

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Biofyzikální chemie



**Bc. Anna Dubánková**

Strukturní charakterizace replikace RNA lidského Aichi viru

Structural characterization of human Aichi virus RNA replication

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D.

Praha, 2016

**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, 02.05.2016

Podpis:

Úvodem své práce bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Mgr. et Mgr. Evženu Bouřovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a ochotu s kterou se mi věnoval v průběhu celé práce. Mé poděkování rovněž patří Martinu Klímovi, Ph.D. za podnětné rady a věcné připomínky. Také bych chtěla poděkovat Janu Šilhánovi, Ph.D. za trpělivou pomoc při zpracovávání strukturních dat. Dále děkuji všem členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu vždy poradit a pomoci.

## **Abstrakt (česky)**

Virové RNA dependentní RNA polymerasy (RdRp) jsou enzymy, které umožňují RNA virům replikovat svůj genom a také připravit mediátorovou RNA pro translaci virových proteinů. Díky své relativní evoluční konzervovanosti jsou RdRp dobrým cílem pro design léčiv. V této práci ukazujeme strukturu RdRp, 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru, která doposud nebyla vyřešena. Aichi virus je lidský patogen, který způsobuje gastroenteritidu. Aichi virus se také používá jako modelový organismus pro studium příbuzných virů, které jsou svou virulencí mnohem nebezpečnější, jako je Rhinovirus, virus hepatitidy A, SARS, virus hepatitidy C, virus žluté horečky nebo západo-Nilský virus.

Kromě strukturní studie 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru se v této práci zabýváme ověřením hypotézy, podle které se protein 3D<sup>pol</sup> váže na membránu skrze fosfatidylinositol 4 fosfát (PI4P z angl. "phosphatidylinositol 4 phosphate") - významný regulační lipid. Membrány bohaté na PI4P vznikají v buňkách po infekci jednovláknovými plus RNA (ssRNA z angl. "single - stranded") viry.

V neposlední řadě jsme zkoumali vliv ribonukleotidů na stabilitu proteinu 3D<sup>pol</sup>.

## **Abstract (anglicky)**

Viral RNA dependent RNA polymerases (RdRps) are enzymes which enable RNA viruses to replicate their genome and to prepare mRNA for translation of viral proteins. Due to its relative evolutionary conservation RdRps are good targets for drug design. In this work we present a structure of the RdRp (3D<sup>pol</sup>) of Aichi virus, which has not been solved yet. Aichi virus is a human pathogen that causes gastroenteritis. Aichi virus is also used as a model organism for studying cognate viruses which virulence is more dangerous, for example: Rhinovirus, Hepatitis A virus, SARS virus, hepatitis C virus, yellow fever, and West-Nile virus.

In addition to structural studies of Aichi virus 3D<sup>pol</sup> we also tested a previously published hypothesis that, 3D<sup>pol</sup> is recruited to the membrane through phosphatidylinositol 4 phosphate (PI4P) - an important regulatory lipid. Membranes highly enriched in PI4P are formed in cells infected by single stranded positive sense RNA (plus ssRNA) viruses.

Finally we tested the influence of ribonucleotides on the 3D<sup>pol</sup> protein stability.

(In Czech)

## Obsah

Teoretický úvod.....	7
Aichi virus.....	7
Genom Picornavirů.....	7
Životní cyklus Picornavirů.....	8
Translace.....	8
Replikace RNA.....	9
Kompartmentace.....	10
Virově indukované membránové struktury.....	10
3CDpro.....	12
3Dpol.....	12
Dvoukovový mechanismus.....	16
3B.....	16
Interakce 3D <sup>pol</sup> s nukleotidy.....	16
Inhibitory 3D <sup>pol</sup> .....	16
Redukce povrchové entropie.....	17
Cíl diplomové práce.....	18
Výsledky.....	19
Expese a purifikace proteinu 3D <sup>pol</sup> wt.....	19
Krystalizace proteinu 3D <sup>pol</sup> wt.....	20
Příprava konstruktů DNA 3D <sup>pol</sup> K33A,K34A.....	22
Expese a purifikace 3D <sup>pol</sup> K33A,K34A.....	23
Krystalizace proteinu 3D <sup>pol</sup> K33A,K34A.....	24
Struktura 3D <sup>pol</sup> z Aichi viru.....	24
Sekvenční srovnání.....	26
Strukturní srovnání.....	27
Interakce proteinu 3D <sup>pol</sup> z Aichi viru s lipidem PI4P.....	30
Diferenční skenovací fluorimetrie.....	32

Diskuse .....	34
Materiál a metody.....	36
Příprava rekombinantního proteinu.....	36
Příprava konstruktů DNA.....	36
Transformace kompetentních bakterií .....	37
Exprese proteinu v <i>E. coli</i> .....	38
Izolace a purifikace proteinu .....	39
Lyse bakteriálních buněk.....	39
Izolace proteinu - Afinity chelatační chromatografie .....	39
Reversní afinity chelatační chromatografie.....	39
Gelová permeační chromatografie.....	39
Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v denaturačním prostředí dodecylsírany sodného (SDS PAGE) .....	40
Krystalizace .....	41
Dehydratace .....	41
Diferenční skenovací fluorimetrie .....	42
"Pulldown Assay" .....	43
Příprava liposomů .....	43
Sekvenční srovnání 3D <sup>pol</sup> .....	43
Strukturní srovnání 3D <sup>pol</sup> .....	43
Závěr .....	44
Použité přístroje .....	45
Použitý materiál: .....	46
Seznam zkratk .....	47
Citovaná literatura .....	49

## **Teoretický úvod**

Centrální dogma molekulární biologie popisuje cestu přenosu genetické informace: replikaci DNA podle DNA, transkripci DNA do RNA a translaci RNA do proteinů [1]. Replikace RNA dle RNA templátu, která je zprostředkována třídou enzymů zvaných RNA dependentní RNA polymerasy (RdRp) stojí mimo toto schéma. RdRp mohou být evolučně staré proteiny z dob, kdy byla RNA primárním genetickým materiálem. Tyto proteiny však mají zásadní funkci i v současné biologii. RdRp jsou kódovány širokou řadou RNA virů, které je využívají k replikaci svého genomu a synthese mRNA.

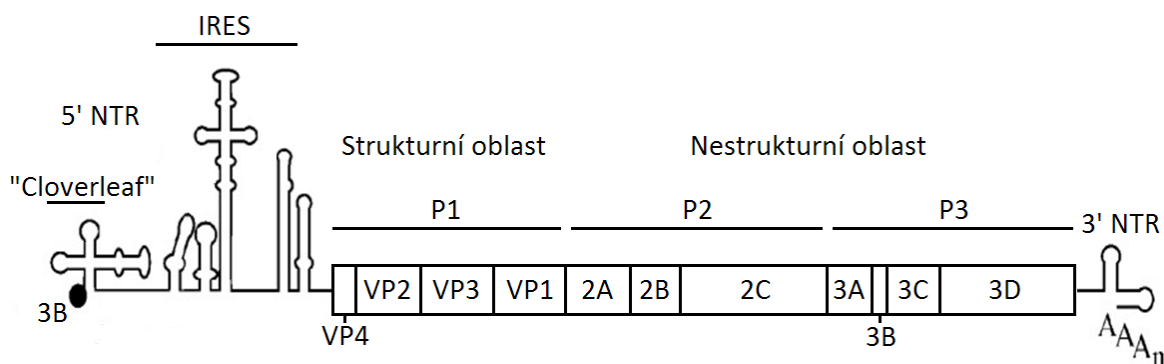
## **Aichi virus**

Viry jsou malé, obligátně intracelulární paraziti, jejichž genetický materiál může být uložen buď v podobě DNA, nebo RNA. Replikace virového genomu i samotná produkce virových partikulí je závislá na hostitelské buňce.

Aichi virus je plus ssRNA virus [2]. RNA genom plus ssRNA virů na rozdíl od genomu minus ssRNA virů může být přímo translatován do virových proteinů. Plus ssRNA viry zahrnují významné lidské patogeny, jako je Poliovirus, *Coxsackievirus B3*, Rhinovirus, virus hepatitidy A, SARS, virus hepatitidy C, virus žluté horečky, západo-Nilský virus a Aichi virus. Aichi virus je lidský patogen způsobující gastroenteritidu, spadá do rodu Kobuvirů z rodiny Picornavirů [3]. Infekce tímto virem byla zaznamenána v posledních deseti letech v Evropě, Asii a Brazílii [3]–[5].

## **Genom Picornavirů**

Uvnitř kapsidu se nachází 8 280 nukleotidů dlouhá plus ssRNA, která kóduje virový polyprotein. Na 5' konci genomu je kovalentně navázaný virový protein 3B, také známý jako VPG (z angl.: „viral protein genome-linked“)[6], který má funkci primeru [7]. Následuje vedoucí sekvence, která umožňuje iniciaci translace RNA (obsahuje replikační signál "cloverleaf" a IRES z angl. "internal ribosomal entry site"). Dále se v genomu nachází 3 oblasti, které kódují mRNA: P1, P2 a P3. Oblast P1 kóduje strukturní proteiny kapsidu, oblasti P2 a P3 kódují nestrukturní virové proteiny (OBR 1, str. 8). Na 3' konci genomu se nachází další, kratší netranslatované místo zakončené polyA koncem [8]. PolyA konec bývá v rámci rodiny Picornavirů variabilně dlouhý, u Aichi viru čítá 13 adenosinů. Výše popsaná mRNA je translatována jako polyprotein, který je následně naštěpen na jednotlivé proteiny [2].



### **OBR 1: Genom Polioviru**

Na obrázku je schematicky znázorněn genom Polioviru, který má stejné uspořádání jako Aichi virus. Na 5' konci se nachází netranslatovaný region (NTR), který zahrnuje "cloverleaf" a IRES. Dále směrem ke 3' konci je strukturní oblast, která kóduje kapsidové proteiny (VP0, VP1, VP3). Následuje nestrukturní oblast, která kóduje virové proteiny schematicky značené jako: 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D. Na 5' konci virového genomu se nachází kovalentně navázaný protein 3B. Převzato a upraveno z [9].

## **Životní cyklus Picornavirů**

Životní cyklus Picornavirů začíná jejich vazbou na povrchové receptory hostitelské buňky [10], [11]. Tato interakce vede k internalizaci virové partikule do buňky prostřednictvím endocytosy (skrze endosomy), a následně k narušení virové kapsidy a uvolnění virové genomové RNA [12], [13].

## **Translace**

Virová genomová RNA je nejprve translatována jako jeden otevřený čtecí rámec za produkce polyproteinu, který je kotranslačně štěpen virovými proteasami 2A a 3CD<sup>pro</sup> [6], [13]. Takto procesované proteiny (3Dpol, 3AB, 3B, 2C) jsou schopné katalyzovat syntézu minus ssRNA, která je templátem pro syntézu plus ssRNA.

P1 protein obsahuje sekvenci všech virových kapsidových proteinů. Postupné štěpení proteinu P1 virovou proteasou 3CD<sup>pro</sup> produkuje VP1, VP3 a VP0. Zároveň rozštěpení proteinu P1 vede



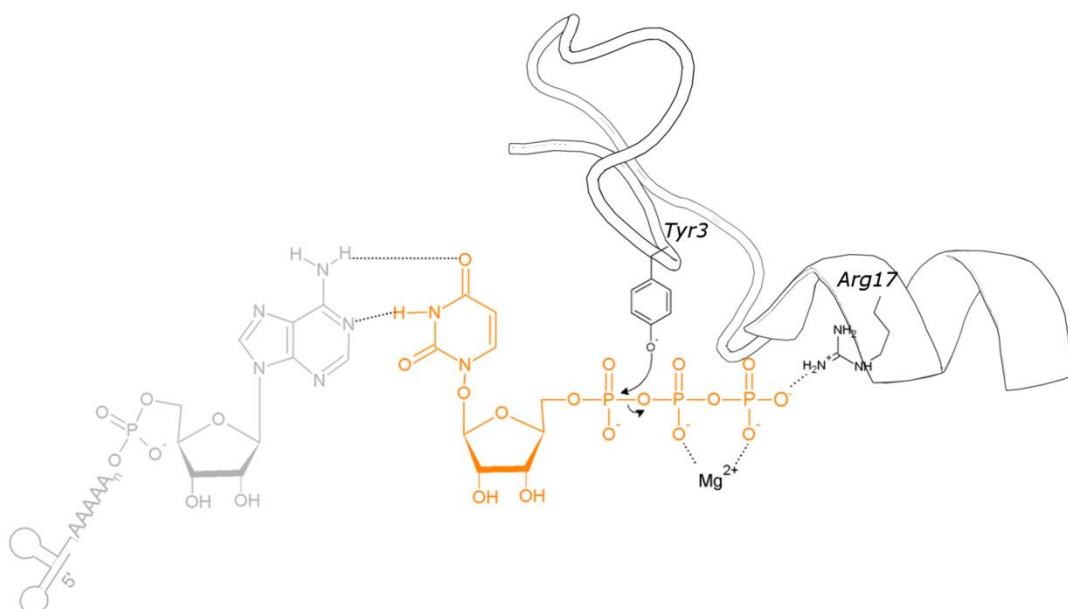
ke spontánní asociaci kapsidových proteinů v kapsid. Protein VP0, který se nachází na N konci polyproteinu, je myristoylován [14]. Není známo, kdy dochází k enkapsidaci RNA do kapsidu, víme pouze, že maturace VP0 na VP2 a myristoylovaný VP4 vede k enkapsidaci virové RNA. Tento proces je úzce spjat s replikací virové RNA.

## Replikace RNA

Replikace RNA vyžaduje iniciaci, tedy tvorbu několika prvních fosfodiesterových vazeb mezi nukleotidy. U RNA virů jsou známy dva typy iniciace replikace RNA: *de novo* a primer dependentní iniciace. Při iniciaci *de novo* je jako primer použit 3' konec templátové RNA [15]. Obecně jsou při iniciaci *de novo* upřednostňovány purinové nukleotidy a to zejména GTP nukleotidy na primerové straně templátu [16].

Enzymy, které využívají primer dependentní mechanismus iniciace replikace RNA, využívají oligonukleotid, nebo protein s primerovou funkcí. Některé minus RNA viry odštěpují oligonukleotid z 5' konce mRNA hostitelské buňky (methylguanosinovou čepičku) a použijí ji jako RNA primer [17]. Některé RdRp jsou schopné samy nasynthetisovat 2 - 5 nukleotidů, které mohou sloužit jako primer [18]. Pro templát primerovou iniciaci některé viry z rodiny *Flaviviridae* používají svůj vlastní 3' konec RNA [19].

Picornaviry používají druhý z mechanismů: při iniciaci replikace Picornavirů je nezbytný virový protein 3B, který je pomocí RdRp, 3Dpol, uridinylován [20], aby mohl následně sloužit jako primer komplementární k polyA konci genomu viru [21]. Hydroxylová skupina třetího tyrosinového zbytku primerového proteinu 3B zprostředkovává tvorbu fosfodiesterové vazby s prvním nukleotidem [22] [23], jak je schematicky znázorněno na OBR 2, str. 10.



### **OBR 2: Model iniciace replikace RNA Polioviru**

Protein 3B (bílý s černou konturou), který je v komplexu s polymerasou  $3D^{pol}$  (na schématu není uvedena), se váže na 3' konec polyA virového genomu (znázorněn šedě). Komplementární nukleotid, UTP je zachycen v blízkosti třetího tyrosinového zbytku, za pomoci argininu 17 proteinu 3B [23]. Protein  $3D^{pol}$  katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby mezi UMP a hydroxylovou skupinou tyrosinu. Uridinylovaný protein 3B pak slouží jako primer komplementární k 3' konci virové RNA [22].

Po iniciaci se RdRp naváže na vedoucí sekvenci virového minus RNA genomu a spustí se replikace, která dá vzniku plus RNA.

### **Kompartimentace**

V případě Picornavirů se předpokládá, že se virový replikační komplex nachází na vnitřní straně membrány vesikulů replikačních organel (viz níže) [24]. Některé proteiny Picornavirů (2B, 3A, 3AB), které se účastní replikace virové RNA, se integrují do membrány hostitelské buňky [25].

### **Virově indukované membránové struktury**

K tvorbě replikačního komplexu potřebují plus RNA viry membránu hostitelské buňky. U Picornavirů dochází k indukci tvorby sítí tubulo – vesikulárních struktur, které jsou nezbytné pro tvorbu

replikačního komplexu [26], [27]. V tubulo – vesikulárních replikačních strukturách jsou proteiny zodpovědné za replikaci virové RNA umístěny na povrchu tubulu [28].

Replikace plus RNA virů probíhá v multiproteinových komplexech na membráně hostitelské buňky [25]. Virově indukované membránové struktury jsou nezbytné pro tvorbu virového replikačního komplexu:

- poskytují určité lipidy nezbytné pro replikaci virové RNA
- zajišťují lešení pro ukotvení virového replikačního komplexu [29]
- napomáhají nárůstu lokální koncentrace komponentů nezbytných pro replikaci virové RNA [29].
- předcházejí aktivaci hostitelských obranných mechanismů, které mohou být spuštěny dvouvláknovou RNA, která vzniká jako meziprodukt během replikace virové RNA [30].

Vazba virové RdRp na membránu je důležitá pro iniciaci replikace RNA [31]. Membrány hostitelských buněk jsou po infekci plus ssRNA viry dramaticky remodelovány, následně na jejich cytosolové straně probíhá replikace RNA [32].

Topologie takovýchto virově indukovaných membránových struktur dosud nebyla přesně popsána. Bylo zjištěno, že C konec poliovirvého proteinu 3A obsahuje hydrofobní sekvenci zodpovědnou za asociaci s membránou [33]. Protein 3A navázaný na membránu selektivně rekrutuje fosfatidylinositol 4 kinasu III $\beta$  [34]. Dosud byly popsány dva možné mechanismy, kterými virové proteiny 3A rekrutují fosfatidylinositol 4 kinasu III $\beta$ :

- prostřednictvím GBF1/Arf1 (z angl. "Golgi-specific Brefeldin A-resistance factor 1" / "ADP-ribosylation factor 1") komplex [35], [36],
- skrze ACBD3 (z angl. "acyl-coenzyme A binding domain 3") [37].

Fosfatidylinositol 4 kinasa III $\beta$  produkuje lipidové mikroprostředí fosfatidylinositol 4 fosfátu (PI4P z angl. "phosphatidylinositol 4 phosphate"), které usnadňuje vazbu virové RNA polymerasy (3D<sup>pol</sup>) na membránu a syntézu virové RNA [34].

Viry přednostně používají membrány ER, endosomů, nebo mitochondriální membrány, které lze snadno rozšiřovat, přeskupovat a zároveň přirozeně obsahují vyšší koncentraci PI4P [38]. Katalytický cyklus proteinu 3D<sup>pol</sup> plus RNA virů se skládá z šesti kroků, během kterých dochází k opakovanému otevření a uzavření aktivního místa.

V prvním kroku je navázán RNA templát a aktivní místo je otevřené. V druhém kroku dochází k vazbě nukleotidu do aktivního místa na základě párování basí, což vede ke třetímu kroku: uzavření aktivního místa a tvorbu tzv. prekatalytického stavu. Ten iniciuje čtvrtý krok, ve kterém  $3D^{pol}$  přechází do tzv. postkatalytického stavu. V následujícím pátém kroku je aktivní místo znovu otevřeno. Předpokládá se existence kroku šest, ve kterém dochází k translokaci proteinu podél templátové RNA [39].

V prvním cyklu vznikne minus ssRNA, která je použita jako templátová RNA pro druhý cyklus, při kterém vzniká plus ssRNA. Plus ssRNA může být použita jako mRNA pro translaci, templát pro replikaci, nebo jako substrát pro enkapsidaci do virové kapsidy.

Plus ssRNA genom je translatován jako jeden polyprotein, který je nascentně štěpen do tří polyproteinů: P1, P2 a P3. Polyprotein P1 je prekursor virových strukturálních proteinů, P2 a P3 jsou prekursory nestrukturních proteinů.

### **3CDpro**

Protein 3CDpro je fúzní protein 3D polymerasy a 3C proteasy. Protein  $3CD^{pro}$  stimuluje iniciaci replikace, vazbu proteinu 3B [40], [41].  $3CD^{pro}$  je RNA vazebný protein, jehož hlavní funkce je kontrola translace a replikace virového genomu [42], [43]. Protein  $3CD^{pro}$  se váže na 5' a 3' nekódující regulační oblasti virového RNA genomu.  $3CD^{pro}$  vykazuje vysokou proteasovou aktivitu, štěpí kapsidové proteiny 1000 x efektivněji než samotná proteasa 3C [44], [45]. Proteolytickým procesováním N - konce získá protein  $3D^{pol}$  polymerasovou aktivitu, kterou  $3CD^{pro}$  nevykazuje [46], [47]. Přidáním 11 residuí z C - konce 3C na N - konec  $3D^{pol}$  dojde ke ztrátě polymerasové aktivity  $3D^{pol}$  [48], stejně jako delecí prvních 6 aminokyselin  $3D^{pol}$  [49]. N - terminální glycin 1  $3D^{pol}$  z Polioviru se nachází v kapse uvnitř proteinu a funguje jako alosterický spínač, který aktivuje polymerasu [50].

### **3Dpol**

RNA dependentní RNA polymerasy (RdRp) hrají významnou roli v replikačním cyklu RNA virů, mají důležitou katalytickou funkci, replikaci RNA. RdRp chemicky vzato katalyzují tvorbu fosfodiesterové vazby mezi ribonukleotidy v RNA. Všechny známé RNA viry používají k replikaci svého genomu RdRp [51].

V současné době jsou struktury virových RdRp intenzivně studovány. Dosud byly vyřešeny struktury  $3D^{pol}$  z těchto virů: lidský Rhinovirus [52], „Foot-and-mouth disease virus“ (FMDV) [53], Poliovirus [54], Coxsackievirus [55], Enterovirus 71 [56] a Encefalomyokardiovirus (EMCV) [57].

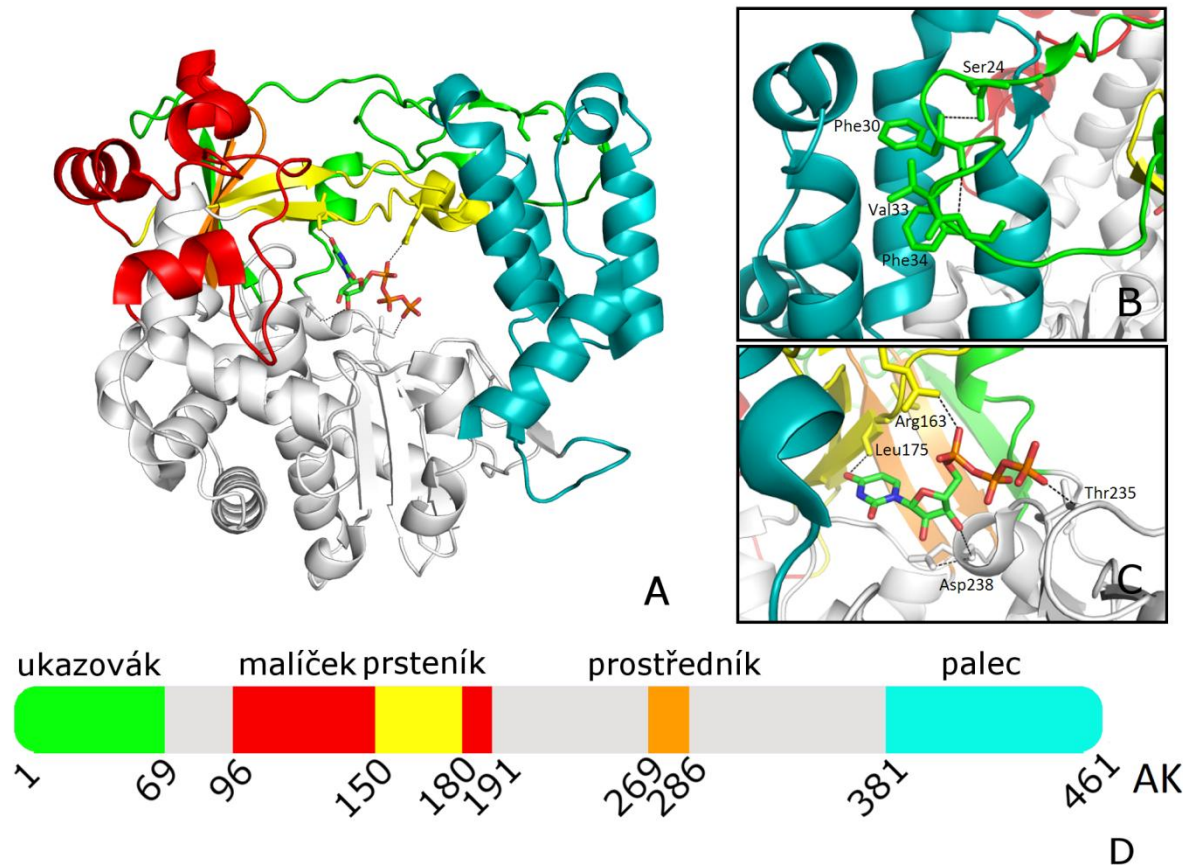
RdRp mají evolučně konservovanou terciární strukturu, takzvanou strukturu pravé ruky, která zahrnuje jednotlivé domény zvané: prsty, dlaň a palec [54]. Tyto strukturální prvky jsou společné i

pro DNA dependentní DNA polymerasy, DNA dependentní RNA polymerasy a RNA dependentní DNA polymerasy [58].

Na základě krystalografických struktur byly u RdRp pozorovány jejich dvě základní konformace: sevřená dlaň a otevřená dlaň [25]. V konformaci sevřené dlaň (kterou zauímají RdRp 3D<sup>pol</sup> [59]) dochází k interakci domén prstů a palce skrze N - konec proteinu a smyček vyčnívajících z prstů (tzv. konečků prstů), které obklopují aktivní místo enzymu [60]. Doména prstů se skládá ze 4 propletených strukturních motivů, které jsou pojmenovány po jednotlivých prstech ruky: ukazováček, prostředníček, prsteníček a malíček, jak je uvedeno na OBR 3, str 14.

Motiv ukazováčku se nachází na N - konci 3D<sup>pol</sup>, vytváří smyčku, která vede přes celý protein k palcové doméně a zpět. Motiv prostředníku se skládá z antiparalelních  $\beta$  - skládaných listů s  $\beta$  - otočkou na konečku prstu. Motiv prsteníku zauímá strukturu dvou antiparalelních  $\beta$  - skládaných listů, které vedou skrz aktivní centrum 3D<sup>pol</sup>. Koneček prstu ukazováčkového motivu sahá do hydrofobní kapsy palcové domény (která se nachází na C - konci proteinu [54]) a tím vytváří NTP vstupní kanál (OBR 3, str 14, část B). Klíčové interdoménové kontakty tvoří 2 konzervované fenylalaniny. Přerušením této interakce dojde k dramatickému poklesu elongační aktivity proteinu 3D<sup>pol</sup> [49], [61].

Prsteníček vyčnívá na povrch struktury  $\alpha$  - helixem, který se nachází mezi  $\beta$  - skládanými listy. Strukturní motiv prsteníku vytváří povrch NTP vstupního kanálu. Malíček je největší strukturní motiv prstové domény, která je oddělena od ostatních prstů žlábkem v horní části oblasti prstů. Horní část malíčku bývá flexibilní, správné sbalení malíčkového motivu je závislé na tvaru prsteníku, kde vytváří střechu NTP vstupního kanálu [50].



### OBR 3: Strukturní domény RdRp

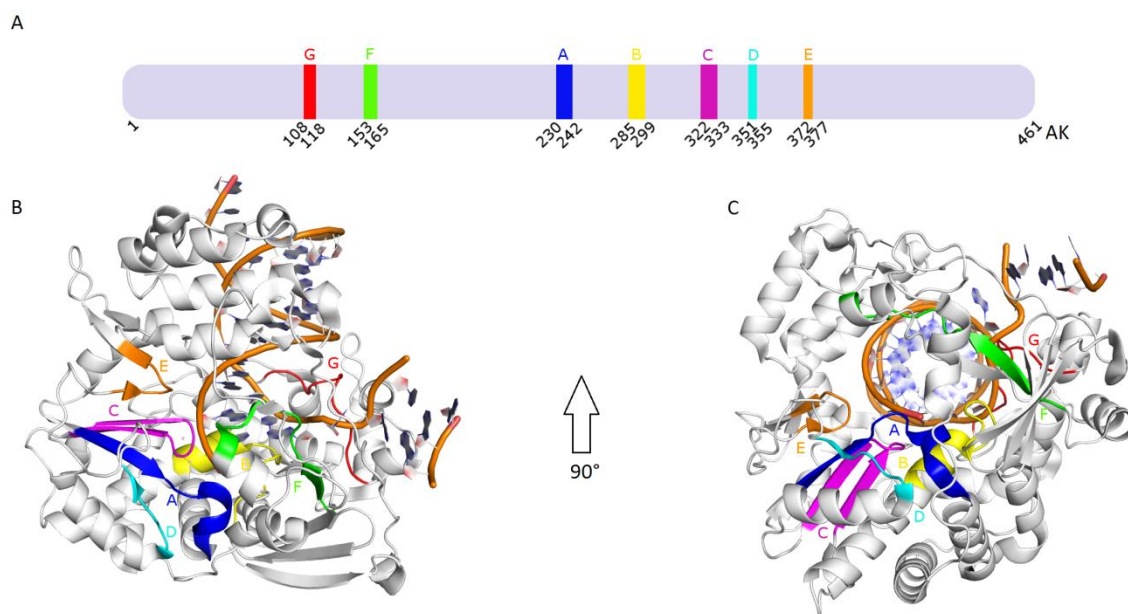
Na obrázku je uveden model proteinu 3D<sup>pol</sup> z Polioviru v komplexu s UTP (PDB ID 2IM2, [61]). Na struktuře jsou označeny jednotlivé strukturní domény: dlaň šedě, palec modře, ukazovák zeleně, prostředník oranžově, prsténík žlutě a malíček červeně. V části B je detail fenylalaninových zbytků 30 a 34 ukazovákového motivu, které interakcí s palcovou doménou vytváří NTP vstupní kanál. V části C je zobrazen detail vazby UTP.

Na obrázku D je schematicky znázorněna aminokyselinová sekvence 3D<sup>pol</sup> Polioviru, na kterém jsou označeny jednotlivé domény (šedě je uvedena dlaň). Čísla pod schématem značí umístění motivu v proteinu v počtu aminokyselin.

U RdRp lze na základě své funkce rozeznat sedm konservovaných strukturních motivů: A - E, které tvoří dlaň a F - G, které představují prsty. Jednotlivé motivy mají svoji roli v replikaci RNA. Motivy A, B, D a F umožňují vazbu nukleotidu [39]. Motiv B obsahuje vysoce konzervovaný serinový zbytek, který hraje roli v rozpoznávání 2' OH NTP, zároveň obsahuje glycin, který umožňuje odklopení

postranního řetězce a odkrytí aktivního místa [39]. Motivy A a C umožňují katalýzu dvěma ionty kovu [62]. Motivy D a E mají méně konzervovanou primární strukturu. Motiv D obsahuje lysin (u Polioviru Lys359), který je konzervovaný v primer dependentních RdRp a hraje zásadní roli v katalýze replikace RNA [63]. Motiv D zprostředkovává vazbu primeru svým vysoce konzervovaným lysinem, motivy B, G, F zase vazbu templátu [64]. Motivy F a G jsou součástí tzv. prstové domény, funkce těchto motivů dosud není zcela známá. Současné výsledky naznačují, že se váže na nově vytvořenou virovou RNA [65]. Motif G se vine podél templát vazebného kanálu. Lokalizace těchto strukturálních motivů v rámci molekuly  $3D^{pol}$  z Polioviru je uvedena na OBR 4.

Zároveň byly ve strukturách RdRp nalezeny 3 důležité kanály: templátový kanál, který slouží ke vstupu templátu RNA, NTP kanál pro vstup nukleotid trifosfátů a centrální kanál, kterým odchází dvouvláknová RNA ven z enzymu [35].



#### **OBR 4: Strukturální motivy RdRp**

V části A je schématicky znázorněn protein  $3D^{pol}$  z Polioviru, na kterém jsou barevnými písmeny označeny jednotlivé motivy (A - F). Čísla pod schématem značí umístění motivu v proteinu v počtu aminokyselin. V části B a C je struktura proteinu  $3D^{pol}$  s RNA z Polioviru (PDB ID 3OL8, [39]), na které jsou barevně označeny jednotlivé strukturální motivy. V části C je protein z části B pootočen o 90°.

RdRp jsou nezbytné pro RNA viry nejen proto že umožňují replikaci virové RNA, ale jsou také motorem, který pohání genovou variabilitu. Samy RdRp mají poměrně konzervovanou strukturu, což je společně s jejich stěžejním významem pro činnost RNA virů dělá dobrým cílem pro design léčiv.

### **Dvoukovový mechanismus**

Pro enzymatickou aktivitu RdRp je nezbytná přítomnost dvou dvoumocných kovových iontů [66]. Přicházející NTP je doprovázeno dvěma ionty kovu, které se vážou na fosfát nukleotidu a dva evolučně konzervované aspartáty. První iont kovu koordinuje  $\alpha$  - fosfátovou skupinu NTP a 3' OH skupinu primeru a karboxyl. Druhý iont kovu koordinuje  $\beta$  - a  $\gamma$  - fosfátovou skupinu NTP. Při této katalýze leží akceptory vodíkové vazby v identické poloze pro všechny správné Watson - Crickovy páry basí, reakce tedy může proběhnout pouze pro korektní párování [67].

Použití různých dvoumocných kovů ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) má vliv na aktivitu RsRp, přičemž nejvíce odpovídají biologickým pozorování  $Mg^{2+}$  ionty [68].

### **3B**

Protein 3B je malý virový protein, který se kovalentně váže na 5' konec virové genomové RNA skrze OH skupinu absolutně konzervovaného tyrosinu, který zpravidla bývá třetí aminokyselinou z N konce [20]. RdRp  $3D^{pol}$  specificky uridyniluje protein 3B [69], který pak může nasedat na polyA konec virového genomu. Protein 3B tak slouží jako primer pro replikaci RNA [22].

### **Interakce $3D^{pol}$ s nukleotidy**

Vazba NTP na RdRp primárně zahrnuje interakci s trifosfáty a ribosou. Trifosfáty interagují s oběma kovovými ionty a kladně nabitými lysinovými a argininovými zbytky (motiv F). Na struktuře  $3D^{pol}$  z Polioviru v komplexu s UTP je patrné, jak jsou fosfátové skupiny stabilizovány threoninovým zbytkem 235 z dlaňové domény a lysinovým 167 spolu s argininovým 163 zbytkem z prsteníkového motivu. 3' OH skupina ribosy je stabilizovaná vodíkovou vazbou aspartátu 238 a uracil zas leucinem 175 [61] (OBR 3, str.14, část C). Vysoce konzervovaný serinový zbytek (na motivu B) vytváří vodíkový můstek, který je nezbytný pro odlišení 2'OH skupiny NTP od 2' H dNTP [39], [70].

Na základě krystalových struktur  $3D^{pol}$  s nukleotidy bylo zjištěno, že GTP zaujímá energeticky náročnější *syn* konformaci, zatím co ATP, UTP a CTP zaujímají výhodnější *anti* konformaci [61].

### **Inhibitory $3D^{pol}$**

Jak již bylo zmíněno, enteroviry z rodiny Picornavirů zahrnují mnoho významných lidských patogenů. Antivirotika proti těmto virům dosud nejsou k dispozici. Virový protein  $3D^{pol}$  je dobrý cíl pro design právě těchto léčiv. Dosud byly nalezeny převážně inhibitory na basi nukleosidů, které kompetují s endogenními nukleotidy. Druhý typ polymerasových inhibitorů jsou tzv. nenukleosidové



inhibitory, které mohou používat různé mechanismy, například stabilizovat enzym tak, že není schopen konformační změny [71].

Obvykle jsou tyto nenukleosidové inhibitory zacíleny na vazbu do dutin na povrchu proteinu, které jsou strukturně více flexibilní než nukleotid vazebné místo. Mimo to mají nenukleosidové inhibitory menší vedlejší účinky a jsou méně náchylné k vývoji virové rezistence [72].

### **Redukce povrchové entropie**

Redukce povrchové entropie (SER, z angl. "Surface entropy reduction") je metoda, která se používá za účelem zvýšení pravděpodobnosti krystalizace proteinů. Aminokyselinové zbytky s vysokou konformační entropií nahrazuje za alaniny. Některé proteiny krystalizují snadno, jiné tvoří krystaly jen obtížně. Podle [73] ovlivňují krystalizační schopnosti proteinů jejich povrchové vlastnosti - zvláště aminokyseliny, které činí nukleační či krystalizační proces obtížnější. Empirická zkušenost podložená dlouhou řadou krystalizačních pokusů tvrdí, že residua obsahující kombinace aminokyselin: lysinu, glutaminu nebo glutamátu snižují krystalizační schopnosti proteinů. Tato residua způsobují navýšení entropické bariery, která musí být překonána při tvorbě krystalových kontaktů [74]. K překonání této bariery mohou být tyto aminokyseliny (obvykle 2 nebo 3 blízko sebe, v pořadí nebo prostoru) nahrazeny aminokyselinami s "nízko - entropickými" postranními řetězci (např. alaniny) [75]. Tímto postupem můžeme navrhnout konstrukty proteinů, které budou mít větší sklony k tvorbě krystalových kontaktů. Bylo ukázáno, že za použití SER je možné vykrytalizovat proteiny, které jinak nekrytalizují a že SER může zlepšit difrakční vlastnosti krystalů [75].

## Cíl diplomové práce

Aichi virus je lidský patogen způsobující gastroenteritidu, který je zároveň používán jako modelový organismus pro další plus RNA viry. V této práci jsme se zaměřili na RNA-dependentní-RNA polymerasu (3Dpol) z Aichi viru, která hraje zásadní roli v replikaci viru.

Naším hlavním cílem je definovat strukturu 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru, která dosud není známá. Vzhledem k vyšší molekulové hmotnosti proteinu (~ 40 kDa) jsme zvolili metodu rengenostrukturní analýzy.

### Zvolili jsme tento pracovní postup:

- příprava expresního plasmidu pro 3D<sup>pol</sup>
- exprese proteinu 3Dpol
- izolace a purifikace 3Dpol
- krystalizace proteinu 3Dpol
- difrakční experiment
- vyřešení struktury proteinu 3Dpol

Kromě strukturní studie proteinu 3Dpol se tato práce rovněž zabývá rozklíčováním mechanismu replikace RNA plus RNA virů, která je závislá na membráně. Dosavadní znalosti v této problematice naznačují, že rozhodující molekulou vazby RdRp na membránu by mohl být lipid PI4P. Molekula PI4P vzniká činností fosfatidylinositol 4 fosfát kinasy III  $\beta$ , kterou na membránu rekrutuje virový protein 3A. Jedním z našich cílů bylo prověřit interakci proteinu 3D<sup>pol</sup> s lipidem PI4P. K ověření této hypotézy byla zvolena metoda "pulldown" na liposomech.

Jako další cíl jsme si stanovili porovnání proteinu 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru s proteiny 3D<sup>pol</sup> z dalších plus RNA virů a to jednak porovnáním primární struktury (sekvenčním srovnáním), terciární struktury (strukturním srovnáním), ale i vlastnostmi proteinu - stabilizace proteinu nukleotidy pomocí diferenční skenovací fluorimetrie.

## Výsledky

Nejprve byl připraven protein 3D<sup>pol</sup> v podobě, ve které se nachází v přírodě, dále uváděný jako 3D<sup>pol</sup> wt (z angl. "wild type"). Ten byl následně použit na studium interakce proteinu 3D<sup>pol</sup> s lipidem PI4P, stabilizace proteinu 3D<sup>pol</sup> nukleotidy, ale i strukturní studii.

### Expres a purifikace proteinu 3D<sup>pol</sup> wt

Expresní konstrukt DNA 3D<sup>pol</sup> wt v expresním plasmidu pRSFD byl v naší laboratoři již připraven (OBR 5).

Konstrukt DNA byl navržen tak, aby obsahoval na N konci 3D<sup>pol</sup> jako fúzní protein histidinovou kotvu (9 x H) a imunoglobulin vazebný protein 1 (GB1, z angl. "Immunoglobulin Binding Protein 1"). Mezi GB1 a 3D<sup>pol</sup> se nachází štěpné místo pro proteasu z viru tabákové mozaiky (TEV, z angl. "Tobacco Etch Virus").

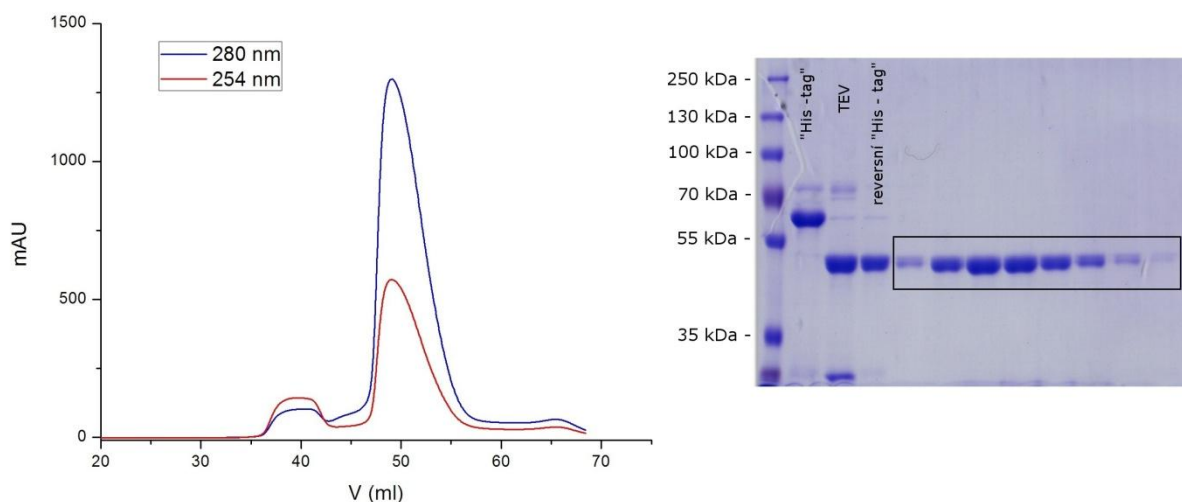


#### **OBR 5: Expresní konstrukt DNA, 3D<sup>pol</sup> wt**

*Modře je znázorněna histidinová kotva, fialově GB1, oranžově TEV štěpné místo, zeleně 3Dpol. Velikost DNA je uváděna v počtu párů basí.*

Výše popsany expresní konstrukt DNA 3D<sup>pol</sup> byl transformován do kompetentních bakterií *E. coli* (BL21 STAR) a exprimován v autoindukčním médiu. Protein byl izolován z bakteriálního lysátu pomocí afinitní chelatační chromatografie ("His-tagu"). Následně byla izolovanému proteinu za současné dialyzy odštěpena GB1 doména s histidinovou kotvou pomocí TEV proteasy. GB1 doména s histidinovou kotvou pak byla oddělena od proteinu 3D<sup>pol</sup> reversní afinitní chromatografií, jak je vidět na OBR 6, str. 20.

Protein byl dále purifikován gelovou permeační chromatografií. Připravili jsme protein 3D<sup>pol</sup> wt v dostatečném množství a čistotě. Průběh purifikace je uveden na OBR 6, str. 20.

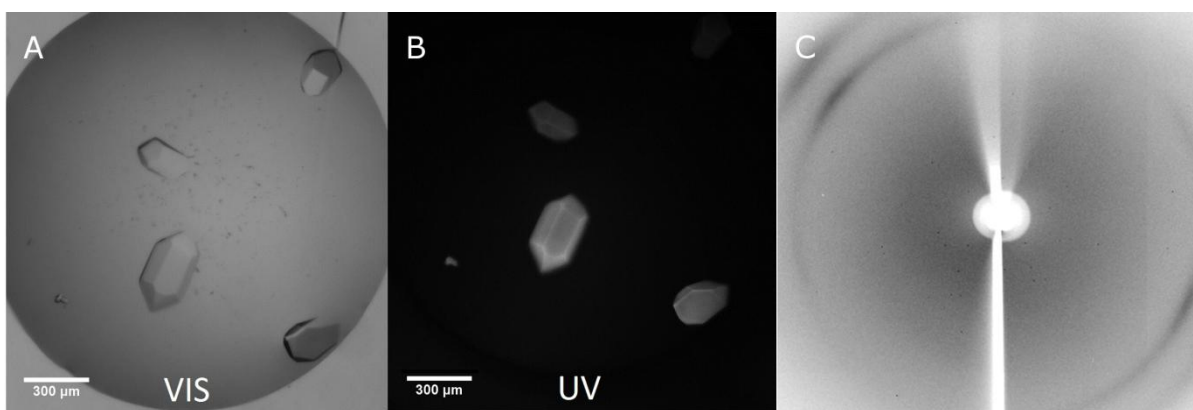


### **OBR 6: Průběh purifikace 3D<sup>pol</sup> wt**

V levé polovině obrázku je uveden eluční profil proteinu 3D<sup>pol</sup> wt z gelové permeační chromatografie (kolona: Hi LOAD 16/60 SUPERdex 75 prep grade ). Na pravé polovině obrázku se nalézá fotografie gelu z SDS PAGE 3D<sup>pol</sup> wt: "His - tag" označuje protein po afinitní chelatační chromatografii, "His - tagu", TEV - protein po odštěpení GB1 s histidinovou kotvou, reversní "His - tag" protein po reversní afinitní chelatační chromatografii (bez GB1 s histidinovou kotvou). Proteiny v rámečku pocházejí z jednotlivých frakcí z gelové permeační chromatografie, které byly použity pro další experimenty.

### **Krystalizace proteinu 3D<sup>pol</sup> wt**

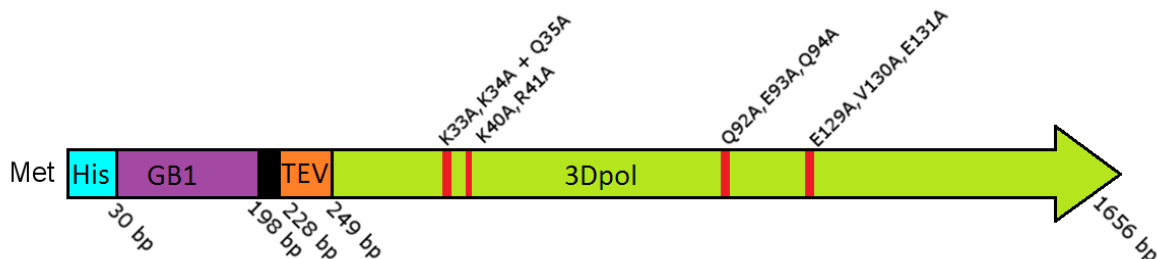
Hned v počátečních difrakčních pokusech se ukázalo, že protein 3D<sup>pol</sup> wt je nevhodný pro krystalografii. Protein sice bylo možné vykrystalizovat, ale vzniklé krystaly difraktovaly k příliš nízkému rozlišení asi 8 Å, jak je vidět na OBR 7, str 21.



**OBR 7: Krystaly 3D<sup>pol</sup> wt, difrakční obraz**

Na obrázku A je uvedena fotografie krystalů 3D<sup>pol</sup> wt, na obrázku B jsou vyfoceny tytéž krystaly pod UV. Fotografie byly provedeny pomocí "Crystal Drop Imager", RIGAKU CrystalMation Gallery DT Minstel DT. Na obrázku C je difrakční obraz krystalů 3D<sup>pol</sup> wt s rozlišením  $\sim 8 \text{ \AA}$ , měřeno na synchrotronu v Berlíně, BESSY II.

Jelikož protein 3D<sup>pol</sup> wt nevytvářel krystaly s dostatečnými difrakčními schopnostmi, rozhodli jsme se připravit mutantní proteiny 3D<sup>pol</sup>. Na základě metody SER byly navrženy konstrukty, u kterých byla nahrazena residua obsahující kombinace aminokyselin lysinu, glutaminu nebo glutamátu za alaniny: K33A,K34A; K33A,K34A,Q35A; K40A,R41A; Q92A,E93A,Q94A; E129A,V130A,E131A (OBR 8, str. 22). Ke zlepšení difrakčních schopností krystalů došlo pouze v případě mutace 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A, proto bude dále popisován pouze tento konstrukt.

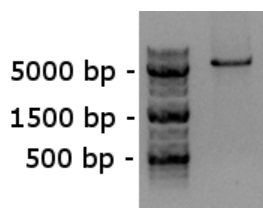


### **OBR 8: Expresní konstrukt DNA, 3D<sup>pol</sup> mutace**

Na obrázku je znázorněn expresní konstrukt DNA 3D<sup>pol</sup> wt, na kterém jsou červenou barvou znázorněny mutace navržené na základě metody SER: K33A,K34A; K33A,K34A,Q35A; K40A,R41A; Q92A,E93A,Q94A; E129A,V130A,E131A.

### **Příprava konstruktů DNA 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A**

Konstrukt 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A byl připraven pomocí mutagenese. PCR reakce amplifikovala konstrukt 3D<sup>pol</sup> včetně mutace v DNA, která kóduje aminokyseliny 33 a 34. Elektroforetická pohyblivost PCR produktu mírně převyšuje standard DNA o 5000 bp, což odpovídá očekávané velikosti amplifikovaného plasmidu s insertem. Zároveň nejsou na gelu vidět žádné další (nespecifické) produkty (OBR 9).



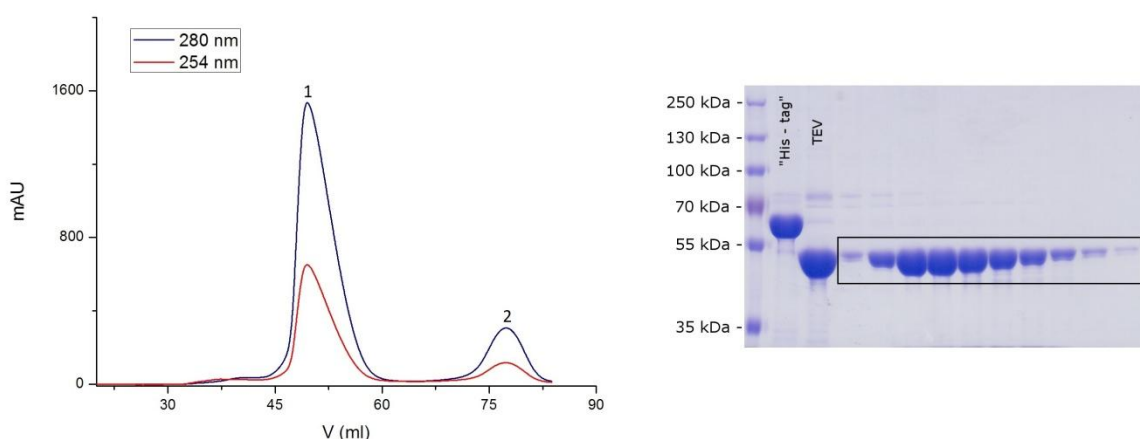
### **OBR 9: Agarosový gel, produkt PCR**

PCR produkt analyzovaný na agarosovém gelu - amplifikovaný plasmid s insertem, sekvencí DNA 3D<sup>pol</sup> a mutací v basích kódujících K33 a K34.

Linearizovaný konstrukt DNA byl zacyklen ligací pomocí T4 ligasy a transformován do kompetentních bakterií *E. coli* (DH5 $\alpha$ ). Pomocí „QIAprep Spin Miniprep Kit“ byl izolován plasmid s insertovanou sekvencí DNA kódující 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A. Správnost konstruktů DNA byla ověřena sekvenací.

## Expres a purifikace 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A

Expresní konstrukt 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A byl transformován do kompetentních bakterií *E. coli* (BL21 STAR) a exprimován v autoindukčním médiu. Protein byl izolován pomocí afinitní chelatační chromatografie, následně byla odštěpena TEV proteasou jeho histidinová kotva sfúzovaná s GB1. Protein 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A byl purifikován pomocí gelové permeační chromatografie. Průběh purifikace 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A je uveden na OBR 10. Na elučním profilu jsou patrné dva píky. Pík 1 patří proteinu 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A a pík 2 odštěpenému GB1 s histidinovou kotvou.



### OBR 10: Průběh purifikace 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A

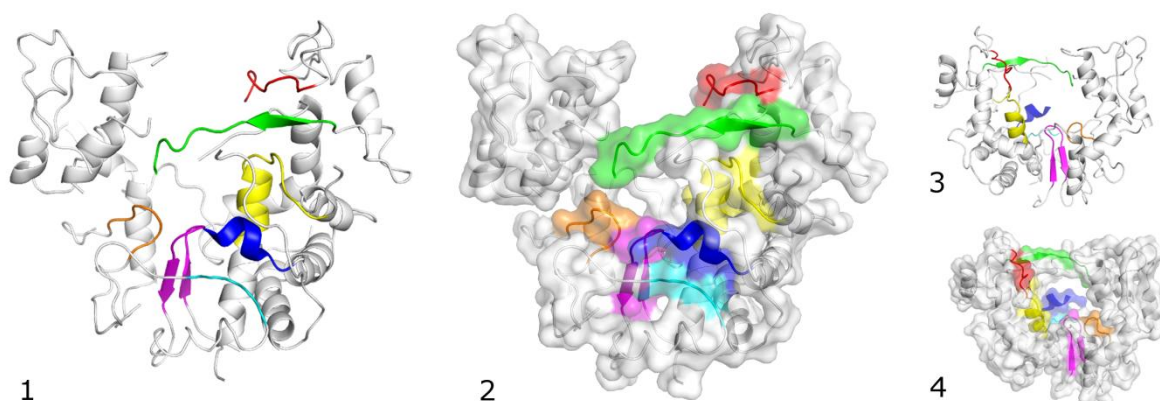
V levé části obrázku je uveden eluční profil proteinu 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A (pík 1) z gelové permeační chromatografie (kolona: Hi LOAD 16/60 SUPERdex 75 prep grade). Pík 2 náleží odštěpenému GB1 s histidinovou kotvou. Na pravé polovině obrázku se nalézají fotografie gelu z SDS PAGE 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A: "His - tag" označuje protein po afinitní chelatační chromatografii, TEV - protein po odštěpení histidinové kotvy, proužky v rámečku pocházejí z jednotlivých frakcí píku 1 z gelové permeační chromatografie, které byly použity pro krystalizační pokusy.

## Krystalizace proteinu 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A

Protein 3D<sup>pol</sup> K33A,K34A byl zahuštěn na 7 mg.ml<sup>-1</sup> a krystalizován formou sedící kapky. Nejvíce krystalů bylo nalezeno v podmínkách z komerčních krystalizačních roztoků MORPHEUS. Krystaly byly dále optimalizovány za účelem získání co největších samostatných krystalů. Prvotní rentgenostrukturní měření ukázala, že tyto krystaly stále difraktují k příliš nízkému rozlišení (6 Å). Jelikož protein krystalizoval poměrně snadno a bylo možné vytvořit větší krystaly, rozhodli jsme se pro optimalizaci jejich difrakce metodou dehydratace. Tato metoda spočívá v přenášení krystalu do prostředí s nižší koncentrací vody a vyšší koncentrací precipitantu. Po mnoha kolech optimalizace jsme získali krystaly difraktující ke 3,8 Å. Rozlišení je pořád poměrně nízké a navíc není dostupná žádná struktura s vysokou homologií pro metodu molekulárního nahrazení. Proto je stavba modelu stále obtížná.

## Struktura 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru

Naměřená data byla integrována a škálována v programu XDS, fázový problém byl vyřešen metodou molekulárního nahrazení, jako model pro nahrazení byla použita polyalaninová struktura s vymazanými smyčkami založená na již vyřešené struktuře 3CD<sup>pro</sup> z Polioviru (PDB ID 2IJD, [76]). "Refinement" byl proveden v prostředí Phenix a manuální změny byly provedeny v programu Coot. Správné řešení struktury při tomto rozlišení (3,8 Å) navíc při nedostupnosti vhodného modelu pro molekulární nahrazení, je extrémně obtížné. Proto uvádíme zde pouze neúplné řešení OBR 11.



### OBR 11: Struktura 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru

Červeně je uveden strukturní motiv G, zeleně motiv F, modře motiv A, žlutě motiv B, růžově motiv C, tyrkysově motiv D a oranžově motiv E. Obrázky 1 a 2 jsou otočeny o 180° podél z osy oproti obrázkům 3 a 4. Na obrázcích 2 a 4 je protein 3D<sup>pol</sup> zobrazen s povrchem.



Statistické zpracování vyhodnocení sběru dat a modelu struktury je uvedeno v TAB 1.

**TAB 1: Statistika sběru dat a vyhodnocení modelu struktury 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru**

Vlnová délka záření	1 Å	<b>Počet nevodíkových atomů</b>	1941
Rozpětí rozlišení (Å)	48,74 - 3,815	Makromolekuly	1941
	(3,951 - 3,815)*	Ligandy	0
Prostorová grupa	P 3 <sub>2</sub> 2 1	Vody	0
Rozměry elementární buňky	106.512 106.512 114.83 90 90 120	Počet zbytků proteinu	376
<b>Celkový počet reflexí</b>	48848 (4810)*	RMS (vazby)	0,010
Počet jedinečných reflexí	7616 (741)	RMS (úhly)	1,62
Multiplicita	6,4 (6,5)*	Ramachandran ("outliers/favored")	10% / 63%
Kompletnost	99,57 (98.15) %*	Kolizní skóre	26,56
I/sigma	17,26 (1,25)* I	<b>Průměrný B-faktor</b>	214,60
"R-merge"	0,05108 (1,645)*	Makromolekuly	214,60
"R-work"	0,3975 (0.4955)*		
"R-free"	0,4444 (0.5491)*		

\* V závorce jsou uvedena data vztažená ke slupce o nejvyšším rozlišení.

## Sekvenční srovnání

Primární struktura 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru je poměrně odlišná od primární struktury vybraných Picornavirů (OBR 12). Jednotlivé strukturní motivy A - G nesou nejvyšší míru evoluční konzervovanosti, proto jsme se zaměřili na jejich další porovnání s naším modelem.

AV	---slivptae-vrpgvvnrmsr <sup>lhps</sup> paygafpvkkqpap <sup>lkrndkrl</sup> qegvdldtql
EV	geiqvwpknketgrlningp <sup>trtkle</sup> psvfhdv <sup>fegnkepavl</sup> hsrdprlevd--feqal
PV	geiqwmrpskevgy <sup>pvinapsk</sup> tkle <sup>psafhyi</sup> fegvkepav <sup>ltkndprl</sup> ktdd--feeai
CV	geiefiesskeagfpvint <sup>psk</sup> tkle <sup>psvf</sup> hqv <sup>fegnkepavl</sup> rngdprlran--feeai
	-MOTIV G--
AV	flkhgkgdvtgppwgleaaadlyfs---tfpts <sup>lpvltqeq</sup> aihgt <sup>pnme</sup> gl <sup>dmgqa</sup> agy
EV	fskyvgntlhepdeyikea <sup>alhy</sup> anqlk <sup>qldints</sup> qms <sup>eeacy</sup> gten <sup>leaid</sup> lhtsagy
PV	fskyvgnkitevdeymke <sup>avdhy</sup> agqlms <sup>ldinte</sup> qmc <sup>ledamy</sup> gtdgle <sup>ald</sup> lhtsagy
CV	fskyignvnt <sup>hvdeym</sup> le <sup>avdhy</sup> agqlat <sup>ldistep</sup> mrle <sup>davy</sup> gtegle <sup>ald</sup> lhtsagy
	-----MOTIV F-----
AV	pwntlgrsr <sup>rs</sup> slfdevepgvfv <sup>pkpel</sup> qaeinqt <sup>ledpdy</sup> vyst <sup>flkdel</sup> rptakveqgl
EV	pysalgikkr <sup>dildp</sup> trdr <sup>vskmk</sup> fy-----mdkyg <sup>ldlp</sup> yst <sup>tyvkd</sup> elrs <sup>idkik</sup> gk
PV	pyvalgkkkr <sup>dilnk</sup> qtr <sup>rdtkem</sup> qrl-----ldtyg <sup>inlpl</sup> vt <sup>tyvkd</sup> elrs <sup>ksk</sup> veqgk
CV	pyvalgikkr <sup>dilsk</sup> tr <sup>rdtkl</sup> kec-----mdkyg <sup>lnlpm</sup> vt <sup>tyvkd</sup> elrs <sup>ae</sup> kvakgk
	-
AV	triveaapihaivagrml <sup>l</sup> gg <sup>lidym</sup> qgr <sup>pge</sup> -hg <sup>savgc</sup> np <sup>dv</sup> h <sup>wt</sup> sffya <sup>fse</sup> fsqvy
EV	sr <sup>lie</sup> ass <sup>lndsv</sup> yl <sup>rma</sup> fg <sup>hlyet</sup> fhan <sup>pgt</sup> it <sup>gsavgc</sup> np <sup>dt</sup> f <sup>wsk</sup> lpillp--gslf
PV	sr <sup>lie</sup> ass <sup>lndsv</sup> am <sup>rma</sup> fg <sup>nlyaa</sup> f <sup>hkn</sup> pg <sup>vit</sup> gs <sup>avgc</sup> dp <sup>dl</sup> f <sup>wsk</sup> ipvlme--eklf
CV	sr <sup>lie</sup> ass <sup>lndsv</sup> am <sup>rqt</sup> fg <sup>nlyk</sup> t <sup>fhl</sup> np <sup>g</sup> iv <sup>tg</sup> s <sup>avgc</sup> dp <sup>dl</sup> f <sup>wsk</sup> ipv <sup>ld</sup> --ghlv
	--MOTIV A--
AV	dldykcfdatlpsavftlvadh <sup>l</sup> tritgd <sup>prv</sup> gry <sup>ihs</sup> ir <sup>hsh</sup> hi <sup>ygn</sup> rmy <sup>dmi</sup> gg <sup>n</sup> psg
EV	afdysgydas <sup>lspvw</sup> fr <sup>alelv</sup> revgy <sup>see</sup> avsl <sup>ieg</sup> inh <sup>thh</sup> vy <sup>rnk</sup> ty <sup>cvl</sup> gg <sup>m</sup> psg
PV	afdtygydas <sup>lspaw</sup> fe <sup>alkmv</sup> lekig <sup>f</sup> gdr <sup>vdy</sup> idy <sup>lnh</sup> sh <sup>hly</sup> kn <sup>kt</sup> yc <sup>vk</sup> gg <sup>m</sup> psg
CV	afdysgydas <sup>lspvw</sup> fa <sup>cl</sup> kl <sup>ll</sup> lek <sup>l</sup> gy <sup>sh</sup> ket <sup>ny</sup> idy <sup>l</sup> cn <sup>sh</sup> h <sup>ly</sup> rd <sup>khy</sup> f <sup>vr</sup> gg <sup>m</sup> psg
	-----
	MOTIV B--
AV	cvatsilnti <sup>inn</sup> icv <sup>ls</sup> ali <sup>qh</sup> -pdfs <sup>psr</sup> fhil <sup>ayg</sup> ddv <sup>iyate</sup> ppi <sup>hps</sup> fl <sup>refy</sup> qk
EV	csgtsifnsm <sup>inn</sup> i <sup>irt</sup> ll <sup>ikt</sup> fk <sup>gid</sup> ld <sup>eln</sup> mv <sup>ayg</sup> ddv <sup>lasyp</sup> fid <sup>cle</sup> lart <sup>-gk</sup>
PV	csgtsifnsm <sup>inn</sup> i <sup>irt</sup> ll <sup>lkt</sup> ky <sup>gid</sup> ld <sup>h</sup> l <sup>kmi</sup> ay <sup>g</sup> ddv <sup>iasyp</sup> hevd <sup>as</sup> lla <sup>qs</sup> -gk
CV	csgtsifnsm <sup>inn</sup> i <sup>irt</sup> l <sup>ml</sup> kv <sup>gid</sup> ld <sup>q</sup> fr <sup>mi</sup> ay <sup>g</sup> ddv <sup>iasyp</sup> wp <sup>idas</sup> lla <sup>ea</sup> -gr
	-----
	MOTIV D
AV	htplvvtpank <sup>g</sup> gd <sup>f</sup> p <sup>pt</sup> st <sup>iyev</sup> tfl <sup>krw</sup> fvp <sup>ddvr</sup> pi <sup>yh</sup> hp <sup>vm</sup> dp <sup>dyeq</sup> s <sup>vmw</sup> l <sup>rd</sup> g
EV	eyglmtmpadk <sup>s</sup> pc <sup>fne</sup> -vnw <sup>nat</sup> f <sup>lkr</sup> g <sup>flp</sup> de <sup>q</sup> fp <sup>fl</sup> ih <sup>pt</sup> mp <sup>kei</sup> hes <sup>ir</sup> w <sup>tk</sup> da
PV	dyltmtmpadk <sup>s</sup> at <sup>fek</sup> -vtw <sup>eni</sup> tfl <sup>kr</sup> f <sup>frade</sup> kyp <sup>fl</sup> vh <sup>pv</sup> mp <sup>kei</sup> hes <sup>ir</sup> w <sup>tk</sup> dp
CV	dcglimtpadk <sup>g</sup> dc <sup>fne</sup> -vtw <sup>anv</sup> tfl <sup>kr</sup> y <sup>frade</sup> qyp <sup>fl</sup> vh <sup>pv</sup> mp <sup>kd</sup> i <sup>hes</sup> ir <sup>w</sup> tk <sup>dp</sup>
	-----
	MOTIV E
AV	-dfqdvvt <sup>sl</sup> chl <sup>af</sup> ns <sup>g</sup> p <sup>kt</sup> yaaw <sup>cm</sup> kv <sup>req</sup> clks <sup>gfap</sup> n <sup>fl</sup> p <sup>ysyl</sup> ql <sup>r</sup> w <sup>l</sup> n <sup>ll</sup> aa
EV	rntqdhvrs <sup>l</sup> cl <sup>law</sup> ng <sup>k</sup> qeyek <sup>f</sup> vst <sup>irs</sup> vpv--gk <sup>ala</sup> ip <sup>nyen</sup> l <sup>rr</sup> n <sup>w</sup> le <sup>lf</sup> --
PV	rntqdhvrs <sup>l</sup> cl <sup>law</sup> ng <sup>ee</sup> yn <sup>k</sup> fl <sup>ak</sup> irs <sup>vp</sup> i--gr <sup>all</sup> l <sup>pe</sup> yst <sup>ly</sup> rr <sup>w</sup> l <sup>ds</sup> f--
CV	kntqdhvrs <sup>l</sup> cl <sup>law</sup> ng <sup>eh</sup> ey <sup>e</sup> f <sup>ir</sup> ki <sup>rs</sup> vpv--ga <sup>cl</sup> tl <sup>p</sup> af <sup>st</sup> l <sup>rr</sup> k <sup>w</sup> l <sup>ds</sup> ---

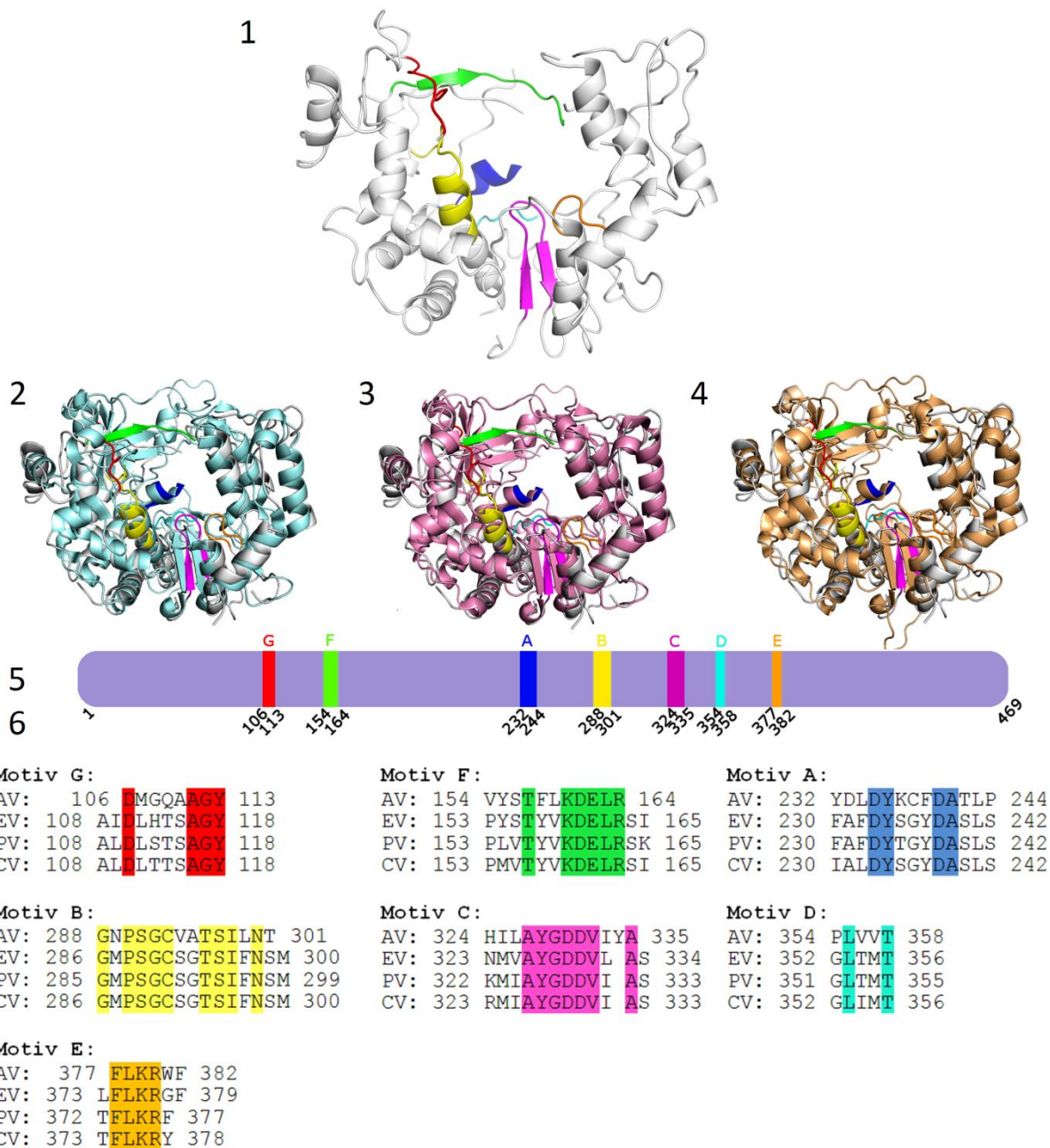
### OBR 12: Sekvenční srovnání 3D<sup>pol</sup>

Na obrázku je uvedeno porovnání primárních struktur 3D<sup>pol</sup> vybraných virů: Aichi viru (AV), Enteroviru 71 (EV), Polioviru 1 (PV) a Coxsackie viru B3 (CV). Tmavě modrou barvou jsou zvýrazněna residua, která se nacházejí na stejných místech ve všech třech proteinech. Světle modrou barvou jsou zvýrazněna residua, která se shodují jen u 3 proteinů.

## Strukturní srovnání

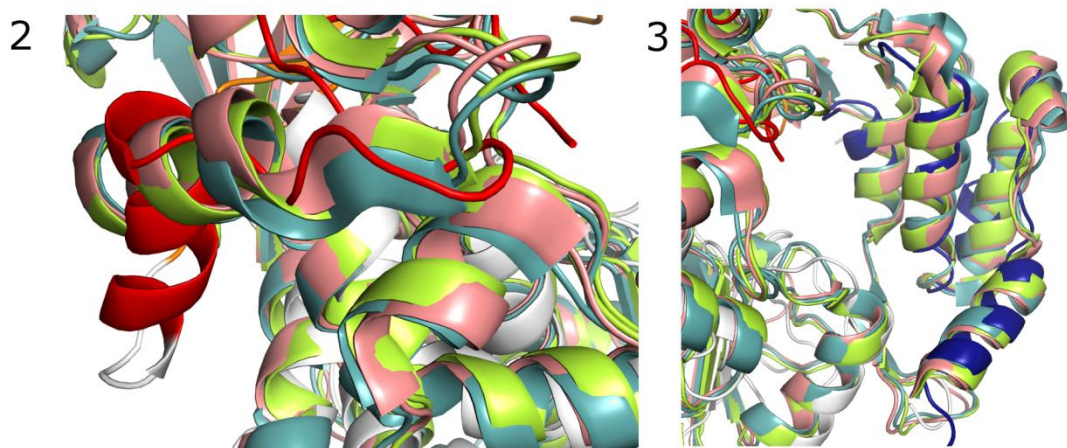
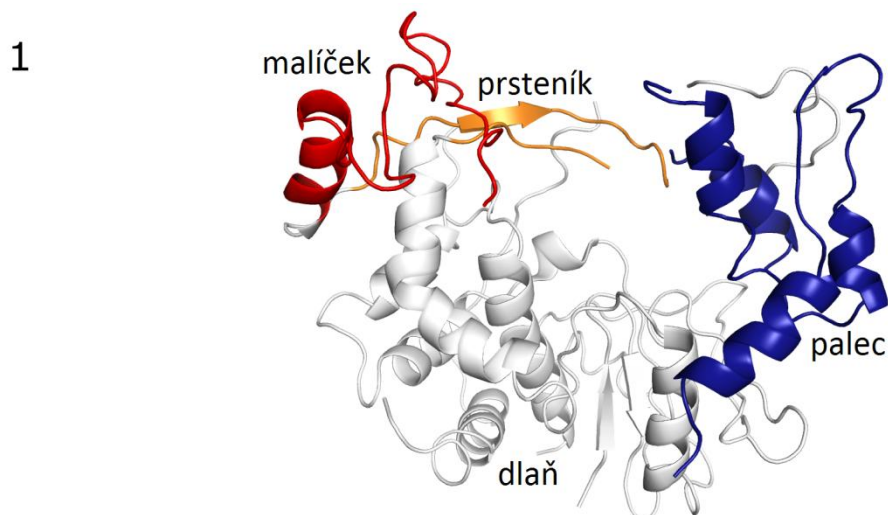
Model struktury proteinu  $3D^{pol}$  z Aichi viru byl porovnán s modely apo proteinu  $3D^{pol}$  z Polioviru 1 (PDB ID 4r0e, [77]),  $3D^{pol}$  z Coxsackie viru B3 (PDB ID 4wfx, [78]) a  $3D^{pol}$  z Enteroviru 71 (PDB ID 4ika, [56]) OBR 13, str. 28. Strukturní motivy F, A, B a E jsou velmi podobné u  $3D^{pol}$  všech čtyřech virů. Naopak nejvíce se odlišují motivy G a D Aichi viru. Tato odlišnost může být způsobena nízkým rozlišením naměřených dat, kvůli kterému je nesnadné nalézt správnou polohu nestrukturovaných smyček nebo odlišnou konformaci proteinu. Na druhou stranu jsme tímto porovnáním ověřili, že toto rozlišení je dostatečné ke správnému přiřazení hlavního řetězce do mapy elektronové hustoty.

Následně jsme porovnali jednotlivé strukturní domény proteinů  $3D^{pol}$  (dlaň, palec a prsty) Aichi viru, Polioviru, Coxsackie viru B3 a Enteroviru 71, OBR 14, str. 29. Elektronová hustota domény prstů byla příliš nízká k tomu, abychom dokázali s jistotou určit přesnou polohu jednotlivých prvků sekundární struktury. Nemělo tedy smysl provádět strukturní srovnání s motivy ukazováku, prostředníku ani prsteníku. Na druhou stranu motiv malíčku je poměrně dobře definovaný, porovnáním malíčkové domény s dalšími viry vidíme nestandardní polohu helixu 136-147. Tato nestandardní konformace může mít souvislost s vyšší flexibilitou prsteníkového motivu. Zároveň konformace malíčkového motivu může být rovněž spjata s poměrně nízkou evoluční konzervovaností primární struktury tohoto motivu (v porovnání s primární strukturou dalších virů, OBR 12, str. 26). Naopak palcová doména zaujímá stejnou pozici jako u porovnávaných  $3D^{pol}$  dalších virů.



### OBR 13: Strukturální srovnání 3D<sup>pol</sup> - strukturální motivy

Model 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru 1 uvedený v části 1 (bílý s barevnými strukturálními motivy) byl porovnán s v části 2 s modelem 3D<sup>pol</sup> z Enteroviru 71 a (PDB ID 4ika, [56]), v části 3 s modelem z Polioviru 1 (PDB ID 4r0e, [77]) a v části 3 s modelem z Coxsackie viru B3 (PDB ID 4wfx, [78]). V části 5 je schematicky znázorněn protein 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru, na kterém jsou barevnými písmeny označeny jednotlivé motivy (A - F). Čísla pod schématem značí umístění motivu v proteinu v počtu aminokyselin. V části 6 je uvedeno sekvenční srovnání jednotlivých strukturálních motivů 3D<sup>pol</sup> výše zmíněných virů: Aichi viru (AV), Enteroviru 71 (EV), Polioviru 1 (PV) a Coxsackie viru B3 (CV).



#### Malíčkový motiv

```
AV -----105ldmgqaagypwntlgrsrrs-lfdevepgvfvpkpel--qa142
EV 96smeeacygtenleaidlhtsagypysalgikkrdilpdttrdvskmkfyndkyg1150
PV 96cledamygtdglealdlttsagypyvalgkkkrdilnkqtrdtkemqrllldtygin151
CV 97kledavygteglealdlttsagypyvalgikkrdilskktrdltklkecmdkyg1191
```

```
EV 180slndsvylrmaf191
PV 180slndsvamrmaf191
CV 180slndsvamrqt191
```

#### Palcová doména

```
AV -----395vmdpdyeqsvmwlrdg-df qdvvtslchlafhsgpkt yaawcmkvreq
EV 381pdeqfpflihptmpmkeihesirwtkdarntqdhvrscllawhngkqeyekfvstirsv
PV 381dekypflvhpvmpmkeihesirwtkdpntqdhvrscllawhnggeeynkflakirsv
CV 381adeqypflvhpvmpmkeihesirwtkdpntqdhvrscllawhnggeheyeefirkirsv
```

```
AV clksgfapnflpysylqlrwln464
EV pv--gkalaipnyenlrrnwlelf462
PV pi--gralllpeystlyrrwldsf461
CV pv--gactlpafstlrrkwldsf461
```

#### OBR 14: Strukturní srovnání 3D<sup>pol</sup> - strukturní domény

Na obrázku 1 je uvedena struktura 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru, na které je červeně označen malíčkový motiv, oranžově prsteníkový motiv a modře palcová doména. Na obrázku 2 a 3 byl model 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru

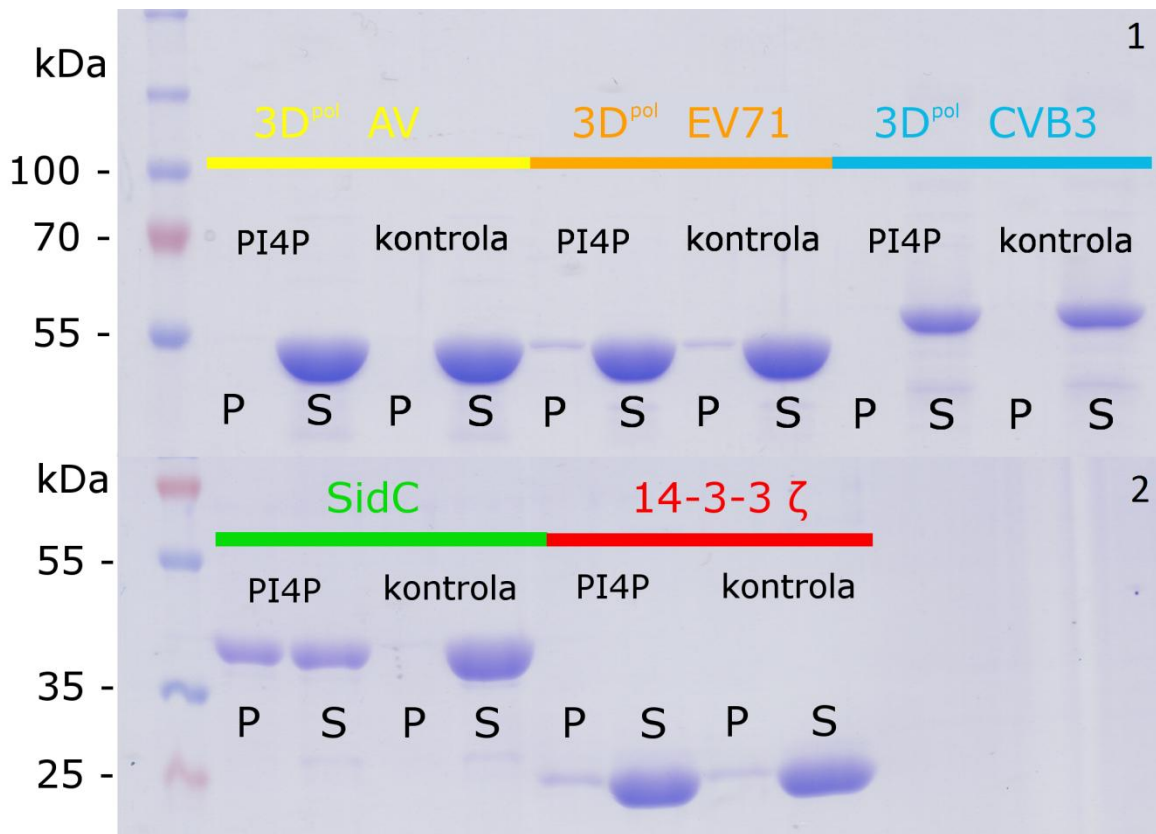
porovnáván s modely  $3D^{pol}$  z Enteroviru 71 a (PDB ID 4ika, [56]) - zelená struktura, Polioviru 1 (PDB ID 4r0e, [77]) modrá struktura a  $3D^{pol}$  z Coxsackie viru B3 (PDB ID 4wfx, [78]) - růžová struktura. Na obrázku 2 se nalézá detail malíčkové struktury a na obrázku 3 detail palcové struktury. V dolní části obrázku je uvedeno sekvenční srovnání jednotlivých strukturních domén a motivů  $3D^{pol}$  výše zmíněných virů: Aichi viru (AV), Enteroviru 71 (EV), Polioviru 1 (PV) a Coxsackie viru B3 (CV).

## **Interakce proteinu $3D^{pol}$ z Aichi viru s lipidem PI4P**

Plus RNA viry mají replikaci své RNA lokalizovanou na membráně. Membrána jim zajišťuje ukotvení virového replikačního komplexu, napomáhají nárůstu lokální koncentrace komponentů nezbytných pro replikaci virové RNA a předchází aktivaci hostitelských obranných mechanismů, které mohou být spuštěny dvouvláknovou RNA, která vzniká jako meziprodukt během replikace virové RNA. Virový protein 3A rekrutuje fosfatidylinositol 4 fosfát kinasu III  $\beta$ , která katalyzuje tvorbu PI4P.

Jedním z možných mechanismů ukotvení virového RNA replikačního komplexu k membráně je přímá interakce RdRp,  $3D^{pol}$  s lipidem PI4P. Tuto interakci jsme analyzovali pomocí metody "pull-down". Byly vytvořeny liposomy obsahující PI4P a kontrolní liposomy bez PI4P. Protein  $3D^{pol}$  wt byl inkubován s těmito liposomy při pokojové teplotě. Následně byla tato směs odstředěna a pelet i supernatant zvlášť analyzován pomocí SDS PAGE (OBR 15, str. 31). Pro porovnání možné interakce s PI4P byly připraveny proteiny  $3D^{pol}$  z Enteroviru 71 a Coxsackie viru B3. Jako pozitivní kontrola byl použit protein SidC, z ang. "intracellular multiplication /defective organelle trafficking". Disociační konstanta proteinu SidC a lipidu PI4P je 71 nM [79]. Jako negativní kontrola byl použit protein 14-3-3  $\zeta$ , který neinteraguje s lipidem PI4P. Všechny proteiny byly připraveny obdobným způsobem jako  $3D^{pol}$  z Aichi viru.





#### OBR 15: Interakce 3D<sup>pol</sup> s PI4P

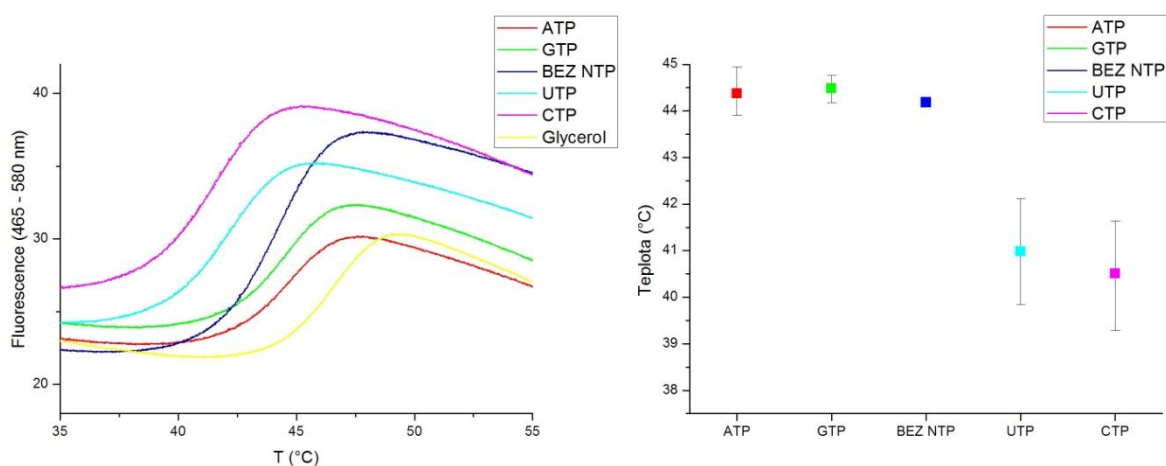
Interakce proteinů 3D<sup>pol</sup> s PI4P byla prověřena metodou "pull-down" na liposomech, které obsahovaly lipid PI4P (na obrázku označeno jako PI4P) a jako kontrola byly použity liposomy bez PI4P (na obrázku označen jako kontrola). Interakce byla vyhodnocena pomocí SDS PAGE. Na obrázku v části 1 jsou uvedeny gely z SDS PAGE. Žlutě jsou zvýrazněny vzorky s proteinem 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru, oranžově 3D<sup>pol</sup> z Enteroviru 71, modře 3D<sup>pol</sup> z Coxsackie viru B3. V části 2 je zeleně označen protein SidC a červeně protein 14-3-3 ζ. Protein SidC byl použit jako pozitivní kontrola, protein 14-3-3 ζ jako negativní kontrola.

Jak je patrné na OBR 15, naprostá většina proteinu 3D<sup>pol</sup> se nacházela v supernatantu, zatímco v peletu se protein prakticky nenacházel. Na základě tohoto experimentu jsme došli k závěru, že pokud interakce mezi proteiny 3D<sup>pol</sup> a PI4P existuje, bude mít poměrně vysokou disociační konstantu. Na základě empirických zkušeností minimálně desetkrát větší, než jaká byla použitá koncentrace proteinu (30 μM), K<sub>d</sub> > 300 μM.

## Diferenční skenovací fluorimetrie

Pomocí DSF jsme studovali teplotní závislost přechodu proteinu z globulárního stavu do stavu tzv. roztavené globule. Stav roztavené globule lze charakterizovat ztrátou stabilní sekundární struktury za tvorby dynamických a flexibilních konstrukcí. Použili jsme metodu DSF k přezkoumání tepelné denaturace 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru v přítomnosti nukleotidů.

Pomocí metody DSF byla měřena stabilizace proteinu 3D<sup>pol</sup> wt nukleotidy. Zároveň byl analyzován i glycerol, který byl použit jako kryoprotektant při zamrazování proteinových krystalů určených pro rentgenostrukturní analýzu.



### OBR 16: DSF - 3D<sup>pol</sup> wt

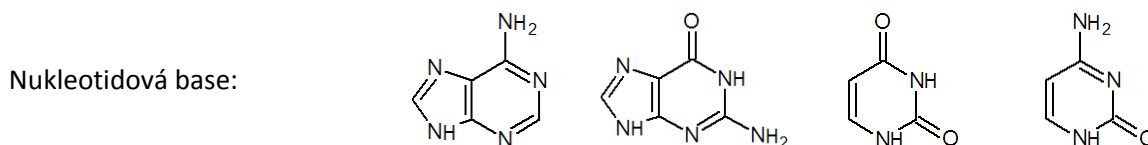
Na levé části obrázku je uveden průběh měření DSF pro jednotlivé nukleotidy a glycerol. Na pravé polovině obrázku jsou znázorněny teploty tání ( $T_m$ ) získané z nezávislých měření.

Výnosem normalizované intenzity fluorescence proti teplotě jsme získali sigmoidní křivky, v jejichž inflexi se nachází teplota přechodu proteinu 3D<sup>pol</sup> wt do tzv. roztavené globule. Zaznamenali jsme dva vlivy přidavku nukleotidu na křivky tání: změnu intenzity DSF signálu a změnu teploty, při které dojde k jeho nárůstu (OBR 16). Rozdílné intenzity DSF signálu si vysvětlujeme jednak jako tepelnou degradaci "SYPRO orange" a jednak jako vliv různého fluorescenčního pozadí, na které mělo vliv množství proteinu, které se nacházelo v komplexu s nukleotidem.



**TAB 2: Výsledky DSF - 3D<sup>pol</sup> wt**

V tabulce jsou uvedeny hodnoty teplot tání proteinu 3D<sup>pol</sup> wt v přítomnosti nukleotidu naměřené pomocí DSF.



NTP	Bez NTP	ATP	GTP	UTP	CTP
T <sub>m</sub> (°C)	44,19 ± 0,01	44,8 ± 0,20	44,6 ± 0,20	42,0 ± 0,11	41,6 ± 0,10

Na základě získaných teplot tání usuzujeme, že pyrimidinové base (UTP a CTP) protein 3D<sup>pol</sup> wt destabilizují, zatím co purinové base jej naopak mírně stabilizují. Nejvíce tepelně stabilizující efekt měl glycerol. Je možné, že molekuly glycerolu interagují s lipofilními residui proteinu 3D<sup>pol</sup> a tím jej stabilizují. Existuje několik krystalových struktur, ve kterých glycerol vytváří krystalové kontakty s 3D<sup>pol</sup> (PDB ID 3cdw, 3cdu [80], 4nz0 [57], 4wfy [78]).

Při provádění této analýzy bychom měli poznamenat, že tepelná denaturace 3D<sup>pol</sup> wt není reversibilní děj a má za následek precipitaci proteinu.

## Diskuse

Aichi virus je lidský patogen, který způsobuje gastroenteritidu. Aichi virus může rovněž sloužit jako dobrý model pro studium dalších plus RNA virů. Protein 3D<sup>pol</sup> je RdRp, zodpovědná za replikaci infekčního plus RNA virového genomu do minus komplementárního řetězce. Tato minus RNA následně slouží jako templát pro syntesu plus RNA virového genomu, který je translatován a sbalen do nového virionu.

Připravili jsme protein 3D<sup>pol</sup> wt z Aichi viru v dostatečném množství a čistotě. Vytvořili jsme proteinové krystaly 3D<sup>pol</sup> wt, ale ty difraktovaly k příliš nízkému rozlišení. Na základě redukce povrchové entropie [75] bylo připraveno několik mutantních proteinů 3D<sup>pol</sup>, jejichž krystaly měly lepší difrakci. Tyto krystaly bylo třeba dále optimalizovat dehydratací, kterou jsme získali "data s rozlišením 3,8 Å.

Řešení struktury o tak nízkém rozlišení bylo velmi náročné, proto v této práci uvádíme neúplné řešení, kde je přiřazen jen hlavní řetězec a postranní zbytky nejsou vůbec modelovány. Na základě strukturních srovnání se strukturami 3D<sup>pol</sup> z Polioviru 1 (PDB ID 4r0e, [77]), 3D<sup>pol</sup> z Coxsackie viru B3 (PDB ID 4wfx, [78]) a 3D<sup>pol</sup> z Enteroviru 71 (PDB ID 4ika, [56]) můžeme usoudit, že jsme správnému řešení poměrně blízko. Srovnání strukturních motivů A - G, které nesou nejvyšší evoluční konzervovanost primární struktury, byl použit pro správné přiřazení hlavního řetězce do mapy elektronové hustoty. Na základě této struktury budou navrženy nové konstrukty 3D<sup>pol</sup>, které by mohly vytvářet krystaly s lepšími difrakčními vlastnostmi.

V druhé části této práce jsme se zabývali ověřením hypotézy, ve které se protein 3D<sup>pol</sup> váže na membránu skrze PI4P. Virový protein 3A rekrutuje fosfatidylinositol 4 kinasu IIIβ (buď skrze GBFI/Arfl [35], [36], nebo ACBD3 [37],) která katalyzuje tvorbu PI4P. Interakce proteinu 3D<sup>pol</sup> s lipidem PI4P by vysvětlovala lokalizaci virového RNA replikačního komplexu na membráně. Membrána poskytuje lešení, jakousi oporu virovému replikačnímu komplexu a zároveň zvyšuje lokální koncentrace komponentů nezbytných pro replikaci RNA [29]. Bylo zjištěno, že koncentrace PI4P ve virově indukovaných membránových strukturách má vliv na replikaci virové RNA [34]. Všechna tato fakta vedou k nejjednoduššímu řešení, tedy přímé interakci 3D<sup>pol</sup> s PI4P. Na základě *in vitro* experimentu ("pulldown") 3D<sup>pol</sup> s PI4P neinteragoval. Interakce v buňkách (pokud vůbec existuje) je buď nepřímá (skrze nějaký další, dosud neznámý protein) a nebo vyžaduje nějakou dosud neznámou posttranslační modifikaci 3D<sup>pol</sup> například fosforylaci.

*In vitro* experimenty naznačují, že pokud k interakci dochází, musí mít výrazně vyšší disociační konstantu než byly koncentrace proteinu (30  $\mu\text{M}$ ) a PI4P (50  $\mu\text{M}$ ) v reakci. Na základě těchto pokusů můžeme říci, že  $K_d$  této interakce bude minimálně 300 $\mu\text{M}$ .

Analýzou teplotní denaturace proteinu 3D<sup>pol</sup> wt z Aichi viru pomocí DSF jsme zjistili, že pyrimidinové base destabilizují protein, zatím co purinové jej mírně stabilizují. Tyto vlastnosti 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru se liší od vlastností 3D<sup>pol</sup> z Polioviru, kde na základě termostabilní eseje bylo zjištěno, že je protein stabilizován všemi čtyřmi nukleotidy [61]. Aichi virus je poměrně sekvenčně málo konzervovaný oproti ostatním Picornavirům, a je proto možné, že používá jiný mechanismus interakce s nukleotidy než Poliovirový 3D<sup>pol</sup>. V [61] se rovněž uvádí, že existuje rozdíl v interakci 3D<sup>pol</sup> s jednotlivými nukleotidy. Na základě krystalové struktury 3D<sup>pol</sup> z Polioviru s jednotlivými nukleotidy bylo zjištěno, že GTP zaujímá odlišnou konformaci než ATP, UTP a CTP. V některých krystalových strukturách byly u virových RdRp (virus hepatitidy C) nalezeny nukleotidy i mimo aktivní místo [81], [82]. Je možné, že u Aichi viru zaujímají GTP a ATP jinou konformaci či jiné vazebné místo, než UTP a CTP, čímž protein tepelně stabilizují.

## Materiál a metody

### Příprava rekombinantního proteinu

#### Příprava konstruktů DNA

Expresní konstrukt 3D<sup>pol</sup> wt byl v naší laboratoři již připraven. Na základě metody SER byl navržen konstrukt, který obsahoval substituci lysinů 33 a 34 na alaniny (K33A, K34A). Metodou polymeraseové řetězové reakce (PCR) byl plasmid i s mutací amplifikován. PCR reakční směs byla připravena dle TAB 3. V TAB 4 jsou pak uvedeny reakční podmínky PCR reakce.

**TAB 3: PCR reakční směs - příprava konstruktů 3D<sup>pol</sup> K33A, K34A**

Reagencie	Množství
Templátová DNA 3D <sup>pol</sup> wt	100 pg (8 µl)
Forwardní primer	10 pmol (1 µl)
Reversní primer	10 pmol (1 µl)
Q5 High-Fidelity master mix (2x)	10 µl

Primery použité při přípravě konstruktů 3D<sup>pol</sup> K33A, K34A:

Forwardní primer: 5' **gctgct**caaccgctcccctcaagcgc 3'

Reversní primer: 5' gacaggaaggcaccgta 3' (5' fosforylace)

(červená barva označuje mutaci)

**TAB 4: Reakční podmínky PCR**

Počet cyklů	Teplota / °C	Čas
1 x	98	1 min
30 x	98	5 s
	54	15 s
	72	3 min
1 x	72	5 min

Koncentrace templátové DNA byla měřena pomocí NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 při  $\lambda = 260$  nm proti destilované vodě.

K analýze produktu PCR reakce byla použita horizontální agarosová elektroforesa. Jako nosič byl použit agarosový gel, elektroforetický pufr odpovídá složení TAE pufru (TAB 5). Vzorky DNA byly nanášeny na gel po 2 µl smíšených s 6x koncentrovaným vzorkovým pufrem (TAB 5). Pro odhad velikostí fragmentů DNA byl na gel spolu se vzorky DNA rovněž nanesen marker Gene Ruler. Migrace DNA pak probíhala po dobu 18 min při napětí  $U = 300$  V. Vzniklé proužky byly vizualizované pomocí Quantum ST4 kamery.

**TAB 5: Roztoky pro DNA agarosovou elektroforesu**

<b>Agarosový gel:</b>	1% (W/V) agarosa; 0,01 % (V/V) ethidium bromid rozpuštěné v TAE pufru
<b>TAE pufr:</b>	40 mM Tris pH 8; 20 mM CH <sub>3</sub> COOH; 1mM EDTA
<b>Vzorkový pufr:</b>	30% (V/V) glycerol; 0,025% (W/V) bromfenolová modř; 3 mM β - merkapto-ethanol)

Produkt PCR byl purifikován adsorpcí DNA na silikagelovou mikrokolonku za vysoké koncentrace chaotropních solí. Následně byly odplaveny nečistoty a DNA byla eluována pufrem obsahujícím Tris - basi. Při purifikaci PCR produktu bylo postupováno dle pokynů výrobců „QIAquick PCR Purification Kit“ [83].

Takto připravený linearizovaný plasmid nesoucí mutaci byl zacyklen ligační reakcí. Reakční směs připravená dle TAB 6 byla promíchána a inkubována hodinu při pokojové teplotě.

**TAB 6: Ligace - reakční směs**

Reagencie	Množství
Linearizovaný plasmid (PCR produkt)	100 ng
5 x ligační pufr	1,5 µl
T4 DNA ligasa	0,3 µl

### **Transformace kompetentních bakterií**

Následně byla rekombinantní DNA v plasmidu vnesena do bakterií *E. coli*. Bylo smíseno 1,5 µl ligační směsi s 60 µl suspence kompetentních bakterií (*E. coli*, DH5α) a inkubováno 20 min na ledu. S takto připraveným bakteriálním roztokem byl proveden tepelný šok (inkubace 42s ve 42°C vodní lázni). Následně byl k suspenzi přidán 1 ml LB média, takto připravená směs byla inkubována 1 h při 37°C. Po inkubaci bylo 180 µl tohoto roztoku přeneseno na Petriho misku s LB – agarem obsahujícím 40 µg.ml<sup>-1</sup> kanamycinu a inkubováno dalších přibližně 12 h při 37 °C.

Kolonie, které vyrostly na povrchu takovéto agarové plotny, byly jednotlivě přeneseny do 5 ml LB média s  $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  kanamycinu. Bakterie byly inkubovány za stálého míchání přibližně 12 h při  $37^\circ\text{C}$ . Takto připravená bakteriální kultura byla zpracována pomocí minipreparace plasmidové DNA, která spočívá v alkalické lysi bakteriálních buněk a následné adsorpci DNA na silikonovou membránu.

Postup se skládá z několika elementárních kroků:

1. Preparace a čištění bakteriálního lysátu
2. Adsorpce DNA na silikagelovou mikrokolonku
3. Promývání a eluce DNA

Při minipreparaci plasmidové DNA bylo postupováno dle pokynů výrobců „QIAprep Spin Miniprep Kit“ [83].

K ověření, zda během mutagenese nedošlo k nechtěným chybám, bylo použito sekvenování DNA (GATC Biotech).

### **Expresse proteinu v *E. coli***

Výše připravený konstrukt DNA byl transformován do genomu bakterií *E. coli* BL 21 Star:  $1 \mu\text{l}$  ( $\sim 300 \text{ ng}$ ) plasmidu byl přidán k  $60 \mu\text{l}$  suspence kompetentních bakterií, následně byla suspence vystavena tepelnému šoku: inkubace ve vodní lázni o teplotě  $42^\circ\text{C}$  po dobu 42 s a pak chlazená 1 min na ledu. Poté byl k tomuto roztoku přidán 1 ml LB média a bakteriální suspence byla inkubována bez přídavku antibiotik v inkubátoru o teplotě  $37^\circ\text{C}$  po dobu 30 min. Dále bylo takto připravené bakteriální inokulum přeneseno do 100 ml LB média obsahujícím  $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  kanamycinu a inkubováno ve třepačce o definované teplotě  $37^\circ\text{C}$  za stálého míchání (220 RPM) asi 12 h.

Takto připravené inokulum bylo přeneseno po 2 ml do 4 x 1 l sterilního autoindukčního média (TAB 7) obsahujícího  $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  kanamycinu. Inokulum bylo inkubováno ve třepačce o definované teplotě  $37^\circ\text{C}$  za stálého míchání (220 RPM), po 4 h byla upravena teplota na  $18^\circ\text{C}$ , při které byly bakterie inkubovány dalších 12 h.

#### **TAB 7: Roztok pro bakteriální expresi**

<b>Autoindukční médium</b>	1 % trypton (w/w); 0,5 % kvasniční extrakt; 2,8 mM glukosa; 6 mM laktosa; 0,5 % (V/V) glycerol; 1 mM $\text{MgCl}_2$ ; 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
----------------------------	--

## Izolace a purifikace proteinu

### Lyse bakteriálních buněk

Bakterie připravené dle předcházejícího odstavce byly odstředovány v litrových kyvetách při 3 000 g po dobu 15 min, za definované teploty 8 °C na centrifuze Sorval Evolution RC. Supernatant byl slit, peleta byla resuspendována v promývacím pufru (TAB 8) a homogenizována pomocí homogenizátoru podle Dounceho. Bakteriální buňky byly lysovány pomocí EmulsiFlexu C3 pod tlakem 110 MPa. Následně byl lysát odstředěn ve 250 ml kyvetách při 40 000 g po dobu 15 min při 8 °C na centrifuze Beckman Coulter - Avanticentrifuge J301.

### Izolace proteinu - Afinitní chelatační chromatografie

Supernatant (dále lysát) byl oddělen od pelety. K lysátu bylo přidáno 5 ml nepravého roztoku Ni-NTA agarosy za následné inkubace po dobu 40 min, při teplotě 4 °C a stálém míchání na rotátoru Multi RS - 60 BIOSAN. Suspenze byla odstředěna centrifugací při 1200 g, po dobu 2 min, za teploty 8 °C na centrifuze Beckman Coulter Allegra X - 15R. Supernatant byl dekantován a peleta resuspendována v promývacím pufru. Tento postup byl zopakován pětkrát, než byla resuspendovaná peleta nanesena na 15-ti ml kolonu a eluována 5 ml elučního pufru (TAB 8).

#### **TAB 8: Roztoky pro izolaci proteinu**

<b>Promývací pufr</b>	50 mM Tris pH 8; 350 mM NaCl; 20 mM imidazol; 10 % (V/V) glycerol; 3 mM $\beta$ - merkaptoethanol
<b>Eluční pufr</b>	50 mM Tris pH 8; 350 mM NaCl; 300 mM imidazol; 10 % (V/V) glycerol; 3 mM $\beta$ - merkaptoethanol

### Reversní afinitní chelatační chromatografie

Izolovaný protein byl následně přenesen do dialyzačního střeva (MWCO 14000) společně se 150  $\mu$ g TEV proteasy a dialysován proti 1 l dialyzačního pufru (TAB 9) asi 12 h za stálé teploty 4 °C.

Dialysát byl znovu inkubován s 5 ml Ni-NTA agarosy po dobu 40 min při teplotě 4 °C a stálém míchání na rotátoru Multi RS - 60 BIOSAN. Nepravý roztok byl přenesen na 15 - ti ml kolonu, v tomto případě bylo zachyceno "flow - through".

### Gelová permeační chromatografie

Vzorek proteinu byl odstředěn centrifugací při 3 000 g po dobu 5 min, na centrifuze Beckman Coulter Allegra X - 15R. Supernatant byl nanesen na kolonu Hi LOAD 16/60 SUPERdex 75 prep

grade ekvilibrovanou pufrém pro gelovou chromatografii (TAB 9) na purifikačním systému ÄKTA purifier 10. Kolona byla promývána 130 ml pufru, během kterých došlo k rozdělení molekul na základě jejich hydrodynamického poloměru. Kolona byla propojena se sběračem frakcí, který rozdělil eluční objem do jamek po 1,5 ml eluátu. Průběh chromatografie byl sledován skrze absorpenci při 280 a 254 nm.

Protein o dostatečné čistotě byl zahuštěn na požadovanou koncentraci pomocí filtrace přetížením při 3 500 g při teplotě 8 °C na centrifuze Beckman Coulter Allegra X - 15R za použití molekulárního síta (MWCO 30 000).

**TAB 9: Purifikační pufr**

<b>Dialyzační pufr</b>	50 mM tris pH 8; 350 mM NaCl; 60 mM imidazol; 10 % (V/V) glycerol; 3 mM β - merkптоethanol
<b>Pufr pro gelovou chromatografii</b>	20 mM Tris pH 8; 500 mM NaCl; 10 % (V/V) glycerol; 3 mM β - merkптоethanol

### **Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v denaturačním prostředí dodecylsíraru sodného (SDS PAGE)**

Jako jedna z metod analýzy proteinových vzorků byla použita SDS PAGE, pomocí které lze rozdělit proteiny na základě jejich elektroforetické pohyblivosti v polyakrylamidovém gelu. Polyakrylamidový gel, který se skládá ze dvou vrstev: zaostřovacího a separačního gelu (TAB 10) byl umístěn do přístroje na vertikální elektroforesu (Mini - PROTEAN Tetra System), horní i dolní komora byla naplněna elektroforetickým pufrém. Před nanesením na gel byly vzorky proteinu smíseny s šestkrát koncentrovaným vzorkovým pufrém (TAB 10).

Elektroforesa probíhala při konstantním napětí 200 V do rozdělení proteinů na gelu. Vzniklé proteinové proužky pak byly detekovány barvením v CBB (z angl. "Coomassie Brilliant Blue") R 250. Gel byl barven asi 1 h v přibližně 20 ml barvicího roztoku CBB (TAB 10).

**TAB 10: Roztoky pro SDS PAGE**

<b>Zaostřovací gel</b>	125 mM Tris pH 6,8; 4 % (V/V) akrylamid / bisakrylamid (37,5 : 1); 0,1 % (W/V) SDS; 0,005 % TEMED; 0,05 % (W/V) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
<b>Separací gel</b>	380 mM Tris pH 8,8; 10 % (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>



<b>Elektroforetický pufr</b>	25 mM Tris pH 8,8; 0,25 M glycin; 0,1 % (W/W) SDS
<b>Vzorkovací pufr (6 x)</b>	350 mM Tris pH 6,8; 10 % (W/V) SDS; 40 mM $\beta$ - merkaptoethanol, 30 % (V/V) glycerol; 0,012 % (W/V) bromfenolová modř
<b>Barvicí roztok CBB</b>	3 mM CBB; 1,5 M CH <sub>3</sub> COOH; 50 % (V/V) methanol

## Krystalizace

Krystaly byly připraveny metodou difuze par v provedení sedící kapky za pomoci krystalizačního robota Oryx a Crystal Gryphoh ARI. K samotné krystalizaci byly použity komerční sady krystalizačních roztoků: MORPHEUS, JCSG Core Suite I - IV a Proplex. Sedící kapka byla vytvořena smísením 0,3  $\mu$ l krystalizačního roztoku a 0,3  $\mu$ l proteinu. Difuze par probíhala proti 60  $\mu$ l krystalizačního roztoku v reservoáru. Krystalizace probíhala při 18 °C v individuálních jamkách na 96 jamkových destičkách s reservoárem (Intelli-plate 102-0001-20) izolovaných fólií.

Krystaly byly monitorovány optickým mikroskopem Olympus SZX 10. Pro rozlišení proteinových krystalů od anorganických byla prověřena fluorescence krystalů, (rsp. aromatických aminokyselin, které absorbují v UV (295 nm, expoziční čas 800 ms) pomocí RIGAKU CrystalMation.

## Dehydratace

Pro zlepšení difrakčních vlastností proteinových krystalů jsme se rozhodli pro metodu dehydratace. Tato metoda spočívá ve zvýšení organisovanosti krystalu a omezení pohybu flexibilnějších částí proteinu. Krystaly byly ručně přenášeny do podmínek s postupně rostoucí koncentrací srážedla (TAB 11), v každé podmínce byly inkubovány 24 h.

**TAB 11: Roztoky pro postupnou dehydrataci krystalů**

<b>PEG 4000</b>	12 % W/V	14 % W/V	16 % W/V
<b>Glycerol</b>	20 % V/V	20 % V/V	20 % V/V
<b>MOPS/HEPES pH 7,5</b>	100 mM	100 mM	100 mM

Dehydratované krystaly byly zamrazeny v kapalném dusíku.

Difrakce takto připravených krystalů byly měřeny v Helmholtzově centru v Berlíně (BESSY, "beamline" 14.1). Pro měření byl použit rentgenový paprsek o vlnové délce 1 Å. Měření probíhalo za chlazení krystalu na teplotu 100 K.

Naměřená difrakční data byla integrována pomocí programu XDS [84]. Fázový problém byl řešen metodou molekulárního nahrazení pomocí software Phaser [85]. Pro stavbu modelu a následný "refinement" byl použit balík programů Phenix [86] a Coot [87]. Model byl graficky zpracován v prostředí PyMol [88].

## Diferenční skenovací fluorimetrie

Pomocí diferenční skenovací fluorimetrie byla měřena teplotní stabilizace proteinu 3D<sup>pol</sup> wt nukleotidem a glycerolem, který byl použit jako kryoprotektant. Jako indikátor denaturace proteinu byla použita "SYPRO orange", amfipatická barva používaná ke sledování přechodu proteinu z globulárního stavu do stavu tzv. roztavené globule, kdy dochází k obnažení jeho hydrofobního jádra. Po interakci "SYPRO orange" s odhalenou hydrofobní částí molekuly dojde k rapidnímu nárůstu intenzity fluorescence.

Byly připraveny 25 µl roztoky, jejichž složení odpovídá TAB 12, které byly následně přeneseny na 96 - jamkovou destičku (FrameStar 480/96). Dále byla měřena intenzita fluorescence pomocí "realtime PCR" - ROCHE LightCycler 482, při excitační/emisní vlnové délce 465 / 580 nm. Nejdříve byla destička ekvilibrována na 20 °C po dobu 10 min. Pak teplota postupně vzrůstala z 20 na 82 °C rychlostí 0,01 °C.s<sup>-1</sup>. Měření bylo opakováno několika nezávislými pokusy.

**TAB 12: Složení vzorků pro diferenční skenovací fluorimetrii**

<b>Stabilizace nukleotidem</b>	5 µM 3D <sup>pol</sup> wt; 5mM NTP; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 3mM β - merkaptoethanol, 10000 x ředěná "SYPRO orange"
<b>Kontrola bez nukleotidu</b>	5 µM 3D <sup>pol</sup> wt; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 3mM β - merkaptoethanol, 10000 x ředěná "SYPRO orange"
<b>Stabilizace glycerolem</b>	5 µM 3D <sup>pol</sup> wt; 10 % (V/V) glycerol; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 3mM β - merkaptoethanol, 10000 x ředěná "SYPRO orange"

Naměřené křivky byly derivovány podle teploty, aby mohl být určen inflexní bod a tím i teplota tání.

## "Pulldown Assay"

### Příprava liposomů

Jeden mg směsi lipidů rozpuštěných v chloroformu byl vysušen dusíkem a dosušen 12 h inkubací ve vakuu. K vysušeným lipidům byl přidán liposomový pufr (TAB 13), směs byla inkubována 1 h při 4°C. Následně byla směs intenzivně vortexována po dobu 2 min při laboratorní teplotě.

**TAB 13: Výsledné složení liposomů**

<b>PI4P</b>	0,1 mg cholesterol, 0,1 mg fosfatidylserin, 0,64 mg fosfatidylcholin, 0,15 mg PI4P, 0,01 mg <i>N</i> -(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)-1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin
<b>Kontrola</b>	0,1 mg cholesterol, 0,1 mg fosfatidylserin, 0,79 mg fosfatidylcholin, 0,01 mg <i>N</i> -(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)-1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin
<b>Liposomový pufr</b>	20 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM $\beta$ - merkptoethanol

Připravené liposomy (30  $\mu$ l, o složení viz TAB 13) byly inkubovány s 30  $\mu$ l 60  $\mu$ M proteinů: 3D<sup>pol</sup>wt z Aichi viru, 3D<sup>pol</sup> z Enteroviru 71, 3D<sup>pol</sup> z Coxsackie viru B3, SidC a 14-3-3  $\zeta$  (příprava proteinů není uvedena) 20 min na ledu. Následně byla směs odstředěna při 22 000 g 10 min na centrifuze eppendorf Centrifuge 5418. Supernatant byl dekantován a pelet resuspendován v 60  $\mu$ l liposomového pufru a analyzován pomocí SDS PAGE.

### Sekvenční srovnání 3D<sup>pol</sup>

Bylo provedeno porovnání primárních struktur proteinů 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru a 3D<sup>pol</sup> z Polioviru 1, Polioviru 2, Coxsackie viru, EMCV. Srovnání bylo provedeno pomocí programu ClustalW [89].

### Strukturní srovnání 3D<sup>pol</sup>

Porovnání terciárních struktur 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru s již vyřešenými strukturami 3D<sup>pol</sup> z Polioviru 1 (PDB ID 4r0e, [77]), 3D<sup>pol</sup> z Coxsackie viru B3 (PDB ID 4wfx, [78]) a 3D<sup>pol</sup> z Enteroviru 71 (PDB ID 4ika, [56])

Strukturní srovnání bylo provedeno prostřednictvím programu PyMol [88].

## Závěr

Na základě metody SER jsme navrhli konstrukt DNA proteinu 3D<sup>pol</sup> K33A, K34A z Aichi viru. Pomocí metod molekulární biologie jsme vytvořili expresní konstrukt DNA 3D<sup>pol</sup> K33A, K34A.

Proteiny 3D<sup>pol</sup> wt i mutantní 3D<sup>pol</sup> K33A, K34A byly připraveny expresí v *E. coli*, izolovány pomocí afinitní chelatační chromatografie a purifikovány gelovou permeační chromatografií. Vykrytalizovali jsme proteiny 3D<sup>pol</sup> K33A, K34A a změřili na něm rozptyl rentgenového záření. Na základě dat z rentgenostrukturní analýzy jsme postavili prvotní model 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru, jehož struktura doposud nebyla definována.

Dále jsme zkoumali možnou interakci proteinu 3D<sup>pol</sup> wt s lipidem PI4P. Jeho přímou interakci jsme nepotvrdili, pokud tyto molekuly interagují, tak je tato interakce slabá s  $K_d > 300 \mu\text{M}$ . Buď tedy molekuly interagují s příliš nízkou afinitou, nebo je v mechanismu této reakce potřeba další interakční partner.

V neposlední řadě jsme porovnávali vlastnosti proteinů 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru, Enteroviru 71, Polioviru 1 a Coxsackie viru. Došli jsme k závěru, že ačkoli má 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru poměrně rozdílnou primární strukturu od zmíněných 3D<sup>pol</sup> z dalších virů, zaujímá relativně obdobnou terciární i kvartérní strukturu. Všechny tyto proteiny interagují s PI4P srovnatelně. Nalezli jsme odlišnosti v teplotní stabilizaci 3D<sup>pol</sup> z Aichi viru nukleotidy od stabilizace 3D<sup>pol</sup> z Polioviru [61], což ukazuje na potencionálně odlišný mechanismus katalýzy.

## Použité přístroje

**TAB 14: Přístroje**

Centrifugy	Allegra X – 15 R Centrifuge; Beckmann Coulter  Sorval Evolution RC  Beckman Coulter – Avanti Centrifuge J30I
"Crystal Drop Imager"	RIGAKU CrystalMation Gallery DT Minstel DT
Emulsiflex	EmulsiFlex C3; Avestin
Fotoaparát	Quantum ST4 camera, Vilbert Lourmat
FPLC	ÄKTA purifier 10
Horizontální elektroforesa	Consort EV 231 P-LAB
Inkubátor	Memmert IPP 400
Krystalizační roztoky	MORPHEUS, Proplex - připraveno v naší laboratoři,  JCSG Core Suite I - IV, Molecular Dimensions
Krystalizací roboti	Oryx 8  Crystal Gryphon - ARI
Mikrospektrofotometr	NanoDrop Spectrophotometer ND-1000
Optický mikroskop	Olympus SZX 10
PCR cyklér	Professional TRIO Thermocycler, Biometra Product Line
pH metr	HI 3220 pH / ORP Meter; HANNA instrument
Předvážky	KERN EMB 500-I
"Realtime PCR"	ROCHE LightCycler 482
Rotátor	Multi RS-60 BIOSAN
Třepačka	Innova 44, Inkubator Shaker Series; New Brunswick Scientific
Vertikální elektroforesa	Mini-PROTEIN Tetra System; BIO RAD
Vortex	Gene 2, Scientific Industries

## Použitý materiál:

**TAB 15: Komerční materiál**

Coomassie brilliant blue	R 250, ROTH
Dialyzační střevo	Dialysing tubing visking, cellulosa, typ 27/32 šířka 34 mm, průměr 21,5 mm, MWCO 14000
DNA LD	Thermo Scienttific 6X DNA Loading Dye
DSF destičky	FrameStar 480/96
Gene Ruler	Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas
High-Fidelity master mix	Q5™ Hot Start High-Fidelity 2X mastermix, NewEngland BioLabs Inc
Kit na purifikaci DNA	QIAquick PCR Purification Kit QIAprep Spin Miniprep Kit
Kolona pro gelovou chromatografii	Hi LOAD 16/60 SUPERdex 75 prep grade (rozměry kolony 1,6 x 60 cm; mrtvý objem 121 ml)
Krystalizační destičky	Intelli-plate 102-0001-20
LB – agar	(Lennox); P-Lab
LB médium	LB Broth (Lennox); P-Lab
Ni - NTA agarosa	Protino Ni-NTA Agarose, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Page Ruler	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder
Skleněné kapiláry na MST	Monolith NT.115™ Standard Treated Capillaries
"SYPRO orange"	SYPRO® Orange Protein Gel Stain (5,000X Concentrate in DMSO), ThermoFisher SCIENTIFIC
TEV - proteasa	připravena školitelem (1mg.ml <sup>-1</sup> )

## Seznam zkratek

Zkratka	Anglický význam	Český ekvivalent
ACBD3	Acyl-coenzyme A binding domain 3	Acyl-koenzym A vazebnou doménu obsahující protein - 3
Arf	ADP-ribosylation factor 1	ADP ribosilační faktor 1
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosfát
AV	Aichi virus	Aichi virus
CBB	Coomassie Brilliant Blue	x
CRE	Cis-active RNA element	Cis - aktivní RNA element
CTP	Cytidine triphosphate	Cytosintrifosfát
CV	Coxsackievirus	Coxsackie virus
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
EMCV	Encephalomyocarditis virus	Encefalomyokardio virus
EV	Enterovirus	Enterovirus
FMDV	Foot-and-mouth disease virus	Virus slintavky a kulhavky
GB1	Immunoglobulin binding protein 1	Imunoglobulin vazebný protein 1
GBFI	Golgi-specific Brefeldin A-resistance factor 1	Golgi specifický Brefedin A rezistenční faktor 1
GFP	Green fluorescent protein	Zelený fluorescenční protein
GTP	Guanosine triphosphate	Guanosintrifosfát
IRES	Internal ribosomal entry site	Vnitřní místo pro vstup ribozomu
Kd	Dissociation constant	Disociační konstanta
MST	MicroScale Thermophoresis	Mikroškálovací termoforesa
NTP	Nucleotide triphosphate	Nukleotid trifosfát
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerasová řetězová reakce
PI4P	Phosphatidylinositol 4 phosphate	Fosfatidylinositol 4 fosfát
RdRp	RNA dependent RNA polymerase	RNA dependentní RNA polymrasa
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
SDS	Sodium dodecyl sulfate	dodecylsíran sodný
SDS PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis in	Elektroforesa v polyakrylamidovém
SER	Surface entropy reduction	Redukce povrchové entropie
SidC	Intracellular multiplication /defective	Substrát intracelulární multiplikace
ssRNA	Single - stranded RNA	Jednovláknová RNA
TEV	Tobacco Etch Virus	Virus tabákové mozaiky
T <sub>m</sub>	Melting temperature	Teplota tání

UTP	Uridine triphosphate	Uridintrifosfát
VPG	Viral protein genome-linked	Protein vázaný k virovému genomu
wt	Wild type	Divoký typ



## Citovaná literatura

- [1] F. Crick, „Central dogma of molecular biology“, *Nature*, roč. 227, č. 5258, s. 561–563, srp. 1970.
- [2] T. Yamashita, K. Sakae, H. Tsuzuki, Y. Suzuki, N. Ishikawa, N. Takeda, T. Miyamura, a S. Yamazaki, „Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans“, *J. Virol.*, roč. 72, č. 10, s. 8408–8412, říj. 1998.
- [3] M. Goyer, L.-S. Aho, J.-B. Bour, K. Ambert-Balay, a P. Pothier, „Seroprevalence distribution of Aichi virus among a French population in 2006–2007“, *Arch. Virol.*, roč. 153, č. 6, s. 1171–1174, čer. 2008.
- [4] D.-Y. Oh, P. A. Silva, B. Hauroeder, S. Diedrich, D. D. P. Cardoso, a E. Schreier, „Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America“, *Arch. Virol.*, roč. 151, č. 6, s. 1199–1206, čer. 2006.
- [5] N. T. K. Pham, P. Khamrin, T. A. Nguyen, D. S. Kanti, T. G. Phan, S. Okitsu, a H. Ushijima, „Isolation and Molecular Characterization of Aichi Viruses from Fecal Specimens Collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam“, *J. Clin. Microbiol.*, roč. 45, č. 7, s. 2287–2288, čvc. 2007.
- [6] N. Kitamura, B. L. Semler, P. G. Rothberg, G. R. Larsen, C. J. Adler, A. J. Dorner, E. A. Emini, R. Hanecak, J. J. Lee, S. van der Werf, C. W. Anderson, a E. Wimmer, „Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA“, *Nature*, roč. 291, č. 5816, s. 547–553, čer. 1981.
- [7] M. H. Baron a D. Baltimore, „Anti-VPg antibody inhibition of the poliovirus replicase reaction and production of covalent complexes of VPg-related proteins and RNA“, *Cell*, roč. 30, č. 3, s. 745–752, říj. 1982.
- [8] ExPASy Bioinformatics Resource Portal 9. 1. 2016, „[http://viralzone.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/652.html](http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/652.html)“.
- [9] N. H. De Jesus, „Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis“, *Virol. J.*, roč. 4, č. 1, s. 70, 2007.
- [10] H. C. Selinka, A. Zibert, a E. Wimmer, „Poliovirus can enter and infect mammalian cells by way of an intercellular adhesion molecule 1 pathway“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 88, č. 9, s. 3598–3602, kvě. 1991.
- [11] C. L. Mendelsohn, E. Wimmer, a V. R. Racaniello, „Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily“, *Cell*, roč. 56, č. 5, s. 855–865, bře. 1989.
- [12] K. Fujii, N. Nagata, Y. Sato, K. C. Ong, K. T. Wong, S. Yamayoshi, M. Shimanuki, H. Shitara, C. Taya, a S. Koike, „Transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 neuropathogenesis“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 110, č. 36, s. 14753–14758, zář. 2013.
- [13] P. Jiang, Y. Liu, H.-C. Ma, A. V. Paul, a E. Wimmer, „Picornavirus Morphogenesis“, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, roč. 78, č. 3, s. 418–437, zář. 2014.
- [14] M. Chow, J. F. Newman, D. Filman, J. M. Hogle, D. J. Rowlands, a F. Brown, „Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance“, *Nature*, roč. 327, č. 6122, s. 482–486, čer. 1987.
- [15] C. T. Ranjith-Kumar, L. Gutshall, M.-J. Kim, R. T. Sarisky, a C. C. Kao, „Requirements for de novo initiation of RNA synthesis by recombinant flaviviral RNA-dependent RNA polymerases“, *J. Virol.*, roč. 76, č. 24, s. 12526–12536, pro. 2002.
- [16] C. T. Martin a J. E. Coleman, „T7 RNA polymerase does not interact with the 5'-phosphate of the initiating nucleotide“, *Biochemistry (Mosc.)*, roč. 28, č. 7, s. 2760–2762, dub. 1989.
- [17] M. Hagen, L. Tiley, T. D. Y. Chung, a M. Krystal, „The role of template-primer interactions in cleavage and initiation by the influenza virus polymerase“, *J. Gen. Virol.*, roč. 76, č. 3, s. 603–611, bře. 1995.

- [18] W. R. McClure, „Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes", *Annu. Rev. Biochem.*, roč. 54, s. 171–204, 1985.
- [19] S. E. Behrens, L. Tomei, a R. De Francesco, „Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus", *EMBO J.*, roč. 15, č. 1, s. 12–22, led. 1996.
- [20] P. G. Rothberg, T. J. Harris, A. Nomoto, a E. Wimmer, „O<sup>4</sup>-(5'-uridylyl)tyrosine is the bond between the genome-linked protein and the RNA of poliovirus", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 75, č. 10, s. 4868–4872, říj. 1978.
- [21] A. Nomoto, B. Detjen, R. Pozzatti, a E. Wimmer, „The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis", *Nature*, roč. 268, č. 5617, s. 208–213, čvc. 1977.
- [22] A. V. Paul, J. H. van Boom, D. Filippov, a E. Wimmer, „Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase", *Nature*, roč. 393, č. 6682, s. 280–284, kvě. 1998.
- [23] C. H. Schein, N. Oezguen, D. E. Volk, R. Garimella, A. Paul, a W. Braun, „NMR structure of the viral peptide linked to the genome (VPg) of poliovirus", *Peptides*, roč. 27, č. 7, s. 1676–1684, čvc. 2006.
- [24] A. Schlegel, T. H. Giddings, M. S. Ladinsky, a K. Kirkegaard, „Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection", *J. Virol.*, roč. 70, č. 10, s. 6576–6588, říj. 1996.
- [25] O. C. Richards a E. Ehrenfeld, „Poliovirus RNA replication", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, roč. 161, s. 89–119, 1990.
- [26] P. Spuul, G. Balistreri, L. Kaariainen, a T. Ahola, „Phosphatidylinositol 3-Kinase-, Actin-, and Microtubule-Dependent Transport of Semliki Forest Virus Replication Complexes from the Plasma Membrane to Modified Lysosomes", *J. Virol.*, roč. 84, č. 15, s. 7543–7557, srp. 2010.
- [27] S. Welsch, S. Miller, I. Romero-Brey, A. Merz, C. K. E. Bleck, P. Walther, S. D. Fuller, C. Antony, J. Krijnse-Locker, a R. Bartenschlager, „Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites", *Cell Host Microbe*, roč. 5, č. 4, s. 365–375, dub. 2009.
- [28] L. Persson a A. Sima, „The effect of pre- and postnatal undernutrition on the development of the cerebellar cortex in the rat. II. Histochemical observations", *Neurobiology*, roč. 5, č. 3, s. 151–166, čer. 1975.
- [29] S. Miller a J. Krijnse-Locker, „Modification of intracellular membrane structures for virus replication", *Nat. Rev. Microbiol.*, roč. 6, č. 5, s. 363–374, kvě. 2008.
- [30] P. Uetz, Y.-A. Dong, C. Zeretzke, C. Atzler, A. Baiker, B. Berger, S. V. Rajagopala, M. Roupelieva, D. Rose, E. Fossum, a J. Haas, „Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome", *Science*, roč. 311, č. 5758, s. 239–242, led. 2006.
- [31] D. Egger, L. Pasamontes, R. Bolten, V. Boyko, a K. Bienz, „Reversible dissociation of the poliovirus replication complex: functions and interactions of its components in viral RNA synthesis", *J. Virol.*, roč. 70, č. 12, s. 8675–8683, pro. 1996.
- [32] S. Dales, H. J. Eggers, I. Tamm, a G. E. Palade, „ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF THE FORMATION OF POLIOVIRUS", *Virology*, roč. 26, s. 379–389, čvc. 1965.
- [33] J. S. Towner, T. V. Ho, a B. L. Semler, „Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB", *J. Biol. Chem.*, roč. 271, č. 43, s. 26810–26818, říj. 1996.
- [34] N.-Y. Hsu, O. Ilnytska, G. Belov, M. Santiana, Y.-H. Chen, P. M. Takvorian, C. Pau, H. van der Schaar, N. Kaushik-Basu, T. Balla, C. E. Cameron, E. Ehrenfeld, F. J. M. van Kuppeveld, a N. Altan-Bonnet, „Viral Reorganization of the Secretory Pathway Generates Distinct Organelles for RNA Replication", *Cell*, roč. 141, č. 5, s. 799–811, kvě. 2010.
- [35] G. A. Belov, M. H. Fogg, a E. Ehrenfeld, „Poliovirus proteins induce membrane association of GTPase ADP-ribosylation factor", *J. Virol.*, roč. 79, č. 11, s. 7207–7216, čer. 2005.
- [36] G. A. Belov, N. Altan-Bonnet, G. Kovtunovych, C. L. Jackson, J. Lippincott-Schwartz, a E. Ehrenfeld, „Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA", *J. Virol.*, roč. 81, č. 2, s. 558–567, led. 2007.

- [37] J. Sasaki, K. Ishikawa, M. Arita, a K. Taniguchi, „ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites: Picornaviral protein/ACBD3/PI4KB complex", *EMBO J.*, roč. 31, č. 3, s. 754–766, úno. 2012.
- [38] J. Ou a W. J. Rutter, „Hybrid hepatitis B virus-host transcripts in a human hepatoma cell", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 82, č. 1, s. 83–87, led. 1985.
- [39] P. Gong a O. B. Peersen, „Structural basis for active site closure by the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 107, č. 52, s. 22505–22510, pro. 2010.
- [40] A. V. Paul, E. Rieder, D. W. Kim, J. H. van Boom, a E. Wimmer, „Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg", *J. Virol.*, roč. 74, č. 22, s. 10359–10370, lis. 2000.
- [41] E. Rieder, A. V. Paul, D. W. Kim, J. H. van Boom, a E. Wimmer, „Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation", *J. Virol.*, roč. 74, č. 22, s. 10371–10380, lis. 2000.
- [42] R. Andino, G. E. Rieckhof, P. L. Achacoso, a D. Baltimore, „Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA", *EMBO J.*, roč. 12, č. 9, s. 3587–3598, zář. 1993.
- [43] K. E. Murray a D. J. Barton, „Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis", *J. Virol.*, roč. 77, č. 8, s. 4739–4750, dub. 2003.
- [44] M. F. Ypma-Wong, P. G. Dewalt, V. H. Johnson, J. G. Lamb, a B. L. Semler, „Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor", *Virology*, roč. 166, č. 1, s. 265–270, zář. 1988.
- [45] T. B. Parsley, C. T. Cornell, a B. L. Semler, „Modulation of the RNA binding and protein processing activities of poliovirus polypeptide 3CD by the viral RNA polymerase domain", *J. Biol. Chem.*, roč. 274, č. 18, s. 12867–12876, dub. 1999.
- [46] J. B. Flanagan a T. A. Van Dyke, „Isolation of a soluble and template-dependent poliovirus RNA polymerase that copies virion RNA in vitro", *J. Virol.*, roč. 32, č. 1, s. 155–161, říj. 1979.
- [47] K. S. Harris, S. R. Reddigari, M. J. Nicklin, T. Hämmerle, a E. Wimmer, „Purification and characterization of poliovirus polypeptide 3CD, a proteinase and a precursor for RNA polymerase", *J. Virol.*, roč. 66, č. 12, s. 7481–7489, pro. 1992.
- [48] M. A. Rothstein, O. C. Richards, C. Amin, a E. Ehrenfeld, „Enzymatic activity of poliovirus RNA polymerase synthesized in *Escherichia coli* from viral cDNA", *Virology*, roč. 164, č. 2, s. 301–308, čer. 1988.
- [49] S. D. Hobson, E. S. Rosenblum, O. C. Richards, K. Richmond, K. Kirkegaard, a S. C. Schultz, „Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function", *EMBO J.*, roč. 20, č. 5, s. 1153–1163, bře. 2001.
- [50] A. A. Thompson a O. B. Peersen, „Structural basis for proteolysis-dependent activation of the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase", *EMBO J.*, roč. 23, č. 17, s. 3462–3471, zář. 2004.
- [51] P. Ahlquist, „RNA-Dependent RNA Polymerases, Viruses, and RNA Silencing", *Science*, roč. 296, č. 5571, s. 1270–1273, kvě. 2002.
- [52] T. C. Appleby, H. Luecke, J. H. Shim, J. Z. Wu, I. W. Cheney, W. Zhong, L. Vogeley, Z. Hong, a N. Yao, „Crystal structure of complete rhinovirus RNA polymerase suggests front loading of protein primer", *J. Virol.*, roč. 79, č. 1, s. 277–288, led. 2005.
- [53] C. Ferrer-Orta, A. Arias, R. Perez-Luque, C. Escarmís, E. Domingo, a N. Verdaguer, „Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA", *J. Biol. Chem.*, roč. 279, č. 45, s. 47212–47221, lis. 2004.
- [54] J. L. Hansen, A. M. Long, a S. C. Schultz, „Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus", *Struct. Lond. Engl.* 1993, roč. 5, č. 8, s. 1109–1122, srp. 1997.

- [55] G. Campagnola, M. Weygandt, K. Scoggin, a O. Peersen, „Crystal structure of coxsackievirus B3 3Dpol highlights the functional importance of residue 5 in picornavirus polymerases", *J. Virol.*, roč. 82, č. 19, s. 9458–9464, říj. 2008.
- [56] C. Chen, Y. Wang, C. Shan, Y. Sun, P. Xu, H. Zhou, C. Yang, P.-Y. Shi, Z. Rao, B. Zhang, a Z. Lou, „Crystal Structure of Enterovirus 71 RNA-Dependent RNA Polymerase Complexed with Its Protein Primer VPg: Implication for a trans Mechanism of VPg Uridylylation", *J. Virol.*, roč. 87, č. 10, s. 5755–5768, kvě. 2013.
- [57] L. Vives-Adrian, C. Lujan, B. Oliva, L. van der Linden, B. Selisko, B. Coutard, B. Canard, F. J. M. van Kuppeveld, C. Ferrer-Orta, a N. Verdaguer, „The crystal structure of a cardiovirus RNA-dependent RNA polymerase reveals an unusual conformation of the polymerase active site", *J. Virol.*, roč. 88, č. 10, s. 5595–5607, kvě. 2014.
- [58] D. L. Ollis, P. Brick, R. Hamlin, N. G. Xuong, a T. A. Steitz, „Structure of large fragment of Escherichia coli DNA polymerase I complexed with dTMP", *Nature*, roč. 313, č. 6005, s. 762–766, bře. 1985.
- [59] C. Ferrer-Orta, A. Arias, C. Escarmis, a N. Verdaguer, „A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, roč. 16, č. 1, s. 27–34, úno. 2006.
- [60] C. Ferrer-Orta, D. Ferrero, a N. Verdaguer, „RNA-Dependent RNA Polymerases of Picornaviruses: From the Structure to Regulatory Mechanisms", *Viruses*, roč. 7, č. 8, s. 4438–4460, srp. 2015.
- [61] A. A. Thompson, R. A. Albertini, a O. B. Peersen, „Stabilization of Poliovirus Polymerase by NTP Binding and Fingers–Thumb Interactions", *J. Mol. Biol.*, roč. 366, č. 5, s. 1459–1474, bře. 2007.
- [62] G. Lu a P. Gong, „Crystal Structure of the full-length Japanese encephalitis virus NS5 reveals a conserved methyltransferase-polymerase interface", *PLoS Pathog.*, roč. 9, č. 8, s. e1003549, 2013.
- [63] C. Castro, E. D. Smidansky, J. J. Arnold, K. R. Maksimchuk, I. Moustafa, A. Uchida, M. Götte, W. Konigsberg, a C. E. Cameron, „Nucleic acid polymerases use a general acid for nucleotidyl transfer", *Nat. Struct. Mol. Biol.*, roč. 16, č. 2, s. 212–218, úno. 2009.
- [64] J. Wu, W. Liu, a P. Gong, „A Structural Overview of RNA-Dependent RNA Polymerases from the Flaviviridae Family", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 16, č. 6, s. 12943–12957, čer. 2015.
- [65] P. Gong, M. G. Kortus, J. C. Nix, R. E. Davis, a O. B. Peersen, „Structures of Coxsackievirus, Rhinovirus, and Poliovirus Polymerase Elongation Complexes Solved by Engineering RNA Mediated Crystal Contacts", *PLoS ONE*, roč. 8, č. 5, s. e60272, kvě. 2013.
- [66] S. A. Jablonski a C. D. Morrow, „Mutation of the aspartic acid residues of the GDD sequence motif of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase results in enzymes with altered metal ion requirements for activity", *J. Virol.*, roč. 69, č. 3, s. 1532–1539, bře. 1995.
- [67] T. A. Steitz, „A mechanism for all polymerases", *Nature*, roč. 391, č. 6664, s. 231–232, led. 1998.
- [68] P. S. Salgado, E. V. Makeyev, S. J. Butcher, D. H. Bamford, D. I. Stuart, a J. M. Grimes, „The structural basis for RNA specificity and Ca<sup>2+</sup> inhibition of an RNA-dependent RNA polymerase", *Struct. Lond. Engl. 1993*, roč. 12, č. 2, s. 307–316, úno. 2004.
- [69] Y. F. Lee, A. Nomoto, B. M. Detjen, a E. Wimmer, „A protein covalently linked to poliovirus genome RNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 74, č. 1, s. 59–63, led. 1977.
- [70] S. Crotty, D. Gohara, D. K. Gilligan, S. Karelsky, C. E. Cameron, a R. Andino, „Manganese-Dependent Polioviruses Caused by Mutations within the Viral Polymerase", *J. Virol.*, roč. 77, č. 9, s. 5378–5388, kvě. 2003.
- [71] J. A. Hardy a J. A. Wells, „Searching for new allosteric sites in enzymes", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, roč. 14, č. 6, s. 706–715, pro. 2004.
- [72] L. van der Linden, L. Vives-Adrián, B. Selisko, C. Ferrer-Orta, X. Liu, K. Lanke, R. Ulferts, A. M. De Palma, F. Tanchis, N. Goris, D. Lefebvre, K. De Clercq, P. Leyssen, C. Lacroix, G. Pürstinger, B. Coutard, B. Canard, D. D. Boehr, J. J. Arnold, C. E. Cameron, N. Verdaguer, J. Neyts, a F. J. M. van Kuppeveld, „The RNA Template Channel of the RNA-Dependent RNA Polymerase as a

- Target for Development of Antiviral Therapy of Multiple Genera within a Virus Family", *PLOS Pathog.*, roč. 11, č. 3, s. e1004733, bře. 2015.
- [73] K. L. Longenecker, S. M. Garrard, P. J. Sheffield, a Z. S. Derewenda, „Protein crystallization by rational mutagenesis of surface residues: Lys to Ala mutations promote crystallization of RhoGDI", *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, roč. 57, č. Pt 5, s. 679–688, kvě. 2001.
- [74] D. R. Cooper, T. Boczek, K. Grelewska, M. Pinkowska, M. Sikorska, M. Zawadzki, a Z. Derewenda, „Protein crystallization by surface entropy reduction: optimization of the SER strategy", *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, roč. 63, č. 5, s. 636–645, kvě. 2007.
- [75] A. Mateja, Y. Devedjiev, D. Krowarsch, K. Longenecker, Z. Dauter, J. Otlewski, a Z. S. Derewenda, „The impact of Glu→Ala and Glu→Asp mutations on the crystallization properties of RhoGDI: the structure of RhoGDI at 1.3 Å resolution", *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, roč. 58, č. 12, s. 1983–1991, pro. 2002.
- [76] L. L. Marcotte, A. B. Wass, D. W. Gohara, H. B. Pathak, J. J. Arnold, D. J. Filman, C. E. Cameron, a J. M. Hogle, „Crystal Structure of Poliovirus 3CD Protein: Virally Encoded Protease and Precursor to the RNA-Dependent RNA Polymerase", *J. Virol.*, roč. 81, č. 7, s. 3583–3596, dub. 2007.
- [77] I. M. Moustafa, V. K. Korboukh, J. J. Arnold, E. D. Smidansky, L. L. Marcotte, D. W. Gohara, X. Yang, M. A. Sanchez-Farran, D. Filman, J. K. Maranas, D. D. Boehr, J. M. Hogle, C. M. Colina, a C. E. Cameron, „Structural Dynamics as a Contributor to Error-prone Replication by an RNA-dependent RNA Polymerase", *J. Biol. Chem.*, roč. 289, č. 52, s. 36229–36248, pro. 2014.
- [78] G. Campagnola, S. McDonald, S. Beaucourt, M. Vignuzzi, a O. B. Peersen, „Structure-Function Relationships Underlying the Replication Fidelity of Viral RNA-Dependent RNA Polymerases", *J. Virol.*, roč. 89, č. 1, s. 275–286, led. 2015.
- [79] S. Dolinsky, I. Haneburger, A. Cichy, M. Hannemann, A. Itzen, a H. Hilbi, „The Legionella longbeachae Icm/Dot Substrate SidC Selectively Binds Phosphatidylinositol 4-Phosphate with Nanomolar Affinity and Promotes Pathogen Vacuole-Endoplasmic Reticulum Interactions", *Infect. Immun.*, roč. 82, č. 10, s. 4021–4033, říj. 2014.
- [80] A. Gruez, B. Selisko, M. Roberts, G. Bricogne, C. Bussetta, I. Jabafi, B. Coutard, A. M. De Palma, J. Neyts, a B. Canard, „The Crystal Structure of Coxsackievirus B3 RNA-Dependent RNA Polymerase in Complex with Its Protein Primer VPg Confirms the Existence of a Second VPg Binding Site on Picornaviridae Polymerases", *J. Virol.*, roč. 82, č. 19, s. 9577–9590, říj. 2008.
- [81] S. Bressanelli, L. Tomei, F. A. Rey, a R. De Francesco, „Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides", *J. Virol.*, roč. 76, č. 7, s. 3482–3492, dub. 2002.
- [82] Z. Cai, M. Yi, C. Zhang, a G. Luo, „Mutagenesis analysis of the rGTP-specific binding site of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase", *J. Virol.*, roč. 79, č. 18, s. 11607–11617, zář. 2005.
- [83] QIAGEN, *QIAquick® Spin Handbook*, roč. 2015. .
- [84] W. Kabsch, „Automatic indexing of rotation diffraction patterns", *J. Appl. Crystallogr.*, roč. 21, č. 1, s. 67–72, úno. 1988.
- [85] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, a R. J. Read, „Phaser crystallographic software", *J. Appl. Crystallogr.*, roč. 40, č. 4, s. 658–674, srp. 2007.
- [86] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkóczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L.-W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, a P. H. Zwart, „PHENIX : a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution", *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, roč. 66, č. 2, s. 213–221, úno. 2010.
- [87] P. Emsley a K. Cowtan, „Coot: model-building tools for molecular graphics", *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, roč. 60, č. Pt 12 Pt 1, s. 2126–2132, pro. 2004.
- [88] *PyMOL Molecular Graphics System, verze 1.2r3pre, Schrödinger, LLC. .*

- [89] J. D. Thompson, T. J. Gibson, a D. G. Higgins, „Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX", *Curr. Protoc. Bioinforma. Ed. Board Andreas Baxevanis AI*, roč. Chapter 2, s. Unit 2.3, srp. 2002.