít ideální krystalizační podmínky pro přípravu krystalů proteinových komplexů s malými molekulami, jaké by bylo možno podrobit difrakčnímu experimentu. Vzhledem k tomu, že je proteinová krystalizace empirický, multifaktorový proces, není vždy snadné najít ideální podmínky krystalizace daného proteinu. Roli hrají faktory fyzikální (teplota, doba růstu krystalu, gravitace, povrchové napětí kapky...), chemické (pH, typ srážedla či jeho koncentrace, iontová síla, koncentrace proteinu...) nebo biochemické (čistota proteinu, ligandy, stabilita proteinu, historie vzorku...).

Jedním z dalších experimentů by mohla být krystalizace v tenké kapiláře<sup>84</sup>. V takovém případě by se molekuly proteinu pohybovaly kapalinou převážně difusí. Díky neustálému pohybu molekul (Brownův pohyb) by došlo k pomalému, předvídatelnému a rovnoměrnějšímu rozptýlení molekul proteinu z oblastí s vysokou koncentrací proteinu do oblastí s vysokou koncentrací precipitantu. Tímto způsobem krystalizace by bylo možné vytvořit krystaly dostatečné pro difrakční experiment. Podobně by se dalo využít i agarosových roztoků a gelů (0,1 – 0,5% (w/v)),

ve kterých by vlivem vysoké viskozity kapaliny docházelo k potlačení konvekčních pohybů (např. vztakových sil) a majoritní pohyb molekul by byl způsoben pouze difusí.

Další možností by mohla být krystalizace pod olejem<sup>85</sup>. Výhodou tohoto postupu je, že olej snižuje náchylnost krystalů k vibracím, které mohou způsobovat nedostatečný a nepravidelný růst krystalů. Pokud se kapka krystalizačního roztoku vloží na rozhraní dvou olejů (s vysokou a nízkou hustotou) lze tím zabránit spontánní nukleaci, ke které může docházet na kontaktu kapky s povrchem, a která vede ke vzniku velkého množství malých krystalů. Pomocí tloušťky vrstvy parafinového a silikonového oleje (v poměru 1 : 1) nad rezervoárem kapky lze také korigovat rychlost krystalizace a tím i velikost vznikajících krystalů.

Pro zlepšení krystalizace proteinu se v některých případech používá T4 lysozym, který stabilizuje flexibilních proteinové struktury<sup>86</sup>. Dobře krystalizující lysozym se zřizuje s požadovaným proteinem, a to takovým způsobem, že se lysozym buď vloží do smyček proteinu, anebo na flexibilní konce. Tímto způsobem by byly vytvořeny různé proteinové konstrukty, u kterých by byla testována krystalizace.

## 6 ZÁVĚR

---

Po úspěšné amplifikaci insertu kódujícího WNV MTasu byl tento insert ligován do plasmidu. Připravený plasmid byl ověřen sekvenací. Vytvořeným plasmidem byly transformovány kompetentní bakteriální buňky, cílový protein byl vyprodukován a následně i purifikován. Dále byly připraveny komplexy MTasy s různými ligandy, u kterých byly měřeny a porovnávány teploty tání. Poté byl vytvořen komplex WNV MTasy s malou molekulou (sinefunginem), jehož krystaly měly posloužit k difrakčním experimentům. Nejlepší krystaly obsahovaly visící kapky proteinu se SIN a podmínky v poměru 1 : 1 v celkovém objemu 2  $\mu$ l. Krystalizační podmínka obsahovala 0,2M  $MgCl_2$ , 22% (w/v) PEG 8000 a 0,1M Tris o pH 8,7. I přes veškeré vynaložené úsilí nebyly nalezeny ideální podmínky k získání krystalů vhodných pro pořízení difrakčních dat a následné vytvoření strukturního modelu komplexu WNV MTasy s malými molekulami.

Nicméně, v projektu se bude i nadále pokračovat. Vzhledem k tomu, že je tento výzkum teprve v počátcích, bude nutné krystalizaci WNV MTasy optimalizovat, aby bylo možné naměřit difrakční data. Poté bude zmíněná MTasa kombinována s nejrůznějšími malými molekulami, které by měly působit inhibičně v aktivním, SAM/SAH-vazebném místě enzymu. Nejúčinnější z těchto molekul budou dále testovány i na MTasách dalších flavivirů.

Vzhledem k vysoké konzervovanosti nestrukturního proteinu 5 (obsahujícího N-koncovou doménu MTasy) by se dalo očekávat, že by tyto malé molekuly jako inhibitory flavivirových MTas našly obrovské uplatnění na poli medicíny jako širokospektrá flavivirová antivirotika.



## POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Barrows, N. J.; Campos, R. K.; Liao, K. C.; Prasanth, K. R.; Soto-Acosta, R.; Yeh, S. C.; Schott-Lerner, G.; Pompon, J.; Sessions, O. M.; Bradrick, S. S.; Garcia-Blanco, M. A.: Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem. Rev.* **118**, 4448–82 (2018).
- (2) Hall, R. A.; Tan, S. E.; Selisko, B.; Slade, R.; Hobson-Peters, J.; Canard, B.; Hughes, M.; Leung, J. Y.; Balmori-Melian, E.; Hall-Mendelin, S.; Pham, K. B.; Clark, D. C.; Prow, N. A.; Khromykh, A. A.: Monoclonal antibodies to the West Nile virus NS5 protein map to linear and conformational epitopes in the methyltransferase and polymerase domains. *J. Gen. Virol.* **90**, 2912–22 (2009).
- (3) Lindenbach, B. D.; Thiel, H.; Rice, C. M.: Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: *Fields Virology*. Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds.), 5th ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 2007, p. 1101–52.
- (4) Collins, M. H.; Metz, S. W.: Progress and Works in Progress: Update on Flavivirus Vaccine Development. *Clin. Ther.* **39**, 1519–36 (2017).
- (5) Holbrook, M. R.: Historical perspectives on flavivirus research. *Viruses.* **9** (2017).
- (6) Gould, E.; Solomon, T.: Pathogenic flaviviruses. *Lancet.* **371**, 500–9 (2008).
- (7) Daep, C. A.; Muñoz-Jordán, J. L.; Eugenin, E. A.: Flaviviruses, an expanding threat in public health: focus on dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. *J. Neurovirol.* **20**, 539–60 (2014).
- (8) Smithburn, K. C.; Hughes, T. P.; Burke, A. W.; Paul, J. H.: A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda 1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **s1-20**, 471–92 (1940).
- (9) Murray, K. O.; Mertens, E.; Desprès, P.: West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet. Res.* **41** (2010).
- (10) Bakonyi, T.; Haussig, J. M.: West nile virus keeps on moving up in Europe. *Eurosurveillance.* **25** (2020).
- (11) World-Health-Organization. West Nile virus [Online]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus> [cit. 18. 3. 2021].
- (12) Guarner, J.; Hale, G. L.: Four human diseases with significant public health impact caused by mosquito-borne flaviviruses: West Nile, Zika, dengue and yellow fever. *Semin. Diagn. Pathol.* **36**, 170–6 (2019).
- (13) Symptoms, Diagnosis, & Treatment | West Nile Virus | CDC [Online]. URL <https://www.cdc.gov/westnile/symptoms/index.html> [cit. 25. 3. 2021].
- (14) Chambers, T. J.; Hahn, C. S.; Galler, R.; Rice, C. M.: Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 649–88 (1990).
- (15) Emara, M. M.; Brinton, M. A.: Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 9041–6 (2007).
- (16) Pijlman, G. P.; Funk, A.; Kondratieva, N.; Leung, J.; Torres, S.; van der Aa, L.; Liu, W. J.; Palmenberg, A. C.; Shi, P. Y.; Hall, R. A.; Khromykh, A. A.: A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. *Cell Host Microbe.* **4**, 579–91 (2008).
- (17) Wengler, G.; Wengler, G.; Gross, H. J.: Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology.* **89**, 423–37 (1978).

- (18) Proutski, V.; Gould, E. A.; Holmes, E. C.: Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: Similarities and differences. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1194–202 (1997).
- (19) Lim, S. P.; Shi, P. Y.: West Nile virus drug discovery. *Viruses.* **5**, 2977–3006 (2013).
- (20) Falgout, B.; Chanock, R.; Lai, C. J.: Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *J. Virol.* **63**, 1852–60 (1989).
- (21) Habarugira, G.; Suen, W. W.; Hobson-Peters, J.; Hall, R. A.; Bielefeldt-Ohmann, H.: West Nile virus: An update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and “One health” implications. *Pathogens.* **9**, 1–51 (2020).
- (22) Miller, S.; Kastner, S.; Krijnse-Locker, J.; Bühler, S.; Bartenschlager, R.: The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J. Biol. Chem.* **282**, 8873–82 (2007).
- (23) Miller, S.; Sparacio, S.; Bartenschlager, R.: Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B. *J. Biol. Chem.* **281**, 8854–63 (2006).
- (24) Kyung, M. C.; Liszewski, M. K.; Nybakken, G.; Davis, A. E.; Townsend, R. R.; Fremont, D. H.; Atkinson, J. P.; Diamond, M. S.: West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19111–6 (2006).
- (25) Lindenbach, B. D.; Rice, C. M.: Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function. *J. Virol.* **73**, 4611–21 (1999).
- (26) Kümmerer, B. M.; Rice, C. M.: Mutations in the Yellow Fever Virus Nonstructural Protein NS2A Selectively Block Production of Infectious Particles. *J. Virol.* **76**, 4773–84 (2002).
- (27) Chambers, T. J.; Grakoui, A.; Rice, C. M.: Processing of the yellow fever virus nonstructural polyprotein: a catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. *J. Virol.* **65**, 6042–50 (1991).
- (28) Li, H.; Clum, S.; You, S.; Ebner, K. E.; Padmanabhan, R.: The Serine Protease and RNA-Stimulated Nucleoside Triphosphatase and RNA Helicase Functional Domains of Dengue Virus Type 2 NS3 Converge within a Region of 20 Amino Acids. *J. Virol.* **73**, 3108–16 (1999).
- (29) Bartelma, G.; Padmanabhan, R.: Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3. *Virology.* **299**, 122–32 (2002).
- (30) Wengler, G.; Wengler, G.: The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology.* **197**, 265–73 (1993).
- (31) Tan, B. H.; Fu, J.; Sugrue, R. J.; Yap, E. H.; Chan, Y. C.; Tan, Y. H.: Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology.* **216**, 317–25 (1996).
- (32) Egloff, M. P.; Benarroch, D.; Selisko, B.; Romette, J. L.; Canard, B.: An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: Crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* **21**, 2757–68 (2002).
- (33) Diamond, M. S.; Edgil, D.; Roberts, T. G.; Lu, B.; Harris, E.: Infection of Human Cells by Dengue Virus Is Modulated by Different Cell Types and Viral Strains. *J. Virol.* **74**, 7814–23 (2000).

- (34) Lu, G.; Gong, P.: Crystal Structure of the Full-Length Japanese Encephalitis Virus NS5 Reveals a Conserved Methyltransferase-Polymerase Interface. *PLoS Pathog.* **9** (2013).
- (35) Issur, M.; Geiss, B. J.; Bougie, I.; Picard-Jean, F.; Despins, S.; Mayette, J.; Hobdey, S. E.; Bisailon, M.: The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA.* **15**, 2340–50 (2009).
- (36) Dong, H.; Zhang, B.; Shi, P. Y.: Flavivirus methyltransferase: A novel antiviral target. *Antiviral Res.* **80**, 1–10 (2008).
- (37) Dong, H.; Ren, S.; Zhang, B.; Zhou, Y.; Puig-Basagoiti, F.; Li, H.; Shi, P.-Y.: West Nile Virus Methyltransferase Catalyzes Two Methylations of the Viral RNA Cap through a Substrate-Repositioning Mechanism. *J. Virol.* **82**, 4295–307 (2008).
- (38) Dubankova, A.; Boura, E.: Structure of the yellow fever NS5 protein reveals conserved drug targets shared among flaviviruses. *Antiviral Res.* **169** (2019).
- (39) Egloff, M. P.; Decroly, E.; Malet, H.; Selisko, B.; Benarroch, D.; Ferron, F.; Canard, B.: Structural and Functional Analysis of Methylation and 5'-RNA Sequence Requirements of Short Capped RNAs by the Methyltransferase Domain of Dengue Virus NS5. *J. Mol. Biol.* **372**, 723–36 (2007).
- (40) Benarroch, D.; Egloff, M. P.; Mulard, L.; Guerreiro, C.; Romette, J. L.; Canard, B.: A structural basis for the inhibition of the NS5 dengue virus mRNA 2'-O-methyltransferase domain by ribavirin 5'-triphosphate. *J. Biol. Chem.* **279**, 35638–43 (2004).
- (41) Hager, J.; Staker, B. L.; Bügl, H.; Jakob, U.: Active site in RrmJ, a heat shock-induced methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **277**, 41978–86 (2002).
- (42) Ray, D.; Shah, A.; Tilgner, M.; Guo, Y.; Zhao, Y.; Dong, H.; Deas, T. S.; Zhou, Y.; Li, H.; Shi, P.-Y.: West Nile Virus 5'-Cap Structure Is Formed by Sequential Guanine N-7 and Ribose 2'-O Methylations by Nonstructural Protein 5. *J. Virol.* **80**, 8362–70 (2006).
- (43) Zhou, Y.; Ray, D.; Zhao, Y.; Dong, H.; Ren, S.; Li, Z.; Guo, Y.; Bernard, K. A.; Shi, P.-Y.; Li, H.: Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *J. Virol.* **81**, 3891–903 (2007).
- (44) Pollar, T. D.; Earnshaw, W. C.: Cell Biology. Philadelphia, Saunders, 2002.
- (45) Shatkin, A. J.: Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell.* **9**, 645–53 (1976).
- (46) Cowling, V. H.: Regulation of mRNA cap methylation. *Biochem. J.* **425**, 295–302 (2010).
- (47) Schwer, B.; Saha, N.; Mao, X.; Chen, H. W.; Shuman, S.: Structure-function analysis of yeast mRNA cap methyltransferase and high-copy suppression of conditional mutants by AdoMet synthase and the ubiquitin conjugating enzyme Cdc34p. *Genetics.* **155**, 1561–76 (2000).
- (48) Wen, Y.; Shatkin, A. J.: Cap methyltransferase selective binding and methylation of GpppG-RNA are stimulated by importin- $\alpha$ . *Genes Dev.* **14**, 2944–9 (2000).
- (49) Saha, N.; Schwer, B.; Shuman, S.: Characterization of human, *Schizosaccharomyces pombe*, and *Candida albicans* mRNA cap methyltransferases and complete replacement of the yeast capping apparatus by mammalian enzymes. *J. Biol. Chem.* **274**, 16553–62 (1999).
- (50) Wu, J.; Chen, Z. J.: Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 461–88 (2014).
- (51) Saletore, Y.; Meyer, K.; Korlach, J.; Vilfan, I. D.; Jaffrey, S.; Mason, C. E.: The birth of the Epitranscriptome: deciphering the function of RNA modifications. *Genome Biol.* **13**, 175 (2012).

- (52) Dong, H.; Fink, K.; Züst, R.; Lim, S. P.; Qin, C. F.; Shi, P. Y.: Flavivirus RNA methylation. *J. Gen. Virol.* **95**, 763–78 (2014).
- (53) Bradrick, S. S.: Causes and consequences of flavivirus RNA methylation. *Front. Microbiol.* **8** (2017).
- (54) Wang, Z.; Jiao, X.; Carr-Schmid, A.; Kiledjian, M.: The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12663–8 (2002).
- (55) Hershey, J. W. B.; Sonenberg, N.; Mathews, M. B.: Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a011528–a011528 (2012).
- (56) Both, G. W.; Banerjee, A. K.; Shatkin, A. J.: Methylation dependent translation of viral messenger RNAs in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 1189–93 (1975).
- (57) Edgil, D.; Polacek, C.; Harris, E.: Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. *J. Virol.* **80**, 2976–86 (2006).
- (58) Dong, H.; Ray, D.; Ren, S.; Zhang, B.; Puig-Basagoiti, F.; Takagi, Y.; Ho, C. K.; Li, H.; Shi, P.-Y.: Distinct RNA Elements Confer Specificity to Flavivirus RNA Cap Methylation Events. *J. Virol.* **81**, 4412–21 (2007).
- (59) Dong, H.; Ren, S.; Li, H.; Shi, P. Y.: Separate molecules of West Nile virus methyltransferase can independently catalyze the N7 and 2'-O methylations of viral RNA cap. *Virology.* **377**, 1–6 (2008).
- (60) Fabrega, C.; Hausmann, S.; Shen, V.; Shuman, S.; Lima, C. D.: Structure and Mechanism of mRNA Cap (Guanine-N7) Methyltransferase. *Mol. Cell.* **13**, 77–89 (2004).
- (61) Hodel, A. E.; Gershon, P. D.; Quioco, F. A.: Structural basis for sequence-nonspecific recognition of 5'-Capped mRNA by a cap-modifying enzyme. *Mol. Cell.* **1**, 443–7 (1998).
- (62) Daffis, S.; Szretter, K. J.; Schriewer, J.; et al.: 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature.* **468**, 452–6 (2010).
- (63) Kumar, P.; Sweeney, T. R.; Skabkin, M. A.; Skabkina, O. V.; Hellen, C. U. T.; Pestova, T. V.: Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **42**, 3228–45 (2014).
- (64) Ulbert, S.: West Nile virus vaccines—current situation and future directions. *Hum. Vaccines Immunother.* **15**, 2337–42 (2019).
- (65) Sridhar, S.; Luedtke, A.; Langevin, E.; et al.: Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *N. Engl. J. Med.* **379** (2018).
- (66) Diagnostic Testing | West Nile Virus | CDC [Online]. URL <https://www.cdc.gov/westnile/healthcareproviders/healthCareProviders-Diagnostic.html> [cit. 25. 3. 2021].
- (67) Prevention | West Nile Virus | CDC [Online]. URL <https://www.cdc.gov/westnile/prevention/index.html> [cit. 19. 3. 2021].
- (68) Colpitts, T. M.; Conway, M. J.; Montgomery, R. R.; Fikrig, E.: West Nile virus: Biology, transmission, and human infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 635–48 (2012).
- (69) Pierson, T. C.; Diamond, M. S.: The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat. Microbiol.* **5**, 796–812 (2020).



- (70) Mastrangelo, E.; Pezzullo, M.; De burghgraeve, T.; Kaptein, S.; Pastorino, B.; Dallmeier, K.; De lamballerie, X.; Neyts, J.; Hanson, A. M.; Frick, D. N.; Bolognesi, M.; Milani, M.: Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: New prospects for an old drug. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1884–94 (2012).
- (71) Chen, Y. L.; Yokokawa, F.; Shi, P. Y.: The search for nucleoside/nucleotide analog inhibitors of dengue virus. *Antiviral Res.* **122**, 12–9 (2015).
- (72) Hong, Z.; Cameron, C. E.: Pleiotropic mechanisms of ribavirin antiviral activities. *Prog. Drug Res.* **59**, 41–69 (2002).
- (73) Milani, M.; Mastrangelo, E.; Bollati, M.; Selisko, B.; Decroly, E.; Bouvet, M.; Canard, B.; Bolognesi, M.: Flaviviral methyltransferase/RNA interaction: Structural basis for enzyme inhibition. *Antiviral Res.* **83**, 28–34 (2009).
- (74) Chen, H.; Liu, L.; Jones, S. A.; Banavali, N.; Kass, J.; Li, Z.; Zhang, J.; Kramer, L. D.; Ghosh, A. K.; Li, H.: Selective inhibition of the West Nile virus methyltransferase by nucleoside analogs. *Antiviral Res.* **97**, 232–9 (2013).
- (75) Dong, H.; Liu, L.; Zou, G.; Zhao, Y.; Li, Z.; Lim, S. P.; Shi, P. Y.; Li, H.: Structural and functional analyses of a conserved hydrophobic pocket of flavivirus methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **285**, 32586–95 (2010).
- (76) Brecher, M.; Chen, H.; Liu, B.; Banavali, N. K.; Jones, S. A.; Zhang, J.; Li, Z.; Kramer, L. D.; Li, H.: Novel broad spectrum inhibitors targeting the flavivirus methyltransferase. *PLoS One.* **10** (2015).
- (77) Lim, S. P.; Sonntag, L. S.; Noble, C.; et al.: Small molecule inhibitors that selectively block dengue virus methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **286**, 6233–40 (2011).
- (78) Geoffrey, B.; Sanker, A.; Madaj, R.; Tresanco, M. S. V.; Upadhyay, M.; Gracia, J.: A program to automate the discovery of drugs for West Nile and Dengue virus—programmatically screening of over a billion compounds on PubChem, generation of drug leads and automated in silico modelling. *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2020).
- (79) QIAquick Spin Handbook - QIAGEN [Online]. URL <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=95f10677-aa29-453d-a222-0e19f01e1e17&lang=en> [cit. 22. 2. 2021].
- (80) QIAprep Miniprep Handbook - QIAGEN [Online]. URL <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=22df6325-9579-4aa0-819c-788f73d81a09&lang=en> [cit. 22. 2. 2021].
- (81) QIAquick Gel Extraction Kit and QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit - (EN) - QIAGEN [Online]. URL <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=a72e2c07-7816-436f-b920-98a0ede5159a&lang=en> [cit. 3. 3. 2021].
- (82) Sangerovo sekvenování: StandardSeq: Jak připravit vzorky - SEQme [Online]. URL <https://www.seqme.eu/documents/standardseq-instructions-cz.pdf> [cit. 4. 3. 2021].
- (83) Pantoliano, M. W.; Petrella, E. C.; Kwasnoski, J. D.; Lobanov, V. S.; Myslik, J.; Graf, E.; Carver, T.; Asel, E.; Springer, B. A.; Lane, P.; Salemme, F. R.: High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. *J. Biomol. Screen.* **6**, 429–40 (2001).
- (84) García-Ruiz, J. M.: Crystallization in Gels and Capillars. In: *Protein crystallization*. Bergfors, T. M. (Ed.), 2nd ed. San Diego, International University Line, 2009, p. 83–94.
- (85) Chayen, N.: Oils for Screening and Optimization. In: *Protein crystallization*. Bergfors, T. M. (Ed.), 2nd ed. San Diego, International University Line, 2009, p. 65–82.

- (86) Chun, E.; Thompson, A. A.; Liu, W.; Roth, C. B.; Griffith, M. T.; Katritch, V.; Kunken, J.; Xu, F.; Cherezov, V.; Hanson, M. A.; Stevens, R. C.: Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. *Structure*. **20**, 967–76 (2012).