

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Dana Ivanovská

**Strukturní a funkční charakterizace inhibice koronavirové
methyltransferázy**

Structural and functional characterization of inhibition
of a coronaviral methyltransferase

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Praha 2023

Prohlášení

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

V Praze dne

.....

Dana Ivanovská

Abstrakt

Koronavirové methyltransferasy se účastní modifikace 5'-konce virové RNA. Svou enzymatickou aktivitou zajišťují nejen účinnou translaci virových proteinů, ale také maskují vlastní RNA před imunitním systémem hostitele. Tato práce se zaměřuje na methyltransferasy SARS-CoV-2 (methyltransferasová doména nestrukturního proteinu 14, MT14 a nestrukturní protein 16 spolu s jeho kofaktorem – nestrukturní protein 10, nsp16/10), které představují atraktivní cíle pro terapeutický zásah. Cílem této práce byla strukturní charakterizace koronavirových methyltransferas v komplexu s různými malými molekulami. Rekombinantně připravené proteiny byly purifikovány a následně podrobeny krystalizačním experimentům. Získané krystaly heterodimeru nsp16/10 v komplexu se sinefunginem byly namáčeny do roztoku obsahujícího nukleotidový analog S-adenosyl-L-homocysteinu. Optimalizací identifikovaných primárních krystalizačních podmínek MT14 s dvěma různými inhibitory byly získány krystaly vhodné pro měření jejich difrakce a následnou strukturní analýzu. Získaná strukturní data budou sloužit jako podklad pro návrh nových inhibitorů cílících na S-adenosyl-L-methionin vazebné místo nsp14.

Klíčová slova: methyltransferasa, nsp14, nsp16, koronavirus, SARS-CoV-2, rekombinantní exprese, krystalizace proteinů

Abstract

Coronaviral methyltransferases participate in the modification of the 5'-end of viral RNA. Their enzymatic activity not only ensures efficient mRNA translation, but also allows the virus to escape the recognition of the innate immune system. This work is focused on the SARS-CoV-2 methyltransferases (the methyltransferase domain of the nonstructural protein 14, MT14, the nonstructural protein 16 and its cofactor – the nonstructural protein 10, nsp16/10), which represent attractive molecular targets for therapeutic intervention. The aim of this work was to structurally characterize the coronaviral methyltransferases in complex with various small molecules. The recombinantly prepared proteins were purified and subsequently subjected to crystallization trials. The obtained crystals of the nsp16/10 heterodimer in complex with sinefungin were soaked in a solution containing a S-adenosyl-L-homocysteine analogue. Crystals suitable for X-ray crystallography of MT14 in complex with two different inhibitors were obtained by optimizing the identified primary crystallization conditions. The acquired structural data of the MT14 inhibitory complexes will serve as a basis for the design of new small molecule inhibitors targeting the S-adenosyl-L-methionine binding site.

Keywords: methyltransferase, nsp14, nsp16, coronavirus, SARS-CoV-2, recombinant expression, protein crystallization

[IN CZECH]

Obsah

1 Úvod	15
2 Literární přehled.....	17
2.1 Eukaryotická mRNA čepička	17
2.1.1 Syntéza eukaryotické mRNA čepičky	17
2.1.2 Funkce mRNA čepičky.....	19
2.1.2.1 Funkce mRNA čepičky v rámci imunitního systému	19
2.2 Koronavirová mRNA čepička.....	21
2.2.1 Syntéza koronavirové mRNA čepičky	21
2.3 SAM-dependentní methyltransferasy	23
2.3.1 Koronavirové methyltransferasy.....	24
2.3.1.1 Nestruturní protein 14.....	24
2.3.1.1.1 Methyltransferasová doména nsp14	25
2.3.1.2 Nestruturní protein 16.....	26
2.3.2 Inhibitory koronavirových methyltransferas	27
3 Cíl práce.....	29
4 Materiál a přístroje.....	31
4.1 Chemikálie	31
4.2 Pufry a roztoky.....	32
4.3 Ligandy	34
4.4 Biologický a genetický materiál.....	34
4.5 Přístroje	35
4.6 Ostatní materiál	36
5 Metody	37
5.1 Příprava expresního plasmidu pro následnou expresi MT14.....	38
5.1.1 Polymerasová řetězová reakce	38
5.1.2 Horizontální agarosová elektroforéza	39
5.1.3 Restrikční štěpení PCR produktu a vektoru pSUMO	39
5.1.4 Ligace insertu do vektoru pSUMO	39
5.1.5 Transformace buněk <i>E. Coli</i> DH5a	40
5.1.6 PCR z kolonií.....	40
5.1.7 Sekvenace plasmidové DNA	41
5.2 Rekombinantní exprese a purifikace koronavirových methyltransferas	41
5.2.1 Transformace bakteriálních buněk expresními plasmidy	41
5.2.2 Rekombinantní exprese nsp10, nsp16, MT14 a TELSAM-MT14	42
5.2.3 Izolace rekombinantních proteinů z bakteriální kultury	42
5.2.4 Metaloafinitní chromatografie	42

5.2.5 Štěpení polyhistidinové kotvy Ulp1 proteasou	43
5.2.6 Reverzní metaloafinitní chromatografie.....	43
5.2.7 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)	44
5.2.8 Gelová permeační chromatografie	44
5.3 Krystalizace proteinů	45
5.3.1 Příprava a krystalizace komplexu nsp16/10 s různými ligandy	45
5.3.2 Příprava a krystalizace komplexu MT14 s různými ligandy.....	45
5.3.3 Příprava a krystalizace inhibičních komplexů TELSAM-MT14	46
5.4 Namáčení krystalů.....	46
5.5 Sběr a zpracování difrakčních dat.....	47
6 Výsledky	49
6.1 Příprava expresního plasmidu pro produkci MT14	49
6.2 Exprese a purifikace koronavirových methyltransferas	51
6.2.1 Purifikace nestrukturního proteinu 10 a 16	52
6.2.2 Purifikace methyltransferasové domény nestrukturního proteinu 14	54
6.2.3 Purifikace methyltransferasové domény nestrukturního proteinu 14 fúzaného s TELSAMem	56
6.3 Příprava a krystalizace proteinových komplexů s různými ligandy	57
6.3.1 Krystalizace komplexu nsp16/10 se SAM a SIN	57
6.3.2 Krystalizace MT14 se SAM a SIN	59
6.3.3 Krystalizace TELSAM-MT14 s TO951 a TO993.....	59
6.4 Strukturní analýza inhibičních komplexů TELSAM-MT14.....	60
7 Diskuze	65
8 Závěr.....	71
Seznam použité literatury.....	73

Seznam použitých zkratk

AMK	aminokyselina
Å	Ångström, $1 \text{ Å} = 10^{-1} \text{ nm}$
CBC	komplex vázající mRNA čepičku, z angl. „cap binding complex“
CIAP	telecí střevní alkalická fosfatasa, z angl. „calf intestinal alkaline phosphatase“
CMTR	2'-O-methyltransferasa, z angl. „cap methyltransferase“
COVID-19	koronavirové onemocnění 2019
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxynukleosid 5'-trifosfát
dsRNA	dvouřetězcová ribonukleová kyselina
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eIF	eukaryotický iniciační faktor
GDP	guanosin difosfát
GMP	guanosin monofosfát
GTasa	guanylyltransferasa
GTP	guanosin trifosfát
IFIT	interferonem indukovaný protein s tetratrikopeptidovým opakováním, z angl. „interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats“
Mda5	protein 5 asociovaný s diferenciací melanomu, z angl. „melanoma differentiation-associated protein 5“
MERS-CoV	koronavirus blízkovýchodního respiračního syndromu, z angl. „Middle East respiratory syndrome-related coronavirus“
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina, z angl. „messenger ribonucleic acid“
MTasa	methyltransferasa

MWCO	mezní hodnota molekulové hmotnosti, z angl. „molecular weight cut-off“
NiRAN	nidovirová nukleotidyltransferasa propojená s RdRp, z angl. „Nidovirus RdRp-associated nucleotidyl transferase“
nsp	nestrukturní protein, z angl. „nonstructural protein“
OD600	optická denzita při vlnové délce 600 nm
ORF	otevřený čtecí rámec, z angl. „open reading frame“
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, z angl. „polyacrylamide gel electrophoresis“
pb	pár bází
PCR	polymerasová řetězová reakce, z angl. „polymerase chain reaction“
PRR	receptor rozpoznávající strukturní vzory, z angl. „pattern recognition receptor“
RdRp	RNA-dependentní RNA-polymerasa
RIG-I	gen I indukovaný kyselinou retinovou, z angl. „retinoic acid-inducible gene I“
RNA	ribonukleová kyselina, z angl. „ribonucleic acid“
RNA Pol II	RNA polymerasa II
RNGTT	RNA guanylyltransferasa a 5'-fosfatasa
RNMT	RNA guanin-N7-methyltransferasa
rpm	otáčky za minutu, z angl. „revolutions per minute“
RTC	replikačně transkripční komplex, z angl. „replication-transcription complex“
RTPasa	RNA trifosfatasa
SAH	S-adenosyl-L-homocystein
SAM	S-adenosyl-L-methionin

SARS-CoV	koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu, z angl. „Severe acute respiratory syndrome coronavirus“
SIN	sinefungin
SUMO	malý modifikátor podobný ubikvitinu, z angl. „small ubiquitin-like modifier“
TELSAM	doména sterilního alfa motivu lidského transkripčního faktoru ETV6, z angl. „sterile alpha motif domain (SAM) of human Translocation ETS Leukemia (TEL) protein“
Ulp	specifická proteasa pro proteiny podobné ubikvitinu, z angl. „ubiquitin-like-specific protease“
vWa	A3 doména Von Willebrandova faktoru, z angl. „von Willebrand factor type A domain“
+ssRNA	jednovláknová RNA s pozitivní polaritou, z angl. „single strand RNA“
% (v/v)	objemové procento
% (w/v)	hmotnostně-objemové procento

1 Úvod

Na přelomu roku 2019 se v čínském Wuhanu objevilo nové vysoce nakažlivé onemocnění zoonotického původu COVID-19, které se posléze rozšířilo po celém světě. Původcem této pandemie byl koronavirus SARS-CoV-2 (koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu, z angl. „Severe Acute Respiratory Syndrome 2“), který byl zařazen do čeledi *Coronaviridae*, konkrétně do rodu *Betacoronavirus* podčeledi *Coronavirinae*. Po SARS-CoV a MERS-CoV se jednalo o třetí koronavirus, se kterým se lidstvo potkalo od začátku 21. století¹.

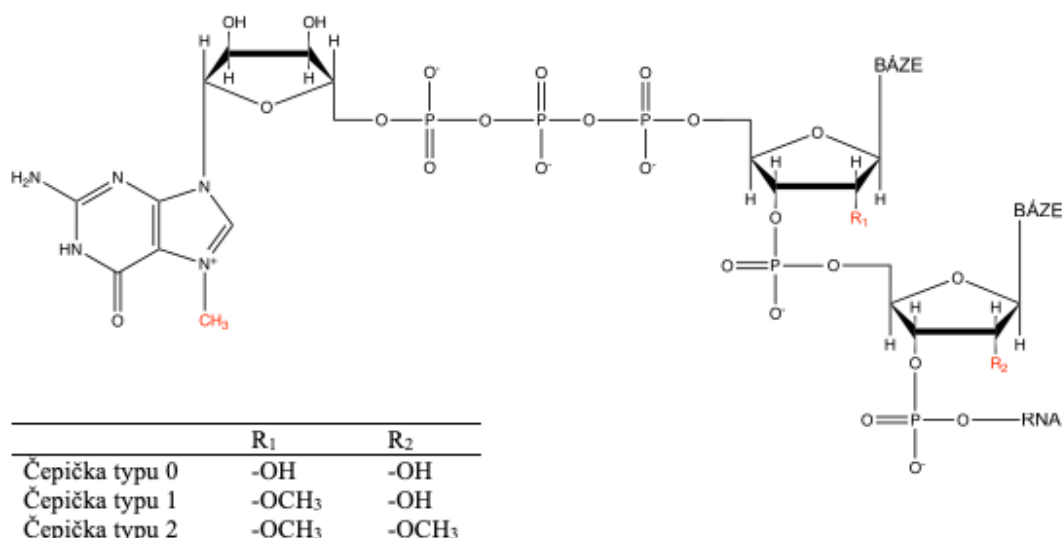
Pojmem koronaviry se souhrnně označují viry spadající do podčeledi *Coronavirinae*. Genom koronavirů je tvořen jednovláknovou RNA s pozitivní polaritou (+ssRNA). Na svém 5'-konci obsahuje strukturu mRNA čepičky, která je nerozeznatelná od eukaryotické. Syntézy čepičky se mimo jiné účastní koronavirové nestrukturní proteiny (nsp) 14 a 16. Jedná se o methyltransferasy, které svou enzymatickou aktivitou zajišťují nejen účinnou translaci virových proteinů, ale také maskují virovou RNA před imunitním systémem hostitele².

Tato diplomová práce se zaměřuje na strukturní a funkční charakterizaci methyltransferas nsp14 a nsp16 koronaviru SARS-CoV-2. Účast v syntéze virové mRNA čepičky činí z výše zmíněných proteinů nejen potencionální cíle terapeutického zásahu, ale také díky jejich vysoké konzervovanosti napříč koronaviry i atraktivní cíle pro vývoj širokospektrálních antivirotik³.

2 Literární přehled

2.1 Eukaryotická mRNA čepička

Na 5'-konci eukaryotických mRNA se vyskytuje specifická struktura označovaná jako čepička (obr. 1). Tato modifikace byla poprvé objevena u virových RNA⁴. Posléze se zjistilo, že všechny transkripční produkty RNA polymerasy II (RNA Pol II) obsahují na svém 5'-konci strukturu čepičky⁵. Základ čepičky, tzv. čepička typu 0, je tvořen N7-methylovaným guanosinem, který je připojený neobvyklou 5'-5' trifosfátovou vazbou k prvnímu transkribovanému nukleotidu RNA. Touto čepičkou chrání svou mRNA např. nižší eukaryotní organismy, včetně kvasinek^{6,7}. U vyšších eukaryotních organismů podléhá tato struktura dalším modifikacím, kdy přenosem methylové skupiny na ribosu prvního a druhého nukleotidu vzniká čepička typu 1 a 2 (cit. ⁸).



Obr. 1: Schématické znázornění struktury mRNA čepičky typu 0, 1 a 2. Na obrázku je zobrazena struktura mRNA čepičky, která obsahuje N7-methylovaný guanosin. Červeně je vyznačena methylová skupina v poloze N7 guanosinu. R₁ a R₂ značí různé funkční skupiny, které se mohou vyskytovat v poloze 2' ribosy v závislosti na typu mRNA čepičky. Vytvořeno v Chemdraw⁹.

2.1.1 Syntéza eukaryotické mRNA čepičky

Čepička je syntetizována na nascentní vlákno mRNA o délce kolem 25–30 nukleotidů¹⁰. První dva kroky syntézy čepičky lidské mRNA jsou katalyzovány bifunkčním enzymem RNA guanylyltransferasou a 5'-fosfatasou (RNGTT), který je navázaný na fosforylovanou C-terminální doménu RNA Pol II (cit. ^{11,12}). K syntéze čepičky dochází kotranskripčně a je zahájena odštěpením γ -fosfátu z pre-mRNA. Přeměnu

5'-trifosfátového konce RNA na difosfátový zajišťuje N-koncová trifosfátová doména RNGTT¹³.

Druhý krok, katalyzovaný guanylyltransferasovou aktivitou C-koncové domény RNGTT, spočívá v hydrolyze GTP za současného vzniku dočasněho intermediátu enzym-GMP. Kovalentně navázaný GMP (přes Lys294) je vzápětí přenesen na 5'-konec pre-mRNA za vzniku Gppp-pre-mRNA^{14,15}.

Následná methylace guanosinu na pozici N7 probíhá za účasti enzymu RNA-guanin-N7-methyltransferasy (RNMT)¹⁶ a dává vzniku základní strukturu čepičky, čepičce typu 0. Tato struktura chrání mRNA před degradací a zároveň umožňuje účinnou translaci mRNA⁵. V nižších eukaryotách, jako jsou např. kvasinky, představuje tato methylace poslední krok syntézy čepičky^{6,7}.

V případě vyšších eukaryotních organismů, včetně člověka, je čepička typu 0 podrobena dalším modifikacím. Methylocí 2'-hydroxylové skupiny prvního nukleotidu mRNA vzniká čepička typu 1 (cit. ⁵). Přenos methylové skupiny je zajišťován jadernou 2'-O-methyltransferasou 1 (CMTR1, z angl. „cap methyltransferase 1“)^{17,18}, přičemž interakce CMTR1 s RNA Pol II naznačuje kotranskripční průběh syntézy mRNA čepičky¹⁹. Na 2'-hydroxylovou skupinu druhého transkribovaného nukleotidu RNA může být následně přenesena ještě další methylová skupina⁵. Syntézu čepičky typu 2 katalyzuje 2'-O-methyltransferasa 2 (CMTR2, z angl. „cap methyltransferase 2“), která se na rozdíl od CMTR1 vyskytuje převážně v buněčném cytosolu^{18,20}.

Methylace koncového guanosinu a prvního nukleotidu vznikajícího mRNA vlákna se odehrává v jádře, zatímco k přenosu methylové skupiny na 2'-hydroxylovou skupinu druhého nukleotidu dochází v cytoplasmě. Dodatečné methylace nukleotidů zvyšují míru exprese translace²¹ a zároveň umožňují imunitnímu systému rozpoznávat vlastní RNA²².

Širší substrátová specifita enzymů CMTR1 a CMTR2 umožňuje náhodné pořadí methylačních reakcí *in vitro*, kdy např. CMTR1 může methylovat nejen čepičku typu 0, ale také prekurzor čepičky typu 0 i čepičku typu 02 (^{m7}GpppNpN_{m2}OpRNA) se stejnou účinností. Obdobně tomu tak je i v případě CMTR2, která může přenášet methylovou skupinu na čepičku typu 0 a na nemethylovaný prekurzor čepičky typu 0. Účinnost katalýzy výše zmíněných reakcí je však v porovnání s methylocí čepičky typu 1 nižší²⁰.

2.1.2 Funkce mRNA čepičky

Čepička hraje zásadní roli v regulaci stability mRNA, zrání a jaderného exportu mRNA a také zastává důležitou funkci při iniciaci translace. Čepička propůjčuje mRNA vyšší stabilitu tím, že fyzicky chrání její 5'-konec před 5'-3' exonukleasami^{23,24}.

mRNA čepička zastává různé role skrze interakce, které jsou zprostředkovávány proteiny, které ji umí rozpoznávat a vázat. Jedná se převážně o jaderný proteinový komplex vázající mRNA čepičku (CBC, z angl. „cap binding complex“) a dále cytosolický eukaryotický iniciační faktor 4F (eIF4F). Oba tyto komplexy vykazují vyšší afinitu pro čepičku typu 1 než čepičku typu 0 (cit. ²⁵).

mRNA čepička se také účastní sestřihu pre-mRNA. Podporuje sestavení spliceosomu a vyštěpení prvního intronu prostřednictvím vazby na jaderný CBC^{25,26}. Tento proteinový komplex se dále účastní jaderného exportu mRNA, na který má zároveň stimulační efekt²⁷.

V cytoplasmě interaguje mRNA čepička s eIF4F, který zastává klíčovou roli při iniciaci translace⁴. Tato interakce umožňuje asociaci eIF4F s 40S ribosomální podjednotkou²⁸.

2.1.2.1 Funkce mRNA čepičky v rámci imunitního systému

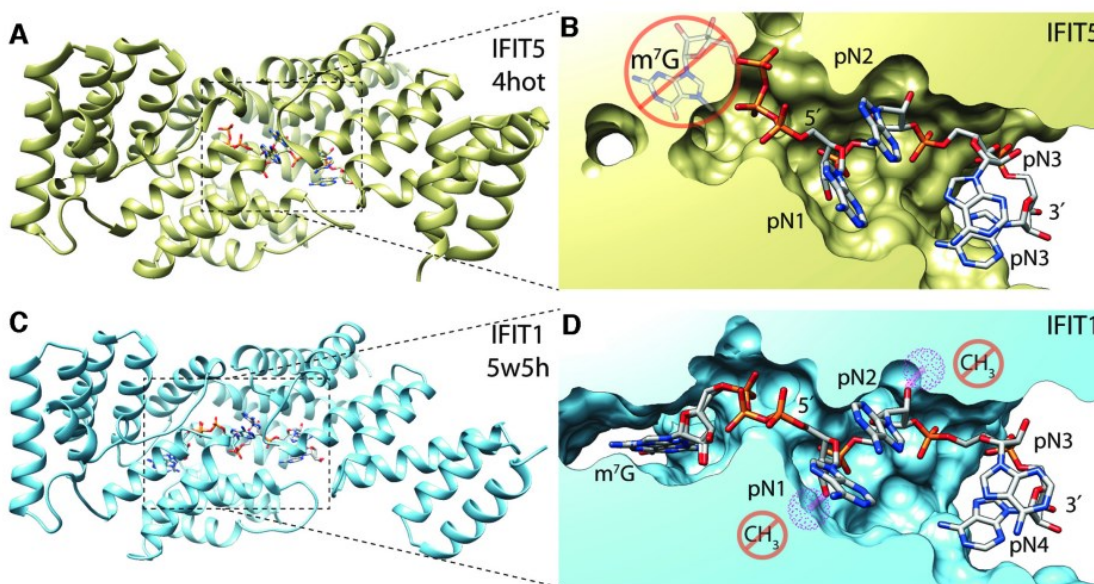
Eukaryotická mRNA čepička zastává ještě jednu důležitou roli. Její přítomnost umožňuje nespecifickému imunitnímu systému rozlišovat vlastní RNA od cizorodé²². mRNA, která na svém 5'-konci neobsahuje standardní eukaryotickou čepičku, patří mezi molekulární vzory asociované s patogeny. Jedná se o strukturální vzory, které jsou rozpoznávány receptory PRR (z ang. „pattern recognition receptor“)²⁹. PRR jsou kategorizovány na základě substrátové specifity, funkce a lokalizace. Mohou být sekretovány, membránově vázány nebo se mohou vyskytovat v cytoplasmě³⁰.

V buněčném cytosolu jsou různé strukturální vzorce 5'-konce virové RNA rozeznávány převážně RIG-like receptory, konkrétně Mda5 a RIG-1. Oba tyto receptory obsahují helikasovou doménu a rozeznávají dsRNA (dsRNA vzniká během replikace ssRNA virů). Zatímco RIG-I interaguje převážně s krátkými řetězci dsRNA, Mda5 interaguje s dlouhými řetězci dsRNA³¹. RIG-I rozeznává trifosfátový konec dsRNA a dále také di- a trifosfátový konec ssRNA^{32,33}. Mda5 se vyznačuje tím, že váže dsRNA, která na svém 5'-konci obsahuje čepičku typu 0 (cit. ³⁴).

Rozpoznání strukturních vzorců výše zmíněnými receptory spouští signální kaskádu, která indukuje produkci interferonů typu I a následně i transkripci genů stimulovaných interferony, včetně interferonem indukovaných proteinů s tetra-riko-peptidovým opakováním³⁵ (IFIT, z angl. „interferon-induced protein with tetra-ri-co-peptide repeats“).

Ačkoliv IFIT postrádají enzymovou aktivitu, jsou schopny specificky interagovat s virovou RNA a v důsledku toho inhibovat replikaci virové RNA^{32,36}. Např. IFIT1 specificky váže svou N-koncovou doménou čepičku typu 0. Naopak svou C-koncovou doménou se může vázat k eukaryotickému iniciačnímu faktoru 3 (eIF3), čímž brání sestavení preiniciačního komplexu, sestávajícího z 40S ribosomální podjednotky, eIF3, eIF2/GTP/Met-tRNA a eIF4F, a tedy i iniciaci translace virové RNA³⁷. IFIT5 naopak rozeznává RNA bez čepičky³⁸.

RNA vazebné místo IFIT1 i IFIT5 je tvořeno pozitivně nabitým žlábkem (obr. 2). Kladné náboje umožňují koordinaci záporně nabitě fosfátové páteře RNA. Na konci RNA vazebného žlábků IFIT1 se vyskytuje navíc hydrofobní kavita, do které se může umístit mRNA čepička. Aminokyselinové zbytky přítomné uvnitř RNA-vazebného žlábků brání účinnému navázání RNA, která obsahuje 2'-O-methylované nukleotidy, což umožňuje rozlišování čepičky typu 0 od čepičky typu 1 nebo 2 (cit. ³⁸).



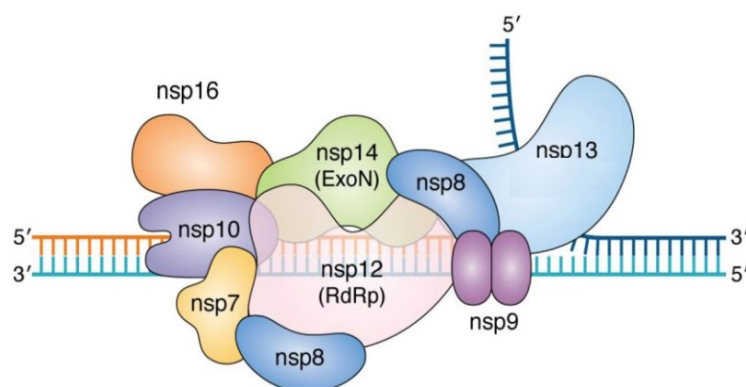
Obr. 2: Prostorová struktura vazebného místa IFIT5 a IFIT1. A, C, Stužkové modely interferonem indukovaných proteinů s tetra-riko-peptidovým opakováním jsou zobrazeny žlutě (IFIT5) a modře (IFIT1). B, D, Pohled do vazebného místa IFIT5 a IFIT1. Vazebné místo IFIT1 neumožňuje navázání čepičky typu 1 nebo 2 (fialové kulové plochy značí překryv methylových skupin čepičky typu 1 a 2 s povrchovým modelem vazebné kapsy IFIT1). Vazebné místo IFIT5 je určeno pouze pro 5'-ppp-RNA. Ligandy jsou zobrazeny tyčinkovým modelem a barevně jsou odlišeny různé atomy (uhlík šedě, kyslík červeně, fosfor oranžově, dusík modře). Převzato³⁸.

2.2 Koronavirová mRNA čepička

Důležité role, které zastává mRNA čepička v translaci proteinů a vrozené imunitě, měly vliv na vývoj eukaryotických virů. Čepička umožňuje virům nejen efektivní syntézu proteinů, ale také chránit svou RNA před rozpoznáním imunitním systémem hostitele. Jelikož k syntéze eukaryotické mRNA čepičky dochází kotranskripčně v buněčném jádře, viry, které se replikují v cytoplasmě, si vyvinuly různé mechanismy, jak modifikovat 5'-konec své RNA. Některé viry odtrhávají mRNA čepičku (tzv. „cap snatching“) z hostitelské RNA^{39,40}. Koronaviry naopak ve své genetické informaci nesou geny kódující proteiny, které se účastní syntézy mRNA čepičky⁴⁰.

2.2.1 Syntéza koronavirové mRNA čepičky

RNA genom SARS-CoV-2 je organizován do několika otevřených čtecích rámců (ORF, z angl. „open reading frame“), z nichž ORF1a a ORF1b tvoří zhruba dvě třetiny genomu. Překrývající se čtecí rámce ORF1a a ORF1b jsou translatovány hostitelskými ribosomy do polyproteinů pp1a a pp1ab. Jejich následným proteolytickým štěpením vzniká 16 nestrukturních proteinů (nsp, z angl. „nonstructural protein“), z nichž se některé účastní tvorby replikačně transkripčního komplexu⁴¹ (RTC, z angl. „replication-transcription complex“, obr. 3). Ústředním proteinem RTC je bifunkční nsp12. Nsp12 je tvořen RNA dependentní RNA polymerasovou doménou (RdRp) a NiRAN doménou, která se vyznačuje guanylyltransferasovou aktivitou^{42,43}. Součástí RTC je dále nsp13, helikasa a trifosfatasa⁴⁴, nsp14, 3'-5' exonukleasa a N7-methyltransferasa, nsp16, 2'-O-methyltransferasa, nsp10, kofaktor nsp14 a nsp16⁴⁵, nsp7 a nsp8, kofaktory nsp12 (cit. ⁴⁶), RNA vazebný nsp9 (cit. ⁴⁷) a pravděpodobně také nukleokapsidový protein³⁸.

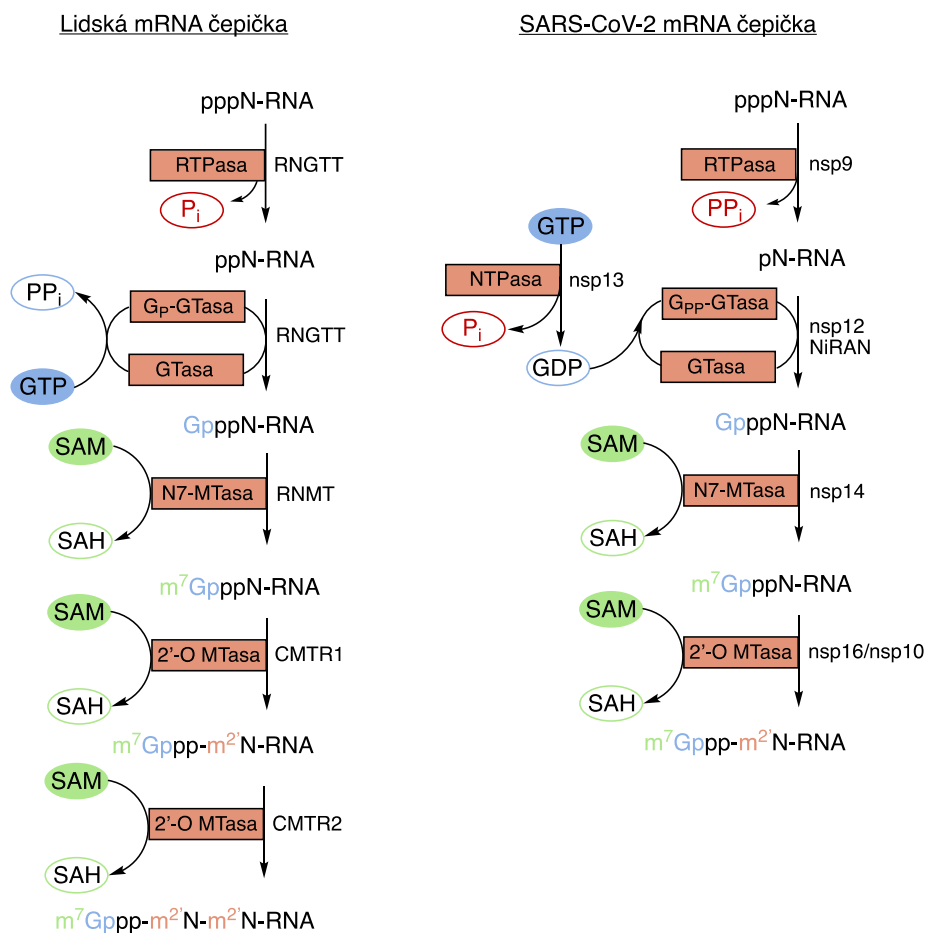


Obr. 3: Schématické znázornění replikačně transkripčního komplexu SARS-CoV-2. Převzato a upraveno⁴⁸.

Nascentní virová 5'-ppp-RNA se během transkripce váže do aktivního místa NiRAN domény nsp12, do kterého zároveň zasahují i první čtyři aminokyselinové zbytky N-terminálního konce nsp9. Po navázání nově vznikající virové RNA do aktivního místa NiRAN domény, N-terminální konec nsp9, konkrétně Asn1, napadá α -fosfát nascentní 5'-ppp-RNA za vzniku kovalentního intermediátu nsp9-pRNA⁴³.

Nsp13 zajišťuje hydrolyzu GTP na GDP, který se posléze váže do aktivního místa NiRAN domény. β -fosfát GDP napadá fosfátovou skupinu kovalentního intermediátu, čímž dochází k uvolnění prekurzoru čepičky (Gppp-RNA) a regeneraci nsp9 (cit. ⁴³). mRNA je následně methylována N7-methyltransferasovou doménou nsp14 za vzniku čepičky typu 0 (cit. ⁴⁹). Poslední krok syntézy virové mRNA čepičky představuje methylace 2'-hydroxylové skupiny prvního transkribovaného nukleotidu (obr. 4). Tato reakce je katalyzována nsp16, který využívá nsp10 jako kofaktor⁵⁰.

Zdá se, že pořadí methylačních reakcí není striktně dáno. Nsp16 může využívat jako substrát také prekurzor čepičky 0, avšak s mnohem nižší účinností⁵¹.



Obr. 4: Syntéza eukaryotické a koronavirové (SARS-CoV-2) mRNA čepičky.

RNGT RNA guanylyltransferasa a 5'-fosfátasa, RNMT – RNA guanin-N7-methyltransferasa, CMTR1 – 2'-O-methyltransferasa 1, CMTR2 – 2'-O-methyltransferasa 2. Vytvořeno v Chemdraw⁹.

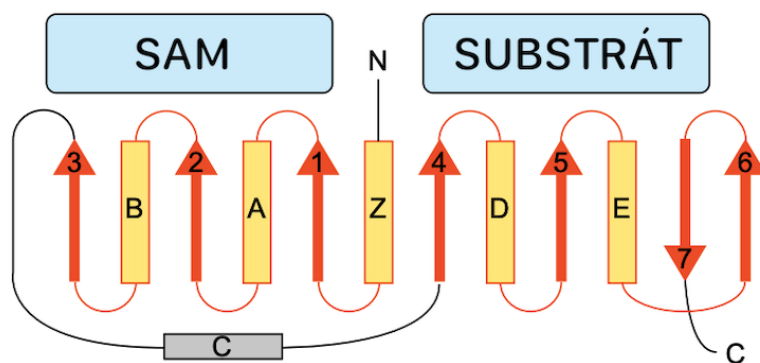
2.3 SAM-dependentní methyltransferasy

Methyltransferasy (dále již MTasy) katalyzují přenos methylové skupiny z jedné sloučeniny na druhou. Zdrojem methylové skupiny může být např. S-adenosyl-L-methionin (SAM), methylamin nebo methyltetrahydrofolát. Většina methylačních reakcí je zprostředkovávána SAM-dependentními MTasami (SAM-MTasami), které využívají S-adenosyl-L-methionin jako donor methylové skupiny⁵². Ve všech organismech, včetně virů, je methylace mRNA čepičky katalyzována SAM-MTasami⁵³.

SAM-MTasy mají velmi nízkou sekvenční homologii, vyznačují se však konzervovanou supersekundární strukturou. SAM-MTasy lze členit do několika skupin na základě společných strukturních vlastností. Většina z nich, včetně většiny doposud strukturně charakterizovaných MTas, které se účastní syntézy čepičky, spadá do skupiny I (cit. ⁵²). Pro tuto skupinu je typický strukturní prvek podobný Rossmannově záhybu, tzv. „Rossmann-like“ záhyb (obr. 5, str. 24). Skládá se ze střídajících se strukturních motivů β -vláken (1–7) a α -helixů (Z, A–E), tzv. $\beta\alpha\beta$ záhyb^{52,54}. β -vlákna mezi sebou interagují skrze vodíkové můstky a společně tvoří β -skládaný list. N-terminální vlákno β 1 se obvykle vyskytuje uprostřed β -skládaného listu. Pořadí β -vláken bývá 3-2-1-4-5-7-6, přičemž vlákno β 7 bývá v antiparalelním uspořádání oproti zbytku. Helixy Z, A a B se nacházejí na jedné straně β -skládaného listu, zatímco helixy C, D a E se vyskytují na druhé straně a vytváří tak strukturu připomínající sendvič⁵².

SAM-vazebné místo se vyskytuje v oblasti N-koncové části β -skládaného listu a je tvořeno smyčkami, které se nacházejí na konci β -vláken 1, 2 a 3. Vazebné místo substrátu se nachází v C-koncové oblasti β -skládaného listu⁵².

Aminokyselinové postranní řetězce zapojené do vazebných interakcí SAM jsou napříč SAM-MTas málo konzervované. I přesto, že MTasy vážou SAM do stejné oblasti β -skládaného listu a kofaktor zaujímá podobnou vazebnou konformaci⁵⁵, jejich vazebné interakce se značně liší⁵². SAM-MTasy skupiny I však sdílí dva konzervované vazebné motivy. Mezi β -vlákem 1 a α -helixem A se vyskytuje oblast bohatá na glycin. Smyčka s motivem GxGxG interaguje s aminokyselinovou částí SAM. V oblasti mezi β -vlákem 2 a α -helixem B se nachází kyselý aminokyselinový zbytek (Glu/Asp), který interaguje s hydroxylovými skupinami ribosy skrze vodíkové můstky^{52,56}.



Obr. 5: Schématické znázornění „Rossmann-like“ záhybu SAM-dependentních methyltransferas. „Rossmann like“ záhyb se skládá ze střídajících se strukturních motivů β -vláken (1–7, v pořadí 3-2-1-4-5-7-6) a α -helixů (Z, A-E). β -vlákna jsou znázorněna červenými šipkami, žluté obdélníky reprezentují jednotlivé α -helixy. Modré obdélníky znázorňují vazebná místa kofaktoru SAM a substrátu. Převzato a upraveno⁵².

2.3.1 Koronavirové methyltransferasy

Genom SARS-CoV-2 je na svém 5'-konci chráněn mRNA čepičkou. Methylace čepičky je katalyzována nsp14 a nsp16. Nsp14 methyluje N7-guanosin za vzniku struktury čepičky 0 (cit. ⁴⁹). Hydroxylová skupina v poloze 2' prvního transkribovaného nukleotidu je methylována nsp16 za vzniku struktury čepičky typu 1 (cit. ⁵⁰). Obě methyltransferasy využívají SAM jako donor methylové skupiny. S-adenosyl-L-homocystein (SAH) tvoří vedlejší produkt methylační reakce².

2.3.1.1 Nestrukturní protein 14

Nsp14 je modulární protein, který zastává důležitou roli během syntézy a transkripce virové RNA. Je tvořen N-terminální doménou, vyznačující se 3'-5' exoribonukleasovou aktivitou⁵⁷, a C-koncovou methyltransferasovou doménou⁴⁹. Obě domény jsou propojeny pantovou oblastí (tzv. „hinge region“), tvořenou flexibilní smyčkou a třemi malými β -vláčky (16–18), které jsou zároveň součástí MTasové domény. Flexibilní pantová oblast je konzervovaná napříč *Coronavirinae* a umožňuje laterální a rotační pohyby C-terminální domény vůči N-terminální doméně⁵⁸.

Koronaviry se vyznačují neobvykle velkými RNA genomy (~30 kb). Přesnost (tzv. fidelita) replikace koronavirů se pohybuje v rozmezí 10^{-6} – 10^{-7} (v porovnání s ostatními RNA viry o několik řádů přesnější)⁵⁸. Nízká mutační rychlost je připisována opravné (tzv. „proofreading“) aktivitě exonukleasové domény nsp14, která umožňuje enzymu vyštěpovat nukleotidy (včetně nukleotidových analogů, např. remdesiviru⁵⁹), které byly nesprávně zařazeny RdRp⁵⁸.

Exonukleasová doména nsp14 asociuje s nsp10 v poměru 1 : 1 za vzniku heterokomplexu⁵⁸. Její enzymová aktivita je výrazně zvýšena v přítomnosti nsp10 jako kofaktoru. Nsp10 však nemá žádný vliv na methyltransferasovou aktivitu nsp14 (cit. ⁶⁰).

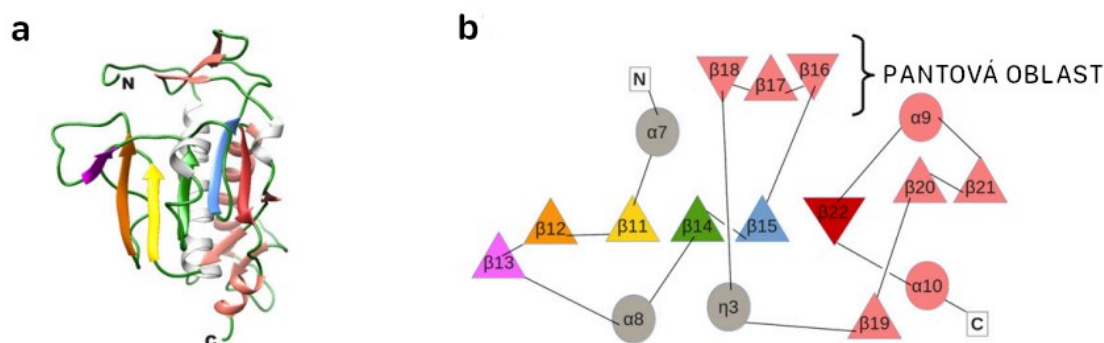
Vzhledem k vysoké míře konzervovanosti nsp14 napříč koronaviry, nsp14 představuje atraktivní cíl pro vývoj širokospektrálních antivirotik³.

2.3.1.1.1 Methyltransferasová doména nsp14

MTasová doména nsp14 se nevyznačuje typickým „Rossmann-like“ záhybem, který je běžně pozorován u MTas účastnících se tvorby mRNA čepičky. MTasová doména nsp14 je tvořena celkem 12 β -vláknky a 5 α -helixy (obr. 6, str. 26). Centrální β -skládaný list se skládá z 5 β -vláken (12, 11, 14, 15 a 22, který je v antiparalelním uspořádání) namísto 7, které jsou typicky pozorovány u MTas skupiny I. Struktura se zároveň vyznačuje absencí β - α - β uspořádání. β -skládaný list je z jedné strany obklopen α -helixem 7 a z druhé strany třemi dlouhými smyčkami, které navíc obsahují dva malé α -helixy (α 8 a η 3). Atypická inserce antiparalelního β -skládaného listu (16–18) je součástí pantové oblasti a je uspořádána kolmo vůči centrálnímu β -skládanému listu. Vazebné místo substrátu, prekursoru čepičky typu 0, je tvořeno pantovou oblastí (N-terminální smyčka tvořená aminokyselinami 288-300 a β -vlákna 16–18) a C-terminálním koncem MTasové domény (α 9–10, β 20–22). Vazebné místo je zároveň stabilizováno koordinovaným zinečnatým iontem, který vytváří strukturu zinkového prstu^{38,60,61}.

Lokální hydrofobní prostředí je stabilizováno α -helixem 10. Tato modifikace C-terminálního konce byla již pozorována u některých SAM-MTas, které vážou nukleové kyseliny⁶¹. Katalýza přenosu methylové skupiny z SAM na RNA substrát je zprostředkována skrze DxGxPxG/A SAM-vazebný motiv, kde x představuje jakoukoliv aminokyselinu⁶².

Methyltransferasová doména nsp14 se liší od jiných virových MTas tím, že její aktivita je silně závislá na přítomnosti exonukleasové domény⁶³.



Obr. 6: Strukturní model a schématické znázornění topologie methyltransferasové domény nsp14. **a**, Stužkový model N7-MTasové domény nsp14. Jednotlivé sekundární struktury jsou vyznačeny různými barvami. Smyčky jsou znázorněny zeleně, β -vlákna růžově, oranžově, žlutě, zeleně, modře, červeně a lososově. α -helixy jsou zobrazeny šedě a lososově. **b**, Topologie N7-MTasové domény nsp14. β -vlákna jsou reprezentována trojúhelníky a α -helixy kruhy. Barevné rozlišení sekundárních struktur odpovídá stužkovému modelu. Převzato a upraveno⁵⁸.

2.3.1.2 Nestruturní protein 16

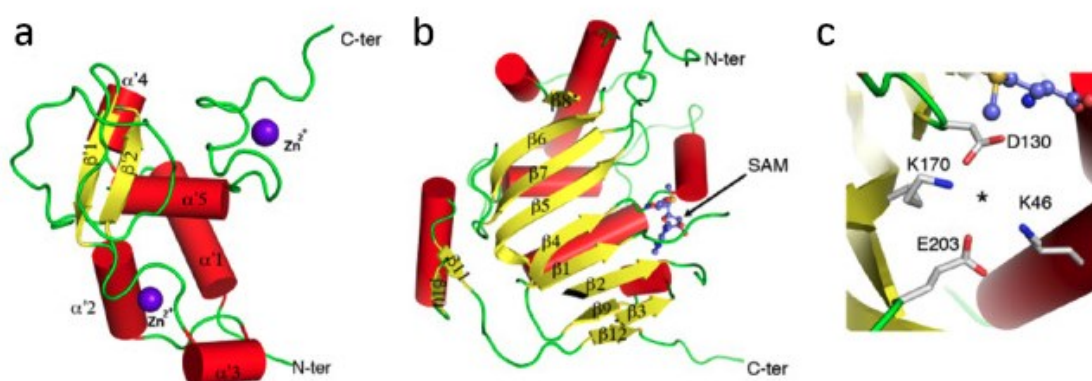
Methylace 2'-hydroxylové skupiny prvního transkribovaného nukleotidu, poslední krok syntézy virové mRNA čepičky, je zajišťována koronavirovým nsp16. Nsp16 vytváří heterodimerní proteinový komplex spolu s nsp10. Přítomnost nsp10 aktivuje methyltransferasovou aktivitu nsp16⁵⁰. Oba tyto nsp jsou vysoce konzervované napříč koronaviry⁶⁴.

Nsp10 je tvořen dvěma antiparalelními β -vláknými, které jsou z jedné strany obklopeny smyčkou a z druhé strany 6 helixy a smyčkami, které se vyznačují přítomností dvou zinkových prstů (obr. 7a, str. 27). Kladně nabitý a hydrofobní povrch nsp10 interaguje s negativně nabitým a hydrofobním povrchem nsp16, čímž dochází ke stabilizaci SAM-vazebného místa. Oba nsp spolu dále interagují skrze rozsáhlou síť vodíkových můstků, které jsou často zprostředkovány molekulami vody^{64,65,66}.

Nsp16 je tvořen celkem 12 α -helixy a 12 β -vláknými. Na rozdíl od methyltransferasové domény nsp14 je katalytické centrum nsp16 tvořeno „Rossmann-like“ záhybem^{64,65} (obr. 7b, str. 27). Jedná se o kanonické uspořádání vláken (3-2-1-4-5-7-6), kde β -vlákno 7 se jako jediný vyskytuje v antiparalelní pozici vůči ostatním. Centrální β -skládaný list SARS-CoV-2 zaujímá tvar písmene J⁶⁶ a je obklopen helixy z obou stran^{64,65,66}. SAM-vazebné místo se vyskytuje v blízkosti β -vláken 1 a 2 „Rossmann-like“ záhybu. Všechna rezidua, která interagují s SAM buď přímo, nebo skrze vodíkové můstky zprostředkovanými molekulami vody, jsou vysoce konzervované napříč koronaviry³⁸. Negativně nabitá SAM-vazebná kapsa je tvořena smyčkami 71–79, 100–108 a 103–148. Aminokyseliny Lys46, Asp130, Lys170 a Glu203 se vyskytují

v blízkosti methylové skupiny SAM a tvoří tzv. kanonickou K-D-K-E katalytickou tetradu⁶⁴ (obr. 27c). Tato katalytická tetradá je konzervovaná i v případě lidské 2'-O-methyltransferasy CMTR1 (cit. ³⁸).

Methylace substrátu je zprostředkována výše zmíněnou katalytickou tetradou a probíhá S_N2 reakčním mechanismem^{64,65}. Katalýza probíhá za účasti bivalentního iontu, Mg^{2+} nebo Mn^{2+} . Kation však pravděpodobně není nezbytný pro katalýzu jako takovou, ale hraje důležitou roli v rámci správného prostorového uspořádání RNA ve vazebném místě^{38,67}.



Obr. 7: Nsp10 a nsp16 s navázaným S-adenosyl-L-methioninem (SAM). **a**, Struktura nsp10, který se skládá z 6 α -helixů (červeně) a dvou β -vláken (žlutě). Zinečnaté ionty jsou zobrazeny fialově. **b**, Kanonický β -skládaný list nsp16 s navázaným ligandem SAM (znázorněn tyčinkovým modelem). **c**, Pohled do katalytického centra nsp16. Postranní řetězce aminokyselinových zbytků katalytické tetrady K-D-K-E jsou zobrazeny tyčinkovým modelem. Atomy jsou barevně rozlišeny (uhlík šedě, kyslík červeně, dusík modře). Převzato a upraveno⁶⁴.

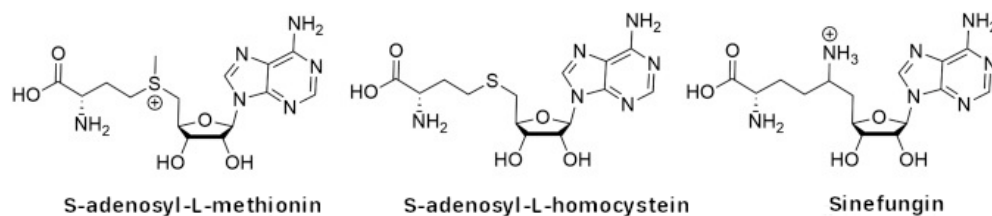
2.3.2 Inhibitory koronavirových methyltransferas

Nsp14 s nsp16 patří mezi nejvíce konzervované proteiny napříč koronaviry. Vysoká sekvenční identita těchto proteinů z nich činí zajímavé cílové molekuly pro vývoj širokospektrálních antivirových. I přes to, že enzymové aktivity těchto proteinů jsou známy již několik let, doposud nebyly nalezeny žádné specifické inhibitory koronavirových MTas^{3,38}.

Inhibitory, u kterých bylo prokázáno, že potlačují methyltransferasovou aktivitu nsp14 nebo nsp16, lze členit do několika skupin na základě mechanismu účinku. První skupina je tvořena inhibitory, které se vážou do SAM-vazebného místa. Jedná se většinou o analoga SAM nebo SAH, vedlejšího produktu methylační reakce³⁸. Do této skupiny patří např. sinefungin (SIN), který byl poprvé izolován ze *Streptomyces griseolus* a vyznačuje se svými fungicidními účinky⁶⁸. Ve struktuře SIN je kladný náboj na síře SAM nahrazen aminoskupinou, která může být za fyziologických podmínek

protonována (obr. 8). SIN inhibuje jak nsp14, tak i nsp16/nsp10 SARS-CoV, SARS-CoV-2 (cit. ⁵⁰) a dále také nsp16/nsp10 MERS-CoV⁶⁹. Kompetitivní inhibitory SIN a SAH se běžně využívají jako standardy při stanovování míry inhibice koronavirových MTas³⁸.

Další skupiny inhibitorů se odvíjí od struktury mRNA čepičky anebo se vyznačují tím, že inhibují protein-proteinové interakce nsp16 a kofaktoru nsp10. Poslední skupina je tvořena látkami, které byly identifikovány pomocí bioscreeningových metod (tzv. „high-throughput screening“) a jejich inhibiční mechanismus není znám³⁸.



Obr. 8: Struktura S-adenosyl-L-methioninu (SAM), S-adenosyl-L-homocysteinu (SAH) a sinefunginu (SIN). Upraveno a převzato⁷⁰.

3 Cíl práce

mRNA čepička představuje evolučně konzervovanou modifikaci eukaryotické mRNA. Zastává důležité role v regulaci genové exprese, zrání a jaderném exportu mRNA, zvyšuje stabilitu RNA a také umožňuje imunitnímu systému rozpoznávat vlastní RNA od cizorodé. Viry si z toho důvodu vyvinuly různé mechanismy, jak modifikovat své genomy. Koronaviry si ve své genetické informaci nesou vlastní enzymový aparát, který jim umožňuje syntetizovat vlastní mRNA čepičku, která je nerozeznatelná od eukaryotické. Účast koronavirových methyltransferas v syntéze mRNA čepičky a jejich vysoká konzervovanost napříč koronaviry z nich činí atraktivní molekuly pro vývoj nových antivirotik a potencionální cíle pro vývoj širokospektrálních antivirotik. Diplomová práce se zabývala methyltransferasami SARS-CoV-2, konkrétně nsp16 a methyltransferasovou doménou nsp14.

Dílčí cíle diplomové práce představovaly:

- Příprava expresního plasmidu pro produkci rekombinantní methyltransferasové domény nsp14 (dále již MT14).
- Bakteriální exprese a následná purifikace samostatné MT14, fúzního proteinu TELSAM-MT14, nsp16 a jeho kofaktoru nsp10.
- Identifikace počátečních krystalizačních podmínek komplexů MT14, TELSAM-MT14 a nsp16/10 s různými ligandy a jejich následná optimalizace.
- Krystalizace inhibičních komplexů MT14, TELSAM-MT14, nsp16/nsp10.
- Rentgenostrukturní analýza inhibičních komplexů koronavirových methyltransferas.

4 Materiál a přístroje

4.1 Chemikálie

agarosa	<i>SERVA, DE</i>
akrylamid	<i>Carl Roth, DE</i>
ampicilin	<i>Carl Roth, DE</i>
β -merkaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
bisakrylamid	<i>Carl Roth, DE</i>
citronan sodný dihydrát	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Coomassie Brilliant Blue G 250	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
dihydrogenfosforečnan draselný	<i>Penta, ČR</i>
dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
dodecylsírán sodný (SDS)	<i>Carl Roth, DE</i>
ethanol	<i>Penta, ČR</i>
ethidium bromid	<i>Carl Roth, DE</i>
ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)	<i>Carl Roth, DE</i>
glukosa	<i>Penta, ČR</i>
glycerol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
glycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
hydrogenfosforečnan sodný	<i>Penta, ČR</i>
chlorid hořečnatý	<i>Penta, ČR</i>
chlorid sodný	<i>Penta, ČR</i>
chlorid zinečnatý	<i>Penta, ČR</i>
imidazol	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
kvasničný extrakt	<i>Carl Roth, DE</i>
kyselina chlorovodíková	<i>Penta, ČR</i>
kyselina octová	<i>Penta, ČR</i>
kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová (MES)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
laktosa	<i>Carl Roth, DE</i>
LB agar	<i>P-Lab, ČR</i>
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
peroxodisírán amonný	<i>Carl Roth, DE</i>
polyethylenglykol (PEG)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>

síran amonný	<i>Carl Roth, DE</i>
síran hořečnatý	<i>Penta, ČR</i>
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
trypton	<i>Carl Roth, DE</i>

4.2 Pufry a roztoky

ligační pufr T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10×)	<i>NEB, USA</i>
nanášecí pufr pro DNA elektroforézu DNA Loading Dye (6×)	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
restrikční pufr FastDigest Green Buffer (10×)	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>

elektrodový pufr pro SDS-PAGE

25mM Tris HCl, pH 8,8; 250mM glycin, 0,1% (w/w) SDS

eluční pufr

MT14: 50mM Tris pH 8,0, 300mM NaCl, 300mM imidazol, 5mM MgSO₄, 3mM β-merkptoethanol, 10% (v/v) glycerol

nsp16 a nsp10: 50mM Tris pH 8,0, 500mM NaCl, 300mM imidazol, 5mM MgSO₄, 3mM β-merkptoethanol, 10% (v/v) glycerol

TELSAM-MT14: 50mM Tris pH 8,0, 400mM NaCl, 300mM imidazol, 10mM MgSO₄, 3mM β-merkptoethanol, 10μM ZnCl₂

LB médium

0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1 % (w/v) trypton, 85 mM NaCl

lyzační, ekvilibrační (afinitní chromatografie) a dialyzační pufr

MT14: 50mM Tris pH 8,0, 300mM NaCl, 20mM imidazol, 5mM MgSO₄, 3mM β-merkptoethanol, 10% (v/v) glycerol

nsp16 a nsp10: 50mM Tris pH 8,0, 500mM NaCl, 20mM imidazol, 5mM MgSO₄, 3mM β-merkptoethanol, 10% (v/v) glycerol

TELSAM-MT14: 50mM Tris pH 8,0, 400mM NaCl, 20mM imidazol, 10mM MgSO₄, 3mM β-merkptoethanol, 10μM ZnCl₂

mobilní fáze pro gelovou chromatografii

MT14, nsp16/10: 10mM Tris, pH 7,4, 150mM NaCl, 1mM TCEP, 5% (v/v) glycerol

TELSAM-MT14: 20mM Tris, pH 8,5, 200mM KCl, 2mM TCEP

promývací pufr

MT14: 50mM Tris pH 8,0, 1M NaCl, 20mM imidazol, 5mM MgSO₄, 3mM β-merkapt ethanol, 10% (v/v) glycerol

nsp16 a nsp10: 50mM Tris pH 8,0, 1M NaCl, 20mM imidazol, 5mM MgSO₄, 3mM β-merkapt ethanol, 10% (v/v) glycerol

TELSAM-MT14: 50mM Tris pH 8,0, 1M NaCl, 20mM imidazol, 10mM MgSO₄, 3mM β-merkapt ethanol, 10μM ZnCl₂

TAE pufr

40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA pH 8,0

vzorkový pufr pro SDS-PAGE (6×)

350mM Tris-HCl, pH 6,8, 6% (v/v) β-merkapt ethanol, 30% (v/v) glycerol, 10% (w/v) SDS, 0,012% (v/v) bromfenolová modř

vyvolávací roztok pro detekci proteinů v polyakrylamidovém gelu

0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250, 50% (v/v) methanol, 10% kyselina octová

ZY médium

1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 2,8mM glukosa, 6mM, laktosa, 0,5% (v/v) glycerol, 1mM MgCl₂, 25mM (NH₄)₂SO₄, 50mM KH₂PO₄, 50mM Na₂HPO₄

1000× koncentrovaný roztok ampicilinu (AMP)

100 mg/ml AMP (rozpuštěno ve vodě), 50% (v/v) ethanol

4.3 Ligandy

SAM (rozpuštěno ve vodě)

Sigma-Aldrich, USA

SAH (rozpuštěno ve vodě)

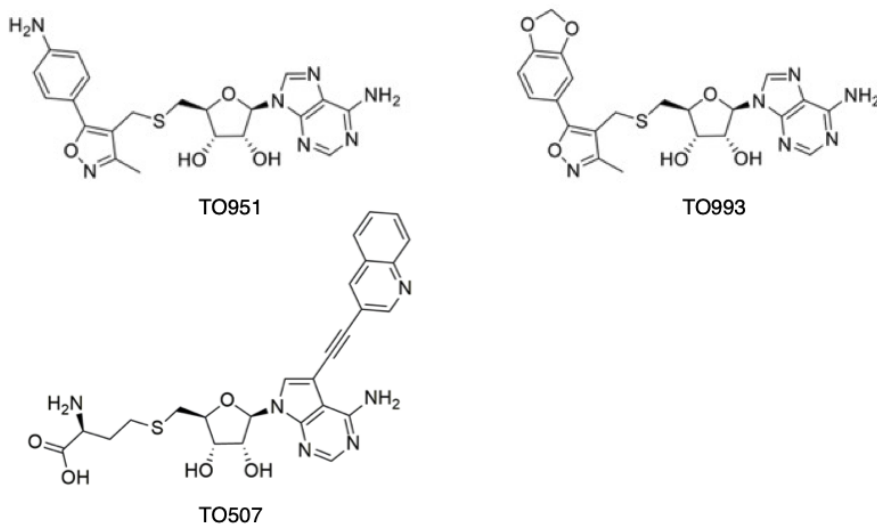
Sigma-Aldrich, USA

SIN (rozpuštěno ve vodě)

Sigma-Aldrich, USA

Inhibitory TO507, TO951, TO993 (rozpuštěny v DMSO, struktury jsou zobrazeny na obr. 9)

*Ing. Tomáš Otava, ÚOCHB AV
ČR v.v.i*



Obr. 9: Struktura ligandů TO507, TO951, TO993.

4.4 Biologický a genetický materiál

endonukleasa *BamHI*

Thermo Fischer Scientific, USA

endonukleasa *NotI*

Thermo Fischer Scientific, USA

Escherichia coli DH5 α

Invitrogen, USA

Escherichia coli NiCo21 (DE3)

New England BioLabs, USA

nukleasa Benzonase

Sigma-Aldrich

PCRBIO Taq Mix Red (2 \times)

PCR Biosystems, UK

Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (2 \times)

Thermo Fischer Scientific, USA

plasmid pSUMO

Addgene, USA

plasmid pSUMO s genem kódujícím nsp10

*připraveno v laboratoři, templát
nsp10 vyroben Invitrogen, USA*

plasmid pSUMO s genem kódujícím nsp14

*připraveno v laboratoři, templát
nsp14 vyroben Invitrogen, USA*

plasmid pSUMO s genem kódujícím nsp16

*připraveno v laboratoři, templát
nsp16 vyroben Invitrogen, USA*

proteasa Ulp1 (histidinová kotva na N-konci)

připraveno v laboratoři

telecí střevní alkalická fosfatasa (CIAP)	<i>Thermo Fischer Scientific, USA</i>
T4 DNA ligasa	<i>Invitrogen, USA</i>

Primery

Nsp14 Mtase start	5' -CAGACGGATCCATGGTTGATTGGACCATCGAGTAT-3'
pSUMO seq rev	5' -CAGCGGTGGCAGCAGCC-3'
pSUMO seq fw	5' -GGCTGATGGAAGCGTTCGC-3'
T7terminator	5' -GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
wvMT NotI	5' -CATATGCGGCCGCTTATTGCAGACGCGTAAAGGTGTTC-3'

4.5 Přístroje

aparatura a zdroj pro horizontální elektroforézu Consort EV231	<i>Carl Roth, DE</i>
aparatura pro SDS elektroforézu Mini-PROTEAN® Tetra Cell	<i>Bio-Rad, USA</i>
centrifuga Allegra X – 15 R, rotor SX4750A	<i>Beckman Coulter, USA</i>
centrifuga Avanti J-26S XPI, rotor JLA-9.1000	<i>Beckman Coulter, USA</i>
centrifuga Avanti J-30I, rotor JA-30.50 Ti	<i>Beckman Coulter, USA</i>
centrifuga 5148 R, rotor FA-45-18-11	<i>Eppendorf, Německo</i>
FPLC systém ÄKTA purifier 10	<i>GE Healthcare Life Sciences, UK</i>
krystalizační robot CrystalGryphon	<i>Art Robbins Instruments, USA</i>
krystalizační robot Dragonfly Crystal	<i>SPT Labtech, UK</i>
krystalizační robot Mosquito Crystal	<i>SPT Labtech, UK</i>
magnetická míchačka ARE	<i>VELP, IT</i>
mikroskop SZX10	<i>Olympus, JP</i>
mikroskop UV fluorescenční Uvex-M	<i>JANSi, USA</i>
rentgenová difrakční stanice MicroMax™-007	<i>HF Rigaku, USA</i>
rotační třepačka Incubating Mini Shaker	<i>VWR, ČR</i>
rotační třepačka s inkubátorem Innova 44	<i>New Brunswick Scient., USA</i>
sonikátor Q700	<i>QSonica, USA</i>
spektrofotometr BioPhotometer plus	<i>Eppendorf, Německo</i>
spektrofotometr Nanodrop ND-1000	<i>Thermo Fischer Scientific, USA</i>

termocyklér Tprofessional TRIO	<i>Biometra, DE</i>
termostat IPP 400	<i>Memmert, DE</i>
UV zobrazovací systém Quantum ST4-1100	<i>Vilbert Lourmat, FR</i>
válcová míchačka TubeRoller R3005	<i>Benchmark Scientific, USA</i>
vodní lázeň JB Aqua 2 Plus	<i>Grant Instruments, UK</i>
vortex Genie 2	<i>Scientific Industries, USA</i>

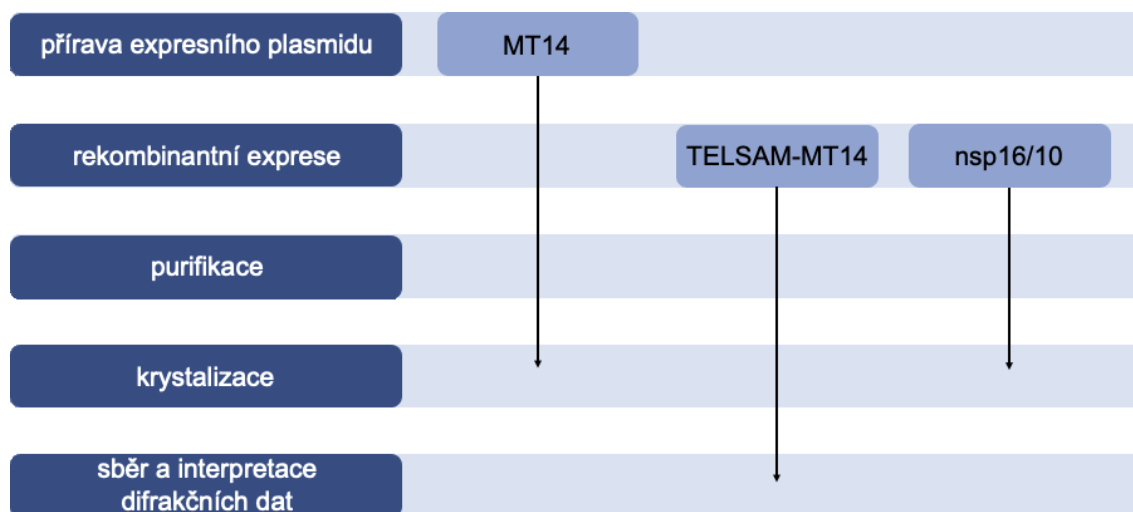
4.6 Ostatní materiál

dialyzační membrána Spectra/Por 1 6-8 kD MWCO	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
gel na SDS elektroforézu	<i>připraveno v laboratoři</i>
homogenizátor dle Dounceho	<i>P-Lab, ČR</i>
chromatografický nosič	<i>HisPur™ Ni-NTA Resin, Thermo Fisher Scientific, USA</i>
kolona HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	<i>GE Healthcare, USA</i>
komerční kit QIAprep Spin Miniprep Kit	<i>Qiagen, DE</i>
komerční kit QIAquick PCR Purification Kit	<i>Qiagen, DE</i>
koncentrátor Macrosep (MWCO 10 000)	<i>Pall Corporation, USA</i>
krystalizační destičky Intelli-Plate 96-2 Shallow Well	<i>ARI (USA)</i>
krystalizační sada JCSG I–IV	<i>Qiagen, DE</i>
krystalizační sada Proplex, SG1 Screen	<i>Molecular Dimensions, USA</i>
standard molekulových hmotností PageRuler plus Prestained Protein Ladder, 10–250 kDa	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
standard molekulových hmotností 1 kb Plus DNA Ladder	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>

5 Metody

Diplomová práce byla zaměřená na methyltransferasy SARS-CoV-2, konkrétně na nsp14, nsp16 a jeho kofaktor nsp10 (nsp16/10). V případě bifunkčního nsp14 byla předmětem zájmu pouze methyltransferasová doména. Za účelem strukturní analýzy komplexů protein-ligand byla provedena exprese a purifikace výše zmíněných proteinů. Rekombinantní proteiny byly následně krystalizovány.

Methyltransferasová doména nsp14 byla podrobena krystalizačním experimentům ve formě samostatného proteinu (MT14) a dále také ve formě proteinu fúzaného s krystalizačním chaperonem TELSAM⁷¹ (doména sterilního alfa motivu lidského transkripčního faktoru ETV6, z angl. „sterile alpha motif domain (SAM) of human Translocation ETS Leukemia (TEL) protein“). Výchozím materiálem pro expresi nsp16/10 a TELSAM-MT14 byly již předem připravené expresní plasmidy nesoucí geny daných proteinů. Vektory byly navrženy a připraveny Petrou Kraččíkovou, Ph. D. Experimentální část diplomové práce týkající se samostatné MT14 zahrnovala přípravu expresního vektoru. Na obr. 10 je znázorněn průběh experimentální části této diplomové práce.



Obr. 10: Schéma experimentální části diplomové práce.

5.1 Příprava expresního plasmidu pro následnou expresi MT14

5.1.1 Polymerasová řetězová reakce

Polymerasová řetězová reakce (PCR) byla využita za účelem amplifikace úseku DNA kódujícího 239 AMK dlouhou methyltransferasovou doménu nestrukturního proteinu 14 SARS-CoV-2. Jako výchozí templát sloužil expresní plasmid pSUMO obsahující plnou sekvenci koronavirového nsp14. K amplifikaci cílové sekvence byly využity oligonukleotidové primery, které byly navrženy tak, aby obsahovaly sekvence nukleotidů rozeznávané restrikními endonukleasami *BamHI* a *NotI*. Koncentrace zásobních roztoků primerů byla 10 μM. Do tenkostěnné mikrozkušavky určené pro PCR byla připravena reakční směs o celkovém objemu 20 μl dle tab. 1. Do směsi byl jako poslední napipetován 2× koncentrovaný roztok obsahující DNA polymerasu, dNTP a chlorid hořečnatý.

Tab. 1: Složení reakční směsi pro PCR

Složka	Objem (μl)
2× Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	10
DNA templát (50 pg μl ⁻¹)	8
přímý primer Nsp14 MTase start (1 μM)	1
zpětný primer wvMT NotI (1 μM)	1

Mikrozkušavka byla následně vložena do PCR termocykléru, který byl předem předehřát na 95 °C. Amplifikace požadovaného genu probíhala podle kroků v tab. 2. Teplotní profil PCR reakce byl přizpůsoben teplotám tání použitých primerů. Pro ověření délky PCR produktů byla provedena horizontální agarosová elektroforéza.

Tab. 2: Teplotní program pro PCR

Počet cyklů	Název cyklu	Teplota (°C)	Čas (s)
1	Počáteční denaturace	98	10
36	Denaturace	98	1
	Hybridizace	65	5
	Elongace	72	15
1	Finální elongace	72	60
1	Ukončení	18	–

5.1.2 Horizontální agarosová elektroforéza

Gel složený z 1% agarosu a 0,01% ethidium bromidu byl vložen do elektroforetické vany tak, aby jamky na gelu byly u záporného pólu, a následně byl převrstven TAE pufrem. Na parafilmu byly smíchány 2 μ l vzorku amplifikovaného DNA úseku s 1 μ l nanášecího pufru (DNA gel Loading Dye). Pro kontrolu velikosti PCR produktu byly do jedné jamky gelu nanášeny 2 μ l DNA standardu a do druhé 3 μ l připraveného vzorku s nanášecím pufrem. Agarosová elektroforéza probíhala v horizontálním uspořádání za konstantního napětí 300 V po dobu 12 minut. K vizualizaci výsledků elektroforézy bylo využito UV záření.

5.1.3 Restrikční štěpení PCR produktu a vektoru pSUMO

PCR produkt byl purifikován pomocí sady QIAquick PCR Purification Kit⁷². Oligonukleotidové primery použité pro amplifikaci MT14 obsahovaly nukleotidovou sekvenci rozeznávanou restrikčními endonukleasami *BamHI* a *NotI*. Cílový plasmid pSUMO obsahoval klonovací místo (tzv. „polylinker“) a tudíž i stejná restrikční místa jako použité primery. K 50 μ l purifikovaného PCR produktu bylo přidáno 6 μ l 10 \times koncentrovaného restrikčního pufru FastDigest Green Buffer, 2 μ l sterilní vody a nakonec 1 μ l restrikční endonukleasy *BamHI* a 1 μ l proteasy *NotI*. Do další eppendorfky bylo napipetováno 5 μ l plasmidu pSumo, 47 μ l sterilní vody, 1 μ l endonukleasy *BamHI*, 1 μ l endonukleasy *NotI* a navíc ještě 1 μ l telecí střevní alkalické fosfatasy (CIAP, z angl. „calf intestinal alkaline phosphatase“). Reakční směsi byly inkubovány po dobu jedné hodiny při 37 °C v termostatu. Produkty štěpení byly přečištěny pomocí sady QIAquick PCR Purification Kit⁷².

5.1.4 Ligace insertu do vektoru pSUMO

Ligační směs o celkovém objemu 15 μ l obsahovala 5 μ l štěpeného PCR produktu, 3 μ l linearizovaného plasmidu pSUMO, 1 μ l T4 DNA ligasy, 1,5 μ l 10 \times koncentrovaného ligačního pufru T4 DNA Ligase Reaction Buffer a 4,5 μ l sterilní vody. Souběžně byla připravena i kontrolní ligační směs, která obsahovala sterilní vodu namísto genu kódujícího MT14. Ligační směsi byly ponechány 1 h při pokojové teplotě.

5.1.5 Transformace buněk *E. Coli* DH5 α

Transformace kompetentních buněk *E. Coli* DH5 α připravenými vektory byla provedena metodou teplotního šoku. K ligačním směsím bylo přidáno 100 μ l kompetentních buněk *E. Coli* DH5 α a suspenze byly ponechány 15 minut inkubovat na ledě. Vzorčky byly vloženy na 45 vteřin do vodní lázně o teplotě 42 °C a vzápětí přemístěny na led, kde byly ponechány další 2 minuty. K bakteriálním suspenzím bylo přidáno 850 μ l LB média a transformované buňky byly inkubovány na rotační třepačce (220 rpm, 37 °C). Po hodinové inkubaci bylo za aseptických podmínek rozetřeno 200 μ l bakteriální suspenze na LB agarové plotny obsahující ampicilin (100 μ g ml⁻¹) jako antibiotikum. Agarové plotny byly ponechány inkubovat v termostatu v převrácené poloze při 37 °C přes noc.

5.1.6 PCR z kolonií

Do osmi mikrozkuvek bylo napipetováno 20 μ l sterilní vody. Do každé z nich byla pomocí sterilní špičky pipety přenesena část biomasy jedné zvolené kolonie. Úspěšnost vložení inzertu do vektoru byla ověřena metodou „colony PCR“. Reakční směsi o celkovém objemu 15 μ l byly připraveny dle tab. 3. Koncentrace zásobních roztoků primerů byla 10 μ M. Jako poslední byl do směsi přidán 2 \times koncentrovaný roztok PCR BIO Taq Mix Red obsahující Taq DNA polymerasu, dNTP a chlorid hořečnatý.

Tab. 3: Složení reakční směsi pro PCR z kolonií

Složka	Objem (μ l)
2 \times PCR BIO Taq Mix Red	7,5
resuspendovaná kolonie	6,5
přímý primer Nsp14 MTase start (1 μ M)	0,5
zpětný primer pSUMO seq rev (1 μ M)	0,5

PCR mikrozkuvky byly následně vloženy do PCR termocykléru. Jelikož byl použit jiný zpětný primer, než jako byl v případě amplifikace genu pro MT14 (kap. 5.1.1, str. 38), teplotní podmínky amplifikace byly upraveny dle tab. 4 (str. 41).

Tab. 4: Teplotní program pro PCR z kolonií

Počet cyklů	Název cyklu	Teplota (°C)	Čas (s)
1	Počáteční denaturace	95	180
36	Denaturace	95	15
	Hybridizace	51	15
	Elongace	72	15
1	Finální elongace	72	60
1	Ukončení	18	–

Všech 8 PCR produktů bylo separováno pomocí horizontální agarosové elektroforézy a následně vizualizováno pod UV světlem obdobně, jako tomu bylo v kapitole 5.1.2, str 39. Na základě výsledků z agarosové elektroforézy byly zvolené 3 kolonie a ty byly přeneseny a resuspendovány v 5 ml LB média obsahujícího 5 µl 1000× koncentrovaného ampicilinu. Média byla ponechána inkubovat na třepačkách (220 rpm, 37 °C) přes noc.

Plasmidová DNA byla dalšího dne izolována z bakteriálních buněk pomocí komerční sady QIAprep SpinMiniprep Kit⁷³ metodou alkalické lyze.

5.1.7 Sekvence plasmidové DNA

Vzorky byly sekvenovány firmou SEQme Sangerovou metodou. Pro každý vzorek byly připraveny dvě směsi obsahující buďto přímý primer pSUmo seq fw nebo zpětný primer T7terminator (tab. 5).

Tab. 5: Složení vzorků pro Sangerovu sekvenaci

Složka	Objem (µl)
plasmid	3,5
sterilní voda	3,0
10µM přímý nebo zpětný primer	0,5

5.2 Rekombinantní exprese a purifikace koronavirových methyltransferas

5.2.1 Transformace bakteriálních buněk expresními plasmidy

Nsp16, nsp10, MT14 a TELSAM-MT14 byly exprimovány v *E. coli* NiCo21 (DE3). Kompetentní buňky byly uchovávány v -80 °C, a proto byly nejprve ponechány rozmrazit na ledě. Ke každému bakteriálnímu alikvotu o přibližném objemu 40 µl bylo přidáno 1,5 µl plasmidu nesoucí gen pro příslušný koronavirový protein. Směs byla následně

držena na ledu přibližně 20 minut. Kompetentní buňky byly transformovány metodou teplotního šoku. Bakterie byly inkubovány ve vodní lázni o teplotě 42 °C po dobu 45 vteřin a poté znovu přeneseny na led. Po 2 minutách bylo ke směsi přidáno 500 µl LB média a bakteriální suspenze byla inkubována za třepání (220 rpm, 37 °C) po dobu 20 min. Buňky byly poté přeneseny do 5 ml LB média obsahujícího 5 µl 1000× koncentrovaného ampicilinu. Inokula byla ponechána růst přes noc na třepáčkách (220 rpm) při 37 °C.

5.2.2 Rekombinantní exprese nsp10, nsp16, MT14 a TELSAM-MT14

Každé inokulum bylo rozděleno do dvou Erlenmeyerových baněk obsahujících 1 litr autoindukčního ZY média. Do všech baněk bylo napipetováno 500 µl 100mM síranu zinečnatého a 1 ml 1000× koncentrovaného ampicilinu. Baňky byly následně inkubovány za třepání (220 rpm, 37 °C). Průběžně byla měřena hodnota optické denzity při 600 nm (OD₆₀₀). Teplota na třepáčkách byla snížena na 15 °C při dosažení hodnoty OD₆₀₀ v rozmezí 0,8–1,0. Bakteriální kultury byly inkubovány na třepáčkách (220 rpm, 15 °C) přes noc.

5.2.3 Izolace rekombinantních proteinů z bakteriální kultury

Bakteriální suspenze byly převedeny z Erlenmeyerových baněk do kyvet. Supernatant byl po centrifugaci (6000× g, 4 °C, 6 min; Avanti Centrifuge J-265 XPI, rotor JLA-9.1000) odstraněn a pelety byly ponechány několik minut na ledu. K peletám bylo přidáno 30 ml příslušného lyzačního pufru a pomocí vortexu byly resuspendovány. Homogenizace pelet probíhala za využití Dounceho homogenizátoru. Buňky byly lyzovány za stálého chlazení pomocí sonikátoru (70 Hz, mezi jednosekundovými pulsy byla čtyřsekundová prodleva) po dobu 4 minut. Buněčný lyzát byl přelit do kyvet a následně centrifugován při vyšších otáčkách (30 000× g, 4 °C; Avanti J-30I, rotor JA-30,50 Ti) po dobu 30 minut. V dalším kroku se pracovalo se supernatantem.

5.2.4 Metaloafinitní chromatografie

První purifikační krok byl prováděn za využití chromatografické kolonky (plastová kolonka s fritou) obsahující zhruba 4 ml aktivované Ni-NTA agarosy. Ni-NTA nosič byl ekvilibrován příslušným pufrům a následně převeden do zkumavek obsahujících

supernatant (viz kapitola 5.2.3, str. 42). Po hodinové inkubaci na válcové míchačce při 4 °C byly vzorky centrifugovány (1620 rpm, 4 °C; centrifuga Allegra X-15 R, rotor SX4750A) po dobu 3 minut. Supernatant byl odebrán a k peletě (Ni-NTA agarosa s navázaným proteinem) bylo přidáno přibližně 40 ml promývacího pufru. Vzorek byl opatrně promíchán a opět centrifugován za stejných podmínek. Chromatografický nosič byl promyt celkem třikrát promývacím pufrem a posléze ještě třikrát ekvilibračním pufrem. Ni-NTA agarosa byla opatrně resuspendována v 5 ml ekvilibračního pufru a následně byla převedena do chromatografické kolonky. Po odkapání ekvilibračního pufru z kolonky byly proteiny eluovány z chromatografického nosiče 10 ml elučního pufru a jímány do zkumavky. Od každého proteinového vzorku bylo odebráno 50 µl pro následnou analýzu pomocí SDS-PAGE. Eluované roztoky obsahující nsp10 a nsp16 byly spojeny dohromady.

V případě TELSAM-MT14 se purifikační protokol mírně lišil. K proteinu byl kromě Ni-NTA nosiče přidán ještě 1 µl nukleasy Benzonase a vzorek byl následně inkubován na válcové míchačce při 4 °C přes noc. Následně se postupovalo stejně jako v případě ostatních proteinů. Protein navázaný na Ni-NTA agarosu byl několikrát promyt a následně eluován.

5.2.5 Štěpení polyhistidinové kotvy Ulp1 proteasou

Ke každému proteinovému roztoku bylo přidáno 50 µl roztoku Ulp1 proteasy o koncentraci 1 mg ml⁻¹. Jednotlivé vzorky byly převedeny do dialyzačních membrán (MWCO 6–8 kDa). Vzorky byly dialyzovány proti 2 l dialyzačního pufru přes noc za stálého míchání při 4 °C.

Vzorek obsahující TELSAM-MT14 nebyl dialyzován, ale namísto toho byl centrifugován (4000 rpm, 4 °C, 2 h). Po dvouhodinové centrifugaci byl vzorek opatrně přelit do čisté zkumavky tak, aby byl zbaven vzniklého precipitátu. Pro následnou elektroforetickou analýzu bylo odebráno 50 µl vzorku. TELSAM-MT14 byla následně purifikována pomocí gelové permeační chromatografie (kap. 5.2.8, str. 44).

5.2.6 Reverzní metaloafinitní chromatografie

Dalšího dne byly vzorky (nsp16/10, MT14) převedeny z dialyzačních membrán do zkumavek a z každého bylo odebráno 50 µl pro následnou analýzu pomocí SDS-PAGE.

Ni-NTA agarosa byla nejprve aktivována 100mM roztokem chloridu sodného, několikrát promyta deionizovanou vodou a posléze ekvilibrována lyzačním pufrem. Inkubace chromatografického nosiče s proteinovými vzorky probíhala obdobně jako v kapitole 5.2.4, str. 42. Po inkubaci byly vzorky převedeny do chromatografických kolonek s fritou a proteiny byly rovnou jímány do zkumavek. Odebrané vzorky (50 μ l) byly posléze analyzovány pomocí SDS PAGE.

5.2.7 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)

Proteinové vzorky odebrané během purifikace byly elektroforeticky separovány za použití polyakrylamidového gelu sestávajícího z 4% zaostřovací zóny (125mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% (v/v) akrylamid : bisakrylamid (37,5 : 1), 0,1% (w/v) SDS, 0,005% (v/v) TEMED, 0,05% (w/v) peroxodisíran amonný a 15% separační zóny (375mM Tris-HCl, pH 8,8, 15% (w/v) akrylamid : bisakrylamid (37,5 : 1), 0,1% (w/v) SDS, 0,001% (v/v) TEMED, 0,05% (w/v) peroxodisíran amonný. Vzorky, které byly nanášeny do jamek gelu, byly připraveny smícháním 5 μ l proteinového roztoku s 1 μ l 6 \times koncentrovaného vzorkového pufru. Do jedné z jamek byly naneseny 3 μ l proteinového standardu molekulových hmotností. Elektroforetická analýza probíhala za konstantního napětí 220 V. Separované proteiny byly vizualizovány obarvením gelu vyvolávacím roztokem. Gel byl následně odbarven deionizovanou vodou.

5.2.8 Gelová permeační chromatografie

Proteiny MT14, TELSAM-MT14 a komplex nsp16/10 byly před posledním purifikačním krokem zakoncentrovány na objem 5 ml. Koncentrátory (MWCO 10 000) obsahující proteinové vzorky byly opakovaně centrifugovány (4000 \times g, 4 $^{\circ}$ C). Pro gelovou permeační chromatografii byla zvolena kolona HiLoad 16/600 Superdex 75 pg. Kolona připojená na FPLC systém ÄKTA purifier byla nejprve promyta deionizovanou vodou a následně ekvilibrována pufrem. Složení mobilní fáze pro ekvilibraci a separaci MT14 a nsp16/10 bylo totožné. Proteinové vzorky byly před nanesením do 5ml smyčky centrifugovány (5000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 min). Maximální tlak před kolonou byl nastaven na 0,5 MPa. Separace probíhala za konstantního průtoku 1 ml min⁻¹ při 8 $^{\circ}$ C a její průběh byl monitorován spektrofotometricky při 254 a 280 nm. Byly sbírány frakce o objemu 1,5 ml. Elektroforetická analýza frakcí probíhala obdobně jako v kapitole 5.2.7.

5.3 Krystalizace proteinů

Purifikované proteiny (kap. 5.2.8, str. 44) byly přeneseny do koncentrátoru (MWCO 10 000) a opakovaným centrifugováním ($4000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min) zakonzentrovány na výslednou koncentraci $3,5\text{ mg ml}^{-1}$ (nsp16/10), 3 mg ml^{-1} (MT14) a $4,8\text{ mg ml}^{-1}$ (TELSAM-MT14). Purifikované proteiny byly využity pro přípravu sedmi komplexů. V případě proteinového komplexu nsp16/10 a MT14 se jednalo o komplexy s přirozeným substrátem SAM a inhibítorem SIN. Zbylé dva komplexy byly tvořeny TELSAM-MT14 s inhibitory TO951 a TO993.

5.3.1 Příprava a krystalizace komplexu nsp16/10 s různými ligandy

Komplex nsp16/10 byl smíchán s 10mM vodným roztokem SIN nebo SAM tak, aby výsledná milimolární koncentrace ligandu byla rovna 1. Připravené směsi nsp16/10 s různými ligandy byly inkubovány na ledu po dobu jedné hodiny.

Pro krystalizaci proteinového komplexu nsp16/10 byly využity komerční sady krystalizačních roztoků JCSG I, JCSG II, JCSG III, JCSG IV, Proplex a SG1 Screen. Do rezervoárů krystalizačních destiček (Intelli-Plate 96-2 Shallow Well) bylo pomocí přístroje CrystalGryphon napipetováno $75\text{ }\mu\text{l}$ precipitačních roztoků výše zmíněných komerčních sad.

Krystalizace probíhala metodou difuze par v uspořádání sedící kapky při teplotě $18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sedící kapky byly rozkapány robotem Mosquito Crystal a vznikly smícháním 300 nl roztoku proteinu s ligandem a 150 nl krystalizačního roztoku z rezervoáru. Krystalizační destičky byly přelepeny průhlednou lepící fólií a kontrolovány obden pomocí mikroskopu.

5.3.2 Příprava a krystalizace komplexu MT14 s různými ligandy

K roztoku MT14 byl přidán 10mM SIN nebo SAM tak, aby konečná koncentrace ligandu ve směsi byla 1mM. Připravené roztoky byly posléze ponechány inkubovat jednu hodinu na ledu.

Pro krystalizaci MT14 byly použity stejné sady krystalizačních roztoků jako v případě komplexu nsp16/10. S využitím přístroje CrystalGryphon bylo do rezervoárů krystalizačních destiček napipetováno $75\text{ }\mu\text{l}$ krystalizačních roztoků.

Krystalizace probíhala metodou difuze par v uspořádání sedící kapky při teplotě $18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na krystalizační destičky bylo pomocí robota Mosquito Crystal naneseno

200 nl komplexu MT14 a 200 nl krystalizačního roztoku z rezervoáru. Přelepené krystalizační destičky byly kontrolovány každý druhý den pomocí mikroskopu.

5.3.3 Příprava a krystalizace inhibičních komplexů TELSAM-MT14

K TELSAM-MT14 byl přidán 1,1 molární nadbytek roztoku inhibitorů TO951 nebo TO993 (inhibitory byly rozpuštěny v DMSO). Inhibiční směsi byly ponechány inkubovat po dobu jedné hodiny na ledu.

Byly připraveny dvě sady krystalizačních roztoků. První sada precipitačních roztoků obsahovala vždy 200mM citronan sodný, 12% (w/v) PEG 3500 a dále 100mM Tris o různém pH (6,8–8,8). pH použitého Trisu se v každém krystalizačním roztoku lišil o 0,1 jednotek. Druhá sada roztoků obsahovala 200mM citronan sodný, 100mM Tris pH 8,5 a různé koncentrace PEGu 3500. Koncentrace PEGu 3500 se pohybovala od 12 do 18 % (w/v) a lišila se vždy o 0,5 % (w/v). Precipitační roztoky byly připraveny rovnou do rezervoárů (75 μ l) krystalizačních destiček pomocí přístroje Dragonfly Crystal.

Krystalizace probíhala metodou difuze par v uspořádání sedící kapky při teplotě 18 °C. Pomocí robota Mosquito Crystal byly připraveny sedící kapky, ve kterých byly připravené komplexy naředěny precipitačními roztoky v poměru 1 : 1. Krystalizační destičky byly následně přelepeny průhlednou lepící fólií a kontrolovány každé dva dny pod mikroskopem.

5.4 Namáčení krystalů

Po ověření difrakce jednoho ze získaných krystalů komplexu nsp16/10 se SIN pomocí měděné rotační anody (podmínka Proplex B10 o složení 0,15M síran amonný, 0,1M MES pH 6,0, 15% (w/v) PEG 4000) byly zbylé krystaly použity pro následné namáčení (tzv. „soaking“). Do mikrozkuřavky byl připraven roztok o složení 0,15M síran amonný, 0,1M MES pH 6,0, 20% (w/v) PEG 4000 (o 5 % vyšší koncentrace PEGu 4000 než v matečném roztoku). Dále byl do roztoku přidán inhibitor TO507 tak, aby jeho výsledná koncentrace v roztoku byla 2mM. Roztok, ve kterém se nacházely krystaly, byl opatrně odsát a krystaly byly převrstveny 1 μ l připraveného roztoku.

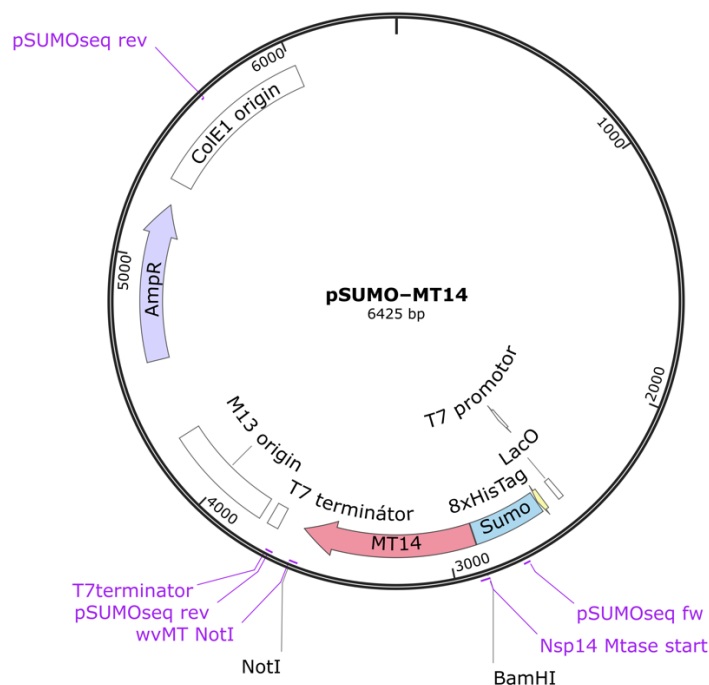
5.5 Sběr a zpracování difrakčních dat

Krystaly komplexů TELSAM-MT14 s inhibitory byly vyloveny z jamek pomocí krystalografických smyček (Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph. D., Mgr. Kateřina Krejčová), přeneseny do kryoprotektivního roztoku (20% (v/v) glycerol v matečném roztoku) a zamraženy v kapalném dusíku. Difrakční data byla naměřena na synchrotronu BESSY II. Naměřená data byla integrována v programu XDS⁷⁴. Fázový problém byl vyřešen metodou molekulárního nahrazení pomocí struktury TELSAM-MT14 s navázaným sinefunginem (7TW9, cit. ⁷¹) pomocí programového vybavení Phaser-MR. Struktura byla upravena pomocí programu Phenix Refine⁷⁵ a Coot⁷⁶. Zpracování naměřených dat a vyřešení 3D struktur bylo provedeno RNDr. Martinem Klímou, Ph. D. Krystalové struktury byly graficky zobrazeny a upraveny v programu PYMOL⁷⁷.

6 Výsledky

6.1 Příprava expresního plasmidu pro produkci MT14

Experimentální část byla zahájena přípravou produkčního vektoru nesoucího gen pro MT14 (obr. 11).



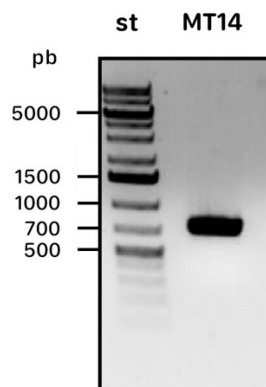
Obr. 11: Schematické znázornění připraveného plasmidu pSUMO nesoucí gen kódující methyltransferasovou doménu nestrukturního proteinu 14. MT14 označuje vložený gen pro methyltransferasovou doménu nsp14. Na obr. jsou znázorněna místa rozeznávaná restričními endonukleasami *BamHI* a *NotI* a komplementární sekvence k použitým primerům. Vytvořeno v programu Snapgene⁷⁸.

DNA úsek kódující methyltransferasovou doménu nestrukturního proteinu 14 (MT14) byl amplifikován polymerasovou řetězovou reakcí (kap. 5.1.1, str. 38). Jako templát sloužil plasmid pSUMO nesoucí gen pro nestrukturní protein 14 (nsp14). Do reakční směsi byly přidány specificky navržené oligonukleotidy (primery) obsahující sekvence rozeznávané restričními endonukleasami *BamHI* a *NotI* (obr. 12).



Obr.12: Sekvence přímého primeru (Nsp14 Mtase start) a zpětného primeru (wvMT NotI). Barevně jsou rozlišeny sekvence rozeznávané jednotlivými endonukleasami a šipkami jsou označeny příslušná restriční místa. Sekvence komplementární k sekvenci MT14 jsou podtrženy fialově. Terminační kodon je rozlišen červeně.

Produkt PCR reakce byl analyzován pomocí horizontální agarosové elektroforézy (kap. 5.1.2, str. 39). Teoretická velikost amplifikované methyltransferasové domény je 744 pb. Na agarosovém gelu byl detekován proužek, jehož elektroforetická pohyblivost odpovídala předpokládané délce PCR produktu (obr. 13).



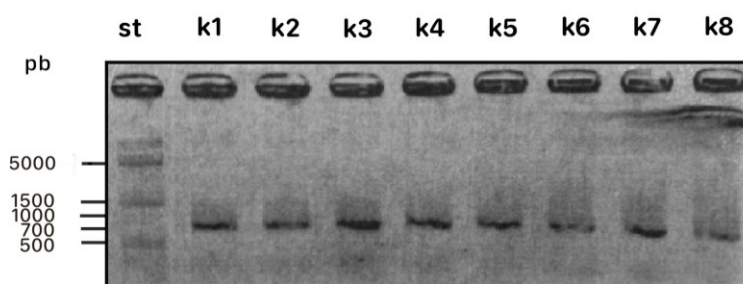
Obr. 13: Amplifikace genu MT14. Za využití plasmidu pSUMO kódujícího nsp14 jako templát byl polymerasovou řetězovou reakcí připraven gen pro MT14. Délka získaného PCR produktu byla ověřena elektroforeticky s využitím standardu molekulových hmotností (st).

Purifikovaný gen pro MT14 a vektor pSUMO byly následně štěpeny restrikcími endonukleasami *Bam*HI a *Not*I (kap. 5.1.3, str. 39). Reakční směs obsahující plasmid pSUMO obsahovala navíc telecí střevní alkalickou fosfatase. Odstranění fosfátu na 5'-konci snižuje pravděpodobnost recirkularizace samotného plasmidu během ligace a naopak podporuje zaligování inzertu do vektoru.

Za účelem zbavení se restrikcími endonukleas byly produkty štěpení přečištěny. Gen kódující MT14 byl působením T4 DNA ligasy vložen do linearizovaného vektoru pSUMO (kap. 5.1.4, str. 39). Souběžně byla připravena i kontrolní ligační směs, ve které byl amplifikovaný inzert nahrazen sterilní vodou.

Připravený konstrukt byl spolu s kontrolním plasmidem použit pro transformaci chemicky kompetentních buněk *E. coli* DH5 α (kap. 5.1.5, str. 40). Bakterie byly následně rozetřeny na LB plotnu a ponechány inkubovat přes noc. Po selekci pomocí ampicilinu byla polymerasovou řetězovou reakcí ověřena úspěšnost ligace v 8 koloniích (kap. 5.1.6, str. 40). Přímý primer Nsp14 MTase Start se komplementárně vázal k sekvenci genu SUMO proteinu, který je součástí vektoru pSUMO, a částečně i ke genu kódujícího MT14. Sekvence zpětného primeru pSUMO seq rev byla komplementární k sekvenci vektoru pSUMO. V případě agarové plotny obsahující bakterie transformované kontrolní ligační směsí nenarostly žádné kolonie, jelikož nedošlo k recirkularizaci vektoru pSUMO, který obsahuje gen pro ampicilinovou rezistenci.

PCR produkty byly analyzovány pomocí horizontální elektroforézy v agarosovém gelu (obr. 14). Na gelu byly detekovány proužky, které odpovídaly předpokládané délce amplifikovaného DNA úseku (821 pb).

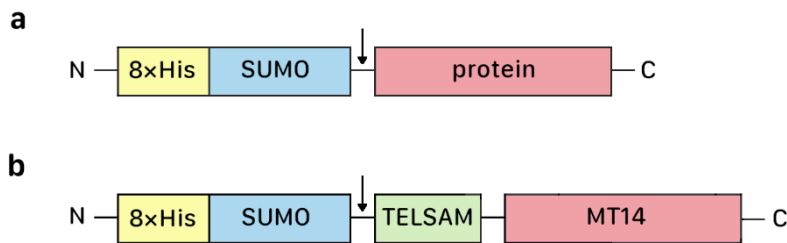


Obr. 14: Amplifikace vloženého genu pro MT14 do vektoru pSUMO. Polymerasovou řetězovou reakcí byl amplifikován DNA úsek kódující MT14, který byl vložen do plasmidu pSUMO. PCR produkty byly vizualizovány pomocí agarosové elektroforézy s využitím standardu molekulových hmotností (st). Dráhy k1–k8 odpovídají 8 vybraným koloniím.

Plasmidová DNA odpovídající koloniím 3, 4 a 6 byla následně izolována metodou alkalické lýze. Plasmidy byly poslány na sekvenaci (kap. 5.1.7, str. 41). Na základě obdržených výsledků Sangerova sekvenování byl pro následnou expresi MT14 zvolen konstrukt izolovaný z třetí kolonie (k3) o koncentraci $68 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$.

6.2 Exprese a purifikace koronavirových methyltransferas

Nsp16, nsp10 a MT14 byly exprimovány ve formě fúzních proteinů, které na svém N-konci obsahovaly sekvenci osmi histidinů (tzv. polyhistidinovou kotvu) následovanou SUMO proteinem (obr. 15a, str. 52). Polyhistidinová značka byla využita za účelem snadné purifikace proteinů metodou metaloafinitní chromatografie. SUMO protein propůjčuje fúznímu proteinu vyšší stabilitu a zároveň zvyšuje jeho rozpustnost. Terciární struktura SUMO proteinu je rozpoznávána Ulp1 proteasou⁷⁹, která odštěpením N-konce exprimovaného proteinu, polyhistidinové kotvy a SUMO proteinu, umožňuje získání samostatného proteinu. Exprimovaný fúzní protein TELSAM-MT14 (obr. 15b, str. 52) obsahoval navíc aminokyselinovou sekvenci krystalizačního chaperonu TELSAM, který stabilizuje krystalové kontakty a napomáhá krystalizaci proteinu⁸⁰.



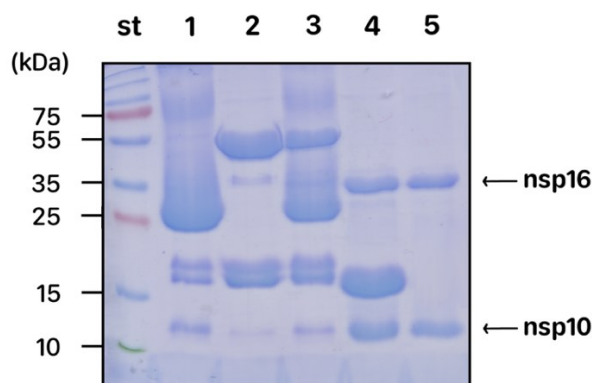
Obr. 15: Schématické znázornění exprimovaných proteinů. a, Nsp16, nsp10 a MT14 obsahují na N-konci polyhistidinovou kotvu (8×His) a SUMO protein. **b,** TELSAM-MT14 obsahuje na N-konci polyhistidinovou kotvu (8×His), SUMO protein a TELSAM. TELSAM je propojený s MT14 prostřednictvím aminokyseliny PAA. Šipkou je znázorněné štěpné místo Ulp1 proteasy.

Pro expresi rekombinantních proteinů byly použity vektory pSUMO, které nesou silný T7 promotor. Proteiny byly produkovány kmenem *E. Coli* NiCo21 (DE3), který umožňuje regulaci expresního systému obsahujícího T7 promotor.

Bakterie byly transformovány metodou teplotního šoku (kap. 5.2.1, str. 41) a následně kultivovány v autoindukčním ZY médiu (kap. 5.2.2, str. 42). Samovolná indukce exprese rekombinantních proteinů byla zprostředkována laktosou, která se v médiu vyskytuje ve vyšší koncentraci než glukosa. Laktosa je transportována do buněk až ve chvíli, kdy dochází ke spotřebování glukosy v médiu. Navázání laktosy, respektive allolaktosy, na lac represor indukuje produkci T7 RNA polymerasy, která je kódována bakteriálním chromozomem. T7 RNA polymerasa rozpoznává allolaktosou indukovaný T7 promotor, čímž dochází k iniciaci translace a vysoké expresi rekombinantního genu⁸¹.

6.2.1 Purifikace nestrukturního proteinu 10 a 16

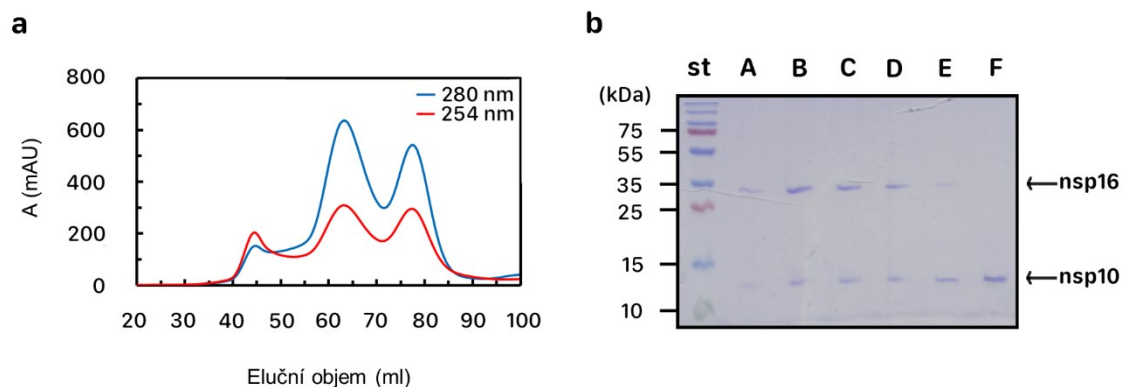
Proteiny byly purifikovány metodou metaloafinitní chromatografie (kap. 5.2.4, str. 42), při které byla využita histidinová kotva nsp. Přidáním Ulp1 proteasy ke spojeným proteinovým vzorkům bylo docíleno odštěpení histidinem značeného SUMO proteinu. Štěpení proteinů bylo doprovázeno dialýzou (kap. 5.2.5, str. 43), během které docházelo k precipitaci nsp16. Proteinové vzorky byly zbaveny Ulp1 proteasy a odštěpeného SUMO proteinu metodou reverzní metaloafinitní chromatografie (kap. 5.2.6, str. 43) díky tomu, že Ulp1 proteasa byla také opatřena polyhistidinovou kotvou. Během purifikace byly odebrány vzorky, které byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 16, str. 53).



Obr. 16: Průběh purifikace nestrukturního proteinu 16 a 10. SDS-PAGE analýza odebraných proteinových vzorků s využitím standardu molekulových hmotností (st). 1- eluovaný vzorek nsp10 po chelatační chromatografii, 2- eluovaný vzorek nsp16 po chelatační chromatografii, 3- vzorek spojeného nsp16 a nsp10 po chelatační chromatografii, 4- vzorek spojených proteinů po štěpení Ulp1 proteasou a dialýze, 5- vzorek spojených proteinů po reverzní chelatační chromatografii. Šipkami jsou označeny pozice jedno-tlivých získaných nestrukturních proteinů.

Působení Ulp1 proteasy je patrný z rozdílu velikostí detekovaných proteinů v dráhách 3 a 4. Odštěpením SUMO proteinu došlo ke snížení molekulové hmotnosti proteinů zhruba o 13 kDa. V dráze 4 lze těsně pod nsp16 pozorovat světlý proužek, který odpovídá Ulp1 protease (~28 kDa). Molekulová hmotnost SUMO proteinu je 12,7 kDa. SUMO protein se však vyznačuje odlišnou elektroforetickou pohyblivostí a na gelu bývá typicky detekován v oblasti kolem 18–22 kDa⁸². Samotný nsp16 je tvořen celkem 299 aminokyselinami a jeho molekulová hmotnost je rovna 33,5 kDa. Molekulová hmotnost 123-aminokyselin dlouhého nsp10 je 12,1 kDa.

Posledním purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie (kap. 5.2.8, str. 44). Zakoncentrovaný proteinový vzorek byl nanesen na kolonu HiLoad 16/600 Superdex 75 pg. Komplex nsp16/10 byl převeden do pufru 10mM Tris, pH 7,4, 150mM chlorid sodný, 1mM TCEP, 5% (v/v) glycerol. Separace probíhala při 8 °C za konstantního průtoku 1 ml min⁻¹. Objem jednotlivých sbíraných frakcí činil 1,5 ml. Frakce vybrané na základě elučního profilu (obr. 17a, str. 54) byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 17b, str. 54).



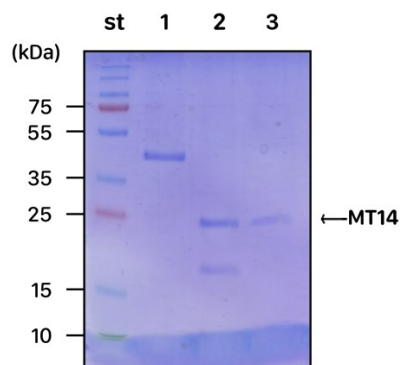
Obr. 17: Záznam chromatografické separace nsp16/10 a SDS-PAGE analýza frakcí. a, Závislost absorbance proteinového vzorku při 280 a 254 nm na elučním objemu. Gelová permeační chromatografie probíhala na koloně HiLoad 16/600 Superdex 75 pg ekvilibrované puforem o složení 10mM Tris, pH 7,4, 150mM chlorid sodný, 1mM TCEP, 5% (v/v) glycerol. Separace probíhala při 8 °C a za konstantního průtoku 1 ml min⁻¹. **b,** Elektroforetická analýza chromatografických frakcí s využitím standardu molekulových hmotností (st). Jednotlivé dráhy na gelu představují frakce o elučním objemu: A- 56,5 ml, B- 61,0 ml, C- 65,5 ml, D- 68,5 ml, E- 71,5 ml, F- 80,5 ml. Šípkami jsou označeny pozice jednotlivých purifikovaných nsp.

Frakce obsahující komplex nsp16/10 (eluční objem 57,0–68,0 ml) byly spojeny, zakonzentrovány na 3,5 mg ml⁻¹ a následně využity pro přípravu komplexů nsp16/10 s ligandy SAM a SIN.

6.2.2 Purifikace methyltransferasové domény nestrukturního proteinu 14

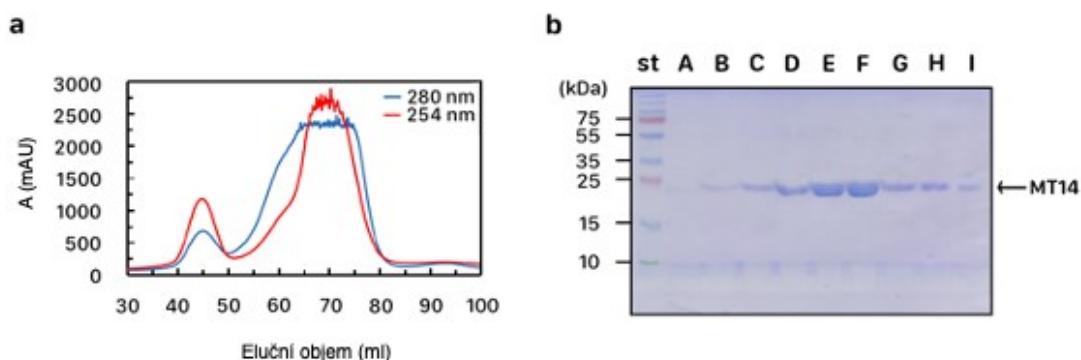
MT14 byla exprimovaná ve formě fúzního proteinu obsahujícího polyhistidinovou kotvu a SUMO protein za účelem snadné purifikace. Molekulová hmotnost fúzního proteinu je 40,1 kDa, zatímco samotné methyltransferasové domény nsp14 je 27,4 kDa.

MT14 byla purifikována metodou metaloafinitní chromatografie a eluována z Ni-NTA nosiče puforem s vysokou koncentrací imidazolu (kap. 5.2.4, str. 42). Štěpení fúzního proteinu Ulp1 proteasou probíhalo za dialýzy vzorku, čímž byl vzorek zbaven vysokého obsahu imidazolu (kap. 5.2.5, str. 43). Odštěpený SUMO protein a Ulp1 proteasa byly odděleny od MT14 metodou reverzní metaloafinitní chromatografie (kap. 5.2.6, str. 43). Průběh purifikace MT14 byl analyzován pomocí SDS-PAGE (obr. 18, str. 55).



Obr. 18: Průběh purifikace methyltransferasové domény nestukturního proteinu 14. SDS-PAGE analýza odebraných proteinových vzorků s využitím standardu molekulových hmotností (st). 1- eluovaný vzorek MT14 po chelatační chromatografii, 2- vzorek MT14 po štěpení Ulp1 proteasou a dialýze, 3- vzorek MT14 po reverzní chelatační chromatografii. Šipkou je označena pozice purifikované MT14.

Po elektroforetickém ověření přítomnosti MT14 byl zakoncentrovaný vzorek purifikován gelovou permeační chromatografií (obr. 19a). Vzorek byl separován na koloně HiLoad 16/600 Superdex 75 pg ekvilibrované pufrům 10mM Tris, pH 7,4, 150mM chlorid sodný, 1mM TCEP, 5% (v/v) glycerol (kap. 5.2.8, str. 44). Separace probíhala při 8 °C za konstantního průtoku 1 ml min⁻¹. Frakce byly sbírané po 1,5 ml a následně byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 19b).

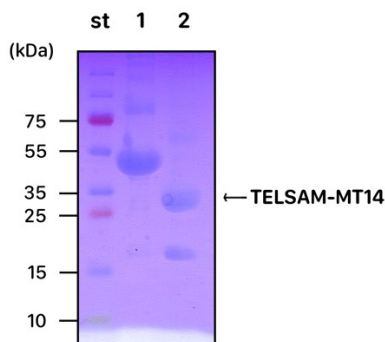


Obr. 19: Záznam chromatografické separace methyltransferasové domény nsp14 a SDS-PAGE analýza frakcí. **a,** Závislost absorbance proteinového vzorku při 280 a 254 nm na elučním objemu. Gelová permeační chromatografie probíhala na koloně HiLoad 16/600 Superdex 75 pg ekvilibrované pufrům o složení 10mM Tris, pH 7,4, 150mM chlorid sodný, 1mM TCEP, 5% (v/v) glycerol. Separace probíhala při 8 °C a za konstantního průtoku 1 ml min⁻¹. **b,** Elektroforetická analýza chromatografických frakcí s využitím standardu molekulových hmotností (st). Jednotlivé dráhy na gelu představují frakce o elučním objemu: A- 52,5 ml, B- 54,0 ml, C- 57,0 ml, D- 61,5 ml, E- 66,0 ml, F- 69,0 ml, G- 75,0 ml, H- 76,5 ml, I- 78,0 ml. Šipkou je označena pozice purifikované MT14. Chromatografický záznam a SDS-PAGE analýza frakcí odpovídá MT14, která byla exprimována v 6 litrech ZY média.

Frakce obsahující MT14 (eluční objem 54,0–78,0 ml) byly spojeny, zakoncentrovány na 3,0 mg ml⁻¹ a následně využity pro přípravu komplexů MT14 s ligandy SAM a SIN.

6.2.3 Purifikace methyltransferasové domény nestrukturního proteinu 14 fúzovaného s TELSAMem

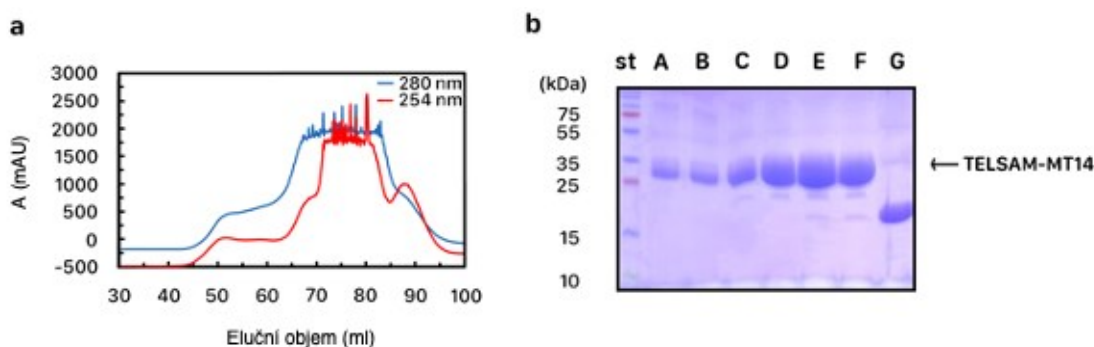
Proteinový roztok obsahující TELSAM-MT14 byl inkubován s nabitým Ni-NTA nosičem přes noc. Směs byla dále inkubována s endonukleasou za účelem zbavení se DNA a RNA ve vzorku. Dalšího dne byl histidinem značený fúzní protein eluován z chromatografického nosiče (kap. 5.2.4, str. 42). Ke vzorku byla přidána Ulp1 proteasa, čímž došlo k odštěpení SUMO proteinu (kap. 5.2.5, str. 43). Po dvouhodinové centrifugaci byl vzorek opatrně zbaven precipitátů. Průběh purifikace byl analyzován pomocí SDS-PAGE (obr. 20).



Obr. 20: Průběh purifikace methyltransferasové domény nestrukturního proteinu 14 fúzované s TELSAMem. SDS-PAGE analýza odebraných proteinových vzorků s využitím standardu molekulových hmotností (st). 1- eluovaný vzorek TELSAM-MT14 po chelatační chromatografii, 2- vzorek TELSAM-MT14 po štěpení Ulp1 proteasou. Šipkou je označena pozice purifikované TELSAM-MT14.

První vzorek byl odebrán po metaloafinitní chromatografii. Detekovaný proužek na gelu v dráze 1 odpovídá očekávané molekulové hmotnosti exprimovaného proteinu (48,2 kDa). Druhý vzorek byl odebrán po působení Ulp1 proteasy. Molekulová hmotnost 308 AMK dlouhé TELSAM-MT14 je 35,5 kDa. Purifikační protokol byl částečně převzatý a neobsahoval metodu reverzní afinitní chromatografie.

Posledním purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie (kap. 5.2.8, str. 44). Separace probíhala na koloně HiLoad 16/600 Superdex 75 pg za průtoku 1 ml min^{-1} při $8 \text{ }^\circ\text{C}$. TELSAM-MT14 byla převedena do pufru 20mM Tris pH 8,5, 200mM chlorid sodný, 2mM TCEP. Průběh chromatografické separace byl monitorován spektrofotometricky při 254 a 280 nm (obr. 21a, str. 57). Frakce byly sbírány po 1,5 ml a následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 21b, str. 57).



Obr. 21: Záznam chromatografické separace methyltransferasové domény nsp14 fúzované s TELSAMem a SDS-PAGE analýza frakcí. a, Závislost absorbance proteinového vzorku při 280 a 254 nm na elučním objemu. Gelová permeační chromatografie probíhala na koloně HiLoad 16/600 Superdex 75 pg ekvilibrované pufrém o složení 10mM Tris, pH 7,4, 150mM chlorid sodný, 1mM TCEP, 5% (v/v) glycerol. Separace probíhala za konstantního průtoku 1 ml min^{-1} při $8 \text{ }^\circ\text{C}$. **b,** Elektroforetická analýza chromatografických frakcí s využitím standardu molekulových hmotností (st). Jednotlivé dráhy na gelu představují frakce o elučním objemu: A- 66,0 ml, B- 67,5 ml, C- 70,5 ml, D- 73,5 ml, E- 76,5 ml, F- 79,5 ml, G- 88,5 ml. Šípkou je označena pozice purifikované TELSMAM-MT14.

Frakce odpovídající elučnímu objemu 66,0–79,5 ml byly spojeny. V později eluovaných frakcích se koncentrace odštěpeného SUMO proteinu zvyšovala (viz dráha G, obr. 21b). Následně byla změřena koncentrace proteinu ($4,8 \text{ mg ml}^{-1}$). Bez nutnosti dalšího zakoncentrování byl purifikovaný vzorek dále použit pro přípravu inhibičních komplexů a jejich následnou krystalizaci.

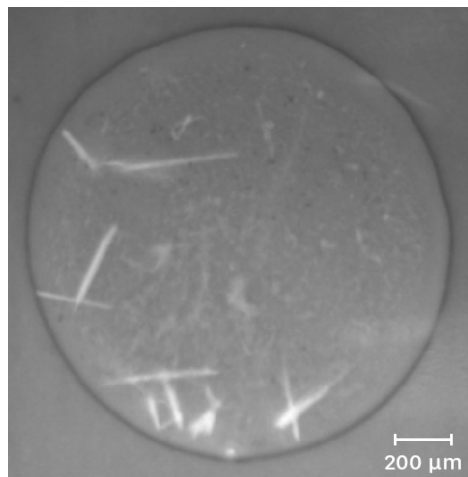
6.3 Příprava a krystalizace proteinových komplexů s různými ligandy

Purifikované proteiny byly inkubovány s různými ligandy. Nsp16/10 a MT14 sloužily k přípravě komplexů s přirozeným substrátem SAM a s inhibitorem SIN. V případě TELSAM-MT14 byly připraveny komplexy s inhibitory TO951 a TO993. Krystalizace komplexů probíhala metodou difuze par v uspořádání sedící kapky. Pomocí několika komerčních a optimalizovaných krystalizačních sad (tzv. „screening“) se podařilo určit počáteční krystalizační podmínky komplexu nsp16/10-SIN a obou inhibičních komplexů TELSAM-MT14. Získané krystaly nsp16/10 byly podrobeny namáčení za účelem nahrazení SIN inhibitorem TO507. Optimalizací identifikovaných podmínek byly získány krystaly obou inhibičních komplexů TELSAM-MT14.

6.3.1 Krystalizace komplexu nsp16/10 se SAM a SIN

Proteinový komplex nsp16/10 o koncentraci $3,5 \text{ mg ml}^{-1}$ byl smíchán s ligandy SIN nebo SAM, tak aby výsledná koncentrace ligandů byla 1mM (kap. 5.3.1, str. 45). Komplex byl naředěn krystalizačním roztokem v poměru 2 : 1 a byl ponechán krystalizovat metodou

difuze par v uspořádání sedící kapky. V podmínce Proplex B10 (0,15M síran amonný, 0,1M MES pH 6,0, 15% (w/v) PEG 4000) byly nalezeny krystaly (obr. 22).



Obr. 22: Proteinové krystaly komplexu nsp16/10 se sinefunginem. Nsp16/10 o koncentraci $3,5 \text{ mg ml}^{-1}$ byl krystalizován metodou difuze par v uspořádání sedící kapky při $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Komplex nsp16/10-sinefungin byl smíchán v poměru 2 : 1 s krystalizační podmínkou 0,15M síran amonný, 0,1M MES pH 6,0, 15% (w/v) PEG 4000. Snímek byl pořízen UV mikroskopem.

Po ověření difrakce jednoho z krystalů pomocí měděné rotační anody byly zbylé krystaly použity pro následné namáčení (tzv. „soaking“). Krystaly byly převedeny do kapky obsahující inhibitor TO507 za účelem vyvázání SIN z aktivního místa nsp16 a nahrazení SIN inhibitorem TO507 (kap. 5.4, str. 46). Dalšího dne nebyly v kapce pozorovány žádné krystaly, došlo k jejich rozpuštění.

Na základě identifikované krystalizační podmínky byla odvozena sada optimalizovaných krystalizačních roztoků. První řada roztoků obsahovala konstantní koncentraci soli (0,15M síran amonný), zatímco pH pufru a koncentrace precipitantu se lišila. Na krystalizační destičku byl vytvořen vertikální gradient precipitantu. Koncentrace PEGu 4000 se pohybovala od 12 do 18 % (w/v) a lišila se vždy o 1 % (w/v). Zároveň byl na krystalizační destičku vytvořen horizontální pH gradient 0,1M MESu, který se pohyboval v rozmezí od 5,6 do 6,4. v každém roztoku se pH MESu lišil o 0,2 jednotky. Druhá řada roztoků obsahovala 0,1M MES pH 6,0. Roztoky obsahovaly různé koncentrace soli, která se pohybovala v rozmezí od 100 do 200 mM a lišila se vždy o 20 mM. Podmínky se dále také lišily koncentrací PEGu 4000, který se pohyboval v rozmezí od 12 do 18 % (w/v) vždy s 1% (w/v) rozdílem. Komplex nsp16/10-SIN byl podroben krystalizačním experimentům. V žádné podmínce nebyly pozorovány krystaly.

6.3.2 Krystalizace MT14 se SAM a SIN

Ke krystalizaci MT14 (koncentrace 3 mg ml⁻¹) bylo využito 6 různých komerčních sad (kap. 5.3.2, str. 45). Komplexy MT14 byly krystalizovány v uspořádání sedící kapky, ve kterých byl komplex MT14-ligand ředěn krystalizačním roztokem v poměru 1 : 1. V žádné krystalizační podmínce nebyly pozorovány krystaly. Většina rozkapaných sedících kapek byla čirá a z toho důvodu byla MT14 zakoncentrována na 4 mg ml⁻¹ a rozkapána do stejných podmínek. V zhruba polovině kapek obsahujících MT14 v komplexu s různými ligandy byla pozorována precipitace. V žádné podmínce nedošlo ke vzniku krystalů.

6.3.3 Krystalizace TELSAM-MT14 s TO951 a TO993

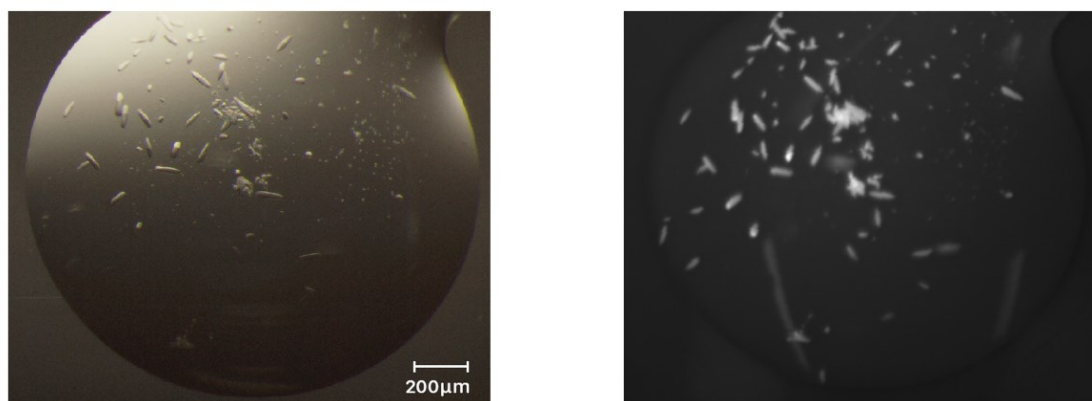
Inhibiční komplexy fúzního proteinu byly krystalizovány v optimalizovaných podmínkách (kap. 5.3.3, str. 46). V případě proteinového komplexu s inhibitorem TO951 byly v podmínce obsahující 200mM citronan sodný, 100mM Tris pH 8,5, 7 % (w/v) PEG 3350 a v podmínce o složení 200mM citronan sodný, 100mM Tris pH 8,5, 7,5 % (w/v) PEG 3350 pozorovány mikrokrytaly. Ve většině sedících kapek byl pozorován precipitát a pro další krystalizační pokusy se pracovalo s proteinem o koncentraci 3,8 mg ml⁻¹.

Na základě identifikované primární krystalizační podmínky komplexu TELSAM-MT14 s TO951 bylo připraveno 14 optimalizovaných roztoků lišících se koncentrací PEGu 3350. Všechny připravené podmínky obsahovaly 200mM citronan sodný a 100mM Tris pH 8,5. Koncentrace PEGu 3350 se pohybovala v rozmezí 2,5 až 9 % (w/v) a v každé podmínce se lišila o 0,5 % (w/v). Inhibiční komplexy TELSAM-MT14 s TO951 a TO993 o koncentraci 3,8 mg ml⁻¹ byly podrobeny krystalizačním experimentům za stejných podmínek, jako tomu bylo v kap. 5.3.3, str. 46.

V podmínce odpovídající 200mM citronanu sodnému, 100mM Tris pH 8,5 a 3% (w/v) PEGu 3350 byly po šesti dnech pozorovány krystaly TELSAM-MT14 v komplexu s TO951, které byly následně použity pro rentgenostrukturní analýzu.

Pro komplex TELSAM-MT14 s inhibitorem TO993 byla identifikována počáteční krystalizační podmínka o složení 200mM citronan sodný, 100mM Tris pH 8,5 a 3,5 % (w/v) PEG 3350. Podmínka byla dále upravena a byly připraveny roztoky, které obsahovaly 100mM Tris pH 8,5 a různé koncentrace soli a precipitantu. Na krystalizační destičky byl vytvořen vertikální koncentrační gradient citronanu sodného. Koncentrace soli se pohybovala v rozmezí 150 až 220 mM a lišila se vždy o 10 mM. Zároveň byl na

krystalizační destičky vytvořen horizontální koncentrační gradient PEGu 3350, jehož koncentrace se pohybovala od 2 do 4 % (w/v). Koncentrace precipitantu se v každém roztoku lišila o 0,5 % (w/v). Krystaly TELSAM-MT14 v komplexu s inhibítorem TO993 (obr. 23) byly získány v podmínce 150mM citronan sodný, 100mM Tris pH 8,5, 3% (w/v) PEG 3350. Krystaly TELSAM-MT14 s inhibitory TO951 a TO993 byly převedeny do matečného roztoku obohaceného glycerolem a následně byly zamrazeny v tekutém dusíku.



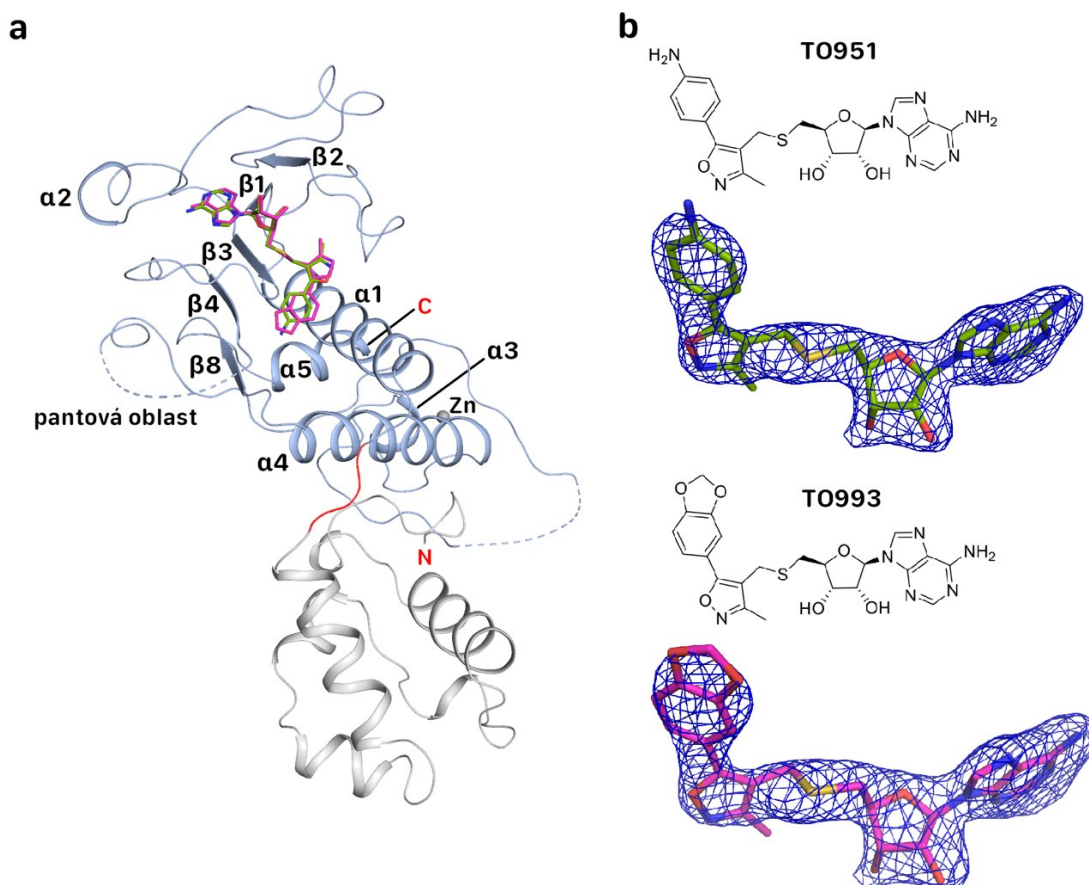
Obr. 23: Proteinové krystaly komplexu TELSAM-MT14 s inhibítorem TO993. TELSAM-MT14 o koncentraci $3,8 \text{ mg ml}^{-1}$ byl krystalizován metodou difuze par v uspořádání sedící kapky při $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Inhibiční komplex byl smíchán v poměru 1 : 1 s krystalizační podmínkou 150mM citronan sodný, 100mM Tris pH 8,5, 3% (w/v) PEG 3350. Snímek vlevo byl pořízený světelným mikroskopem, snímek vpravo UV mikroskopem.

6.4 Strukturní analýza inhibičních komplexů TELSAM-MT14

Cílem této práce bylo strukturně charakterizovat MT14 a objasnit vazebné interakce inhibitorů TO951 a TO993. Jedná se o analoga SAH s modifikovaným aminokyselinovým zbytkem. Krystaly komplexů MT14 byly získány krystalizací MT14 fúzané s krystalizačním chaperonem TELSAMem. Z naměřených difrakčních dat byly vyřešeny krystalové struktury obou inhibičních komplexů. Získané krystaly poskytovaly difrakci, která dosahovala rozlišení 2,3–2,6 Å. Pro pantovou oblast (AMK 402–433), pro AMK 456–466 a pro C-koncové AMK 525–527 nebyly získány mapy elektronové hustoty.

TELSAM-MT14 je tvořen N-koncovým TELSAMem (77 AMK dlouhý) a C-koncovou MT14 (228 AMK dlouhý, AMK 300-527). TELSAM je propojen s MT14 skrze 3 AMK (PPA). Centrální β -skládaný list je tvořen 5 β -vláknky v pořadí 1, 2, 3, 4, 8, přičemž β -vlákno 8 se vyskytuje v antiparalelním uspořádání (obr. 24). β -skládaný list je z jedné strany obklopen čtyřmi α -helixy (1, 3, 4, 5) a zinečnatým iontem, který

je koordinován přes Cys452, Cys477, Cys484 a His487. Z druhé strany je obklopen pantovou oblastí a třemi dlouhými smyčkami. Jedna z těchto smyček obsahuje malý α -helix 2. Inhibitory se nachází na C-terminálním konci β -vláken 2, 1, 3 a vazebné interakce jsou zprostředkovány smyčkami, které se nachází mezi β -vlákem 2 a 1, β -vlákem 2 a α -helixem 2 a mezi β -vlákem 3 a 4 (a také mezi α -helixem 4 a β -vlákem 8 v případě TO951).

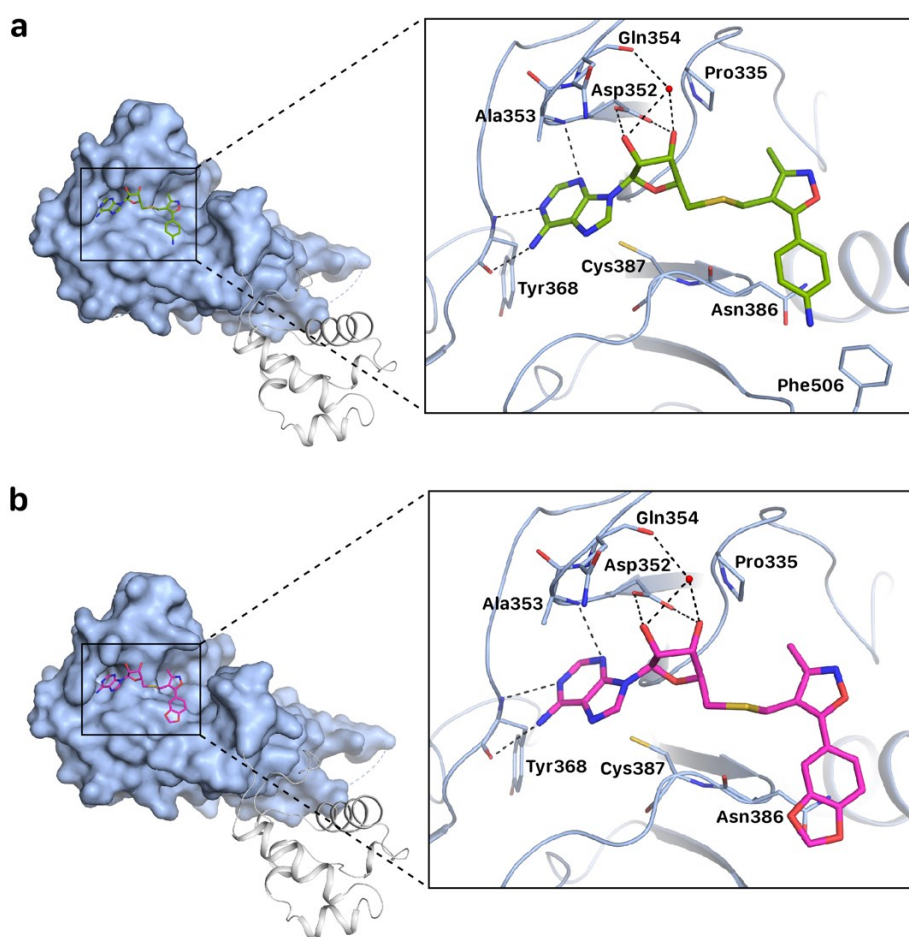


Obr. 24: Krystalová struktura TELSAM-MT14. **a**, Struktura fúzního proteinu (stužkový model) s navázanými inhibitory (tyčinkovým model) TO951 (zeleně) a TO993 (růžově). N-koncový TELSAM (šedě) je propojen přes tři aminokyseliny (PPA, červeně) s C-koncovou methyltransferasovou doménou nsp14 (světle modře). **b**, Struktura ligandů se znázorněnou mapou elektronové hustoty. Jednotlivé atomy ligandů jsou barevně rozlišeny (uhlík zeleně/růžově, kyslík červeně, dusík modře, sira žlutě).

Purinová báze (adenin) inhibitorů je umístěna v žlábků tvořeného postranními řetězci Ala353, Phe367, Tyr368, Cys387 a Val389. Poloha adeninu v žlábků je dána thiol- π interakcí s Cys387, hydrofobními interakcemi s Ala353, Val389, Phe367 a vodíkovými vazbami. Atomy adeninu v pozici N1 a N6 tvoří vodíkové vazby s aminoskupinou a karboxylovou skupinou hlavního řetězce Tyr368 (obr. 25a, b, str. 62). Podobně tomu je i v případě atomu v poloze N3, který interaguje s Ala353 skrze vodíkovou vazbu.

Ribosa je stabilizována vodíkovými vazbami tvořenými mezi hydroxylovými skupinami ribosy a Asp352. Dále také interaguje s Gln354 skrze vodný můstek.

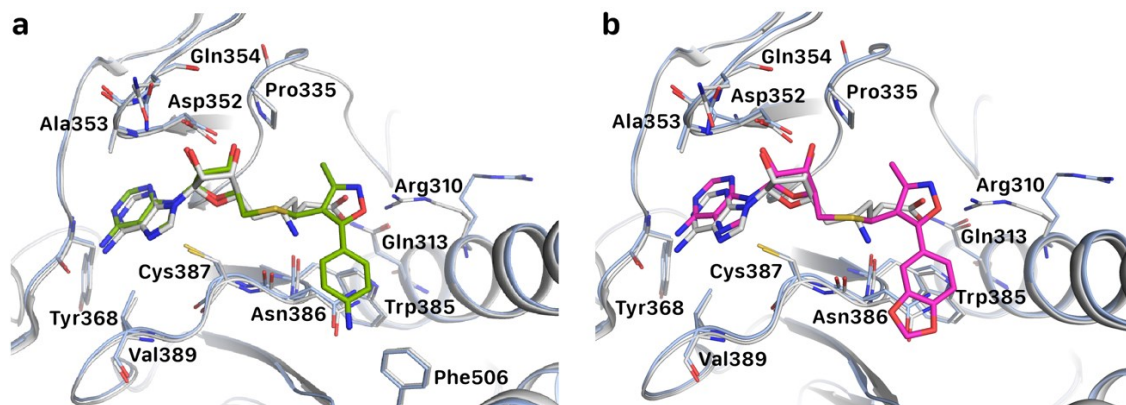
Modifikované aminokyselinové zbytky inhibitorů interagují s MT14 převážně skrze hydrofobní interakce. Isoxazolová část inhibitoru TO951 je stabilizována Pro335, zatímco anilinová je stabilizována Asn386 a Phe506. Anilinový substituent TO951 dále interaguje s Asn386 skrze amin- π interakci. Isoxazolová část ligandu TO993 je stabilizována hydrofobní interakcí s Pro335, zatímco benzimidazolová část substituentu je stabilizována hydrofobními interakcemi s Asn386. Benzen benzimidazolu dále interaguje s Asn386 skrze amin- π interakci.



Obr. 25: Krystalová struktura TELSAM-MT14 v komplexu s inhibitory TO951 a TO993. Methyltransferasová doména nsp14 je zobrazena povrchovým modelem (světle modře), TELSAM stužkovým modelem (šedá). Pohled do vazebného místa MT14 s navázaným inhibitorem (tyčinkový model): **a**, TO951 (zeleně), **b**, TO993 (růžově). Aminokyselinové zbytky jsou znázorněny tyčinkovým modelem. Vodíkové interakce jsou znázorněny přerušovanými čarami (černě). Molekula vody je zobrazena jako červená koule. Jednotlivé atomy ligandů jsou barevně rozlišeny (uhlík zeleně/růžově/světle modře, kyslík červeně, dusík modře, síra žlutě).

Adenin a ribosa inhibitorů TO951, TO993 a sinefunginu se vážou do vazebného místa MT14 skrze stejné interakce (obr. 26a, b, str. 63). Val389 interaguje s atomem

v pozici N7 adeninu sinefunginu skrze vodný můstek. Aminoskupina sinefunginu, která nahrazuje methylovou skupinu SAM, interaguje s hlavním řetězcem Asn386 skrze vodíkovou vazbu. Druhá aminoskupina sinefunginu vytváří vodné můstky s Gln313 a Trp385. Karboxylová skupina sinefunginu interaguje s Arg310 skrze solný můstek. Tato interakce způsobuje odlišnou konformaci aminokyselinového zbytku Arg310 v porovnání s inhibitory TO951 a TO993, které s Arg310 neinteragují.



Obr. 26: Superpozice krystalové struktury TELSAM-MT14 v komplexu s různými inhibitory.
a, Superpozice methyltransferasové domény nsp14 v komplexu s inhibítoem TO951 (zeleně) a sinefunginem (bíle). **b**, Superpozice methyltransferasové domény nsp14 v komplexu s inhibítoem TO993 (růžově) a sinefunginem (bíle). Struktura MT14 v komplexu s TO951 a TO993 je zobrazena světle modře, struktura methyltransferasové domény nsp14 v komplexu se sinefunginem (7TW9, cit. ⁷¹) je zobrazena bíle. Struktury jsou zobrazeny stužkovým modelem. Ligandy a aminokyselinové zbytky jsou znázorněny tyčinkovým modelem. Jednotlivé atomy ligandů jsou barevně rozlišeny (uhlík zeleně, růžově a bíle, kyslík červeně, dusík modře, síra žlutě).

7 Diskuze

Genom SARS-CoV-2 je na svém 5'-konci chráněn strukturou čepičky, která je nerozeznatelná od eukaryotické mRNA čepičky. Tato modifikace je esenciální nejenom pro stabilitu a účinnou translaci virové mRNA, ale také brání jejímu rozpoznání imunitním systémem hostitele. Účast koronavirových methyltransferas v syntéze mRNA čepičky z nich činí atraktivní cílové molekuly pro vývoj nových inhibitorů.

Diplomová práce se zabývala methyltransferasami SARS-CoV-2, konkrétně MT14 a nsp16, který využívá nsp10 jako kofaktor. Za účelem strukturní analýzy komplexů koronavirových MT s různými ligandy byly proteiny nejprve exprimovány a posléze purifikovány.

I přesto, že předmětem zájmu byl nsp16 a ne jeho kofaktor nsp10, oba proteiny byly purifikovány a podrobeny krystalizačním experimentům ve formě heterodimerů v komplexu s různými ligandy. Nsp16 využívá SAM jako donor methylové skupiny. Vedlejším produktem methylační reakce je SAH. Bylo prokázáno, že SAM vazebné místo nevykazuje žádné konformační změny mezi navázaným SAM, SAH a SIN^{66,83}. Disociace SAM/SAH z vazebného místa je pravděpodobně regulována nsp10, kdy komplex nsp16/10 je schopen vázat substrát a disociace nsp10 umožňuje vyvázání SAM/SAH⁸³. Tento navržený mechanismus je v souladu se zjištěním, že nsp16 neváže SAM, SAH, SIN ani RNA bez přítomnosti nsp10. Interakce nsp10 s nsp16 pravděpodobně stabilizuje SAM vazebné místo a způsobuje prodloužení RNA vazebného žlábků nsp16 (cit. ⁸⁴).

Experimentální část týkající se samotné MT14 zahrnovala přípravu expresního vektoru. Amplifikovaný DNA úsek obsahoval sekvence rozeznávané restrikcími endonukleasami, pomocí kterých bylo následně umožněno vložení genu do plasmidu, který obsahoval klonovací místo. Cílový plasmid dále také obsahoval sekvenci kódující β -laktamasu, díky které byly bakterie transformované tímto plasmidem rezistentní na ampicilin. Pro sekvenaci připravených konstruktů byl zvolen přímý primer pSUMO seq fw a zpětný primer T7terminator. Primer T7terminator byl zvolen z toho důvodu, že se zpětný primer pSUMO seq rev komplementárně vázal i k jiné sekvenci plasmidu (viz obr. 11, str. 49). Plasmidy izolované z klonů 3, 4 a 6 obsahovaly nukleotidovou sekvenci kódující MT14, která se shodovala s navrženou sekvencí. Pro účely exprese MT14 byl zvolen konstrukt izolovaný z třetí kolonie (k3).

Purifikace MT14 probíhala podle purifikačního protokolu nsp16 a nsp10, zatímco purifikace TELSAM-MT14 probíhala podle převzatého protokolu⁷¹.

Rekombinantní proteiny (nsp16, nsp10, MT14, TELSAM-MT14) byly exprimovány ve formě fúzních proteinů. Na N-konci obsahovaly polyhistidinovou kotvu a SUMO protein. Značení polyhistidinovou kotvou sloužilo pro účel snadné purifikace pomocí metaloafinitní chromatografie, během které se využívá interakce imidazolu histidinu s nikelnatými ionty, které jsou imobilizovány na pevném nosiči. Navázané proteiny byly eluovány z nosiče pufrům o vyšší koncentraci imidazolu (300 mM). Imidazol v pufru vytěsňuje proteiny na základě kompetice s imidazoly polyhistidinové kotvy.

Proteiny byly následně štěpeny Ulp1 proteasou a v případě nsp10, nsp16 a MT14 bylo štěpení doprovázeno dialýzou. Nsp16 a nsp10 byly nejprve purifikovány každý zvlášť a vzorky byly spojeny teprve až před gelovou permeační chromatografií. Během dialýzy však docházelo k výrazné precipitaci nsp16. Precipitace byla pravděpodobně způsobena odštěpením SUMO proteinu, který zvyšuje rozpustnost proteinů. Ve snaze zamezit precipitaci nsp16 bylo složení dialyzačního a ekvilibračního pufru (použitého na metaloafinitní chromatografii) upraveno snížením koncentrace chloridu sodného (300 mM). Jelikož i po úpravě složení dialyzačního pufru stále docházelo k precipitaci nsp16, vzorky obsahující nsp10 a nsp16 byly spojeny již po metaloafinitní chromatografii. Precipitace byla posléze pozorována v menší míře. Doposud nevyřešená krystalová struktura samostatného nsp16 naznačuje dynamické chování proteinu v roztoku, které je stabilizováno nsp10 (cit. ⁸⁵).

Vzorky obsahující nsp16/10 a MT14 byly následně zbaveny odštěpeného SUMO proteinu a histidinem značené Ulp1 proteasy metodou reverzní afinitní chromatografie. Průběh purifikace byl analyzován pomocí SDS-PAGE. Odštěpený SUMO protein o velikosti 12,7 kDa se na gelu objevoval v oblasti kolem 18 kDa. Pomalejší migrace je pravděpodobně zapříčiněna vysokým obsahem lysinu, jehož kladný náboj není plně kompenzován nábojem SDS.

Proteiny byly následně purifikovány gelovou permeační chromatografií, pomocí které byly proteinové vzorky zbaveny precipitátů. Komplex nsp16/10 byl zároveň separován od přebývajících nenavázaného nsp10. V případě TELSAM-MT14 nebyla na základě převzatého protokolu⁷¹ provedena reverzní metaloafinitní chromatografie a odštěpený SUMO protein byl separován gelovou permeační chromatografií od TELSAM-MT14 díky rozdílné molekulové hmotnosti. UV detektor byl saturován

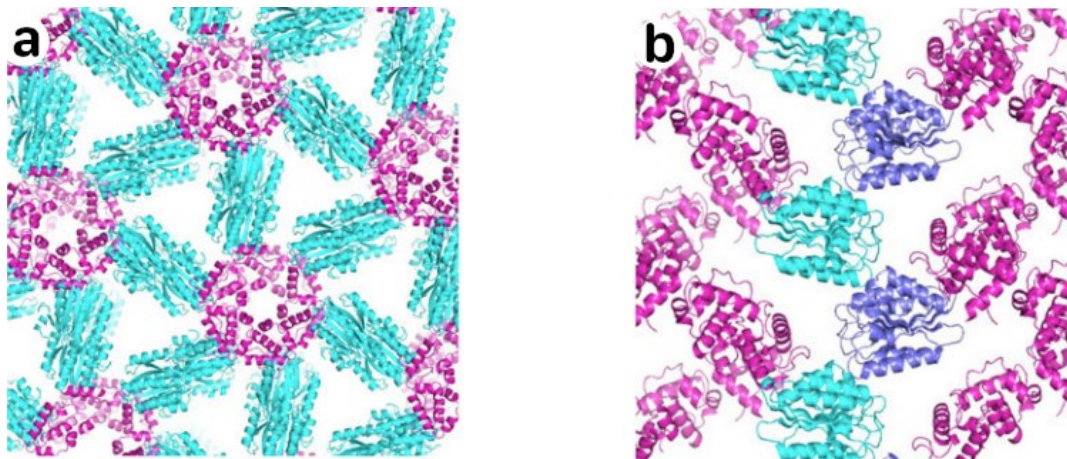
vysokou koncentrací TELSAM-MT14. Ze závislosti absorbance při 254 nm na elučním objemu (obr. 21a, str. 57) a SDS-PAGE analýzy jednotlivých frakcí (obr. 21b, str. 57) lze však pozorovat, že vrchol chromatogramu vznikl částečným spojením tří vrcholů. První menší vrchol odpovídá samotné TELSAM-MT14. Vzhledem k malému rozdílu molekulové hmotnosti mezi Ulp1 proteasou a TELSAM-MT14 a vysoké nanesené koncentraci TELSAM-MT14 byly tyto dva proteiny eluovány společně. Největší chromatografický vrchol byl tvořen převážně TELSAM-MT14 a malým množstvím Ulp1 proteasy. Poslední vrchol byl tvořen převážně odštěpeným SUMO proteinem. Vzorek proteinu byl kontaminován Ulp1 proteasou, avšak koncentrace Ulp1 proteasy v porovnání s TELSAM-MT14 byla malá. Jelikož se posléze podařilo získat krystaly inhibičních komplexů TELSAM-MT14, nebylo třeba purifikační protokol upravovat a zavádět reverzní chelatační chromatografii za účelem odstranění Ulp1 proteasy a SUMO proteinu.

Purifikované rekombinantní proteiny byly zakoncentrovány na $3,5 \text{ mg ml}^{-1}$ (nsp16/10), 3 mg ml^{-1} (MT14) a $4,8 \text{ mg ml}^{-1}$ (TELSAM-MT14) a podrobeny krystalizaci.

Heterodimer nsp16/10 byl krystalizován v komplexu se sinefunginem. Získané krystaly byly následně namáčeny v roztoku obsahující ligand TO507. Dalšího dne již nebyly v kapce pozorovány žádné krystaly, došlo k jejich rozpuštění. Protokol pro namáčení krystalů nemohl být optimalizován, jelikož se posléze nepodařilo získat další krystaly nsp16/10 v komplexu se sinefunginem vhodné morfologie pro sběr difrakčních dat.

Primární krystalizační podmínka pro samostatnou MT14 v komplexu s různými ligandy nebyla identifikována. Přítomnost flexibilní pantové oblasti mohla bránit pravidelnému uspořádání proteinu v krystalové mřížce.

V případě TELSAM-MT14 bylo využito krystalizačního chaperonu TELSAM, který vytváří šestičetnou helikální strukturu (obr. 27, str. 68). Krátký flexibilní peptidový řetězec, tzv. „linker“ (v našem případě PPA), který propojuje TELSAM s cílovým proteinem, umožňuje cílovému proteinu najít vhodné prostorové uspořádání vůči krystalizačnímu chaperonu TELSAM. Helikální struktury TELSAMu jsou zároveň schopny přizpůsobovat vzestup helixu, čímž napomáhají cílovým proteinům vytvářet účinné krystalové kontakty mezi sebou⁸⁰.



Obr. 27: TELSAM fúzaný s A3 doménou Von Willebrandova faktoru (vWa). **a**, Pohled ze shora na krystalovou mřížku TELSAM-vWa. TELSAM (růžově) a vWa (modře) jsou znázorněny stužkovým modelem. **b**, Pohled z boku na krystalovou mřížku TELSAM-vWa zobrazující dvě TELSAM helikální struktury (růžově) a vWa (modře a fialově)⁸⁰.

Krystaly byly získané v krystalizačních podmínkách, které se vyznačovaly nízkou koncentrací PEGu 3350 (3 a 3,5 % (w/v)) a 100mM Tris pH 8,5.

Krystalová struktura MT14 neobsahuje typický „Rossmann-like“ záhyb, který se běžně vyskytuje u SAM-MTas typu I. Centrální skládaný list MT14 je tvořen 5 skládanými listy namísto 7 a neobsahuje β - α - β uspořádání. Struktura nsp14 se vyznačuje přítomností flexibilní pantové oblasti, která je tvořena β -skládaným listem (β -vlákna 5, 6, 7, AMK 402–433) a smyčkou (AMK 288–299). β -skládaný list je součástí methyltransferasové domény a interaguje s exonukleasovou doménou. Ve vyřešené krystalové struktuře byla pantová oblast neuspořádaná. Interakce methyltransferasové domény s exonukleasovou doménou pravděpodobně stabilizuje pantovou oblast a je potřebná pro její správné prostorové uspořádání. Flexibilní smyčka se nachází na samém začátku MT14 a nebyla součástí použitého (a převzatého⁷¹) konstruktu. Konstrukt použitý pro krystalizaci samostatné MT14 naopak tuto flexibilní smyčku obsahoval a ta mohla bránit krystalizaci proteinu.

Adenosinová část inhibitorů TO951 a TO993 se váže do vazebného místa MT14 převážně pomocí vodíkových vazeb, zatímco modifikované aminokyselinové zbytky inhibitorů interagují s MT14 převážně skrze hydrofobní interakce. Modifikovaný aminokyselinový zbytek SIN interaguje s MT14 prostřednictvím několika vodných můstků. Struktura TELSAM-MT14 v komplexu se SIN dosahovala vysokého rozlišení 1,41 Å (cit. ⁷¹), při kterém byly ve struktuře patrné molekuly vody. Krystalové struktury TELSAM-MT14 v komplexu s TO951 a TO993 byly vyřešeny s rozlišením 2,3–2,64 Å, při kterém byla ve vazebném místě patrná pouze jedna molekula vody, tudíž

všechny vazebné interakce nemusely být identifikovány. Např. Val389 interaguje s atomem adeninu v pozici N7 sinefunginu skrze vodný můstek. K této interakci bude pravděpodobně docházet i v případě inhibitorů TO951 a TO993.

Inhibitory se v porovnání se SIN vyznačují hydrofobním charakterem, který umožňuje jejich vstup do buněk. Z budoucího hlediska možného využití těchto inhibitorů na poli medicíny je nutné stanovit jejich selektivitu vůči koronavirové methyltransferasové doméně nsp14. Strukturní popis interakce MT14 s inhibitory TO951 a TO993 by mohl sloužit jako podklad pro návrh nových selektivních inhibitorů cílících na S-adenosyl-L-methionin vazebné místo koronavirového nsp14.

8 Závěr

Diplomová práce se zabývala methyltransferasami SARS-CoV-2. Účast koronavirových methyltransferas v syntéze virové mRNA čepičky z nich činí atraktivní cílové molekuly pro vývoj nových antivirotik. Hlavním cílem práce byla charakterizace vazebných interakcí mezi inhibitory a koronavirovými methyltransferasami.

Dílní výsledky diplomové práce jsou:

- Byl připraven rekombinantní plasmid pSUMO nesoucí gen pro MT14.
- Nsp16, nsp10, MT14, TELSAM-MT14 byly exprimovány v bakteriálním expresním systému.
- Rekombinantní proteiny byly izolovány a následně purifikovány metodou metaloafinitní chromatografie a gelovou permeační chromatografií.
- Proteiny byly podrobeny krystalizačním experimentům ve formě komplexů s různými inhibitory.
- Byly identifikovány primární krystalizační podmínky pro komplexy nsp16/10 se SIN a pro TELSAM-M14 v komplexu s TO951 a TO993.
- Krystalizační podmínky TELSAM-MT14 v komplexu s TO951 a TO993 byly úspěšně optimalizovány a byly získány krystaly vhodné pro rentgenostrukturní analýzu.
- Na základě vyřešených krystalových struktur inhibičních komplexů TELSAM-MT14 byly popsány vazebné interakce inhibitorů TO951 a TO993.

Seznam použité literatury

- 1 Gralinski, L. E.; Menachery, V. D.: Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*. **12**:2, 135 (2020).
- 2 Chen, Y.; Guo, D.: Molecular mechanisms of coronavirus RNA capping and methylation. *Viol. Sin.* **31**:1, 3–11 (2016).
- 3 Bobiļeva, O.; Bobrovs, R.; Kaņepe, I.; Patetko, L.; Kalniņš, G.; Šišovs, M.; Bula, A. L.; Griņberga, S.; Boroduškis, M. R.; Ramata-Stunda, A.; Rostoks, N.; Jirgensons, A. Tars, K.; Jaudzems, K.: Potent SARS-CoV-2 mRNA Cap Methyltransferase Inhibitors by Bioisosteric Replacement of Methionine in SAM Cosubstrate. *ACS Med. Chem. Lett.* **12**:7, 1102–1107 (2021).
- 4 Muthukrishnan, S.; Both, G.; Furuichi, Y.; Shatkin, A. J.: 5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation. *Nature*. **255**: 5503, 33–37 (1975).
- 5 Trotman, J. B.; Schoenberg, D. R.: A recap of RNA recapping. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. **10**:1, e1504 (2019).
- 6 Furuichi, Y.; Shatkin, A. J.: Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. *Adv. Virus Res.* **55**, 135–184 (2000).
- 7 Sripathi, C. E.; Groner, Y.; Warner, J. R.: Methylated, blocked 5' termini of yeast mRNA. *J. Biol. Chem.* **251**:10, 2898–2904 (1976).
- 8 Shatkin A. J.: Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell*. **9**:4, 645–653 (1976).
- 9 PerkinElmer Informatics. *Chemdraw*, verze 22.0 [software] (2022). Dostupné z: <<https://perkinelmerinformatics.com>>
- 10 Rasmussen, E. B.; Lis, J. T.: In vivo transcriptional pausing and cap formation on three Drosophila heat shock genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:17, 7923–7927 (1993).
- 11 Ho, C. K.; Sriskanda, V.; McCracken, S.; Bentley, D.; Schwer, B.; Shuman, S.: The guanylyltransferase domain of mammalian mRNA capping enzyme binds to the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **273**:16, 9577–9585 (1998).
- 12 Yamada-Okabe, T.; Doi, R.; Shimmi, O.; Arisawa, M.; Yamada-Okabe, H.: Isolation and characterization of a human cDNA for mRNA 5'-capping enzyme. *Nucleic Acids Res.* **26**:7, 1700–1706 (1998).
- 13 Furuichi, Y.; Muthukrishnan, S.; Tomasz, J.; Shatkin, A. J.: Mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal blocked and methylated sequence, m⁷GpppGmpC. *J. Biol. Chem.* **251**:16, 5043–5053 (1976).
- 14 Shuman S.: RNA capping by HeLa cell RNA guanylyltransferase. Characterization of a covalent protein-guanylate intermediate. *J. Biol. Chem.* **257**:12, 7237–7245 (1982).
- 15 Furuichi, Y.; Shatkin, A. J.: *Caps on eukaryotic mRNAs*. Chichester, John Wiley & Sons, 2014.
- 16 Ensinger, M. J.; Moss, B.: Modification of the 5' terminus of mRNA by an RNA (guanine-7-)-methyltransferase from HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **251**:17, 5283–5291 (1976).
- 17 Bélanger, F.; Stepinski, J.; Darzynkiewicz, E.; Pelletier, J.: Characterization of hMTr1, a human Cap1 2'-O-ribose methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **285**:43, 33037–33044 (2010).
- 18 Langberg, S. R.; Moss, B.: Post-transcriptional modifications of mRNA. Purification and characterization of cap I and cap II RNA (nucleoside-2'-)-methyltransferases from HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **256**:19, 10054–10060 (1981).

- 19 Haline-Vaz, T.; Silva, T. C.; Zanchin, N. I.: The human interferon-regulated ISG95 protein interacts with RNA polymerase II and shows methyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**:4, 719–724 (2008).
- 20 Werner, M.; Purta, E.; Kaminska, K. H.; Cymerman, I. A.; Campbell, D. A.; Mittra, B.; Zamudio, J. R.; Sturm, N. R.; Jaworski, J.; Bujnicki, J. M.: 2'-O-ribose methylation of cap2 in human: function and evolution in a horizontally mobile family. *Nucleic Acids Res.* **39**:11, 4756–4768 (2011).
- 21 Kuge, H.; Brownlee, G. G.; Gershon, P. D.; Richter, J. D.: Cap ribose methylation of c-mos mRNA stimulates translation and oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res.* **26**:13, 3208–3214 (1998).
- 22 Daffis, S.; Szretter, K. J.; Schriewer, J.; Li, J.; Youn, S.; Errett, J.; Lin, T. Y.; Schneller, S.; Zust, R.; Dong, H.; Thiel, V.; Sen, G. C.; Fensterl, V.; Klimstra, W. B.; Pierson, T. C.; Buller, R. M.; Gale, M., Jr; Shi, P. Y.; Diamond, M. S.: 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature.* **468**:7322, 452–456 (2010).
- 23 Furuichi, Y.; LaFiandra, A.; Shatkin, A. J.: 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature*, **266**:5599, 235-239 (1977).
- 24 Shimotohno, K.; Kodama, Y.; Hashimoto, J.; Miura, K. I.: Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**:7, 2734–2738 (1977).
- 25 Galloway, A.; Cowling, V. H.: mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. *Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul Mech.* **1862**:3, 270–279 (2019).
- 26 Ghosh, A.; Lima, C. D.: Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* **1**:1, 152–172 (2010).
- 27 Lewis, J. D.; Izaurrealde, E.: The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur. J. Biochem.* **247**:2, 461–469 (1997).
- 28 Shatkin A. J.: mRNA cap binding proteins: essential factors for initiating translation. *Cell.* **40**:2, 223–224 (1985).
- 29 Uehata, T.; Takeuchi, O.: RNA Recognition and Immunity-Innate Immune Sensing and Its Posttranscriptional Regulation Mechanisms. *Cells*, **9**:7, 1701 (2020).
- 30 Kell, A. M.; Gale, M., Jr: RIG-I in RNA virus recognition. *Virology.* **479**, 110–121 (2015).
- 31 Kato, H.; Takeuchi, O.; Mikamo-Satoh, E.; Hirai, R.; Kawai, T.; Matsushita, K.; Hiiragi, A.; Dermody, T. S.; Fujita, T.; Akira, S.: Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* **205**:7, 1601–1610 (2008).
- 32 Ramanathan, A.; Robb, G. B.; Chan, S. H.: mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.* **44**:16, 7511–7526 (2016).
- 33 Jiang, F.; Ramanathan, A.; Miller, M. T.; Tang, G. Q.; Gale, M., Jr; Patel, S. S.; Marcotrigiano, J.: Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature.* **479**:7373, 423–427 (2011).
- 34 Züst, R.; Cervantes-Barragan, L.; Habjan, M.; Maier, R.; Neuman, B. W.; Ziebuhr, J.; Szretter, K. J.; Baker, S. C.; Barchet, W.; Diamond, M. S.; Siddell, S. G.; Ludewig, B.; Thiel, V.: Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.* **12**:2, 137–143 (2011).

- 35 Vladimer, G. I.; Górna, M. W.; Superti-Furga, G.: IFITs: Emerging Roles as Key Anti-Viral Proteins. *Front. Immunol.* **5**, 94 (2014).
- 36 Diamond M. S.: IFIT1: A dual sensor and effector molecule that detects non-2'-O methylated viral RNA and inhibits its translation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**:5, 543–550 (2014).
- 37 Fensterl, V.; Sen, G. C.: Interferon-induced Ifit proteins: their role in viral pathogenesis. *J. Virol.* **89**:5, 2462–2468 (2015).
- 38 Nencka, R.; Silhan, J.; Klima, M.; Otava, T.; Kocek, H.; Krafcikova, P.; Boura, E.: Coronaviral RNA-methyltransferases: function, structure and inhibition. *Nucleic Acids Res.* **50**:2, 635–650 (2022).
- 39 De Vlugt, C.; Sikora, D.; Pelchat, M.: Insight into Influenza: A Virus Cap-Snatching. *Viruses.* **10**:11, 641 (2018).
- 40 Decroly, E.; Ferron, F.; Lescar, J.; Canard, B.: Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**:1, 51–65 (2011).
- 41 Kim, D.; Lee, J. Y.; Yang, J. S.; Kim, J. W.; Kim, V. N.; Chang, H.: The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell.* **181**:4, 914–921 (2020).
- 42 Lehmann, K. C.; Gulyaeva, A.; Zevenhoven-Dobbe, J. C.; Janssen, G. M.; Ruben, M.; Overkleeft, H. S.; van Veelen, P. A.; Samborskiy, D. V.; Kravchenko, A. A.; Leontovich, A. M.; Sidorov, I. A.; Snijder, E. J.; Posthuma, C. C.; Gorbalenya, A. E.: Discovery of an essential nucleotidylating activity associated with a newly delineated conserved domain in the RNA polymerase-containing protein of all nidoviruses. *Nucleic Acids Res.* **43**:17, 8416–8434 (2015).
- 43 Park, G. J.; Osinski, A.; Hernandez, G.; Eitson, J. L.; Majumdar, A.; Tonelli, M.; Henzler-Wildman, K.; Pawłowski, K.; Chen, Z.; Li, Y.; Schoggins, J. W.; Tagliabracchi, V. S.: The mechanism of RNA capping by SARS-CoV-2. *Nature.* **609**, 793–800 (2022).
- 44 Ivanov, K. A.; Ziebuhr, J.: Human coronavirus 229E nonstructural protein 13: characterization of duplex-unwinding, nucleoside triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities. *J. Virol.* **78**:14, 7833–7838 (2004).
- 45 Yadav, R.; Chaudhary, J. K.; Jain, N.; Chaudhary, P. K.; Khanra, S.; Dhamija, P.; Sharma, A.; Kumar, A.; Handu, S.: Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells.* **10**:4, 821 (2021).
- 46 Malone, B.; Urakova, N.; Snijder, E. J.; Campbell, E. A.: Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**:1, 21–39 (2022).
- 47 Yan, L.; Ge, J.; Zheng, L.; Zhang, Y.; Gao, Y.; Wang, T.; Huang, Y.; Yang, Y.; Gao, S.; Li, M.; Liu, Z.; Wang, H.; Li, Y.; Chen, Y.; Guddat, L. W.; Wang, Q.; Rao, Z.; Lou, Z.: Cryo-EM Structure of an Extended SARS-CoV-2 Replication and Transcription Complex Reveals an Intermediate State in Cap Synthesis. *Cell.* **184**:1, 184–193 (2021).
- 48 Hartenian, E.; Nandakumar, D.; Lari, A.; Ly, M.; Tucker, J. M.; Glaunsinger, B. A.: The molecular virology of coronaviruses. *J. Biol. Chem.* **295**:37, 12910–12934 (2020).
- 49 Chen, Y.; Cai, H.; Pan, J.; Xiang, N.; Tien, P.; Ahola, T.; Guo, D.: Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**:9, 3484–3489 (2009).
- 50 Bouvet, M.; Debarnot, C.; Imbert, I.; Selisko, B.; Snijder, E. J.; Canard, B.; Decroly, E.: In vitro reconstitution of SARS-coronavirus mRNA cap methylation. *PLoS Pathog.* **6**:4, e1003549 (2010).

- 51 Benoni, R.; Krafcikova, P.; Baranowski, M. R.; Kowalska, J.; Boura, E.; Cahová, H.: Substrate Specificity of SARS-CoV-2 Nsp10-Nsp16 Methyltransferase. *Viruses*. **13**:9, 1722 (2021).
- 52 Martin, J. L.; McMillan, F. M.: SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**:6, 783–793 (2002).
- 53 Byszewska, M.; Śmietański, M.; Purta, E.; Bujnicki, J. M.: RNA methyltransferases involved in 5' cap biosynthesis. *RNA Biol.* **11**:12, 1597–1607 (2014).
- 54 Sun Q.; Huang M.; Wei Y.: Diversity of the reaction mechanisms of SAM-dependent enzymes. *Acta Pharm. Sin. B.* **11**:3, 632–650 (2021).
- 55 Cheng X.; Blumenthal R. M.: *S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions*. Singapore, World Scientific Publishing, 1999.
- 56 Gana, R.; Rao, S.; Huang, H.; Wu, C.; Vasudevan, S.: Structural and functional studies of S-adenosyl-L-methionine binding proteins: a ligand-centric approach. *BMC Struct. Biol.* **13**, 6 (2013).
- 57 Minskaia, E.; Hertzog, T.; Gorbalenya, A. E.; Campanacci, V.; Cambillau, C.; Canard, B.; Ziebuhr, J.: Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:13, 5108–5113 (2006).
- 58 Ferron, F.; Subissi, L.; Silveira De Morais, A. T.; Le, N. T. T.; Sevajol, M.; Gluais, L.; Decroly, E.; Vonrhein, C.; Bricogne, G.; Canard, B.; Imbert, I.: Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**:2, 162–171 (2018).
- 69 Moeller, N. H.; Shi, K.; Demir, Ö.; Belica, C.; Banerjee, S.; Yin, L.; Durfee, C.; Amaro, R. E.; Aihara, H.: Structure and dynamics of SARS-CoV-2 proofreading exoribonuclease ExoN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **119**:9, e2106379119 (2022).
- 60 Bouvet, M.; Imbert, I.; Subissi, L.; Gluais, L.; Canard, B.; Decroly, E.: RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**:24, 9372–9377 (2012).
- 61 Ma, Y.; Wu, L.; Shaw, N.; Gao, Y.; Wang, J.; Sun, Y.; Lou, Z.; Yan, L.; Zhang, R.; Rao, Z.: Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**:30, 9436–9441 (2015).
- 62 Ogando, N. S.; El Kazzi, P.; Zevenhoven-Dobbe, J. C.; Bontes, B. W.; Decombe, A.; Posthuma, C. C.; Thiel, V.; Canard, B.; Ferron, F.; Decroly, E.; Snijder, E. J.: Structure-function analysis of the nsp14 N7-guanine methyltransferase reveals an essential role in *Betacoronavirus* replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**:49, e2108709118 (2021).
- 63 Chen, Y.; Tao, J.; Sun, Y.; Wu, A.; Su, C.; Gao, G.; Cai, H.; Qiu, S.; Wu, Y.; Ahola, T.; Guo, D.: Structure-function analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA cap guanine-N7-methyltransferase. *J. Virol.* **87**:11, 6296–6305 (2013).
- 64 Rosas-Lemus, M.; Minasov, G.; Shuvalova, L.; Inniss, N. L.; Kiryukhina, O.; Wiersum, G.; Kim, Y.; Jedrzejczak, R.; Maltseva, N. I.; Endres, M.; Jaroszewski, L.; Godzik, A.; Joachimiak, A.; Satchell, K. J. F.: The crystal structure of nsp10-nsp16 heterodimer from SARS-CoV-2 in complex with S-adenosylmethionine. *BioRxiv*. 2020.04.17.047498, (2020).
- 65 Rosas-Lemus, M.; Minasov, G.; Shuvalova, L.; Inniss, N. L.; Kiryukhina, O.; Brunzelle, J.; Satchell, K. J. F.: High-resolution structures of the SARS-CoV-2 2'-O-methyltransferase reveal strategies for structure-based inhibitor design. *Sci. Signal.* **13**:651, eabe1202 (2020).

- 66 Krafcikova, P.; Silhan, J.; Nencka, R.; Boura, E.: Structural analysis of the SARS-CoV-2 methyltransferase complex involved in RNA cap creation bound to sinefungin. *Nat. Commun.* **11**:1, 3717 (2020).
- 67 Viswanathan, T.; Misra, A.; Chan, S. H.; Qi, S.; Dai, N.; Arya, S.; Martinez-Sobrido, L.; Gupta, Y. K.: A metal ion orients SARS-CoV-2 mRNA to ensure accurate 2'-O methylation of its first nucleotide. *Nat. Commun.* **12**:1, 3287 (2021).
- 68 Hamil, R. L.; Hoehn, M. M.: A9145, a new adenine-containing antifungal antibiotic. I. Discovery and isolation. *J. Antibiot.* **26**:8, 463–465 (1973).
- 69 Aouadi, W.; Blanjoie, A.; Vasseur, J. J.; Debart, F.; Canard, B.; Decroly, E.: Binding of the Methyl Donor S-Adenosyl-L-Methionine to Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus 2'-O-Methyltransferase nsp16 Promotes Recruitment of the Allosteric Activator nsp10. *J. Virol.* **91**:5, e02217-16 (2017).
- 70 Smith, E.; Zhou, W.; Shindiapina, P.; Sif, S.; Li, C.; Baiocchi, R. A.: Recent advances in targeting protein arginine methyltransferase enzymes in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets.* **22**:6, 527–545 (2018).
- 71 Kottur, J.; Rechkoblit, O.; Quintana-Feliciano, R.; Sciaky, D.; Aggarwal, A. K.: High-resolution structures of the SARS-CoV-2 N7-methyltransferase inform therapeutic development. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **29**, 850–853 (2022).
- 72 QIAquick Spin Handbook - QIAGEN [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.qiagen.com/fr/resources/resourcedetail?id=95f10677-aa29-453d-a222-0e19f01ebe17&lang=en>> [cit. 28. 11. 2022].
- 73 QIAprep Miniprep Handbook - QIAGEN [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=22df6325-9579-4aa0-819c-788f73d81a09&lang=en>> [cit. 28. 11. 2022].
- 74 Kabsch, W.: XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D., Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
- 75 Afonine, P. V.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Mustyakimov, M.; Terwilliger, T. C.; Urzhumtsev, A.; Zwart, P. H.; Adams, P. D.: Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. Sect. D., Biol. Crystallogr.* **68**, 352–367 (2012).
- 76 Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K.: Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D., Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
- 77 Schrödinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, verze 2.5.4 [software] (2022). Dostupné z: <<http://www.pymol.org/pymol>>
- 78 GSL Biotech, LLC. Snapgene, verze 6.2 [software] (2022). Dostupné z: <<http://www.snapgene.com>>
- 79 Butt, T. R.; Edavettal, S. C.; Hall, J. P.; Mattern, M. R.: SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* **43**:1, 1–9 (2005).
- 80 Nawarathnage, S.; Soleimani, S.; Mathis, M. H.; Bezzant, B. D.; Ramírez, D. T.; Gajjar, P.; Bunn, D. R.; Stewart, C.; Smith, T.; Pedroza Romo, M. J.; Brown, S.; Doukov, T.; Moody, J. D.: Crystals of TELSAM-target protein fusions that exhibit minimal crystal contacts and lack direct inter-TELSAM contacts. *Open Biol.* **12**:3, 210271 (2022).
- 81 Studier F. W.: Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**:1, 207–234 (2005).

- 82 Hanif, M. U.; Yaseen, A.; Gul, R.; Mirza, M. U.; Nawaz, M. H.; Ahmed, S. S.; Aziz, S.; Chaudhary, S.; Khan, A. A.; Shoaib, M.: Small Ubiquitin-Like Modifier Protein 3 Enhances the Solubilization of Human Bone Morphogenetic Protein 2 in *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **186**:1, 256–270 (2018).
- 83 Wilamowski, M.; Sherrell, D. A.; Minasov, G.; Kim, Y.; Shuvalova, L.; Lavens, A.; Chard, R.; Maltseva, N.; Jedrzejczak, R.; Rosas-Lemus, M.; Saint, N.; Foster, I. T.; Michalska, K.; Satchell, K. J. F.; Joachimiak, A.: 2'-O methylation of RNA cap in SARS-CoV-2 captured by serial crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**:21, e2100170118 (2021).
- 84 Chen, Y.; Su, C.; Ke, M.; Jin, X.; Xu, L.; Zhang, Z.; Wu, A.; Sun, Y.; Yang, Z.; Tien, P.; Ahola, T.; Liang, Y.; Liu, X.; Guo, D.: Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex. *PLoS Pathog.* **7**:10, e1002294 (2011).
- 85 Vithani, N.; Ward, M. D.; Zimmerman, M. I.; Novak, B.; Borowsky, J. H.; Singh, S.; Bowman, G. R.: SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus antiviral potential. *Biophys. J.* **120**:14, 2880–2889 (2021).