

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Rašíd Kamal

Strukturní studie mutantu S6A matrixového proteinu Mason-Pfizerova opičího viru
Structural study of S6A mutant of matrix protein from Mason-Pfizer monkey virus

Diplomová práce

Školitel: doc.Ing. Richard Hrabal, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 04.05.2011

Podpis

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli, doc. Richardu Hrabalovi, za trpělivost a vstřícnost s jakou mne seznamoval s náročnou a zajímavou metodou a za čas, který ochotně věnoval na četné konzultace při psaní této práce. Stejně tak děkuji Ing. Janu Prchalovi za četné rady a intervence při zpracovávání NMR spekter a práci v laboratoři. Můj velký dík patří také Dr. Janu Lipovovi za laskavé a neautoritativní pedagogické vedení při přípravě proteinu. Musím rovněž poděkovat kolegům z laboratoří NMR a Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT, kteří byli vždy ochotni pomoci a vytvářeli pohodovou pracovní atmosféru. Neskonale vděčný jsem své rodině, že to se mnou celé vydržela a podporovala mne.

Abstrakt

Mason-Pfizerův opičí virus (M-PMV) patří k retrovirům morfogenetického typu D, které sestavují virové částice v cytoplazmě. Tím je tento proces časově a prostorově oddělen od pučení na cytoplazmatické membráně, a proto M-PMV představuje vhodný modelový organismus pro studium životního cyklu retrovirů. Matrixový protein, který je N-terminální částí polyproteinového retrovirového prekurzoru Gag, hraje v tomto životním cyklu ústřední úlohu. Jednou z oblastí, která je pro jeho funkce klíčová, je jeho myristoylovaný N-konec, důležitý zejména pro vazbu na cytoplazmatickou membránu při pučení z hostitelské buňky. Mezi serinem 6 a glutamátem 9 divokého typu tohoto proteinu je vodíková vazba, jejíž vliv na strukturu a molekulární mechaniku této oblasti jsme studovali narušením zmíněné interakce výměnou serinu 6 za alanin. Tato práce popisuje přípravu rekombinantního, mutantního matrixového proteinu M-PMV, přiřazení rezonancí atomů jeho páteře nukleární magnetickou rezonanční spektroskopií a zjištěnou sekundární strukturu porovnává s dalšími mutanty a divokým typem.

Abstract

Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) belongs to the morphogenetic type D retroviruses which produce viral particles in the cytoplasm. This process is temporally and spatially separated from the cytoplasmic membrane budding and therefore M-PMV is a suitable model organism for studying the life cycle of retroviruses. Matrix protein, which is N-terminal portion of Gag polyprotein precursor, plays a central role in this life cycle. One of the key areas of the protein is its myristoylated N-terminus which is particularly important for binding to the cytoplasmic membrane during budding from host cells. A hydrogen bond exists between serine 6 and glutamate 9 of the wild-type protein. We have studied its influence on the structure and molecular mechanics of the corresponding area of the protein by means of disruption of this interaction by replacing serine 6 with alanine. This thesis describes the preparation of recombinant mutant of the M-PMV matrix protein, resonance assignment of its backbone atoms with nuclear magnetic resonance spectroscopy and compares observed secondary structure with that of other mutants and the wild type.

Obsah:

1 Úvod	1
2 TEORETICKÁ ČÁST	
2.1 Retroviry	2
2.1.1 Taxonomie	3
2.1.2 Stavba zralých virionů	3
2.1.3 Organizace genomu	4
2.1.4 Životní cyklus	5
2.1.4.1 Vstup viru do buňky.....	5
2.1.4.2 Reverzní transkripce.....	7
2.1.4.3 Integrace do genomu.....	7
2.1.4.4 Transkripce provirové DNA.....	8
2.1.4.5 Sestřih virové mRNA.....	9
2.1.4.6 Translace virové mRNA.....	9
2.1.4.7 Sestavování a pučení virionů z buňky.....	9
2.1.4.8 Maturace virionů.....	10
2.2 Mason-Pfizerův opičí virus	11
2.2.1 Strukturní proteiny M-PMV	11
2.2.1.1 Fosfoprotein (pp16).....	11
2.2.1.2 Proteiny p12 a p4.....	12
2.2.1.3 Kapsidový protein (p27).....	12
2.2.1.4 Nukleokapsidový protein (p14).....	12
2.2.1.5 Env proteiny.....	13
2.2.1.6 Matrixový protein (p10).....	13
2.2.1.6.1 Funkce MA.....	14
2.2.1.6.2 Struktura MA.....	14
2.2.1.6.2.1 Myristoylový přepínač.....	16
2.3 Mutace MA HIV-1	19
2.4 Mutace MA M-PMV	19

2.4.1 G2A.....	19
2.4.2 A18V, A79V, T69I.....	19
2.4.3 P43L, P72S.....	20
2.4.4 T41I/T78I.....	20
2.4.5 R55F, R55W.....	20
2.4.6 S6A.....	21
3 Cíl práce.....	22
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	
4.1 Materiál	
4.1.1 Přístroje.....	23
4.1.2 Chemikálie.....	23
4.1.3 Komerční kity.....	25
4.1.4 Buněčný materiál.....	25
4.1.5 Roztoky.....	25
4.2 Metody	
4.2.1 Příprava konstruktů DNA.....	28
4.2.1.1 PCR mutageneze.....	30
4.2.2 Izolace konstruktů DNA.....	31
4.2.2.1 Přečištění směsi s amplikonem.....	31
4.2.2.2 Inkubace směsi s amplikonem restriční endonukleázou.....	31
4.2.2.3 Transformace a kultivace buněk <i>E. coli</i> DH5 α	32
4.2.2.4 PCR narostlých bakteriálních kolonií (<i>colony</i> PCR)	32
4.2.2.5 Agarosová elektroforéza.....	33
4.2.2.6 Kultivace buněk <i>E. coli</i> DH5 α	33
4.2.2.7 Izolace plazmidové DNA z buněk <i>E. coli</i> DH5 α	34
4.2.3 Expres a purifikace rekombinantního MA v buňkách <i>E. coli</i> BL21...34	
4.2.3.1 Transformace a kultivace buněk <i>E. coli</i> BL21.....	34
4.2.3.2 Expres izotopově značeného MA S6A v buňkách BL21.....	34
4.2.3.3 Dezintegrace buněk po expresi.....	35
4.2.3.4 Metaloafinitní chromatografie v kolonách s NiNTA agarosou.....	35
4.2.4 NMR spektroskopie.....	36
4.2.4.1 Koncentrování vzorků a příprava pro NMR spektroskopii.....	36
4.2.4.2 Měření spekter NMR.....	36

4.2.4.3 Sekvenční přiřazování rezonancí.....	37
4.2.5 Odhad sekundární struktury na základě indexu chemických posunů ..	38
4.2.6 Posouzení strukturní stability molekuly pomocí indexu náhodného klubka a parametru uspořádanosti S^2	39
5 Výsledky	
5.1 Příprava rekombinantního proteinu.....	40
5.2 Přiřazení rezonancí atomů páteře proteinu.....	41
5.3 Porovnání chemických posunů MA M-PMV mutantu S6A a WT....	43
5.4 Zhodnocení sekundární struktury a její porovnání s WT.....	44
6 Diskuse.....	48
7 Závěr.....	50
8 Seznam použité literatury.....	51
9 Seznam zkratk.....	55
10 Příloha.....	56

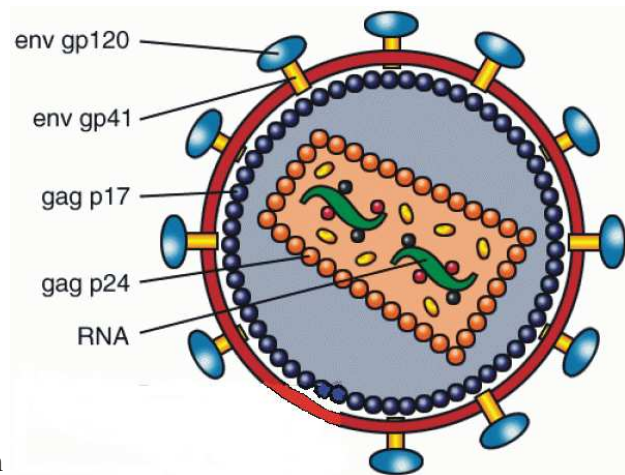
1 Úvod

Retroviry jsou, vzhledem ke stále nezodpovězeným otázkám v oblasti léčby infekce HIV a AIDS a léčby i prevence onkologických onemocnění, aktuální a v centru pozornosti biomedicíny. Sbírání poznatků výzkumnými týmy, které se dívají na určitou problematiku rozdílnou optikou, používaje odlišnou metodiku, by mělo vyústit ve vývoj účinné látky proti AIDS. Ta by pak měla být spolehlivým základem pro budoucí praktické uplatnění v klinické oblasti. Tedy v ideálním případě se stát podnětem pro aplikovaný výzkum s cílem zejména vývoje antivirotik, imunologické a genové terapie. Strukturně-biologické přístupy bádání vysvětlují molekulárně-mechanické zákonitosti z interakčních rozhraní životního cyklu retrovirů. Právě aspekty prostorové orientace a konformace klíčových molekul jsou v současnosti z pohledu chemie léčiv často východiskem pro tvorbu nové terapeutické sloučeniny. Tato práce shrnuje strukturní studie mutantů matrixového proteinu (MA) Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV), jednoho z modelových organismů a detailně popisuje přípravu a studium jeho mutantu, konkrétně S6A.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Retroviry

Retroviry jsou RNA viry, jenž během své replikace přepisují genetickou informaci do DNA intermediátu procesem nazývaným reverzní transkripce. Tu provádí virová reverzní transkriptasa (RT). Funguje jako RNA dependentní DNA polymerasa a rovněž v dalším kroku jako DNA dependentní DNA polymerasa a ribonukleasa, kterou si virus v kapsidě přináší s sebou do hostitelské buňky spolu s integrasou (IN). IN začleňuje DNA s virovým genomem do genomu hostitelské buňky jako provirus. Retroviry obsahující ve svém genomu onkogen, či jejichž proteiny interferují s buněčným cyklem nebo DNA opravnými mechanismy, mají onkogenní potenciál. Vkládaná DNA je ohraničena sekvencemi LTR (*long terminal repeat*), které obsahují i některé retrotranspozony. Po aktivaci proviru dochází k syntéze virových komponent a sestavování virionů, které pučením opouštějí buňku, aby posléze dozrály.



Obr. 1

Struktura virionu HIV-1:

p17 - matrixový protein

p24 - kapsidový protein

RNA je v komplexu s nukleoproteinem

(Převzato z <http://www.avert.org>)

2.1.1 Taxonomie

Retroviry jsou obalené, (+) ssRNA viry s diploidním genomem, tvořící čeleď *Retroviridae* a patří do IV. Skupiny Baltimorovy klasifikace. Tato čeleď se dále dělí na podčeledi *Orthoretrovirinae* a *Spumaretrovirinae*. Rodiny spadající do těchto kategorií jsou dále určeny náležitostí k jednomu z morfogenetických typů A, B, C či D. Toto dělení zohledňuje různé lokalizace a způsoby tvorby virionů a morfologii *core*.

Tab. 1: Čeleď *Retroviridae* s druhovými příklady

Podčeleď	Rod	Druh	Typ
<i>Orthoretrovirinae</i>	<i>Alpharetrovirus</i>	<i>Rous sarcoma v.</i>	C
		<i>Avian leukosis v.</i>	C
	<i>Betaretrovirus</i>	<i>Mouse mammary tumour v.</i>	B
		<i>Mason-Pfizer monkey v.</i>	D
	<i>Gammaretrovirus</i>	<i>Murine leukaemia v.</i>	C
	<i>Deltaretrovirus</i>	<i>Human T-lymphotropic v.</i>	C
<i>Epsilonretrovirus</i>	<i>Walleye dermal sarcoma v.</i>	C	
	<i>Lentivirus</i>	<i>Human immunodeficiency v.</i>	C
<i>Spumaretrovirinae</i>	<i>Spumavirus</i>	<i>Chimpanzee foamy v.</i>	A

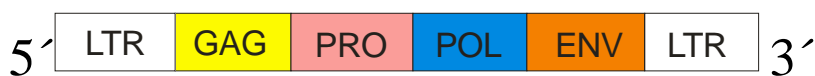
2.1.2 Stavba zralých virionů

Jelikož se jedná o viry obalené, je první vrstvou fosfolipidová dvojvrstva, kterou částice získala při svém pučení skrze cytoplazmatickou membránu hostitelské buňky. V této dvojvrstvě jsou zanořeny transmembránové glykoproteiny (TM) a k nim většinou nekovalentně vázány povrchové glykoproteiny (SU). K její vnitřní straně přiléhají molekuly MA, jež je v ní kotven svým myristoylovaným N-koncem a elektrostatickými interakcemi mezi bazickými aminokyselinami na povrchu MA a fosfátovými skupinami lipidové dvojvrstvy (Zhou W et al., 1994). Další vrstvou tvoří vlastní kapsida viru. Ta je tvořena protomery kapsidového proteinu (CA) a způsob jejího uspořádání je taxonem a je pro konkrétní druh neměnný. Kapsida obsahuje genomovou RNA ve vazbě

s nukleokapsidovým proteinem (NC), RT, IN, proteázu (PR) a někdy též druhově specifické, regulační proteiny.

2.1.3 Organizace genomu

Typická velikost genomu retrovirů je 7-12kB. Přítomny jsou dvě kopie (+) vláknů (*sense*) RNA s nesegmentovaným genomem, který obsahuje tři nebo čtyři základní a u jednoduchých retrovirů jediné, geny: *gag* (*group-specific antigen*), *pro* (*protease*), *pol* (*polymerase*) a *env* (*envelope*) (obr. 2). *gag* kóduje hlavní strukturální polyprotein, který je při maturaci štěpen na MA, NC, CA a některé další proteiny. U M-PMV jsou významnými fosfoprotein (PP) a protein p12. Gen *pro* kóduje PR a dUTPázu (Elder JH et al., 1992), gen *pol* RT a IN (Panganiban AT, Temin HN, 1984) a v nepřítomnosti genu *pro* též jeho enzymy. Gen *env* kóduje SU a TM. Typ syntetizovaného polyproteinu závisí na čtecím rámci. Na 5' konci RNA vlákna jsou oblasti R a U5, na 3' konci potom U3 a R. Jsou tedy zrcadlově obráceny. Obsahují sekvence fungující jako promotor a regulující terminaci transkripce a polyadenylaci. K jejich plně funkčnímu uspořádání dochází však až po jejich sestavení v LTR, tedy po reverzní transkripci. LTR jsou tvořeny DNA sekvencí U3 – R – U5. Za U5 regionem RNA následuje PBS (*primer binding site*). Před U3 se nachází PPT (*polypurine tract*).



Obr. 2

Obecné schéma uspořádání retrovirového genomu.

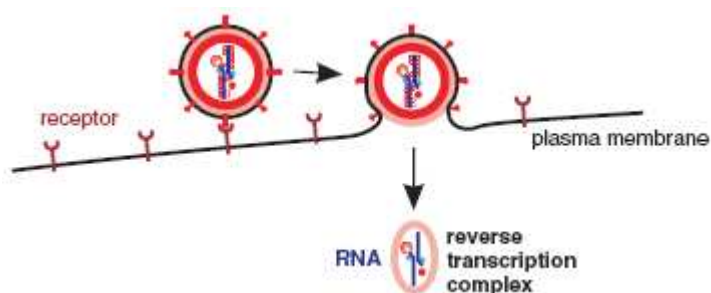
2.1.4 Životní cyklus

Infekce buňky je zahájena kontaktem povrchových virových glykoproteinů (SU) se specifickým buněčným receptorem. Po splynutí membrán vstupuje virová kapsida do cytoplazmy, kde se následně rozpadá. Za tento proces zodpovídá interakce SU a buněčného receptoru a rovněž SU a TM. V dalším kroku vzniká tzv. preintegrační komplex (PIC). Reverzní transkripce virové RNA do DNA je zahájena RT buď ještě v cytoplazmě, nebo až po translokaci PIC do jádra. Tam, za účasti IN, je reverzní transkript kovalentně začleněn do hostitelské, jaderné DNA. Po určitém možném období latence je provirus aktivován a transkribován hostitelskou RNA polymerasou II. Tato aktivace je těsně spjata s proliferační aktivitou hostitelské buňky, nebo s aktivitou určité genové oblasti (Feinstein SC, Ross SR a Yamamoto KR, 1982). Vznikající mRNA slouží jak k plnění virových kapsid, tak k translaci. Vznikají dva typy produktů. V drsném endoplazmatickém retikulu (RER) jsou kromě některých druhově specifických proteinů syntetizovány membránové glykoproteiny. Cestou translace na volných ribozomech vznikají polyproteinové prekurzory strukturních proteinů. Ty se podle toho, k jakému morfogenetickému typu náleží daný retrovirus, sestavují v nezralý virion buď v cytoplazmě, nebo simultánně s pučením přímo na cytoplazmatické membráně, kde virion získává svůj fosfolipidový obal. Po vypuštění virová částice dozrává a polyproteiny jsou PR rozštěpeny na jednotlivé enzymy a strukturní proteiny (Vogt VM, 1996). Poté již všechny komponenty virionu zaujímají v jeho struktuře své charakteristické postavení.

2.1.4.1 Vstup viru do buňky

Základní podmínkou pro vstup retroviru do buňky je fyzický kontakt SU a příslušného buněčného receptoru, který je následován fúzí fosfolipidové membrány virionu a cytoplazmatické membrány hostitelské buňky (obr. 3). Existují indicie, že tato událost se odehrává s větší pravděpodobností v doménách cytoplazmatické membrány s vyšším zastoupením cholesterolu a sfingolipidů a naopak nižším obsahem fosfatidylcholinu, které nazýváme lipidové rafty (Liao Z, Graham DR a Hildreth JE, 2003; Manes S et al., 2000; Popik W, Alce TM a Au WC, 2002). Molekulární podstata této přeměny tkví v přestavbě architektury proteinu Env, který je přítomen jako dvě komplexní, homotrimerní

podjednotky SU a TM, které drží pohromadě zejména leucinový zip TM (Kliger Y a Shai Y, 1997; Fass D et al., 1997; Fass D, Harrison SC a Kim PS, 1996). I když je stále uváděno, že spojení SU a TM je nekovalentní, bylo přinejmenším v některých případech prokázáno kovalentní spojení disulfidickou vazbou (Opstelten DJ, Wallin M a Garoff H, 1998). Izomerace disulfidové vazby mezi TM a SU byla u *Murine leukaemia* viru identifikována jako iniciátor splynutí membrán (Wallin M, Ekstrom M a Garoff H, 2004). Disulfid izomerasu aktivují různé podmínky chemické a fyzikální, např. močovina, pokles koncentrace vápenatých iontů nebo vyšší teplota (Wallin M, Ekstrom M a Garoff H, 2005). Po kontaktu SU a buněčného receptoru dojde k aktivaci disulfid izomerasy a disulfidová vazba mezi SU a TM je nahrazena SU intramolekulárním S-S můstkem, za využití do té doby nepřístupné thiolové skupiny. Tím fakticky dochází k disociaci SU. TM poté preferenčně zaujímá energeticky výhodnější pozici, ve které jsou vystaveny dříve skryté hydrofobní oblasti (Markovic I et al., 2004). Oproti jiným virům je tento způsob vstupu do buňky nezávislý na acidifikaci, kterou vyžadují pro fúzi viry využívající endozomální cestu. Výjimkou z tohoto pravidla jsou ptačí retroviry, u kterých interakce SU s receptorem nestačí a je jakýmsi předstupněm či částečným aktivátorem před samotnou aktivací nízkým endozomálním pH (Mothes W et al., 2000). Po odpláštění na cytoplazmatické membráně se kapsida rozpadá a vzniká PIC a spouští se reverzní transkripce.



Obr. 3

Vstup retroviru do buňky

(Převzato ze John B. Carter, Venetia A. Saunders: *Virology -Principles and Applications-*, John Wiley and Sons Ltd., 2007)

2.1.4.2 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce se spouští ihned po rozbalení virionu za předpokladu, že je k dispozici dostatek nukleotidů, tRNA a adenosin trifosfátu (ATP). Samotná tvorba DNA intermediátu se skládá z následujících kroků (Gilboa E et al., 1979):

- 1) První vzniklé vlákno DNA bude *antisense* (-). Do oblasti PBS umístěné na 5'konci virové RNA se naváže tRNA *primer* a na jeho 3'konci začne RT syntézu DNA reverzní transkripcí U5 a R regionů směrem k 5'konci templátu. Takto vzniká *minus strand strong stop* DNA.
- 2) Dochází k translokaci vznikajícího vlákna na 3'konec templátu za současné degradace již transkribované RNA, kterou obstarává RT. Na 3'konci templátu dochází k párování bazí R oblastí a syntéza pokračuje. Vznikající (-) vlákno tedy začíná sekvencí PBS, U5, R, U3. Transkripce pokračuje až k místu, kde dříve nasedal tRNA *primer*, přičemž RNA je opět degradována, s výjimkou oblasti PPT. Ta slouží v dalším kroku jako *primer* pro syntézu *sense* vlákna.
- 3) Nyní je PPT využit jako primer pro syntézu *sense* vlákna. Jelikož je s *antisense* vláknem spárován v jeho 5'koncové oblasti, běží syntéza ve směru U3, R, U5, a zastavuje se v oblasti PBS komplementární tRNA. Oblast PPT byla již degradována a vzniká *plus strand strong stop* DNA. tRNA *primer* je ribonukleázovou aktivitou RT odstraněn.
- 4) Dochází k druhé translokaci, při níž je 3'konec (+) vlákna přiložen ke 3'konci (-) vlákna v oblasti PBS. Jelikož 5'konec (+) vlákna nyní přečnívá, může být dosyntetizován (-) LTR. Začne tedy elongace obou vláken. Výsledkem je tedy, ve smyslu pohledu na *sense* DNA intermediát, vlákno se sekvencí ve směru 5'=> 3': U3 – R – U5 – PBS, genová oblast, U3 – R – U5. Oblasti U3 – R – U5 jsou nazývány LTR.

2.1.4.3 Integrace do genomu

Integrace do genomu buňky je nezbytným krokem pro zajištění životaschopnosti viru, jelikož neintegrováná DNA je v komplexech špatně přístupných RNA polymerase (Sakai H et al., 1993.). Kromě lentivirů a spumavirů vyžadují retroviry k integraci rozpad

jaderné obálky během mitózy (Lewis PF, Emerman M, 1994; Roe T et al., 1993; Miller DG, Adam MA a Miller AD, 1990). U HIV, který vstupuje i do jádra nedělících se buněk, je situace složitější a doposud není zcela objasněna (Bukrinsky MI et al., 1992). Bylo navrženo několik modelů, z nichž některé, popisující například úlohu MA a jeho fosforylace, již byly vyvráceny (Gallay P et al., 1995; Freed EO et al., 1997; Kootstra NA a Schuitemaker H, 1999; Reil H et al., 1998). Samotná integrasa sice obsahuje jaderný lokalizační signál, ale nezdá se, že by hrála rozhodující roli v importu PIC do jádra (Gallay P et al., 1997; Limon A et al., 2002). Jiné modely navrhují účast proteinu PIC Vpr v transportu pomocí nukleoporinů, ke kterým se váže (Fouchier RA et al., 1998; Iijima S et al., 2004). Jako negativní transportní faktor byl navržen CA (Yamashita M a Emerman M, 2004). Byla sice potvrzena důležitost MA a jeho jaderného lokalizačního signálu, ale jeho regulační funkce není zřejmě nepostradatelná (Haffar OK et al., 2000; Yamashita M a Emerman M, 2005). Vlastní integraci provádí IN, která rozpoznává trojici nukleotidů ATT koncové oblasti LTR a odstraňuje TT z obou 3' konců. Transesterifikační reakcí, bez potřeby ATP, jsou 3' konce virové DNA kovalentně připojeny k DNA hostitelské. Každé vlákno je napadeno na jiném místě a mezi místy integrace je tedy několik bazí. Různé viry preferují různá místa integrace do hostitelské DNA. 5' konce jsou připojeny opravnými mechanismy hostitele, stejně tak i doplnění chybějících bazí, což vede k duplikaci několika bazí hostitelské DNA, a to z obou stran (Vora AC et al., 1997; Bushman FD a Craigie R, 1990).

2.1.4.4 Transkripce provirové DNA

LTR sekvence obsahuje silnou promotorovou oblast. Konkrétně jde o U3 oblast, v níž leží jak promotory TATA box a CCAAT box, tak zesilovače transkripce (*enhancery*) (Speck NA a Baltimore D, 1987; Ryden TA a Beemon K, 1989). Některé retroviry jsou transkribovány víceméně konstitutivně, jiné jsou závislé na hormonální regulaci. Transkripci zajišťuje RNA polymerasa II. Vznikající virová RNA podstupuje standardní úpravu mRNA: *capping* 5' konce a polyadenylaci 3' konce.

2.1.4.5 Sestřih virové mRNA

Nesestřižená mRNA, čili pre-mRNA, normálně setrvává v jádře, dokud sestřih neproběhne a jejímu exportu z jádra je bráněno. Nesestřižená mRNA slouží k syntéze Gag polyproteinu. V blízkosti 3' konce obsahuje konstitutivní exportní elementy (CTE), které jsou rozpoznávány hostitelskými proteiny, které vytvoří komplex pro export RNA z jádra. U M-PMV se nalézají mezi *env* a LTR (Bray M et al., 1994). Gen *env* je translatován ze sestřižené mRNA. Tak vznikají také pomocné regulační proteiny účastné v replikaci a podílející se na infektivitě komplexních retrovirů, jako je tomu v případě HIV-1. Třetí možný osud syntetizované RNA je asociace s NC a inkorporace do virionů.

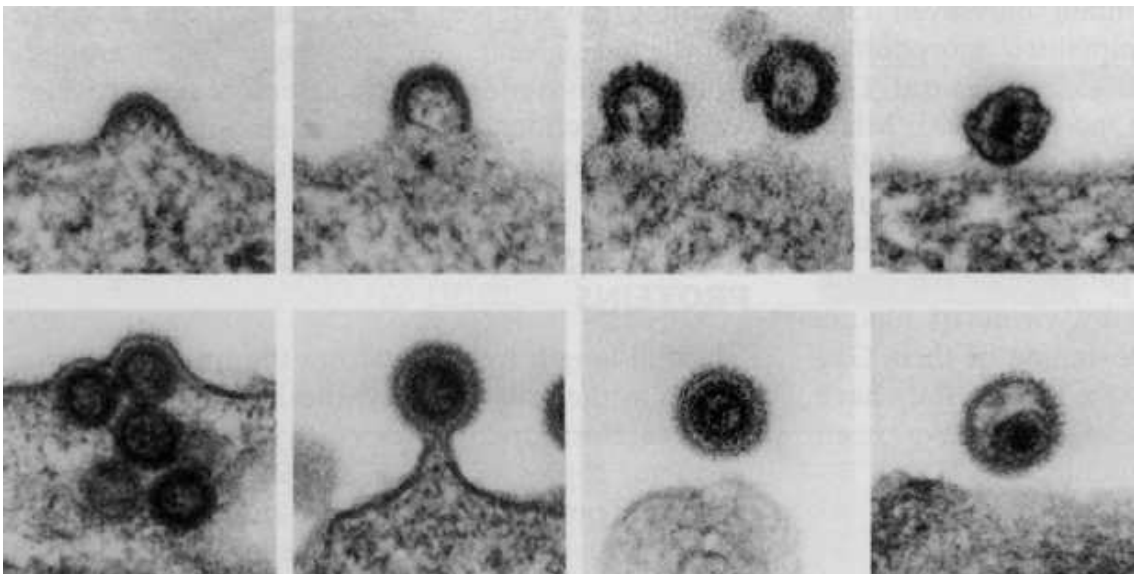
2.1.4.6 Translace virové mRNA

Translace genu *env* probíhá v drsném endoplazmatickém retikulu, odkud je následně transportován do Golgiho aparátu, kde je glykosylován a proteolyticky štěpen na SU a TM (Bradac J a Hunter E, 1986). Naproti tomu syntéza hlavních strukturních proteinů probíhá na volných ribozomech. Nesestřižená RNA má většinou tři čtecí rámce. Posun čtecího rámce z Gag na Gag-Pro-Pol/Gag-Pol spouští tvorba vlásenkových struktur v blízkosti terminačního kodonu (Staple DW a Butcher SE, 2003; Jacks T et al., 1988). Většinou vzniká produkt Gag, ale minoritně také Gag-Pro a asi v 1% případů dochází k pročtení sekvence až do genu *pol* a vzniká Gag-Pro-Pol (Bradac J a Hunter E, 1984). Hlavní polyprotein bývá na aminoterminálním glycinu často kotranslačně myristoylován myristoyl-CoA transferasou (Henderson LE, Krutzsch HC a Oroszlan S, 1983). Stejně je tomu u M-PMV.

2.1.4.7 Sestavování a pučení virionů z buňky

Nezralé viriony se sestavují asociací Gag polyproteinů a RNA. Z hlediska topologie tohoto procesu rozlišujeme retroviry skládající viriony v cytoplazmě a na fosfolipidové membráně (obr. 4), buď cytoplazmatické, nebo endoplazmatického retikula (Hunter E, 1994). Cílení na místo skládání zajišťují různé signály. U HIV (morfogenetický typ C) je to dvojitá signalizace: bazická oblast a myristoyl, které cílí HIV Gag k membráně, kde

molekuly asociují a postupně vychlipují cytoplazmatickou membránu (Zhou W et al., 1994). Naproti tomu u M-PMV (morfo-genetický typ D) je sice přítomnost myristoylu nutná k zaujetí konformace vhodné pro transport, ale vlastním signálem k cílení, v tomto případě do pericentriolární oblasti je *cytoplasmic targeting/retention signal* (CTRS) sekvence, jíž váže molekulární motor dynein (Sfakianos JN, LaCasse RA a Hunter E, 2003; Vlach J et al., 2008). Vazba na membránu je zajišťována synergickým působením myristoylu, který se hydrofobně váže k lipidovým komponentám cytoplazmatické membrány a bazické oblasti, která zase váže fosfátové skupiny fosfolipidů. Odškrcení pučícího virionu od membrány obstarává interakce PP a buněčných proteinů.



Obr 4.

Na elektron-mikroskopických snímcích horní řady je zachyceno pučení virionů retroviru typu C. V dolní řadě pučící viriony retroviru typu D.

(Převzato z Coffin J., Hughes S. a Varmus H.: *Retroviruses*, Cold Spring Laboratory Press, 1997)

2.1.4.8 Maturace virionů

Ke zrání virionů dochází až mimo buňku a hlavním činitelem tohoto procesu je aspartátová proteasa PR. PR štěpí Gag na jednotlivé proteiny, jakožto i gp22 na gp20 a gp2 (Vogt VM, 1996). U retrovirů typu C se pravděpodobně podílí na funkci myristoylového

proteolytického přepínače, kdy po akci PR se sníží afinita MA k membráně a ten pak může být uvolněn do cytoplazmy hostitelské buňky (Hermida-Matsumoto L a Resh MD, 1999). Mechanismus aktivace PR je stále nejasný. Neatraktivnějším vysvětlením je v současnosti vliv změny pH při opuštění buňky a následná změna některých interakcí uvnitř Gag, které původně aktivaci PR brání. Struktura zralého virionu je od nezralého odlišná: nezralé viriony mají po obvodu elektron-denzní prstenec oproti elektron-lucentnímu centru. U zralých virionů je centrální část *core* více vzdálena od obalu, celá struktura je více kondenzovaná a *core* má taxonomicky charakteristické uspořádání.

2.2 Mason-Pfizerův opičí virus

M-PMV je vhodným modelem pro studium procesů z životního cyklu retrovirů, protože má časově a prostorově odděleny procesy skládání a pučení virionů a navíc pro člověka není nebezpečný. Původně byl izolován z prsního karcinomu *Macaca mulatta*, je však neonkogenní a u makaků vyvolává fatální imunodeficienci. Je to jednoduchý retrovirus z rodiny betaretrovirů. Je morfogenetického typu D a má tedy cylindrické *core*. Jako primer pro reverzní transkripci využívá lyzinovou tRNA.

2.2.1 Strukturní proteiny M-PMV

Proteiny M-PMV jsou syntetizovány ve formě společných prekurzorů. V následujícím přehledu jsou popsány jejich vlastnosti a funkce jak v rámci těchto prekurzorů, tak jako již solitérních, zralých proteinů.

2.2.1.1 Fosfoprotein (pp16)

PP vzniká odštěpením C-terminální části z prekurzoru pp24. Jak název napovídá je fosforylován a jeho hlavní úloha spočívá ve zprostředkování odškrcení pučícího virionu od cytoplazmatické membrány. Hlavní oblasti PP důležité pro jeho funkci jsou tzv. pozdní domény – *late domains*. Tyto domény nejsou specialitou ani M-PMV, ani retrovirů, ale

vyskytují se u mnoha pučících virů, například u Ebola viru či viru vztekliny. Jedna z těchto domén však obsahuje PPPY motiv, který je konzervovaný u mnoha retrovirů (Gottwein E et al., 2003).

2.2.1.2 Proteiny p12 a p4

p12 napomáhá svým leucinovým zipem sestavování virionů (Sommerfelt MA, Rhee SS a Hunter E, 1992). p4 je na proliny bohatý protein, který se rovněž spolupodílí na stabilizaci molekul Gag a jejich sestavování ve virovou částici (Bradac J a Hunter E, 1984).

2.2.1.3 Kapsidový protein (p27)

CA tvoří kapsidu, která má druhově typickou geometrii a je hydrofobní schránkou pro genomovou RNA a enzymy retroviru. CA jako protein, vedle glykoproteinů, je patrně nejsilnějším antigenem virů obecně. Vznikající strukturní podjednotky nazýváme protomery. Protomery mají schopnost se samy sestavit do uspořádané struktury *in vitro*. CA sestává z N-terminální a C-terminální domény. C-terminální doména je dimerizační a stabilizuje interkce mezi jednotlivými molekulami Gag během skládání. C-terminální doména je hlavním prvkem v určení geometrie kapsidy (Ganser-Pornillos BK, Cheng A a Yeager M; 2007).

2.2.1.4 Nukleokapsidový protein (p14)

Tento protein vytváří pevný komplex s RNA a je klíčový pro inkorporaci RNA do vznikajících virionů. K asociaci (+)RNA vláken s NC dochází pravděpodobně již při vzniku nascentního polypeptidu Gag. Vlastní vazbu RNA zajišťuje jeho motiv zinkových prstů ohraničený bazickými oblastmi – tzv. I doména (Cimarelli A et al., 2000). NC je též zodpovědný za dimerizaci RNA (Muriaux D et al., 2004).

2.2.1.5 Env proteiny

Jsou tvořeny formou prekurzoru Env (pr 86), který je v Golgiho aparátu glykosylován a proteolyticky štěpen hostitelskou proteasou furinem (Dong J et al., 1992; Bradac J a Hunter E, 1986). Výsledné produkty jsou vystaveny na povrchu cytoplazmatické membrány, kde se později obalí pučící viriony. Glykoproteiny jsou SU (gp 70) a TM (gp 20). SU je bohatě glykosylován a plní funkci ligandu. Jeho cukerné zbytky definují spektrum potenciálních hostitelů daného retroviru. Jako druhotná funkce je mu přisuzována ochrana virionu před protilátkami. TM je rovněž glykoprotein, jehož konformační proměna je podstatou splynutí membrán (viz kap. 2.1.4). TM (gp22) podstupuje při maturaci druhou proteolytickou úpravu, tentokrát virovou, nikoliv hostitelskou proteasou (Green N et al., 1981). Při ní je z jeho karboxylového konce odštěpeno 17 z 38 aminokyselin jeho cytoplazmatické domény, za histidinem 21, a tak vzniká finální TM (gp20). Druhá proteolytická úprava je nezbytná pro jeho fúzogenní funkci (Brody BA, Rhee SS a Hunter E, 1994; Rein A et al., 1994).

2.2.1.6 Matrixový protein (p10)

MA vytváří první proteinovou vrstvu pod virovým obalem, s kterým je asociován. Tvoří N-terminální část Gag polyproteinu a je hlavním determinantem morfogenetického typu. N-terminální glycin MA je cílem kotranslační myristoylace myristoyl-CoA transferasou. Seriny a threoniny MA bývají fosforylovány hostitelskými kinasami asociovanými s membránou. Ty se mohou vyskytovat i ve virové částici, do které se dostávají různé hostitelské proteiny vyskytující se v místě skládání. Úloha fosforylace MA v životním cyklu M-PMV je, stejně jako v případě jiných retrovirů, předmětem diskuze. Podle některých autorů může být aktivátorem jaderné lokalizační funkce MA, který takto může cílit PIC do jádra. Podstatou této změny je získání záporného náboje a disociace od membrány, neboť samotný myristoyl nestačí na udržení MA při membráně. MA je pak dostupný pro asociaci s PIC a jeho směřování k jádru.

2.2.1.6.1 Funkce MA

Kromě vazby na membrány, má MA M-PMV ještě následující funkce:

Cílení PIC do jádra

Je studováno zejména u retrovirů schopných infikovat i nedělící se buňky. V těchto případech se zdá být jedním z významných faktorů jaderný lokalizační signál MA. M-PMV však patří mezi viry, které nejsou schopny infikovat nedělící se buňky. Respektive PIC musí setrvat v cytoplazmě dokud nedojde k dezintegraci jaderné obálky. Jeho stabilita je však omezená a po určité době je degradován (Andreadis ST et al., 1997; Miller DG, Adam MA a Miller AD, 1990). Tato funkce je zatím málo objasněna.

Cílení polyproteinů Gag na místo skládání virové částice

Tento problém je u M-PMV velmi dobře prostudován díky mutačním studiím, a to hlavně mutanru R55F, o kterém je pojednáno dále. MA obsahuje v jedné ze svých smyček CTRS sekvenci s argininem 55 (Yasuda J a Hunter E, 2000). Tato oblast je nepostradatelná pro interakci s transportním systémem – dyneinem, konkrétně s jedním z jeho lehkých řetězců Tctex-1 (Vlach J et al., 2008). Dyneinový komplex transportuje Gag molekuly na místo skládání virových partikulí, tj. do pericentriolární oblasti. Ta je v těsné blízkosti mikrotubuly organizujícího centra a je jakýmsi transportním ústředím.

Inkorporace TU a SM

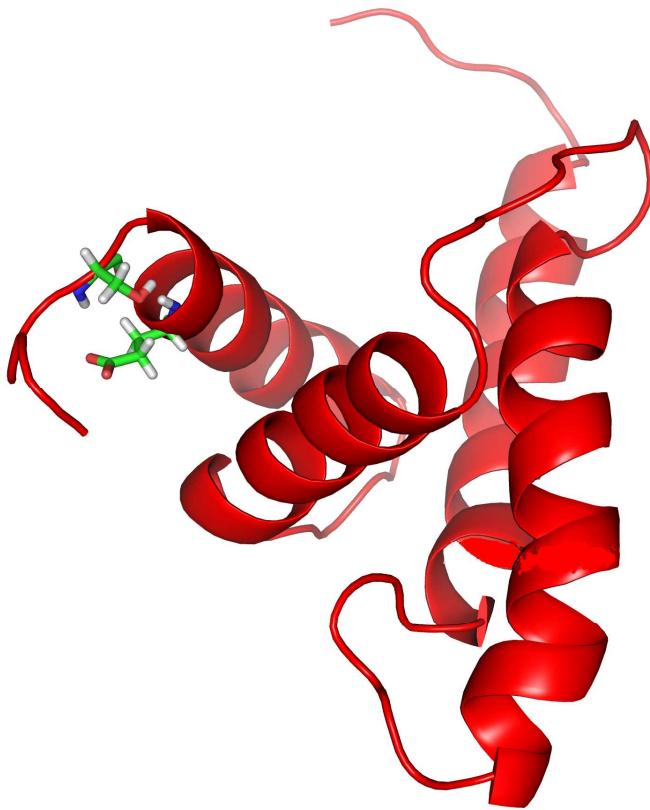
Oba proteiny jsou nekovalentně spojeny. Cytoplazmatická doména TM pravděpodobně interaguje s MA, který jej inkorporuje do obalu pučícího virionu (Song C, Dubay SR a Hunter E, 2003). Je také důležitý pro jeho druhou proteolytickou úpravu během maturace.

2.2.1.6.2 Struktura MA

MA M-PMV se svojí sekundární a terciární strukturou podobá MA jiných retrovirů, jako např. RSV (*Rous sarcoma virus*) či HTLV (*Human T-lymphotropic virus*), a to i přes

nízkou homologii ve struktuře primární. Je to globulární protein, s volným C-koncem.

Tvoří jej 100 aminokyselin a skládá se ze čtyř alfa-helixů propojených smyčkami (Conte MR et al., 1997). Prvních šest aminokyselin (amk) tvoří flexibilní konec. Helix 1 (17 amk) hydrofobně interaguje s helixem 2 (14 amk). Mezi nimi je první smyčka o délce 5 amk, druhá má 10 amk. Třetí helix má 17 amk a následující smyčka je tvořena 7 amk. Poslední, čtvrtý helix sestává z 18 amk. Helixy 1 a 2 jsou téměř kolmé k helixům 3 a 4. V molekule se nachází dvě bazické domény, N- a C-koncová. N-terminální bazická oblast se vyskytuje i u jiných MA a její kladný náboj se spolupodílí na vazbě virové partikule na membránu – tzv. M-doména.

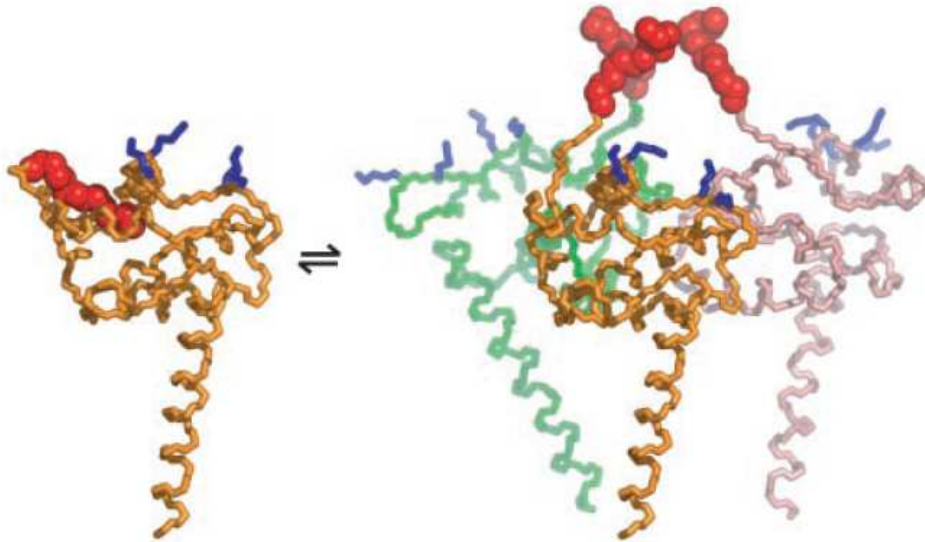


Obr. 5

MA M-PMV s vyznačeným Ser 6 a Glu 9 na N konci.

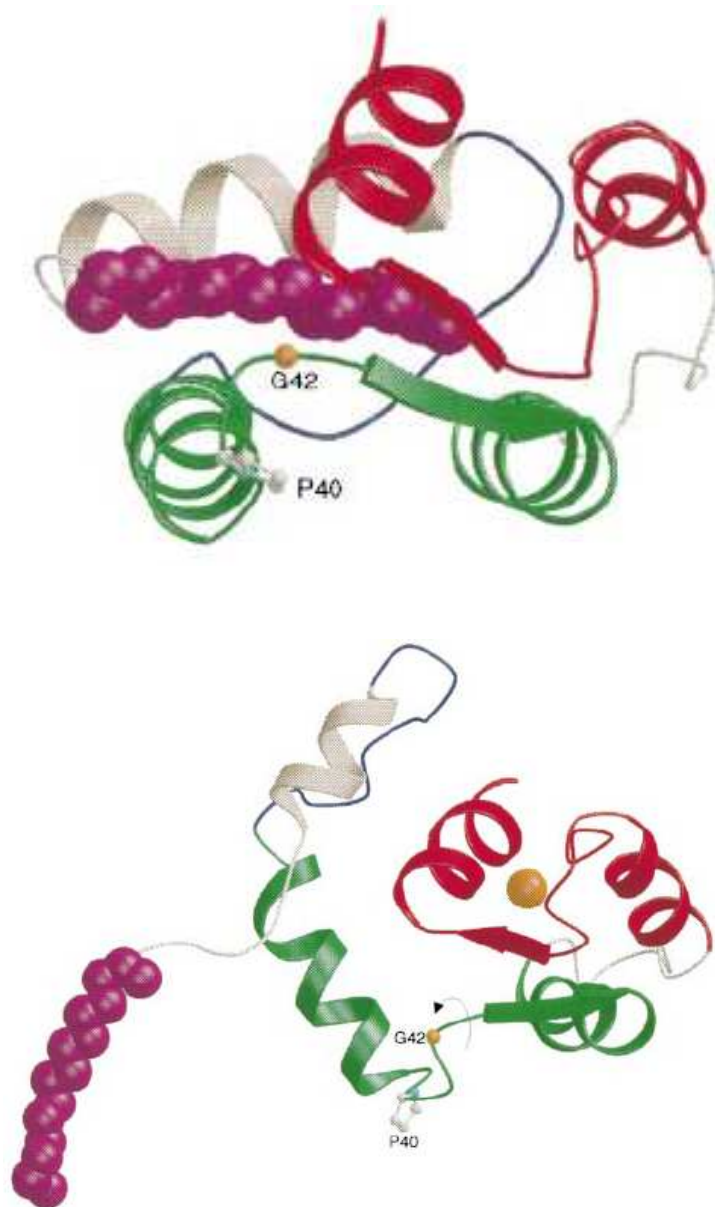
2.2.1.6.3 Myristoylový přepínač

Jde o mechanismus využívající myristoyl proteinů k jejich řízené a vratné vazbě na membrány. Je známo několik způsobů ovládní tohoto přepínače. Fyzickým podkladem je buď konformační proměna indukovaná proteolyticky nebo vazbou ligandu (obr. 7), změna entropie při oligomerizaci (obr. 6), anebo změna elektrostatického náboje. Současný výzkum se snaží najít odpověď na otázku, který z těchto funkčních modelů je platný pro MA M-PMV a jaký je jeho přesný mechanismus. Již byl navržen model ovládní ligandem, kterým jsou fosfátové skupiny fosfolipidů v membráně. Po vazbě bazické oblasti na membránu indukuje konformační změna vynoření myristoylu z hydrofobní kapsy. Přitom platí, že ani jedna z těchto vazebných interakcí by sama o sobě nebyla dostatečně silná k udržení asociace Gagů s membránou, potažmo virovým obalem (Peitzsch RM a McLaughlin S, 1993). U HIV-1 byl navržen princip ovládní myristoylového přepínače změnou entropie (Tang C et al., 2004), ale i proteolyticky (Hermida-Matsumoto L a Resh MD, 1999). Myristoyl, pokud molekuly MA oligomerizují, je ve výchozí pozici orientovaný vně a slouží jako transportní signál. Ve formě trimerů s exponovanými myristoylovými zbytky se váže na membránu (Morikawa Y et al., 1998). Po vypuštění z buňky PR tento přepínač deaktivuje, interakce MA s membránou se zeslabí a může tak být k dispozici pro další své úlohy po vstupu do nově infikované buňky. Další funkce myristoylu má přímý vztah ke struktuře MA, respektive k její stabilizaci. Rozdíly v terciární struktuře MA HIV s myristoylem a bez myristoylu jsou minimální. Malý vliv myristoylu na proteinovou strukturu byl potvrzen i pro některé neuronální vápníkové senzorké proteiny (*neuronal calcium sensor proteins* – NCS proteiny), konkrétně pro NCS-1 kvasinkový (*fission yeast*) homolog (Lim S et al., 2011) a pro recoverin (Ames JB et al., 1997). Přesto je myristoyl MA M-PMV, který je ještě součástí Gagů, nutný k transportu jeho nezralých částic, neboť přispívá ke správné konformaci. Podobně jako u HIV-1, je zřejmě spolu s bazickou oblastí signálem k transportu k membráně, ale tento signál je před sestavením nezralého virionu potlačen dominantní úlohou CTRS sekvence a uplatňuje se pouze při její absenci, jako je tomu v případě mutantu R55F (viz kap. 2.4) (Rhee SS a Hunter E, 1997). Na jeho transportu se podílí recyklační endocytická dráha a Env proteiny (Sfakianos JN, Hunter E, 2003). Strukturní studium myristoylovaného MA M-PMV v současnosti probíhá.



Obr. 6

Myristoylový přepínač ovládaný změnou entropie při oligomerizaci MA HIV-1. (Převzato z Tang C et al., 2004)



Obr. 7

Příklad ovládní myristolylového přepínače ligandem. N-terminální doména recoverinu bez navázaného (nahore) a s navázaným vápenatým iontem (dole). (Převzato z Ames JB et al., 1997)

2.3 Mutace MA HIV-1

Byly identifikovány oblasti nezbytné pro udržení schopnosti viru sestavovat infekční částice a vypučet z buňky. Klíčové byly shledány domény 55-59, 84 - 95 a prvních šest aminokyselinových zbytků. Jediná aminokyselinová záměna v těchto regionech vede buď k potlačení schopnosti formovat viriony – to se týká mutací v aminoterminální oblasti, obsahující myristoylační signál a mutací ovlivňujících stabilitu Gag proteinu, např. L50A/L51A, nebo ke změně místa skládání, kdy částice pučí do intracytoplazmatických vakuol. To způsobují mutace R39E/R43E, L85R, Y86G, C87D, V88E a H89G (Freed EO et al., 1994; Cannon PM et al., 1997).

Byly také zjištěny mutace (W16A, L21K, W36A), které zesilují vazbu na membránu a jsou tak schopny zrušit účinek mutací s právě opačným efektem (L8A, C57S, I60E) (Paillart JC a Gottlinger HG, 1999).

2.4 Mutace MA M-PMV

2.4.1 G2A

Glycin v pozici 2 je společným znakem všech myristoylovaných proteinů. Je součástí myristoylačního signálu M-G-X-X-X-S/T a na něj je také myristoyl přenášen myristoyl-CoA transferasou po odštěpení methioninu 1 methionyl aminopeptidasou (Maurer-Stroh S, Eisenhaber B a Eisenhaber F, 2002). Sestavování není narušeno, ale virové partikule obsahující tento mutant se hromadí v cytoplazmě. Touto mutací tedy byla prokázána důležitost myristoylace pro uskutečnění transportu nezralých virionů k cytoplazmatické membráně (Rhee SS a Hunter E, 1987).

2.4.2 A18V, A79V, T69I

Tyto mutace jsou fenotypově podobné mutaci G2A. Stabilita Gag ani schopnost sestavit virion není narušena, ale transport k membráně je omezen, i když v malé míře

probíhá (Rhee SS a Hunter E, 1991). Potlačení schopnosti transportu není tak výrazné, jako v případě mutantu G2A.

2.4.3 P43L, P72S

Proliny se zdají být důležité pro stabilitu Gag proteinu a tím zřejmě i pro efektivitu procesu skládání virionů. Tyto mutanty mají výrazně sníženou schopnost sbalit Gag a sestavit virovou částici. Tím se výrazně snižuje infektivita virionů, nicméně není nulová (Rhee SS a Hunter E, 1991).

2.4.4 T41I/T78I

Tento dvojitý mutant patrně ukazuje důležitost správné funkce myristoylového zbytku pro interakci s cytoplazmatickou membránou a následné vypuštění virionů. Pokud jsou threoniny, normálně exponované na povrchu Gag molekuly, nahrazeny hydrofobními izoleuciny, které se zanoří do centra proteinové globule MA, je hydrofobní interakce mezi myristoylem a jádrem proteinu tak silná, že je omezena možnost vynoření myristoylu z hydrofobní kapsy a být tak k dispozici k vazbě MA na membránu. Viriony, které obsahují tyto mutanty, se skládají a transportují k cytoplazmatické membráně normálně, ale nevypučí a hromadí se pod ní (Rhee SS a Hunter E, 1991). Stejný fenotyp byl pozorován u mutantů Y11F a Y28F, přičemž jeho fyzikálně-chemická podstata je pravděpodobně stejná (Stansell E et al., 2004).

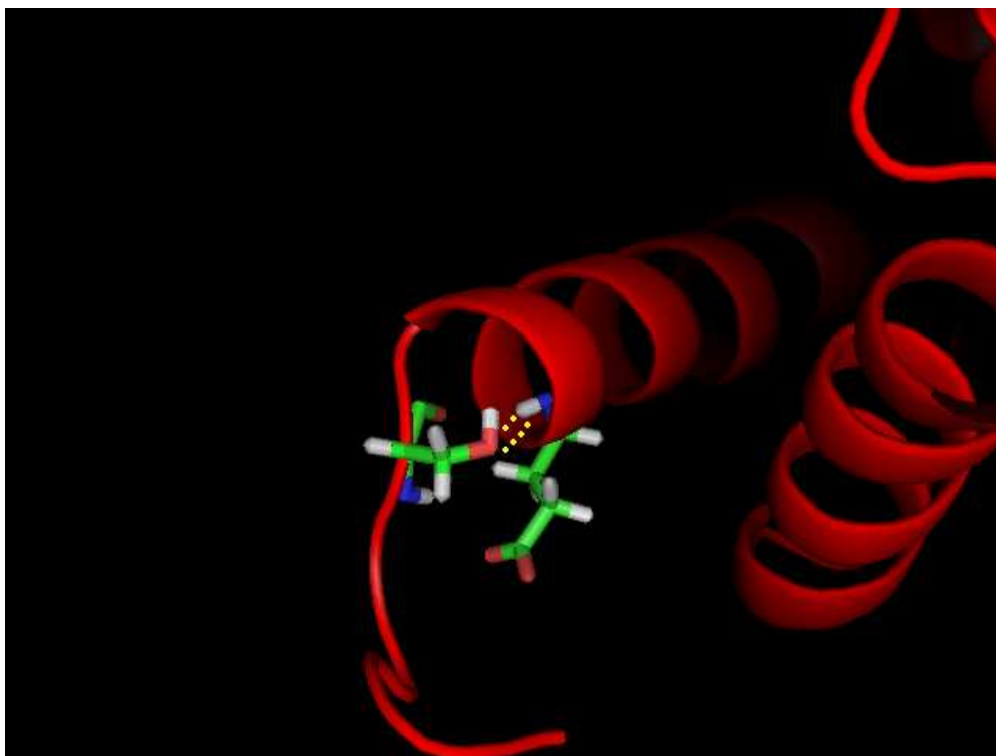
2.4.5 R55F, R55W

Mutace argininu 55 pomohly objasnit mechanismus směřování Gag proteinů do místa skládání ve virových částic. Jediná bodová mutace v tomto místě způsobila změnu tohoto místa z pericentriolární oblasti pod membránu (Rhee SS a Hunter E, 1990). Tedy *de facto* změnu z morfogenetického typu D na C. Bylo zjištěno, že R55 je součástí CTRS sekvence (viz výše), prostřednictvím níž interaguje Gag s molekulárním motorem dyneninem, který Gag následně transportuje na místo skládání. Struktura mutantu R55F

byla vyřešena a bylo zjištěno, že na rozdíl od WT MA, který má tento signál exponovaný na povrchu molekuly, dochází vlivem mutace k jeho částečnému zneprístupnění a tím pádem k znemožnění interakce s dyneinem (Vlach J et al., 2008). Výsledkem je nefunkčnost transportu Gag k jádru buňky, čímž se otevírá prostor pro standardní transport k membráně, kde dochází ke skládání virových kapsid, podobně jako u typu C.

2.4.6 S6A

Na mutantu S6A, který je předmětem této diplomové práce, je prováděna strukturní analýza s cílem objasnit mechanické vlastnosti N-koncové oblasti MA M-PMV a přispět k pochopení molekulárního mechanismu myristoylového přepínače. Mezi hydroxylovou skupinou postranního řetězce serinu 6 a aminoskupinou glutamátu byla ve struktuře WT MA objevena vodíková vazba (obr. 8) (Vlach J et al., 2008). Tato vodíková vazba patrně pomáhá stabilizovat celý N-konec MA.



Obr. 8

Detail studované N-koncové oblasti MA M-PMV se znázorněným Ser 6 a Glu 9 v naznačené interakci. Kyslíkové atomy jsou vyznačeny červeně, dusíkové modře a vodíkové bíle.

3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je příprava rekombinantního vzorku mutantu S6A MA M-PMV a objasnění strukturních změn oproti struktuře divokého typu (*wild-type* - WT) pomocí nukleární magnetické rezonanční spektroskopie (NMR spektroskopie). Dále na základě této analýzy prohloubit pochopení vztahů struktury a funkce matrixového proteinu retrovirů a důsledků těchto vztahů pro jejich životní cyklus. Zpracovaná experimentální data poslouží pro další kroky studia jak mutantu S6A, tak MA M-PMV jako takového.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Přístroje

analytické váhy: Sartorius

aparatura pro elektroforetickou separaci DNA: Horizon 11.14 Gibco BRL

aparatura pro elektroforetickou separaci proteinů: MiniProtean III BioRad

inkubační blok: Thermolyne 17600

koncentrační kyvety: Centricon (*cut-off* 3 kDa), Amicon Millipore

kývačka: KS 125 IKA Labortechnik

laminární box: Clean Air Woerden

NMR spektrometr: Bruker 600 Avance III

odsolovací kolony: Sephadex-PD 10 GE Healthcare

odstředivky: Beckman J2-MC, Hettich EBA 12R, Eppendorf 5415C

orbitální inkubátor: Gallenkamp

PCR aparatura: Techne Cyclogene FPHC3MD

pH metr: inoLab pH Level 1 WTW

předvážky: AND

spektrofotometr: Unicam Helios α

sonikátor: Microson UL

vortex: IKA Labortechnik

4.1.2 Chemikálie

Základní použité chemikálie a výrobci jsou uvedeny v tabulce. Všechny ostatní chemikálie, jako např. soli pro přípravu pufovacích roztoků, jsou od výrobce Sigma. Plazmid pEMAPPHis je odvozený z plazmidu pET-22b od firmy Novagen a poskytl jej Dr. Ing. Jan Lipov z Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT v Praze. Rekombinantní proteasu PR M-PMV poskytl Ing. Jan Prchal tamtéž.

Tab. 2: Použité chemikálie a výrobcí

ampicilin	Biotika Slovenská Lupča
akrylamid	Sigma
agarosa	BioRad
bis-akrylamid	BioRad
bromfenolová modř	Lachema
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma
DNasa I	Roche
DNA polymerasa Pfu	Fermentas
DNA polymerasa RedTaq ready mix	Sigma
deoxycholát sodný	Sigma
dithiothreitol (DTT)	Sigma
dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma
Dpn I restriční endonuklesa	New England BioLab
ethidium bromid	BioRad
glycerol	Penta
isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Sigma
kvasničný autolyzát	Serva
lysozym	Fluka
NEB 4 pufr	New England BioLab
Ni-NTA agarosa	Qiage
oligonukleotidy	Sigma
peroxodisíran amonný (APS)	Sigma
RNasa A	Roche
směs inhibitorů proteas	Complete Roche
standard molekulových hmotností	Broad Range BioRad
TBE pufr	Sigma
technický agar	Oxoid
thiamin	Sigma
tricin	Sigma
Tris base	Sigma
¹³C glukosa	Spectra Stable Isotopes
¹⁵N chlorid amonný	Spectra Stable Isotopes

4.1.3 Komerční kity

QIAfilter Plasmid Midi Kit Qiagen

QIAquick PCR Purification Kit Qiagen

4.1.4 Buněčný materiál

Escherichia coli: BL21 (DE3) a DH5 α , Invitrogen, z mikrobiologické sbírky Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT v Praze. Kompetentní buňky byly připraveny metodou dle Cohena za použití chloridu vápenatého (viz disertační práce Struktura a funkce proteinů retrovirové kapsidy, Ing. Jan Lipov, Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT v Praze, 2006).

4.1.5 Roztoky

minimální médium M9 (1 l)

1 ml 1M MgSO₄

1 ml 0,1M CaCl₂

1 ml 1M thiamin

10 ml 20% glukosa (w/w)

10 ml 50% NH₄Cl (w/w)

100 ml 10x koncentrovaného solného roztoku M9

M9 – roztok solí (10x koncentrovaný, 1 l)

75 g Na₂HPO₄·2H₂O

30 g KH₂PO₄

5 g NaCl

pH = 7,4

LB médium (1 l)

10 g trypton

10 g NaCl

5 g kvasničný autolyzát

200 µl 5M NaOH

SOC médium (1 l)

20 g trypton

5 g kvasničný autolyzát

0,5 g NaCl

10 ml 250 mM KCl

5 ml 2M MgCl₂

20 ml 1M glukosa

pH = 7

vzorkový pufr SDS-PAGE (*Protein Gel Sample Loading Buffer – PLB*)

50mM Tris base

100 mM DTT

2% SDS (w/v)

0,1% bromfenolová modř

10% glycerol (w/v)

pH = 6,8

pufr pro SDS-PAGE gel

3M Tris base

0,3% SDS (w/v)

pH = 8,45

katodový pufr SDS-PAGE

100mM Tris base

100mM tricín

0,1% SDS (w/v)

anodový pufr SDS-PAGE

200mM Tris base

pH = 8,9

barvicí roztok gelů SDS-PAGE (1 l)

2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250

100 ml CH₃COOH

450 ml CH₃OH

odbarvovací roztok gelů SDS-PAGE (1 l)

100 ml CH₃COOH

250 ml CH₃OH

fosfátový lyzovací pufr

300mM NaCl

50mM fosfátový pufr

10mM imidazol

pH = 8

M-PMV proteasový pufr

100mM fosfátový pufr

900mM NaCl

pH = 6,25

pufr pro koncentrování vzorků

250mM NaCl

100mM fosfátový pufr

5mM DTT

pH = 6

vzorkový pufr pro NMR spektroskopii

250mM NaCl

100mM fosfátový pufr

5mM DTT

0,05% NaN₃

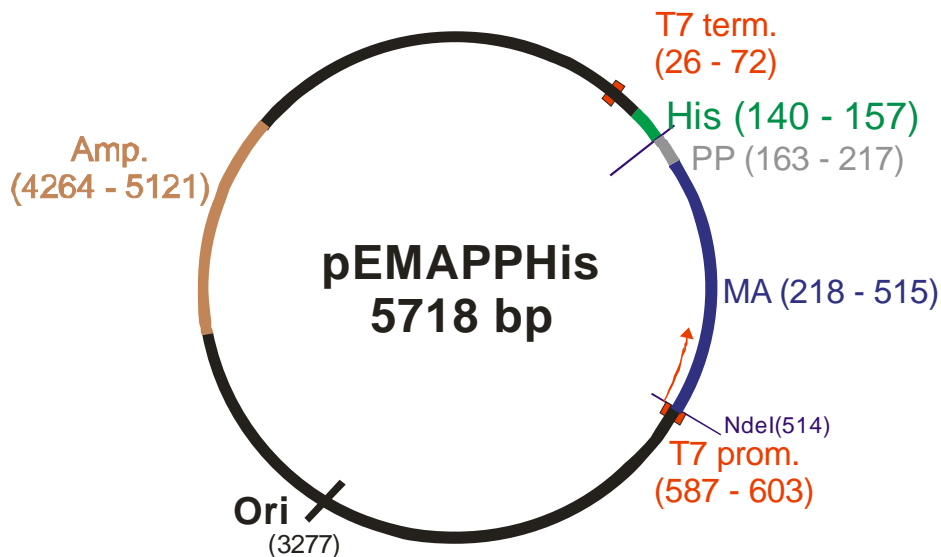
10% D₂O

pH = 6

4.2 Metody

4.2.1 Příprava konstruktů DNA

Jako předloha posloužil plazmid pEMAPPHis (Obr. 9), odvozený z plazmidu pET-22b od firmy Novagen, nesoucí gen pro MA a část genu PP mezi restrikčními místy Nde I a Xho I. S touto sekvencí byla do plazmidu vnesena další restrikční místa pro endonukleasy Mun I, Bsm I a Pac I. Za MA byl ponechán fragment PP (18 aminokyselin) z důvodu výhodné přítomnosti štěpného místa 13 kDa formy PR. Takto je možno při purifikaci proteinu metaloafinitní chromatografií na Ni-NTA agarose odštepit PP i s C-terminální histidinovou kotvou a získat pouze MA.



Obr. 9

Plazmid pEMAPPHis

Mutace byla do sekvence zavedena prostřednictvím polymerázové řetězové reakce (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), tzv. PCR mutageneze, tedy použitými primery (Obr. 11). Aminokyselinová sekvence MA M-PMV (NCBI NP_954557) WT/S6A, včetně iniciačního methioninu je:

Met Gly Gln Glu Leu **Ser/Ala** Gln His Glu Arg Tyr Val Glu Gln Leu Lys Gln Ala Leu Lys Thr Arg Gly Val Lys Val Lys Tyr Ala Asp Leu Leu Lys Phe Phe Asp Phe Val Lys Asp Thr Cys Pro Trp Phe Pro Gln Glu Gly Thr Ile Asp Ile Lys Arg Trp Arg Arg Val Gly Asp Cys Phe Gln Asp Tyr Tyr Asn Thr Phe Gly Pro Glu Lys Val Pro Val Thr Ala Phe Ser Tyr Trp Asn Leu Ile Lys Glu Leu Ile Asp Lys Lys Glu Val Asn Pro Gln Val Met

```

ATG GGG CAA GAA TTA AGC CAG CAT GAA CGT TAT GTA GAA CAA TTG
AAG CAG GCT TTA AAG ACA CGG GGA GTA AAG GTT AAA TAT GCT GAT
CTT TTG AAA TTT TTT GAT TTT GTG AAG GAT ACT TGT CCT TGG TTT CCG
CAA GAG GGA ACC ATA GAT ATT AAA CGG TGG CGT AGA GTA GGC GAC
TGT TTC CAA GAC TAT TAC AAT ACT TTT GGC CCG GAG AAA GTC CCA
GTA ACT GCA TTC TCT TAC TGG AAC TTA ATT AAA GAA TTG ATA GAT AAG
AAA GAA GTT AAC CCA CAA GTA ATG
  
```

Obr. 10

Nukleotidová sekvence genu p10 s vyznačeným místem mutace.

5'GATATACATATGGGGCAAGAATTA **GCC** CAGCATGAACGTTATGTAGAAC

5'GTTCTACATAACGTTTCATGCTG **GGC** TAATTCTTGCCCCATATGTATATC

Obr. 11

Primery pro kódující (*forward*-fwd) a čtecí vlákno (*reverse*-rev), nesoucí mutaci. Bílé oblasti patří do vlastní sekvence plazmidu.

4.2.1.1 PCR mutageneze

Při PCR mutagenezi jsme amplifikovali celý plazmid *long range* PCR. Použity byly zcela komplementární primery (viz obrázek výše) o délce 49 bp, s $T_m = 79,2^\circ\text{C}$. Výchozí koncentrace primerů byla připravena na 100 $\mu\text{mol/l}$.

reakční směs 1: 1 μl fwd primeru

1 μl rev primeru

8 μl NFW (*nucleases free water*)

reakční směs 2: 1 μl plazmidové DNA

9 μl NFW

směs do termocyklu:

1,5 μl směsi 1

1 μl směsi 2

1,5 μl 10mM směsi dNTP

5 μl 10x koncentrovaného pufru pro DNA polymerázu Pfu

1 μl DNA polymerázy Pfu

40 μl NFW

Po přidání Pfu již byla směs na ledu.

program termocyklieru:

1) 8 min. 95°C - počáteční denaturace

16 cyklů:

2) 40 min. 95°C - denaturace

3) 40 min. 60°C - hybridizace primerů

4) 9 min. 68°C - syntéza

5) 10 min. 68°C

6) 16°C - udržovací teplota

4.2.2 Izolace konstruktů DNA

4.2.2.1 Přečištění směsi s amplikonem

Izolace byla prováděna soupravou *QIAquick PCR purification kit* od firmy Qiagen. Princip užití metody je filtrace roztoku s fragmenty DNA o délce 0,1 – 10 kbp přes polopropustnou křemičitou membránu. Postupováno bylo dle přiloženého protokolu.

4.2.2.2 Inkubace směsi s amplikonem restriční endonukleázou

Protože templátová plazmidová DNA, pomnožená a izolovaná z bakteriálních buněk, je metylovaná, byla směs inkubována s endonukleasou Dpn I a templátová DNA tak odstraněna. Reakční směs obsahovala 10 µl směsi z PCR, 16,5 µl NFW, 3 µl 10x koncentrovaného pufru NEB 4 a 0,5 µl Dpn I. Inkubace probíhala při teplotě 37°C po dobu 30 minut.

4.2.2.3 Transformace a kultivace buněk *E. coli* DH5 α

Na -140°C zmražená suspenze buněk byla inkubována 10 minut v ledové tříšti umístěné v prostředí s pokojovou teplotou. Poté bylo do směsi přidáno 5 μ l roztoku s DNA a inkubováno 30 minut, přičemž směs byla stále na ledu. Po uplynutí této doby byly buňky vystaveny teplotnímu šoku umístěním do vodní lázně o teplotě 42°C na 45 sekund. Následovala opět inkubace na ledu, a to 2 minuty. Následně bylo do směsi přidáno 450 μ l SOC média o pokojové teplotě a celá směs přenesena do 10ml zkumavky a 1 hodinu resuscitována v orbitálním inkubátoru při 250 rpm a 37°C. Tato směs byla rozetřena na agarosové plotny s ampicilinem, které byly inkubovány v obrácené pozici při 37°C 16 hodin.

4.2.2.4 PCR narostlých bakteriálních kolonií (*colony* PCR)

Pro ověření úspěšné transformace jsme provedli *colony* PCR ze čtyř dobře narostlých a samostatných bakteriálních kolonií. Připravili jsme tedy čtyři vzorky s primery obsahujícími žádanou mutaci (*TrueMut*) a čtyři s primery se sekvencí WT (*FalseMut*) jako negativní kontrolu. Do 23,5 μ l NFW v mikrozkušavkách bylo přidáno 25 μ l komerční směsi Taq polymerasy *RedTaq ready mix*, která již obsahuje kromě enzymu i příslušný pufr a barvu pro agarosovou elektroforézu. DNA byla přidána ve formě NFW kontaminované příslušnou kolonií v objemu 2 μ l. Poslední složkou bylo 1,5 μ l směsi pozitivní nebo negativní kontroly. Roztok s primery byl 100 μ M. Jako *reverse* primer byla použita sekvence T7 terminátoru.

pozitivní kontrola:

1 μ l primerů *TrueMut* (fwd)

1 μ l T7 primerů (rev)

8 μ l NFW

negativní kontrola:

1 μ l primerů *FalseMut* (fwd)

1 μ l T7 primerů (rev)

8 μ l NFW

kontrolní oligonukleotidy:

TrueMut (fwd): 5' TACATATGGGGCAAGAATTA **GC**

FalseMut (fwd): 5' TACATATGGGGCAAGAATTA **AG**

T7 term. (rev): 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG

program termocyklu:

1) 5 min. 95°C - počáteční denaturace

25 cyklů:

2) 1 min. 95°C - denaturace

3) 1 min. 51 °C – hybridizace primerů

4) 1 min. 72 °C – syntéza

5) 16°C udržovací teplota

4.2.2.5 Agarosová elektroforéza

Byla provedena kontrolní agarosová elektroforéza vzorků z *colony* PCR, a to v TBE pufru s koncentrací ethidium bromidu 0,5 µg/ml a při konstantním napětí 5 V/cm. 1% gel byl vytvořen z 0,25 g agarosu, 25 ml TBE a 2 µl ethidium bromidu. Vizualizace se prováděla UV světlem ($\lambda = 254$ nm).

4.2.2.6 Kultivace buněk *E. coli* DH5 α

Do 70 ml sterilního LB média bylo přidáno 7 µl ampicilinu a ověřená bakteriální kolonie pozitivních transformantů. Tato směs byla kultivována v 250ml Erlenmeyerově baňce na orbitálním inkubátoru po cca 16 hod. 150 rpm a při teplotě 37°C. Po kultivaci byla kultura zcentrifugována 10 min, 5000g, 4°C a peleta zamražena.

4.2.2.7 Izolace plazmidové DNA z buněk *E. coli* DH5 α

K izolaci byla použita komerční souprava QIAfilter Plasmid Midi Kit od firmy Qiagen. Izolace probíhá na principu alkalické lyze, kdy chromozomální DNA a proteiny precipitují při neutralizaci alkalického roztoku. Precipitát je zcentrifugován a plazmidová DNA je navázána na pryskyřici. Postupováno bylo podle přiloženého protokolu. Vzorek výtěžku byl kontrolně sekvenován v Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT.

4.2.3 Exprese a purifikace rekombinantního MA v buňkách *E. coli* BL21

4.2.3.1 Transformace a kultivace buněk *E. coli* BL21

Transformace a kultivace buněk BL21 probíhala stejně jako DH5 α (kap. 4.2.2.3). Lišila se pouze objemem roztoku DNA přidávaného do transformační směsi, který byl v tomto případě 1 μ l.

4.2.3.2 Exprese izotopově značeného MA S6A v buňkách BL21

Kolonie transformovaných buněk jsme resuspendovali v 250 ml minimálního média M9 s ^{13}C glukosou jako jediným zdrojem uhlíku a ^{15}N chloridem amonným jako jediným zdrojem dusíku a přidavkem 0,25 ml ampicilinu. Počáteční optická denzita při 590 nm se pohybovala v rozmezí 0,07 – 0,15. Inkubace probíhala v orbitálním inkubátoru za teploty 37°C při 250 rpm po dosažení $\text{OD}_{590} = 0,6$. Poté jsme indukovali expresi MA přidáním 200 μ l IPTG do kultury a ponechali v inkubátoru za stejných podmínek 4 hodiny. Typická finální OD_{590} byla 1,5. Po expresi byla kultura zcentrifugována 10 min., 5000g a 4°C.

4.2.3.3 Dezintegrace buněk po expresi

Peleta buněk po expresi byla resuspendována ve fosfátovém lyzovacím pufru s přídatkem 50 mg lysozymu při celkovém objemu směsi 40 ml. Bylo přidáváno 800 μ l *Complete* na 750 ml výchozího inokula. Zásobní roztok *Complete* byl z jedné tablety rozpuštěné v 1 ml fosfátového lyzovacího pufru. Po promíchání následovala mikrosonikace směsi na ledu (2x 1 min., 1 min. na chlazení). Po přidání 400 μ l 10% deoxycholátu jsme nechali směs promíchávat na kývačce 1 hodinu. Následovalo 30 min. inkubace s 5 μ l RNasy A (finální koncentrace 2 μ g/ml) a 5 μ l DNasy (finální koncentrace 1 μ g/ml) I při 37°C. Závěrečným krokem byla centrifugace při 15 000 g, 15 min. a 4°C. Supernatant obsahoval fúzní protein MAPPHis.

4.2.3.4 Metaloafinitní chromatografie v kolonách s NiNTA agarosou

Na 750 ml kultury byly používány 4 ml NiNTA, která se přidávala do kolony s fritou spolu se supernatantem s předchozího kroku. Navazování vzorku při pomalém točení trvalo 1 hodinu. Po vypuštění lyzátu z kolony (*flow through*) byla NiNTA propláchnuta 20 ml fosfátového lyzovacího pufru a ekvilibrována 20 ml proteasového pufru. Odštěpování MA od PP s histidinovou kotvou probíhalo ve 4 ml proteasového pufru s přídatkem 150 – 1000 μ l PR o koncentraci 0,4 mg/ml. Štěpení probíhalo 12-18 hod. Výměna proteasového pufru za vzorkový pufr pro koncentrování a NMR se prováděla na kolonách PD 10 od firmy GE Healthcare podle protokolu výrobce.

4.2.3.5 SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Kontrola expresního profilu byla prováděna Tris-tricin SDS-PAGE (10% T, 3,5% C), při programu 40 V 40 min. a 150 V 50 min. Vzorky byly ve vzorkovém pufru denaturovány varem po dobu 2 min.

4.2.4 NMR spektroskopie

4.2.4.1 Koncentrování vzorků a příprava pro NMR spektroskopii

Vzorek byl koncentrován v příslušném pufru a koncentračních kyvetách s limitem (*cut off*) 3 kDa. Krok centrifugace byl 5 min. při 2000g a 20 °C. Po každém kroku byl vzorek promíchán opakovaným pipetováním. Finální objem byl přizpůsoben pro NMR kyvety Shigemi. Koncentrace konečného vzorku se pohybovala od 0,25 do 0,5 mmol/l. Před uskladněním pro měření spekter a vlastním měřením byl přidán azid sodný a D₂O (viz kap. 4.1.6) a 20 µl zásobního roztoku *Complete*.

4.2.4.2 Měření spekter NMR

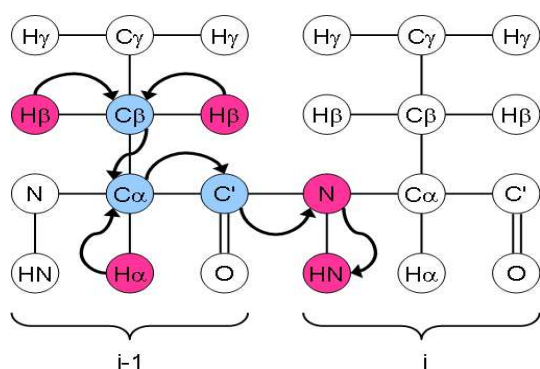
Spektra byla snímána na spektrometru Bruker 600 Avance III vybaveném kryosondou a pracujícím s rezonanční frekvencí pro vodík 600 MHz a zpracována programem NMRpipe a vizualizovaná v programu NMR Draw.

Tab. 3: Základní nastavení NMR experimentů

experiment	velikost dat v komplexních bodech			spektrální šířka (Hz)		
	¹ H	¹⁵ N	¹³ C	¹ H	¹⁵ N	¹³ C
¹ H- ¹⁵ N-HSQC	2048	128		9615	1825	
¹ H- ¹³ C-HMQC	2048		256	9615		12073
HNCA	2048	46	96	8418	2190	4803
CBCANH	2048	46	96	8418	2190	11321
CBCA(CO)NH	2048	40	128	8418	2190	11318
HNCO	2048	50	118	8418	2190	4528
HBHA(CO)NH	2048/96	40		8418/8418	2190	
H(C)CH-TOCSY	2048/128		64	7324/7324		11319

Vlastní sekvenční přiřazování proteinu a vyhodnocování spekter bylo provedeno v programu CCPNMR Analysis (Vranken WF et al., 2005). Základním dvoudimenzionálním (2D) experimentem pro přiřazení páteře proteinu bylo ¹H-¹⁵N-HSQC,

se signály NH skupin peptidových vazeb a amidů postranních řetězců. Tato spektra zároveň sloužila ke zhodnocení kvality vzorku, případně degenerace, a to porovnáním s předešlými spektry a posouzením přítomnosti uspořádané struktury. Dále byly snímány třídimenzionální (3D) experimenty: HNCA, CBCANH, CBCA(CO)NH, HBHA(CO)NH a HNC(O). Signály některých vodíků α , β a uhlíků α , β byly nalezeny ve spektrech obsahujících informace o postranních řetězcích ^1H - ^{13}C -HMQC (2D) a H(C)CH-TOCSY (3D). Hodnoty chemických posunů vytvářejí ve spektrech systém souřadnic, kterými se podle typu experimentu dají určit odezvy příslušných atomů. Východiskem pro pohyb a prohledávání 3D spekter jsou 2D spektra, v nichž přiřazené signály vymezují příslušnou rovinu pohybu v 3D spektru. Informace obsažená v signálu je závislá na způsobu přenosu magnetizace mezi vybranými jádry (obr. 12). Toto je řízeno sekvencí radiofrekvenčních pulzů.

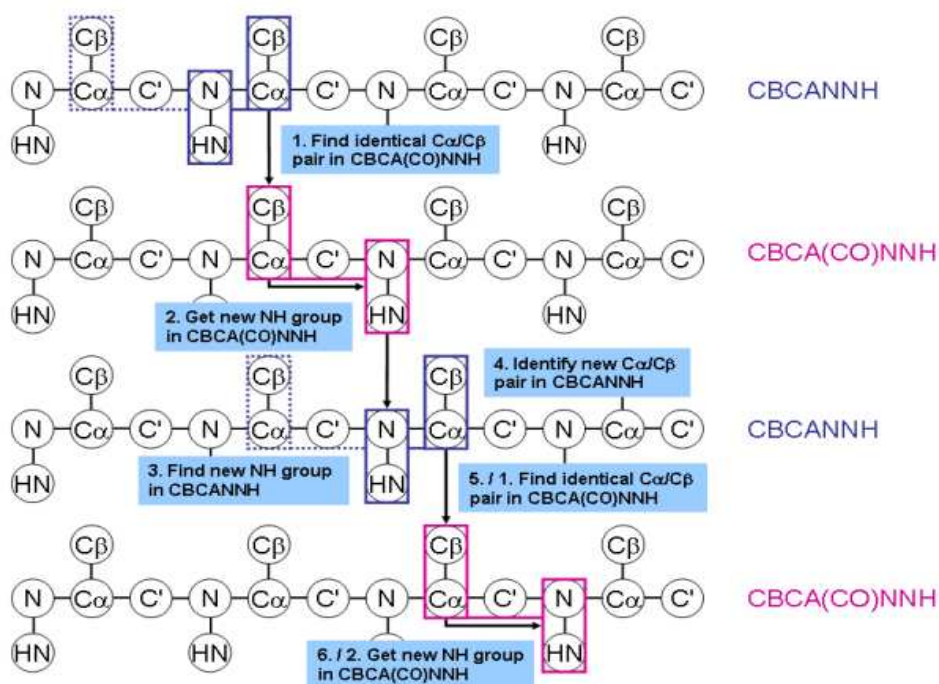


Obr. 12

Schéma přenosu magnetizace z atomů aminokyseliny $i-1$ na i k detekci na vodíku HN. Experiment HBHA(CO)NH. (Převzato z <http://www.ccpn.ac.uk>)

4.2.4.3 Sekvenční přiřazování rezonancí

Experimenty jsou navrženy ve dvojicích, jejichž prováděním lze určit signály náležící aminokyselině s příslušným signálem v ^1H - ^{15}N -HSQC a signály aminokyseliny předchozí. Tyto signály aminokyseliny $i-1$ poté slouží k nalezení v sekvenci předcházejícího signálu v ^1H - ^{15}N -HSQC a cyklus se opakuje. Toto je základní princip sekvenčního přiřazování (obr. 13).



Obr. 13

Schéma sekvenčního přiřazování ve dvojici experimentů CBACNH - CBCA(CO)NH. (Převzato z <http://www.ccpn.ac.uk>)

4.2.5 Odhad sekundární struktury na základě indexu chemických posunů

Index chemického posunu (*chemical shift index* – CSI) je výpočetní metoda pro predikci sekundární struktury z již přiřazených chemických posunů atomů páteře proteinu. Opírá se o stanovení tzv. sekundárních chemických posunů. Sekundární chemický posun je v podstatě chemický posun závislý na konformaci. Jeho číselná hodnota je rozdílem mezi chemickým posunem experimentálně získaným a příslušnou referenční hodnotou pro strukturu náhodného klubka (*random coil*). Čím více je získaná hodnota vzdálena od nuly, tím více je struktura pravidelná. Chemické posuny blízké nule, (+/- 0,1 ppm pro H α), jsou indexovány 0 a hodnoty vzdálenější 1 a -1. Z dílčích hodnot je pak stanoven tzv. konsensus index pro celou aminokyselinu. Pokud jsou v sekvenci polypeptidu indexovány alespoň čtyři aminokyseliny v řadě po sobě (ne však nezbytně) hodnotou -1, jedná se pravděpodobně o α -helix. Pokud jsou indexovány hodnotou 1 alespoň tři aminokyselinové

zbytky, jde pravděpodobně o β -list (Wishart DS, Sykes BD a Richards FM, 1992) CSI byl počítán programem CSI (Wishart DS a Sykes BD, 1994), verze 2.0.

4.2.6 Posouzení strukturní stability molekuly pomocí indexu náhodného klubka a parametru uspořádanosti S^2

Flexibilita páteře proteinové molekuly může být odhadnuta na základě chemických posunů jader jejích atomů. Metodou *Random Coil Index* (RCI) lze stanovit tzv. parametr uspořádanosti S^2 . Takto lze označit oblasti, které si udržují stabilně uspořádanou sekundární strukturu a odlišit je od oblastí flexibilních. Při ověřování přesnosti těchto výpočtů porovnáváním experimentálních dat s daty z databází byl publikován korelační koeficient metody $RCI \geq 0,8$ (Berjanskii MV a Wishart DS, 2005). Referenční hodnoty pro strukturu náhodného klubka jsou před kalkulací sekundárních chemických posunů korigovány opravnými faktory podle sousedních aminokyselin. Hodnoty tabelované pro konkrétní aminokyselinu $i+1$, $i+2$, $i-1$ a $i-2$ jsou přičteny k chemickému posunu i -té aminokyseliny.

Výpočet RCI pro daný aminokyselinový zbytek probíhá dle vzorce:

$$RCI = (\langle A |\Delta\delta_{Ca}| + B |\Delta\delta_{CO}| + C |\Delta\delta_{C\beta}| + D |\Delta\delta_N| + E |\Delta\delta_{NM}| + F |\Delta\delta_{Ha}| \rangle)^{-1}$$

kde A, B, C, D, E a F jsou koeficienty zohledňující soubory atomů, jejichž chemické posuny byly do výpočtu zahrnuty a jsou jimi násobeny absolutní hodnoty sekundárního chemického posunu konkrétního atomu, získaného při výpočtu CSI. Znaky $\langle \rangle$ označují průměr.

Pro parametr uspořádanosti S^2 platí vztah:

$$S^2 = 1 - 0,5 \ln(1 + RCI \cdot 100)$$

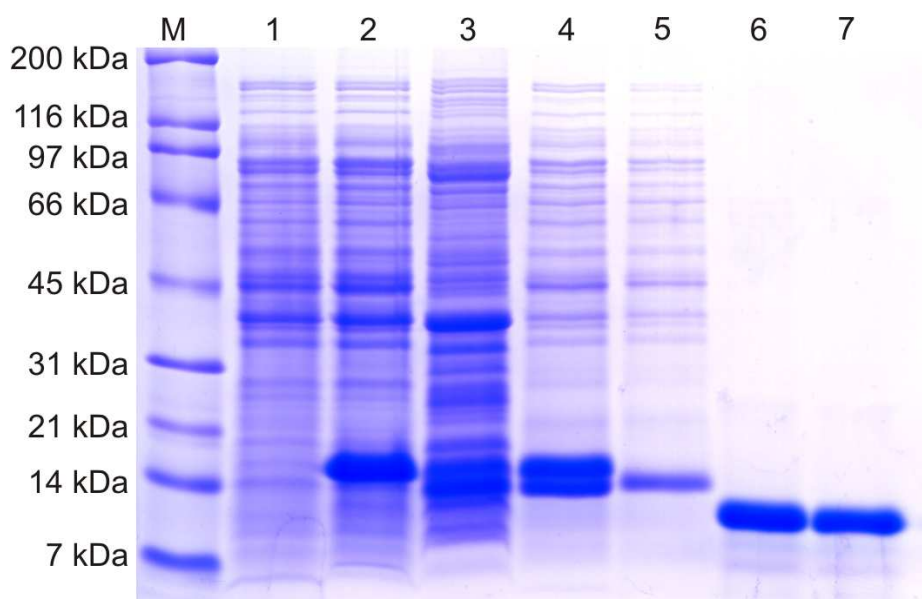
(Berjanskii M a Wishart DS, 2006)

Hodnoty S^2 pro mutant S6A MA M-PMV byly počítány v programu Talos+ (Shen Y et al, 2009).

5 Výsledky

5.1 Příprava rekombinantního proteinu

Příprava jednoho vzorku probíhala z celkem 750 nebo 500 ml kultury. Nárůst kultury před indukcí exprese IPTG, vzhledem k použití izotopového značení, trval přibližně 5 hodin. Protokol byl experimentálně optimalizován pro výtěžek o stabilní koncentraci cca 0,37 mmol/l. Přibližná koncentrace byla ověřována spektrofotometricky ($\lambda = 280 \text{ nm}$). Proměnlivými prvky v purifikaci bylo množství přidávané PR a doba odštěpování od NiNTA, molarita NaCl koncentračního pufru a doba jednoho koncentrovacího kroku. Bylo odstraněno chlazení při navazování vzorku na NiNTA a během koncentrování. Pokud byla před koncentrováním časová prodleva, nebyl vzorek zamražován, ale pouze skladován při 5°C. Pro kontrolu byla použita SDS-PAGE v Tris-tricinovém uspořádání (obr. 14).



Obr. 14

Gel SDS-PAGE, ukazující průběh exprese a purifikace MA. dráhy:

M – standard molekulových hmotností

1 – buňky před indukcí IPTG

2 – buňky po indukci IPTG

3 – peleta po lyzi

4 – supernatant po lyzi

5 – *flow through* po navazování MAPPHis na NiNTA

6 – vzorek s odštěpeným MA od PPHis

7 – vzorek MA po převedení do pufru pro NMR spektroskopii

5.2 Přiřazení rezonancí atomů páteře proteinu

Podařilo se přiřadit 99% atomů C_{α} , 96% C_{β} , 91% H_{α} , 83% H_{β} , 90% uhlíků karbonylových skupin peptidových vazeb (CO), 92% dusíků peptidových vazeb a 98% příslušných vodíků (HN). Celková úspěšnost přiřazení atomů páteře proteinu je 95%.

Nepodařilo se nalézt žádný jednoznačně přiřaditelný signál glutamátu 9. Signály amidických atomů prolinů se ve spektrech 1H - ^{15}N -HSQC nevyskytují, protože nemají v polypeptidovém řetězci vodík HN, na kterém probíhá detekce. Jejich ostatní atomy však mají signály ve spektrech jako atomy aminokyselin $i-1$ (HNCA, CBCANH,

5.3 Porovnání chemických posunů MA M-PMV mutantu S6A a WT

Při studiu závislosti mezi průměrnými chemickými posuny daného jádra v páteři molekuly proteinu a sekundární strukturou dané molekuly bylo zjištěno, že nejspolehlivěji korelují s přítomností α -helixu (korelační koeficient 0,8) nebo β -listu (korelační koeficient 0,75) hodnoty chemických posunů vodíků α (Sibley AB, Cosman M a Krishnan VV, 2003). Pro soubory chemických posunů vodíků α mutantu S6A a WT byla spočítána střední kvadratická odchylka (RMSD) 0,268 podle vzorce:

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [x_i - y_i]^2}{N}}$$

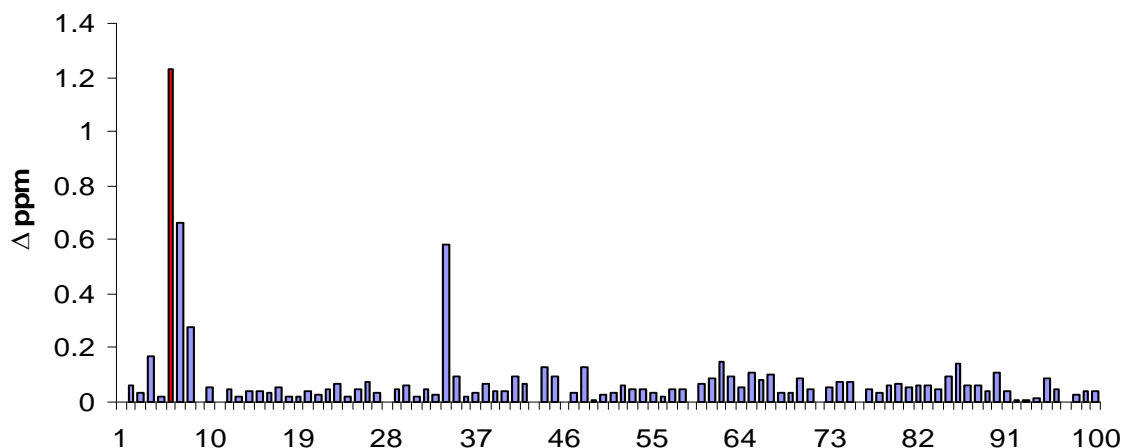
Ze srovnání s hodnotami pro již vyřešené mutanty R55F (RMSD = 0.078), a T41I/T78I (RMSD = 0.535) plyne, že sice není zcela zanedbatelná, ale je přibližně o polovinu menší než v případě dvojitého mutantu T41I/T78I, který měl zachovaný celkový charakter molekuly, avšak se změnou velikosti některých interhelikálních úhlů. Vzhledem k tomu, že největší změny v chemických posunech mutantu S6A jsou v oblasti mutace, tedy na nestrukturovaném N-konci, je pravděpodobné, že terciární struktura molekuly mimo tuto oblast nebude významně dotčena. Naopak i přes nízkou RMSD mutantu R55F nelze předpokládat, že by jeho změna struktury byla menší než u S6A. V terciární struktuře R55F jsou totiž výrazné změny, které však nejsou lokalizované, ale zasahují celkovou třírozměrnou architekturu proteinu, a to reorientací prvních dvou α -helixů vůči C-terminální polovině proteinu a je tedy možné, že ze statistického hlediska se celková změna v chemických posunech tak výrazně neprojeví.

Pro zobrazení strukturních změn se však více hodí chemické posuny dusíků a vodíků peptidové vazby, a to pro větší šíři hodnot. Vzhledem k přibližně pětinasobným hodnotám chemických posunů dusíků oproti vodíkům, byly celkové změny v chemických posunech těchto atomů WT a S6A vyjádřeny pomocí vzorce:

$$\Delta = \sqrt{\left(\frac{\omega^{15}N}{5}\right)^2 + (\omega^1H)^2}$$

kde ω je rozdíl mezi hodnotou chemického posunu daného atomu WT a S6A. Získané hodnoty pro jednotlivé aminokyseliny jsou zaneseny do sloupcového grafu č.1.

Graf 1: Rozdíly v chemických posunech amidických atomů peptidových vazeb WT a mutantu S6A. Pozice mutované aminokyseliny vyznačena červeně.



Výraznější změna v chemických posunech je patrná pouze v okolí mutace a u fenyalaninu 34.

5.4 Zhodnocení sekundární struktury a její porovnání s WT

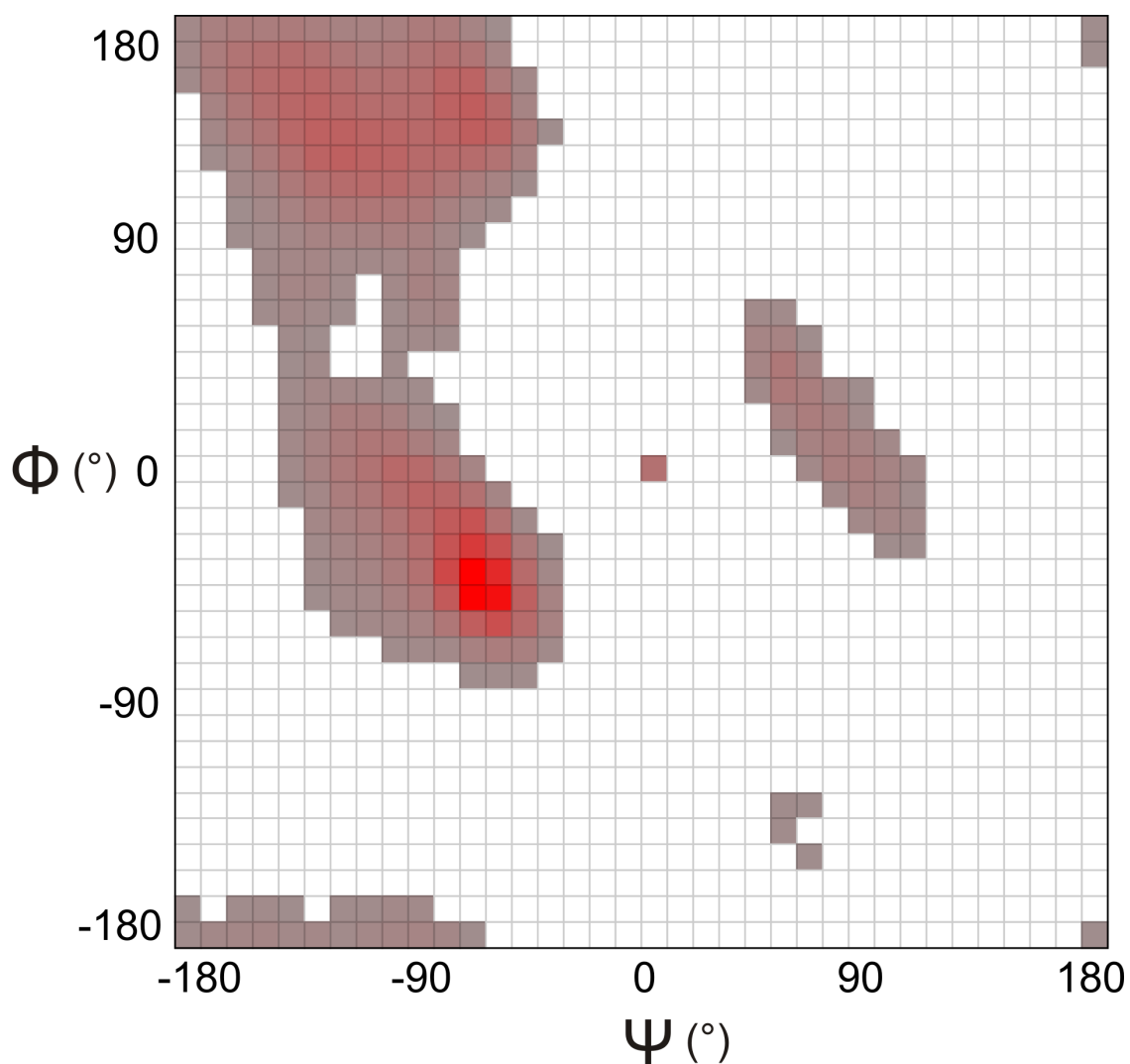
Celkově nedošlo k větší změně rozložení prvků sekundární struktury. Signifikantnější změnou je zkrácení třetího α -helixu o tři aminokyseliny v jeho N-terminální části a nepřítomnost náznaku oblasti β -listu, ovšem velmi krátké, tvořené pouze třemi aminokyselinami. Zvýšená flexibilita příslušné smyčky však bude muset být potvrzena při řešení terciární struktury.



Obr. 15

Rozložení prvků sekundární struktury MA mutantu S6A (nahore) a WT (dole).

Celkový charakter proteinu zůstal zachován a převaha α -helikální struktury nebyla ovlivněna, což dobře demonstruje Ramachandranův diagram na obrázku 16.

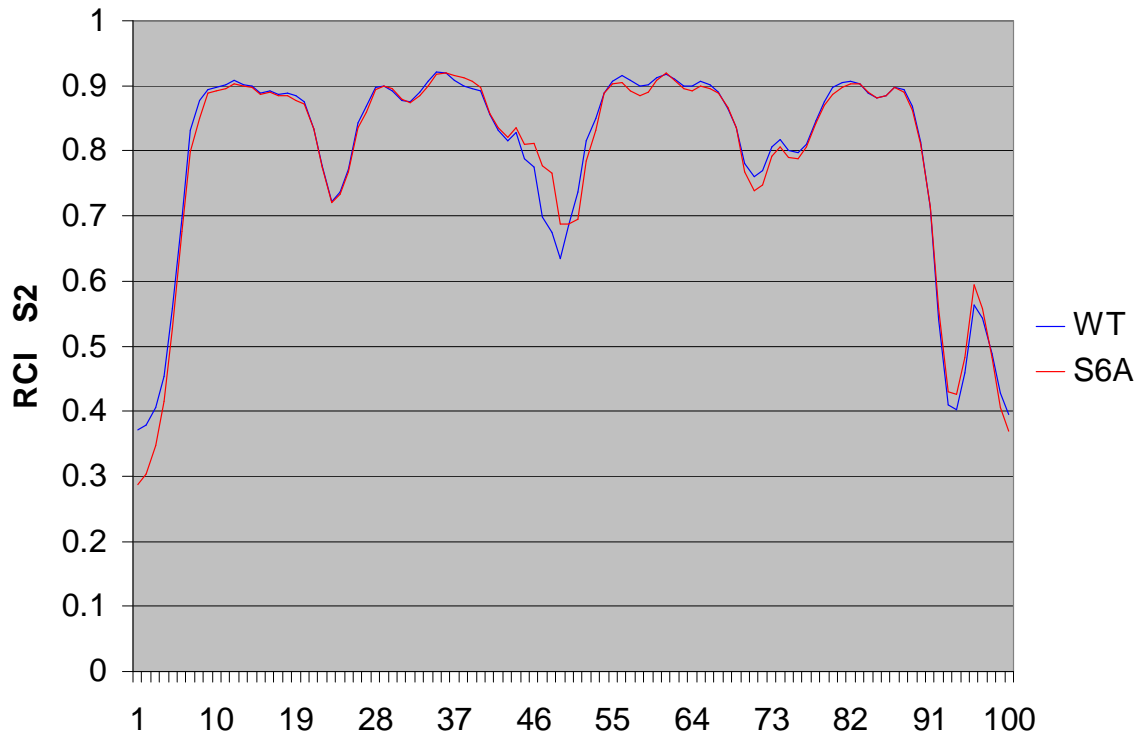


Obr. 16

Ramachandranův diagram S6A MA M-PMV vytvořený na základě přiřazených rezonancí v programu Analysis.

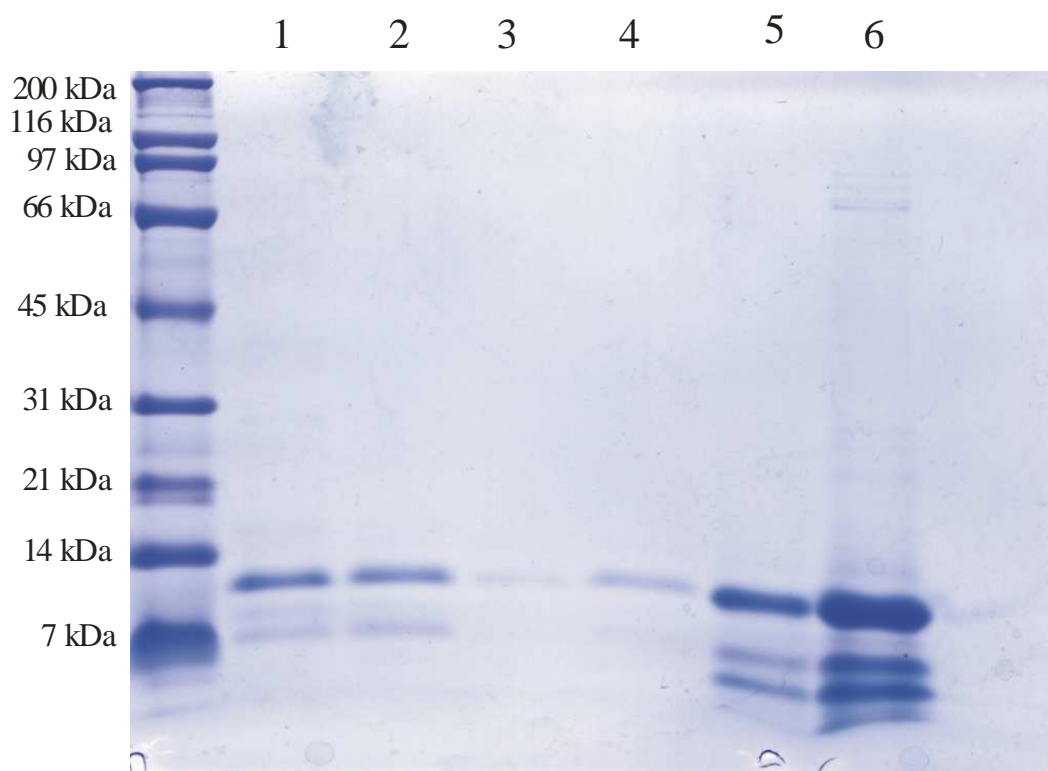
V programu Talos+ byly vypočítány RCI jednotlivých aminokyselin a graficky znázorněn vývoj parametru uspořádanosti S^2 , který charakterizuje míru pohyblivosti jednotlivých aminokyselin. Výsledky v grafu 2 naznačují mírné zvýšení dynamiky N-konce, to však bude možné potvrdit až na základě změření relaxačních vlastností atomů.

Graf 2: Vývoj parametru S^2 u jednotlivých aminokyselin WT a mutantu S6A na základě hodnot z programu Talos+



6 Diskuze

Podářilo se vypurifikovat vzorek rekombinantního proteinu v dostatečné koncentraci pro nasnímání spekter NMR a pro přiřazení chemických posunů atomů proteinu. Vzhledem k nahrazení jednoho ze dvou serinů alaninem, došlo ke zvýšení hydrofobicity molekuly a musela být zkrácena doba jednoho kroku při koncentrování, vyloučeny chladicí kroky a zamrazování vzorků. Byla optimalizována iontová síla vzorkového pufru změnami molární koncentrace NaCl. Také jsme zvyšovali množství PR pro odštěpování MA a prodlužovali dobu inkubace MAPPHis s PR. Podářilo se však dosáhnout efektivní koncentrace maximálně 0,37 mmol/l. Kvůli nižší koncentraci byla některá NMR spektra horší kvality a některé hledané rezonance nemohly být jednoznačně přiřazeny pro jejich nízkou intenzitu. Nízké výtěžky exprese také znemožňovaly vícestupňovou purifikaci vzorků, která by přinesla další ztráty. PR tedy byla ve vzorku ponechána a byla přidána směs inhibitorů proteas. Je otázkou, do jaké míry se tyto skutečnosti podílely na stabilitě vzorku, který degradoval po 3 – 10 týdnech. Souhrnně lze říci, že optimalizace pro konečnou koncentraci 0,5 mmol/l při objemu 300 μ l nebyla přínosem z důvodu následné ztráty části vzorku: vzorky přibližně od koncentrace 0,4 mmol/l se nejpozději do druhého dne částečně vysrážely. V některých vzorcích se na gelech SDS-PAGE prokázala přítomnost proteinů s molekulovou hmotností 10 a méně kDa, tedy lehčích než MA (obr. 17). Hmotnostní spektrometrií bylo ověřeno, že jde o fragmenty MA. Jejich výskyt byl dán zřejmě nepřesností (nedostatečnou substrátovou specifitou) PR a pravděpodobně též kontaminací proteasami z lyzátu. Pro druhou domněnku svědčí fakt, že vyšší objemy použité PR s vyšším výskytem fragmentů nijak nekorelovaly. Díky nízké citlivosti NMR spektroskopie jako takové, nemělo toto viditelný dopad na kvalitu spekter v porovnání s těmi, která byla naměřena na vzorcích s nižším podílem nečistot.



Obr. 17

Gel SD-PAGE porovnávající vzorky purifikovaného MA, které obsahovaly fragmenty. Dráhy obsahují různé vzorky o různé koncentraci proteinů. Je patrné, že schéma molekulových hmotností těchto fragmentů bylo u různých vzorků téměř shodné.

Nepodařilo se najít chemické posuny glutamátu 9, ale protože se jedná o jediný výpadek ve studované oblasti, nemělo by to mít, s ohledem na použitý software, vážný dopad na přesnost odhadu sekundární struktury. Z výsledků je patrné, že došlo k mírnému prohloubení destabilizace N-konce molekuly. Celkově však S6A i WT MA M-PMV jsou v sekundární struktuře pravděpodobně téměř totožné. Výjimkou, kromě N-koncové oblasti, je smyčka mezi α -helixy 2 a 3, což sice dobře koresponduje se změnou hodnot S^2 v tomto regionu, ale navzdory zkrácení helixu došlo ke zvýšení těchto hodnot.

7 Závěr

- Podařilo se připravit izotopově značený vzorek mutantu S6A matrixového proteinu M-PMV v koncentraci nezbytné pro změření spekter NMR.
- V dvou- a třídímenzionálních experimentech NMR spektroskopie byly nalezeny chemické posuny atomů proteinové páteře.
- Získané hodnoty chemických posunů byly porovnány s divokým typem matrixového proteinu M-PMV a identifikovány změny v okolí mutace.
- Byla stanovena střední kvadratická odchylka pro soubory vodíků α mutantu S6A a divokého typu a porovnána s dalšími mutanty.
- Z chemických posunů byl proveden výpočet jejich indexu CSI a odhadnuta sekundární struktura, v níž nebyly zjištěny větší odlišnosti od divokého typu.
- Byly provedeny kalkulace parametru uspořádanosti metodou RCI pro mutant S6A a divoký typ a porovnány. Bylo zjištěno, že N-terminální oblast mutantu je lehce destabilizována, v kontrastu k mírnému, neočekávanému snížení flexibility mezi třetím a čtvrtým α -helixem.

8 Seznam použité literatury

- Ames JB**, Ishima R, Tanaka T, Gordon JI, Stryer L, Ikura M; Nature. **1997** Sep 11;389(6647):198-202.
- Andreadis ST**, Brott D, Fuller AO, Palsson BO; J Virol. **1997** Oct;71(10):7541-8.
- Berjanskii MV**, Wishart DS; J Am Chem Soc. **2005** Nov 2;127(43):14970-1.
- Berjanskii M**, Wishart DS; Nat Protoc. **2006**;1(2):683-8.
- Bukrinsky MI**, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty S, Stevenson M; Proc Natl Acad Sci U S A. **1992** Jul 15;89(14):6580-4.
- Bushman FD**, Craigie R; J Virol. **1990** Nov;64(11):5645-8.
- Bradac J**, Hunter E; Virology. **1984** Oct 30;138(2):260-75.
- Bradac J**, Hunter E; Virology. **1986** Apr 30;150(2):491-502.
- Bray M**, Prasad S, Dubay JW, Hunter E, Jeang KT, Rekosh D, Hammarskjöld ML; Proc Natl Acad Sci U S A. **1994** Feb 15;91(4):1256-60.
- Brody BA**, Rhee SS, Hunter E; J Virol. **1994** Jul;68(7):4620-7.
- Cannon PM**, Matthews S, Clark N, Byles ED, Iourin O, Hockley DJ, Kingsman SM, Kingsman AJ; J Virol. **1997** May;71(5):3474-83.
- Cimarelli A**, Sandin S, Höglund S, Luban J; J Virol. **2000** Apr;74(7):3046-57.
- Conte MR**, Klikova M, Hunter E, Ruml T, Matthews S; EMBO J. **1997** Oct 1;16(19):5819-26.
- Dong JY**, Dubay JW, Perez LG, Hunter E; J Virol. **1992** Feb;66(2):865-74.
- Elder JH**, Lerner DL, Hasselkus-Light CS, Fontenot DJ, Hunter E, Luciw PA, Montelaro RC, Phillips TR; J Virol. **1992** Mar;66(3):1791-4.
- Fass D**, Harrison SC, Kim PS; Nat Struct Biol. **1996** May;3(5):465-9.
- Fass D**, Davey RA, Hamson CA, Kim PS, Cunningham JM, Berger JM; Science. **1997** Sep 12;277(5332):1662-6.
- Feinstein SC**, Ross SR, Yamamoto KR; J Mol Biol. **1982** Apr 15;156(3):549-65.
- Fouchier RA**, Meyer BE, Simon JH, Fischer U, Albright AV, González-Scarano F, Malim MH; J Virol. **1998** Jul;72(7):6004-13.

- Freed EO**, Orenstein JM, Buckler-White AJ, Martin MA; *J Virol.* **1994** Aug;68(8):5311-20.
- Freed EO**, Englund G, Maldarelli F, Martin MA; *Cell.* **1997** Jan 24;88(2):171-3; discussion 173-4.
- Gallay P**, Swingler S, Aiken C, Trono D; *Cell.* **1995** Feb 10;80(3):379-88.
- Gallay P**, Hope T, Chin D, Trono D; *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1997** Sep 2;94(18):9825-30.
- Ganser-Pornillos BK**, Cheng A, Yeager M; *Cell.* **2007** Oct 5;131(1):70-9.
- Gilboa E**, Mitra SW, Goff S, Baltimore D; *Cell.* **1979** Sep;18(1):93-100.
- Gottwein E**, Bodem J, Müller B, Schmechel A, Zentgraf H, Kräusslich HG; *J Virol.* **2003** Sep;77(17):9474-85.
- Green N**, Shinnick TM, Witte O, Ponticelli A, Sutcliffe JG, Lerner RA; *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1981** Oct;78(10):6023-7.
- Haffar OK**, Popov S, Dubrovsky L, Agostini I, Tang H, Pushkarsky T, Nadler SG, Bukrinsky M; *J Mol Biol.* **2000** Jun 2;299(2):359-68.
- Henderson LE**, Krutzsch HC, Oroszlan S; *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1983** Jan;80(2):339-43.
- Hermida-Matsumoto L**, Resh MD; *J Virol.* **1999** Mar;73(3):1902-8.
- Hunter E**; *Sem Virol.* **1994**;5:71-83.
- Iijima S**, Nitahara-Kasahara Y, Kimata K, Zhong Zhuang W, Kamata M, Isogai M, Miwa M, Tsunetsugu-Yokota Y, Aida Y; *Virology.* **2004** Oct 1;327(2):249-61.
- Jacks T**, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE; *Nature.* **1988** Jan 21;331(6153):280-3.
- Kliger Y**, Shai Y; *Biochemistry.* **1997** Apr 29;36(17):5157-69.
- Kootstra NA**, Schuitemaker H; *Virology.* **1999** Jan 20;253(2):170-80.
- Lewis PF**, Emerman M; *J Virol.* **1994** Jan;68(1):510-6.
- Liao Z**, Graham DR, Hildreth JE; *AIDS Res Hum Retroviruses.* **2003** Aug;19(8):675-87.
- Limón A**, Devroe E, Lu R, Ghory HZ, Silver PA, Engelman A; *J Virol.* **2002** Nov;76(21):10598-607.
- Lim S**, Strahl T, Thorner J, Ames JB; *J Biol Chem.* **2011** Apr 8;286(14):12565-77.

- Mañes S**, del Real G, Lacalle RA, Lucas P, Gómez-Moutón C, Sánchez-Palomino S, Delgado R, Alcamí J, Mira E, Martínez-A C.; *EMBO Rep.* **2000** Aug;1(2):190-6.
- Maurer-Stroh S**, Eisenhaber B, Eisenhaber F; *J Mol Biol.* **2002** Apr 5;317(4):541-57.
- Markovic I**, Stantchev TS, Fields KH, Tiffany LJ, Tomić M, Weiss CD, Broder CC, Strebel K, Clouse KA; *Blood.* **2004** Mar 1;103(5):1586-94.
- Miller DG**, Adam MA, Miller AD; *Mol Cell Biol.* **1990** Aug;10(8):4239-42. Erratum in: *Mol Cell Biol* 1992 Jan;12(1):433.
- Morikawa Y**, Zhang WH, Hockley DJ, Nermut MV, Jones IM; *J Virol.* **1998** Sep;72(9):7659-63.
- Mothes W**, Boerger AL, Narayan S, Cunningham JM, Young JA; *Cell.* **2000** Nov 10;103(4):679-89.
- Muriaux D**, Costes S, Nagashima K, Mirro J, Cho E, Lockett S, Rein A; *J Virol.* **2004** Nov;78(22):12378-85.
- Opstelten DJ**, Wallin M, Garoff H; *J Virol.* 1998 Aug;72(8):6537-45. Erratum in: *J Virol* **1998** Oct;72(10):8460.
- Paillart JC**, Göttlinger HG; *J Virol.* **1999** Apr;73(4):2604-12.
- Panganiban AT**, Temin HM; *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1984** Dec;81(24):7885-9.
- Peitzsch RM**, McLaughlin S; *Biochemistry.* **1993** Oct 5;32(39):10436-43.
- Popik W**, Alce TM, Au WC; *J Virol.* **2002** May;76(10):4709-22.
- Reil H**, Bukovsky AA, Gelderblom HR, Göttlinger HG; *EMBO J.* **1998** May 1;17(9):2699-708.
- Rein A**, Mirro J, Haynes JG, Ernst SM, Nagashima K; *J Virol.* **1994** Mar;68(3):1773-81.
- Rhee SS**, Hunter E; *J Virol.* **1987** Apr;61(4):1045-53.
- Rhee SS**, Hunter E; *Cell.* **1990** Oct 5;63(1):77-86.
- Rhee SS**, Hunter E.*EMBO J.* **1991** Mar;10(3):535-46
- Roe T**, Reynolds TC, Yu G, Brown PO; *EMBO J.* **1993** May;12(5):2099-108.
- Ryden TA**, Beemon K; *Mol Cell Biol.* **1989** Mar;9(3):1155-64.
- Sakai H**, Kawamura M, Sakuragi J, Sakuragi S, Shibata R, Ishimoto A, Ono N, Ueda S, Adachi A; *J Virol.* **1993** Mar;67(3):1169-74.

Sfakianos JN, LaCasse RA, Hunter E; *Traffic*. **2003** Oct;4(10):660-70.

Sfakianos JN, Hunter E; *Traffic*. **2003** Oct;4(10):671-80.

Sibley AB, Cosman M, Krishnan VV; *Biophys J*. **2003** Feb;84(2 Pt 1):1223-7.

Shen Y, Delaglio F, Cornilescu G, Bax A J *Biomol NMR*. **2009** Aug;44(4):213-23.

Sommerfelt MA, Rhee SS, Hunter E; *J Virol*. **1992** Dec;66(12):7005-11.

Song C, Dubay SR, Hunter E; *J Virol*. **2003** May;77(9):5192-200.

Speck NA, Baltimore D; *Mol Cell Biol*. **1987** Mar;7(3):1101-10.

Stansell E, Tytler E, Walter MR, Hunter E; *J Virol*. **2004** May;78(10):5023-31.

Staple DW, Butcher SE; *Nucleic Acids Res*. **2003** Aug 1;31(15):4326-31.

Tang C, Loeliger E, Luncsford P, Kinde I, Beckett D, Summers MF; *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2004** Jan 13;101(2):517-22.

Vlach J, Lipov J, Rumlová M, Veverka V, Lang J, Srb P, Knejzlík Z, Pichová I, Hunter E, Hrabal R, Ruml T; *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2008** Jul 29;105(30):10565-70.

Vogt VM; *Curr Top Microbiol Immunol*. **1996**;214:95-131.

Vora AC, Chiu R, McCord M, Goodarzi G, Stahl SJ, Mueser TC, Hyde CC, Grandgenett DP; *J Biol Chem*. **1997** Sep 19;272(38):23938-45.

Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J, Laue ED; *Proteins*. **2005** Jun 1;59(4):687-96.

Wallin M, Ekström M, Garoff H; *EMBO J*. **2004** Jan 14;23(1):54-65.

Wallin M, Ekström M, Garoff H; *J Virol*. **2005** Feb;79(3):1678-85.

Wishart DS, Sykes BD, Richards FM; *Biochemistry*. **1992** Feb 18;31(6):1647-51.

Wishart DS, Sykes BD; *J Biomol NMR*. **1994** Mar;4(2):171-80.

Yamashita M, Emerman M; *J Virol*. **2004** Jun;78(11):5670-8.

Yamashita M, Emerman M *PLoS Pathog*. **2005** Nov;1(3):e18.

Yasuda J, Hunter E; *Virology*. **2000** Mar 15;268(2):533-8.

Zhou W, Parent LJ, Wills JW, Resh MD; *J Virol*. **1994** Apr;68(4):2556-69.

9 Seznam zkratek

amk - aminokyselina

ATP – adenosin trifosfát

AIDS – *acquired immunodeficiency syndrome*

CA – kapsidový protein

CSI – *chemical shift index* (index chemického posunu)

CTRS – *cytoplasmic targeting/retention signal*

HIV – *Human immunodeficiency virus*

HTLV – *Human T-lymphotropic virus*

IN - integráza

IPTG – isopropyl thiogalaktopyranosid

LTR – *long terminal repeats*

MA – matrixový protein

M-PMV – *Mason-Pfizer monkey virus*

NC – nukleoprotein

NMR – nukleární magnetická rezonance

PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza

PBS – *primer binding site*

PCR – *polymerase chain reaction* (polymerázová řetězová reakce)

PIC – *pre-integration complex* (pre-integrační komplex)

PP – fosfoprotein

PPT – *polypurine tract*

PR - proteáza

RER – *rough endoplasmic reticulum* (drsne endoplazmatické retikulum)

RMSD – *root mean square deviation* (střední kvadratická odchylka)

RSV – *Rous sarcoma virus*

RT – reverzní transkriptáza

SDS – dodecylsulfát sodný

SU – *surface* (povrchový) protein

TM – transmembránový protein

WT – *wild type* (divoký typ)

10 Příloha

Tabulky chemických posunů S6A MA M-PMV:

		HN	N	HA	HA2	HA3	CA
1	Met						56.96
2	Gly	8.43	110.11		3.93		45.37
3	Gln	8.36	120.31	4.19			55.96
4	Glu	8.44	122.33	4.2			56.91
5	Leu	8.27	123.49	4.25			55.95
6	Ala	8.39	124.14	4.26			53.39
7	Gln	8.34	118.92	3.88			58.7
8	His	8.54	119.55	4.56			58.65
10	Arg	8.39	119.36	3.99			58.59
11	Tyr			4.11			60.89
12	Val	7.57	118.54	3.12			66.99
13	Glu	8.53	121.02	4.18			59.69
14	Gln	8.43	118.22	3.95			59.22
15	Leu	7.33	122.01	3.93			57.82
16	Lys	8.33	120.74	3.6			60.41
17	Gln	8.41	118.77	3.99			58.61
18	Ala	8.11	124.16	4.1			55.21
19	Leu	8.35	119.25	3.81			58.12
20	Lys	8.02	121.81	3.98			59.95
21	Thr	8.12	115.34	4.03			65.77
22	Arg	7.3	119.31	4.34			55.37
23	Gly	7.92	107.32		3.64		45.57
24	Val	7.79	122.11	3.95			61.91
25	Lys	8.61	128.74	4.12			56.01
26	Val	7.77	121.85	4.43			59.64
27	Lys	8.82	124.27	4.34			55.81
28	Tyr	8.22	120.81	3.74			62.69
29	Ala	9.08	117.81	3.81			55.29
30	Asp	6.78	116.01	4.45			57.09
31	Leu	7.79	123.41				57.22
32	Leu	8.64	120.64	3.94			58.77
33	Lys	7.58	118.62	4.1			59.5
34	Phe	7.85	121.59	4.32			61.08
35	Phe	8.44	117.96	3.89			64.43
36	Asp	8.36	125.13	4.48			57.75
37	Phe	7.58	123.34	4.29			61.52
38	Val	8.13	121.73	2.93			67.27
39	Lys	7.73	120.02	3.74			59.12

		HN	N	HA	HA2	HA3	CA
40	Asp	7.55	116.58	4.14			56.9
41	Thr	7.5	109.47	3.76			64.16
42	Cys	8.23	118.3	4.38			55.76
43	Pro			4.33			65.39
44	Trp	6.4	113.13				53.89
45	Phe	7.18	126.52				56.55
46	Pro			4.66			62.87
47	Gln	8.54	120.17				56.38
48	Glu	7.16	115.1	4			54.97
49	Gly	8.59	110.61		4.14	3.67	45.42
50	Thr	8.03	115.59	4.19			61.91
51	Ile	8.59	126.21	4.05			62.77
52	Asp	8.29	126.09	4.86			52.38
53	Ile	8.95	124.56	4.1			62.78
54	Lys	8.19	122.92				60.46
55	Arg	8.36	119.35	4.35			60.21
56	Trp	9.1	120.71	4.69			59.67
57	Arg	9.05	120.74	4.34			60.6
58	Arg	7.45	120.54	4.23			59.82
59	Val	8.16	122.19	3.61			66.46
60	Gly	7.46	106.07		1.94	2.54	46.2
61	Asp	7.87	122.87				57.36
62	Cys	8.01	120.77				62.97
64	Gln	8.05	118.76	4.11			59.36
65	Asp	8.19	120.01	4.43			57.75
66	Tyr	8.79	122.36	4.38			61.94
67	Tyr	8.96	121.7	3.94			61.79
68	Asn	8.75	118.18	4.35			55.57
69	Thr	7.97	115.03	3.78			65.82
70	Phe	8.49	118.1	4.41			59.2
71	Gly	7.74	109.06		4.25	3.52	44.97
72	Pro			4.29			64.18
73	Glu	8.69	116.93	4.02			58.73
74	Lys	7.49	116.33	4.32			55.27
75	Val	7.22	119.07	4.22			58.9
76	Pro			4.39			62.65
77	Val	8.55	120.84	3.9			65.54
78	Thr	7.28	108.18	3.92			62.37

		HN	N	HA	HA2	HA3	CA
79	Ala	7.54	123.5	4.02			55.87
81	Ser	8.12	116.84	4.19			61.78
82	Tyr	8.38	121.1	3.99			60.84
83	Trp	8.45	119.75	4.26			64.23
84	Asn	8.44	118.6	4.16			57.31
85	Leu	8.07	120.87	3.92			58.1
86	Ile	7.86	118.05	3.39			63.6
87	Lys	7.8	121.09	3.32			60.08
88	Glu	7.76	115.81	3.9			58.94
89	Leu	7.31	118.47	3.92			57.59
90	Ile	7.57	113.11	3.98			62.67
91	Asp	8.05	122.36	4.48			55.11
92	Lys	7.82	120.23	4.21			56.31
94	Glu	8.39	121.87	4.24			56.38
95	Val	8.1	121.24	4			62.24
96	Asn	8.5	123.22	4.94			51.21
97	Pro			4.33			63.45
98	Gln	8.32	119.83	4.28			56.08
99	Val	8.01	121.41	4.04			62.42
100	Met	7.9	129.2	-			57.13

		HB1/2	CB	CO
1	Met		30.37	176.73
2	Gly			174.75
3	Gln	1.94,2.02	29.44	175.94
4	Glu	1.87	29.99	176.79
5	Leu	1.56	42.35	177.61
6	Ala	1.43	18.72	178.65
7	Gln	2.14	28.37	177.74
8	His	3.07	29.64	
10	Arg	1.85	30.14	
11	Tyr	3	38.93	177.31
12	Val	1.99	30.96	177.57
13	Glu		29.25	178.71
14	Gln	1.97,2.04	27.9	179.48
15	Leu	1.66,1.08	42.13	177.9
16	Lys	2.17,1.69	32.24	179.33
17	Gln	2.08	27.99	178.13
18	Ala	1.41	18.55	180.94
19	Leu	1.86,1.28	40.8	178.71
20	Lys	1.98	31.87	181.17
21	Thr	4.27	69.15	175.29
22	Arg	2.10,1.77	29.87	175.88
23	Gly			173.74
24	Val	1.73	32.78	174.59
25	Lys	1.66	32.34	174.93
26	Val	1.88	34.51	174.25
27	Lys		32.95	
28	Tyr	3.03	38.48	176.59
29	Ala	1.37	18.89	180.13
30	Asp	2.73	40.79	178.7
31	Leu	1.30,1.62	41.99	178.48
32	Leu	1.12,1.57	41.85	179.31
33	Lys	1.92	32.1	179.82
34	Phe	3.05,3.04	38.25	176.9
35	Phe	2.98	37.83	178.88
36	Asp	3.06,2.80	39.72	177.66
37	Phe	3.09	38.4	178.9
38	Val	2.09	31.07	176.37
39	Lys	1.92,1.83	31.65	177.31

		HB1/2	CB	CO
40	Asp	2.41	41.27	177.84
41	Thr	3.59	70.3	175.15
42	Cys	2.76	27.86	
43	Pro		31.2	175.42
44	Trp		29.47	175.76
45	Phe			
46	Pro		34.55	175.57
47	Gln		29.59	173.92
48	Glu	1.66		178.14
49	Gly			173.3
50	Thr	3.95	70.23	174.34
51	Ile	1.79	38.93	175.68
52	Asp	2.90,2.70	44.12	176.9
53	Ile	1.88	38.46	176.14
54	Lys		31.69	181.06
55	Arg		31.29	178.88
56	Trp	3.20,3.17	30.7	180.15
57	Arg	2.1	30	178.21
58	Arg	2.09	29.75	175.76
59	Val	1.45	31.31	176.62
60	Gly			175.89
61	Asp		40.03	178.7
62	Cys		27.21	177.58
63	Phe	3.25,2.83	37.15	178.1
64	Gln	2.14	28.53	177.88
65	Asp	2.79	41.3	178.87
66	Tyr	3.21	38.84	178.13
67	Tyr	3.21,3.38	39.18	178.24
68	Asn	3.03	38.35	176.6
69	Thr	3.6	69.63	174.9
70	Phe	2.38,2.98	40.54	176.46
71	Gly			
72	Pro	1.98,2.35	32.12	178.35
73	Glu	1.96	29.1	177.46
74	Lys	1.57,2.02	33.66	175.38
75	Val	2.09	33.64	
76	Pro	1.63	32.17	178.59
77	Val	2.16	31.72	177.47

		HB1/2	CB	CO
78	Thr	3.75	68.97	175.65
79	Ala	0.71	17.88	179.31
80	Phe	2.96,3.19	38.11	178.82
81	Ser	3.96		177.72
82	Tyr	1.43	34.7	177.77
83	Trp	3.56	28.88	179.3
84	Asn	2.82,3.06	39.83	176.64
85	Leu	1.71	42.53	179.23
86	Ile	1.67	36.64	176.52
87	Lys	0.76,1.64	31.37	177.4
88	Glu	1.96	29.33	178.21
89	Leu	1.55,1.75	42.36	178.57
90	Ile	1.9	38.31	177.08
91	Asp	2.58	41.36	176.21
92	Lys	1.72	32.78	176.24
93	Lys	1.76	32.67	176.43
94	Glu	1.87,2.01	30.39	175.17
95	Val	1.95	32.83	175.26
96	Asn	2.62,2.77	39.21	
97	Pro	1.85,2.19	32.35	176.62
98	Gln	2.02,1.92	29.5	175.68
99	Val	2	32.73	174.99
100	Met		33.93	

Postranní řetězce							
1	Met						
2	Gly						
3	Gln						
4	Glu	2.19:Hga					
5	Leu	0.70:Hda*	24.40:Cda				
6	Ala						
7	Gln	2.35:Hga	33.89:Cg				
8	His						
10	Arg	1.64:Hga	3.15:Hda	27.33:Cg	43.41:Cd		
10	Arg	1.64:Hga	3.15:Hda	27.33:Cg	43.41:Cd		
11	Tyr						
12	Val	0.57:Hga*	0.59:Hgb*				
13	Glu	35.15:Cg					
14	Gln	2.44:Hga					
15	Leu	1.27:Hg	0.35:Hda*	0.53:Hdb*	25.28:Cg	24.92:Cda	
16	Lys	1.19:Hga	1.22:Hgb	1.50:Hda			
17	Gln	2.47:Hga					
18	Ala						
19	Leu	0.56:Hda*	0.59:Hdb*				
20	Lys	1.45:Hga	2.99:Hda	25.28:Cg			
21	Thr	1.28:Hg2*					
22	Arg	3.08:Hda	43.33:Cd				
23	Gly						
24	Val	0.73:Hga*	0.74:Hgb*				
25	Lys						
26	Val	0.72:Hga*					
27	Lys						
28	Tyr						
29	Ala						
30	Asp						
31	Leu						
32	Leu	1.41:Hg	0.84:Hda*	0.86:Hdb*	27.14:Cg	24.93:Cda	24.31:Cdb
33	Lys	1.53:Hga	1.71:Hda	2.99:Hea			
34	Phe						
35	Phe						
36	Asp						
37	Phe						
38	Val	0.19:Hga*	0.50:Hgb*	23.34:Cga			

Postranní řetězce							
39	Lys						
40	Asp						
41	Thr	0.33:Hg2*	21.92:Cg2				
42	Cys						
43	Pro						
44	Trp						
45	Phe						
46	Pro						
47	Gln						
48	Glu	1.89:Hga	35.03:Cg				
49	Gly						
50	Thr	1.09:Hg2*	21.80:Cg2				
51	Ile	0.66:Hg2*	0.45:Hd1*	27.60:Cg1	17.93:Cg2	13.51:Cd1	
52	Asp						
53	Ile	1.45:Hg1a	1.47:Hg1b	1.03:Hg2*	0.98:Hd1*	27.81:Cg1	18.32:Cg2
54	Lys						
55	Arg						
56	Trp						
57	Arg	1.82:Hga	3.24:Hda	3.30:Hdb	27.32:Cg	43.64:Cd	
58	Arg						
59	Val	-0.51:Hga*	0.54:Hgb*	20.70:Cga	22.97:Cgb		
60	Gly						
61	Asp						
62	Cys						
63	Phe						
64	Gln	2.35:Hga					
65	Asp						
66	Tyr						
67	Tyr						
68	Asn						
69	Thr	0.22:Hg2*					
70	Phe						
71	Gly						
72	Pro	1.97:Hga	3.22:Hda	50.21:Cd			
73	Glu	2.23:Hga					
74	Lys	1.24:Hga	1.43:Hda	1.50:Hdb	2.55:Hea	2.60:Heb	25.21:Cg
75	Val	0.44:Hga*	1.07:Hgb*				
76	Pro	1.32:Hga					
77	Val	1.00:Hga*	1.01:Hgb*	20.96:Cga	21.06:Cgb		
78	Thr	1.06:Hg2*					

Postranní řetězce							
79	Ala						
80	Phe						
81	Ser						
82	Tyr						
83	Trp						
84	Asn						
85	Leu	0.65:Hda*	0.73:Hdb*				
86	Ile	1.12:Hg1a	1.47:Hg1b	-0.31:Hg2*	0.73:Hd1*	29.57:Cg1	16.25:Cg2
87	Lys	1.24:Hga	24.33:Cg				
88	Glu	37.00:Cg					
89	Leu	1.50:Hg	0.63:Hda*	0.67:Hdb*	25.43:Cg	25.04:Cda	24.43:Cdb
90	Ile	1.15:Hg1a	0.69:Hg2*	0.31:Hd1*	25.67:Cg1	14.49:Cd1	
91	Asp						
92	Lys	1.36:Hga	1.60:Hda	2.91:Hea	29.80:Cd	42.56:Ce	
93	Lys	25.17:Cg					
94	Glu	2.30:Hga	33.96:Cg				
95	Val	0.74:Hga*	0.82:Hgb*	21.14:Cga	20.80:Cgb		
96	Asn						
97	Pro	1.92:Hga	3.69:Hda	3.71:Hdb	27.32:Cg	50.82:Cd	
98	Gln	2.29:Hga	33.90:Cg				
99	Val	0.84:Hga*	20.92:Cga				
100	Met						