

METODY

Exprese a purifikace proteinů flavivirových proteinů

Umělé geny flavivirových proteinů NS5 byly získány od společnosti EVAg (z angl. European Virus Archive goes Global). Sekvence kódující RdRp domény byly zaklonovány do vektoru pET28b pomocí Gibsonovi reakce. Výsledné proteiny nesly na N-konci histidinovou kotvu (6×His), za kterou následovalo štěpné místo pro TEV proteázu. Sekvence kódující MTázovou doménu byla zaklonována pomocí restriční klonování (štěpná místa BamHI a XhoI) do vektoru pSUMO, který byl předem připraven u nás v laboratoři. Výsledný protein obsahoval His-SUMO (8×His-SUMO) kotvu na N-konci.

Všechny proteiny byly exprimovány a purifikovány s využitím standardních protokolů pro virové enzymy v systému *E. coli*. Geny byly exprimovány v kmeni *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) RIL v LB médiu doplněném o 50 μM ZnSO₄ a 1 mM MgCl₂. Bakterie byly sklizeny centrifugací, resuspendovány a poté sonikovány v lyzačním pufru (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM imidazol, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol, 3 mM β-merkaptoethanol). Po lýze buněk byl supernatant navázán na Ni-NTA agarózové kuličky (Macherey-Nagel), promyt lyzačním pufrům se zvýšenou koncentrací NaCl na 1 M a protein byl následně eluován pomocí lyzačního pufru obsahující 300 mM imidazol.

U všech RdRp a NS5 proteinů byla histidinová kotva štěpena pomocí TEV proteázy v dialyzačním střevo proti lyzačnímu pufru při 4 °C přes noc a proteiny byly dále purifikovány pomocí afinitní chromatografie za využití kolon HiTrap Heparin HP, HiTrap Q HP nebo HiTrap SP HP (Cytiva). Následovala gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 16/600 (GE Life Science) v pufru o složení: 20 mM CHES pH 9,5, 800 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol a 1 mM TCEP.

V případě MTáz byla SUMO kotva odštěpena pomocí Ulp1 proteázy za dialýzy proti lyzačnímu pufru při 4 °C přes noc. Odštěpená kotva byla odstraněna pomocí Ni-NTA agarózových kuliček a proteiny byly dále purifikovány pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 75 16/600 (GE Life Sciences) v pufru o složení 25 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 5% glycerol a 1 mM TCEP. Na závěr byly přečištěné proteiny koncentrovány na koncentraci 4 mg/ml v případě RdRp a NS5 proteinů a na 10 mg/ml v případě MTáz a poté zmrazeny při -80 °C a uchovány pro další použití.

Expresa a purifikace proteinů ze SARS-CoV-2

Geny kódující proteiny NSP7, NSP8 a NSP12 ze SARS-CoV-2 byly získány komerčně (Invitrogen). Gen kódující sekvenci proteinu NSP7 byl zaklonován do první pozice pro klonování do upraveného vektoru pRSF-Duet obsahující histidinovou kotvu (6×His) na N-konci, následovanou GB1 solubilizační kotvou, spojovací sekvencí 10 asparaginových zbytků a štěpným místem pro TEV proteázu. Do druhé klonovací pozice byl následně zaklonován gen pro NSP8, který neobsahoval žádnou kotvu. Gen kódující sekvenci proteinu NSP12 byl zaklonován do vektoru pAceBac obsahující histidinovou kotvu na C-konci.

Komplex proteinu NSP7 a NSP8 byl exprimován v kmeni *E. coli* BL21-STAR (DE3) v LB médiu. Bakterie byly sklizeny centrifugací, resuspendovány a poté sonikovány v lyzačním pufru (50 mM HEPES pH 7,5, 20 mM imidazol, 300 mM NaCl, 10 % glycerol, 3mM β-merkapt ethanol). Po centrifugaci byl supernatant navázán na Ni-NTA agarózové kuličky (Macherey-Nagel), promyt lyzačním pufrům se zvýšenou koncentrací NaCl na 1 M a protein byl následně eluován pomocí lyzačního pufru obsahující 300 mM imidazol. 6×His-GB1 kotva byla odštěpena pomocí TEV proteázy a oddělena od proteinu navázáním na Ni-NTA agarózové kuličky za stejných podmínek, jak bylo popsáno výše. Komplex proteinů NSP7/NSP8 byl následně purifikován pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 75 16/600 (GE Life Sciences) v pufru o složení 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 3mM β-merkapt ethanol. Čisté proteiny byly následně zakoncentrovány na koncentraci 5 mg/ml, zmrazeny v kapalném dusíku a uchovány při -80°C k dalšímu použití.

Plazmid s NSP12 byl použit k přípravě rekombinantního bakuloviru, kterým byly infikovány buňky Sf9. Po 68 hodinách byly buňky sklizeny centrifugací, resuspendovány v lyzačním pufru (20 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 3mM MgCl₂, 10% (v/v) glycerol, 3mM β-merkapt ethanol) a sonikovány (Q700 Sonicator, QSonica). Bakteriální lyzát byl následně centrifugován a supernatant byl poté inkubován s Ni-NTA agarózou, promyt lyzačním pufrům a eluován pomocí lyzačního pufru se zvýšenou koncentrací imidazolu (300 mM). Následovala gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 16/600 (GE Healthcare) v pufru (20 mM HEPES pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 % (v/v) glycerol a 3 mM β-merkapt ethanolu). Čistý protein NSP12 byl zakoncentrován na koncentraci 5 mg/ml, poté zmrazen v tekutém dusíku a uložen při -80 °C k dalšímu použití.

Krystalizace a krystalografická analýza

Krystaly Ntaya RdRp a MTázy v komplexu se SAHem rostly 7 dní při 18 °C v uspořádání sedící kapky. Krystalizační směs tedy obsahovala protein a roztok se srážedlem (0,1 M Trizma/Bicin pH 8,5, 0,02 M směs monosacharidů, 10 % (w/v) PEG 4000, 20 % (v/v) glycerol) v poměru 1:1 (200 nl každé). GTP bylo přidáno v koncentraci 10 mM za přítomnosti 1mM Mg²⁺ a směs byla inkubována s krystaly přes noc. Krystaly Ntaya MTázy v komplexu se sinefunginem rostly dva týdny v krystalizační destičce v uspořádání sedící kapky. Roztok obsahoval 4,0 M mravenčan sodný. Krystaly nevyžadovaly kryoprotekci, a tak byly ihned zmrazeny v kapalném dusíku.

Krystaly Ntaya a Zika MTáz použité ke krystalizaci s látkou AT-9010 narostly za 4 dny při 18 °C. Složení roztoku v jamce v případě Ntaya viru bylo 0,2 M trihydrát octanu sodného, 0,1 M HEPES sodný pH 7,5, 25% (w/v) PEG 3350 a v případě Ziky 0,2 M MgCl₂, 0,1 M HEPES pH 7.5, 25% (w/v) PEG 3350. Krystaly byly poté inkubovány s látkou AT-9010 přes noc v přítomnosti 1 mM Mg²⁺. Krystaly byly následně ochráněny proti namrznutí přidáním 20% glycerolu a zamrazeny v tekutém dusíku.

Datasety byly získány buď měřením na domácím zdroji (rotační anoda, Rigaku Micromax-007 HF) nebo na synchrotronu BESSY II V Berlíně. Data byla integrována a škálována pomocí XDS. Problém fází byl řešen pomocí molekulárního nahrazení s využitím struktur Zika MTázy (PDB: 5MRK) a polymerázy viru žluté zimnice (PDB: 6QSN). Počáteční modely byly získány pomocí Phaser programu z balíčku Phenix a dále zpřesňování automaticky pomocí Phenix refine a manuální stavbou modelu v programu Coot. Atomové souřadnice a strukturní faktory byly uloženy v PDB databázi.

Stanovení polymerázové aktivity flavivirových RdRp pomocí detekce prodlužování primeru

Polymerázová aktivita RdRp domén proteinu NS5 byla stanovena v reakci, kdy docházelo k prodlužování fluorescenčně značeného RNA primeru (Cy5 5'-AGAACCUGUUGAACAAAAGC-3') podle templátu (5'-AUUAUUAGCUGCUUUUGU-3'). Reakce byla provedena v reakční směsi obsahující 30 nM protein, 10 nM komplex templát/primer RNA, 10 μM NTP v reakčním pufru (5 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM DTT, 0,5 % Triton X-100, 1% glycerol, 3 mM MnCl₂) v celkovém objemu reakce 20 μl. Reakce byly inkubovány při 33 °C jednu hodinu, následně zastaveny přidáním denaturujícího pufru

obsahujícího 80% formamid a 50mM EDTA. Vzorky byly poté denaturovány při 95 °C 10 minut a produkty byly rozděleny pomocí 20% denaturujícího polyakrylamidového gelu (8 M močovina, 1x TBE, 20% akrylamid (19:1)). Data byla kvantifikována pomocí programu ImageJ (NIH) a byla vyhodnocena v programu GraphPad Prism (Dotmatics). Získaná data byla v grafech proložena sigmoidální křivkou závislosti odpovědi na dávce.

Stanovení polymerázové aktivity proteinů ze SARS-CoV-2 pomocí detekce prodlužování primeru.

Metoda byla provedena stejně jako bylo popsáno výše pro flaviviry s několika obměnami. Byl použit reakční pufr o složení 10 mM Tris pH 8,0, 2 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM β-merkaptoethanol. Celkový objem reakce byl 10 μl a reakční směs obsahovala 10 μM NTP, 0,5 μM komplex primer/templát RNA, 1 μM NSP12 a 3 μM NSP7/NS8. Rovněž se lišila sekvence primeru (HEX-5'-AGAACCUGUUGAACAAAAGC-3') a templátu (5'-AUUAUUAGCUGCUUUUGUUCAACAGGUUCU-3')

Stanovení polymerázové aktivity proteinů ze SARS-CoV-2 pomocí radioaktivního měření detekce prodlužování primeru

Jako primer byla použita RNA P-5'-AGAACCUGUUGAACAAAAGC-3' a jako templát T-5'-U25-GCUUUUGUUCAACAGGUUCU-3' a bylo přidáno 0,01 μCi/μL [α-32P]-ATP. Po inkubaci bylo 5 μl reakce nanášeno na celulózu membránu s aniontovou výměnou (WhatmanTM Grade DE81 DEAE cellulose paper; GE Healthcare) v triplicátech. Membrána byla následně vysušena a 5×promyta roztokem 0,125 mM Na₂HPO₄, vodou a ethanolem a znovu vysušena. Suchý filtrační papír byl následně vložen do vyvolávací kazety s filmem přes noc a umístěn do -80°C. Následně byl film analyzován za pomoci vizualizace fosforu. Destička byla skenována na zařízení Amersham Typhoon 5 Biomolecular Imager (GE Healthcare), produkty byly kvantifikovány pomocí softwaru Image Studio Lite (LI-COR) a data byla zpracována v GraphPad verze 6 (GraphPad Prism verze 6, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Stanovení aktivity flavivirových MTáz

MTázová aktivita byla stanovena kolegyní RNDr. Dominikou Chalupskou Ph.D. Byl použit RNA substrát s m7Gp3A čepičkou sekvenčně odpovídající příslušnému viru. Reakční směs obsahovala 4μM SAM, 4μM RNA s m7Gp3A čepičkou v reakčním pufru (5mM Tris pH 8,0, 1 mM TCEP, 0,1 mg/ml BSA, 0,005% Triton X-100, 1 mM MgCl₂). Reakce byla zahájena

přidáním příslušné MTázy o výsledné koncentraci 0,5 μM v celkovém objemu 6 μl . Reakční směs byla inkubována při 25 °C po dobu 0-100 minut a analyzována pomocí systému Echo spojeného s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem Sciex 6500 s ionizačním zdrojem typu elektrosprej. Aktivita MTáz byla měřena na základě množství reakčního produktu, kterým byl SAH.