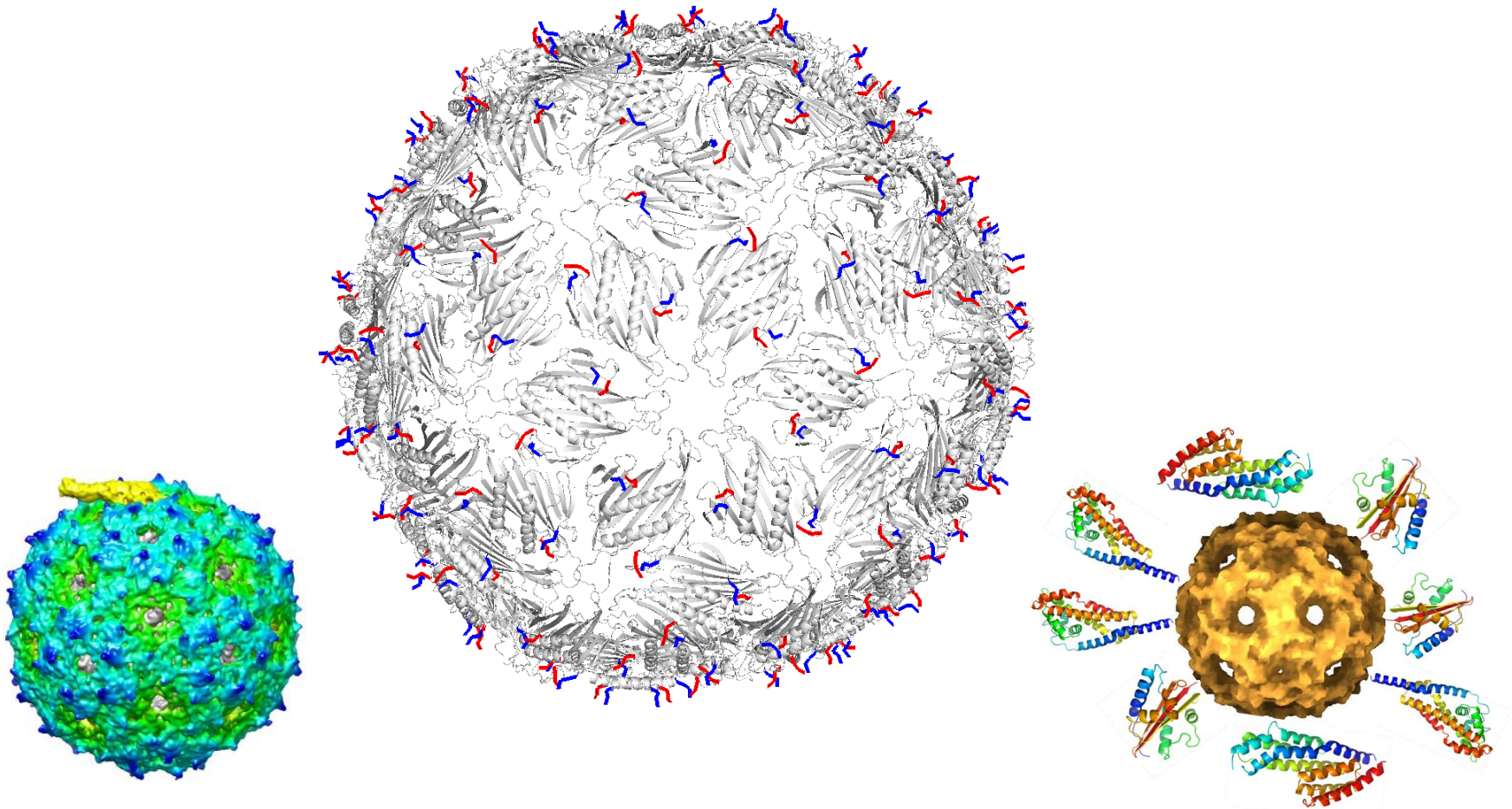
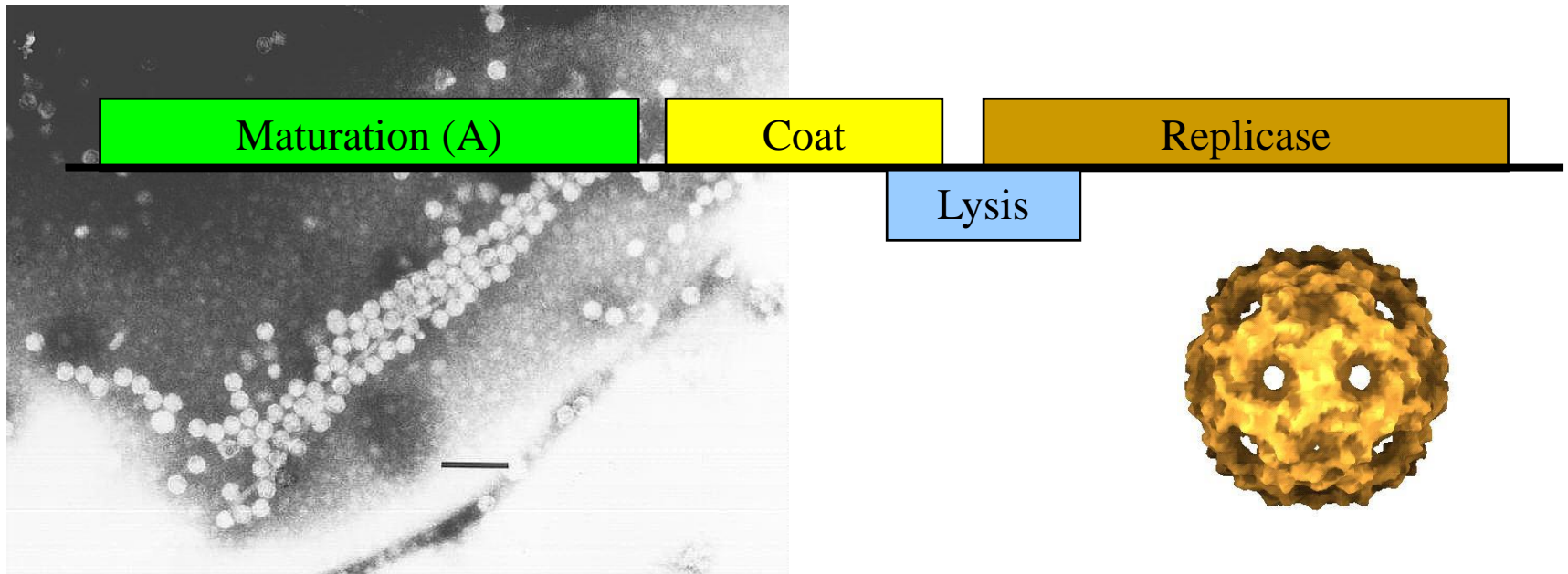


Vienpavediena RNS bakteriofāgu AP205 un MS2 trīsdimensionālās struktūras

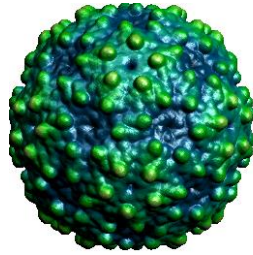


Vienpavediena RNS bakteriofāgi

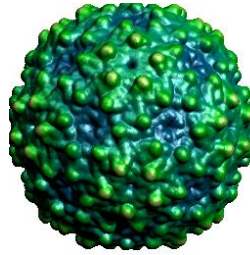
- Vieni no vienkāršākajiem vīrusiem, inficē dažādas baktērijas, absorbējoties uz to pili struktūrām
- Vīrusa daļiņa sastāv no 178 apvalka proteīna monomēriem un minorā A proteīna; ietver 3.5-4kb garu ssRNA genomu, kurš kodē 4 proteīnus
- Tiek lietoti kā vienkārši modeļi dažādu molekulārās bioloģijas problēmu izpētē, kā arī pēdējā laikā – vakcīnu izstrādē
- Mūsu grupa ir devusi nozīmīgu ieguldījumu RNS fāgu izpētē - publicēti 23 raksti (PubMed), deponētas 31 struktūras PDB



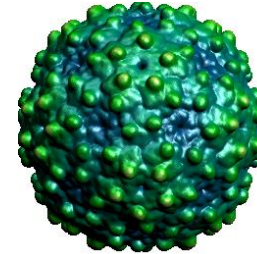
MS2



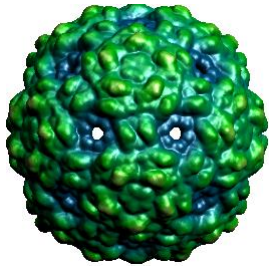
fr



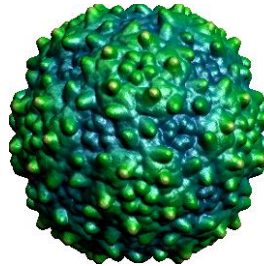
GA



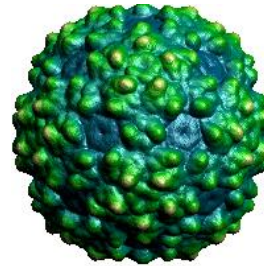
Q β



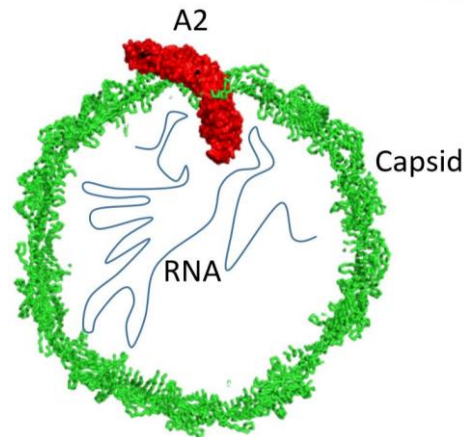
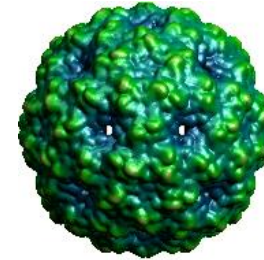
PP7



PRR1



ϕ Cb5



- Līdz šim iegūtajās vīrusu struktūrās ir bijis iespējams saskatīt tikai mažoro apvalka proteīnu – bet ne genomu vai minoros apvalka proteīnus...

Ikosaedrisko vīrusu struktūru pētījumu metodes

- Kristalogrāfija – līdz šim visizplatītākā metode
 - Nepieciešams izaudzēt vīrusu kristālus
 - Principā nav iespējams noteikt asimetrisko elementu (piem. genoma) struktūru
- Krio-EM
 - Pēdējo gadu laikā izšķirtspēja ir līdzīga rentgnstruktūranalīzei
 - Ir iespējams noteikt asimetrisko elementu struktūru
 - Atbilstošs mikroskops maksā 4M EUR...
- Cietās fāzes NMR
 - Metodi pirmo reizi ir izdevies pielietot tieši mūsu bakteriofāga AP205 gadījumā

ARTICLE

Received 8 Feb 2016 | Accepted 11 Jul 2016 | Published 26 Aug 2016

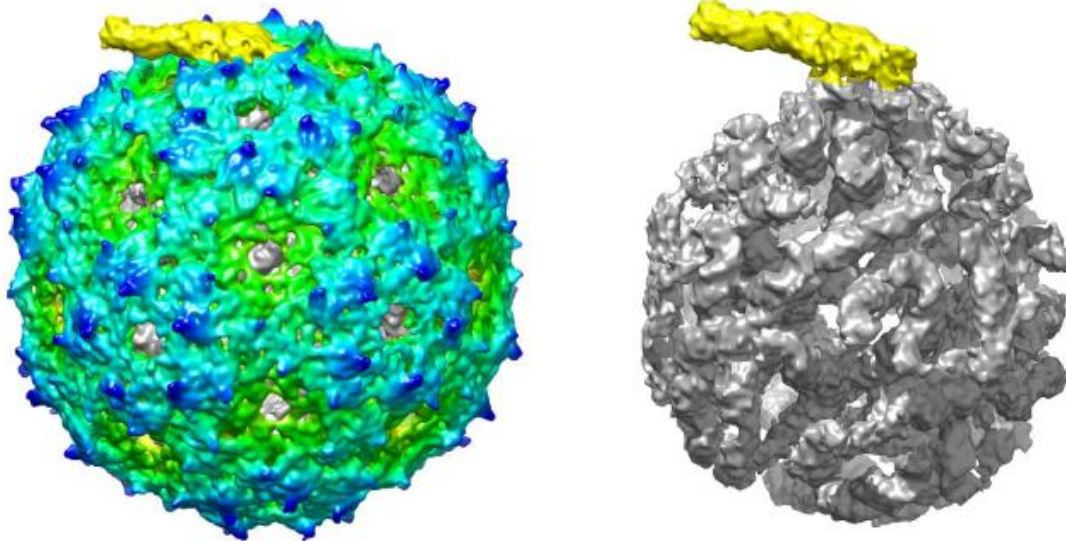
DOI: 10.1038/ncomms12524

OPEN

Asymmetric cryo-EM reconstruction of phage MS2 reveals genome structure *in situ*

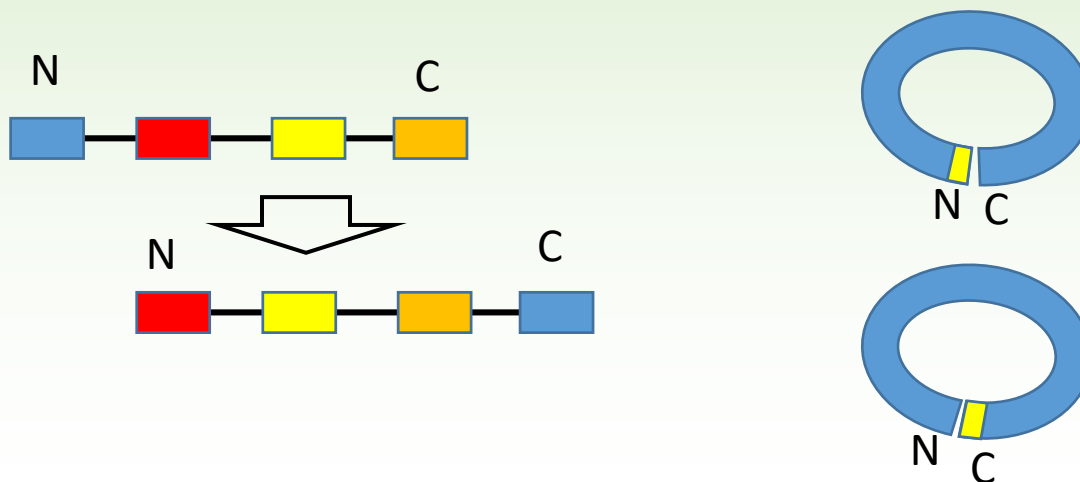
Roman I. Koning^{1,2}, Josue Gomez-Blanco³, Inara Akopjana⁴, Javier Vargas³, Andris Kazaks⁴, Kaspars Tars⁴, José María Carazo³ & Abraham J. Koster^{1,2}

Fāga MS2 asimetriskā struktūra – sadarbībā ar holandiešu un spāņu kolēģiem



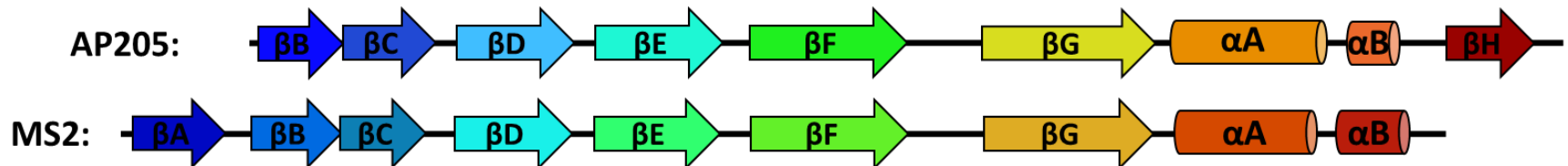
AP205 – proteīnu cirkulārās permutācijas piemērs

- Cirkulārā permutācija – parādība, kad evolūcijas gaitā proteīna N-terminālā daļa migrē uz C-terminālo, vai otrādi
- Visbiežāk novērota daudzdomēnu proteīnos
- Reti sastopama viendomeņa proteīnos un tikai tad, ja N- un C-terminālie gali ir tuvu novietoti viens otram
- AP205 gadījums ir īpašs...
- Pirmās indikācijas bija no ssNMR pētījumiem Lionā



AP205 CP sekvences salīdzinājums ar citiem fāgiem

	β A	β B	β C	β D	β E					
AP2051	ANKPMQ	PITSSTANKI	VWSD	PTRLS	TTFSASLLRQR	----VKVGI	AELN			
ϕ Cb5 1	ALG	DTLTI	TLGGSGGT	AKVLRKIN	GDG--YT	SEYYI	PETS--S	SFRAKVRHTK	ϕ Cb5 49	
Q β 1	AKLET	VTLGNI	GKDGKQ	TLVLNPRGVN	PTNG	VASLSQ	AGAVPALEK	RVTVSVSQ	Q β 54	
PP7 1	SK	TIVL-SV	GE---	ATRTLTEIQSTA	--D	RQIFP	EKVGPLVGRL	RLTASLRQ	PP7 46	
MS2 1	ASNFTQ	FVLV	DNGGTG--	DVTVAPSN	FAN--GV	AEWIS	SN-SRSQAY	KVTC SVRQ	MS2 50	
	β F			β G						
AP205	NVSGQY	---	VSVYKRPAPKPEG	CADA	----	CVIMP	NENQSIRTVIS	GS---	AEN	
ϕ Cb5 50	ESVKPNQVQ	YERHNV	EFTETV	YASGSTP	-----	E	FVRQAYVVIRE	KVGD	VSA	ϕ Cb5 96
Q β 55	PSRNR	---	KNYKVQVKIQNPTAC	TANGS	---	CDP	SVTRQAYADVTR	SFTQYST	DE	Q β 103
PP7 47	NGAK	---	TAYRVNLKLDQADV	DCSTSV	CGELP	KVRYTQV	WSHDVTIVANS	TEA	PP7 97	
MS2 51	SSA	---	QNRKYTIKVEVP	KVATQTV	GG-	VELPVA	AWRSYLN	MELTIP	IFATNS	MS2 99
	α A		α B							
AP205	LATLKAETH		KRNVDTLFA		SGNAGLGFLDP	TAAIVS	SDTTA			
ϕ Cb5 97	TVSDLGEALS		FYL---		NEALY	GWES				
Q β 104	ERAFVRTELA		AALLAS--		PLLIDA	DQLNPAY				
PP7 98	SRKSLYDLTKSLVAT		--		SQVEDLVVN	LVPLGR				
MS2 100	DCELIVKAMQGL		LKDG-N		PIPSAIAA	NSGIY				



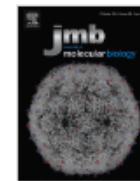
AP205 struktūras noteikšana – 3 metodes 3 valstīs

- Ar kristalogrāfijas palīdzību VLP struktūru iegūt neizdevās, jo kristālu izšķirtspēja bija tikai 20 Å
- Izdevās iegūt mutantu AP205 CP formu, kura veidoja tikai dimērus, bet ne 180-mēru VLP
- AP205 CP dimēriem tika noteikta struktūra ar kristalogrāfijas palīdzību
- Holandē ar krio-EM palīdzību tika noteikta VLP struktūra vidējā izšķirtspējā, kurā tika ievietota mūsu dimēru struktūra
- Francijā ar ssNMR palīdzību tika iegūtas pirmās indikācijas par cirkulāro permutāciju, kā arī izstrādāta metode ssNMR pielietojumam vīrusu struktūru noteikšanai





Journal of Molecular Biology

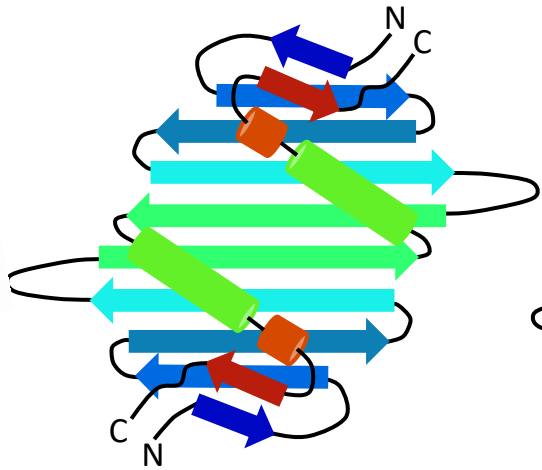
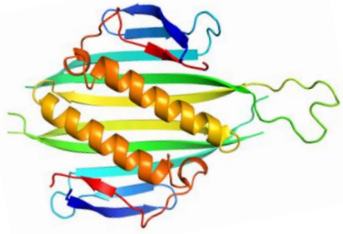
Volume 428, Issue 21, 23 October 2016, Pages 4267–4279



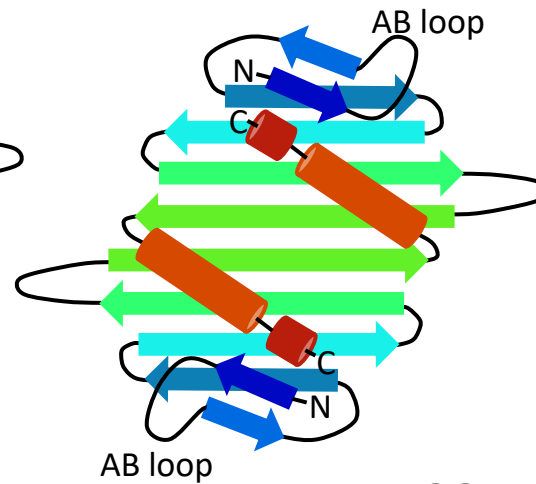
Structure of AP205 Coat Protein Reveals Circular Permutation in ssRNA Bacteriophages

Mihails Shishovs¹, Janis Rumnieks¹, Christoph Diebolder², Kristaps Jaudzems³, Loren B. Andreas³, Jan Stanek³, Andris Kazaks¹, Svetlana Kotelovica¹, Inara Akopjana¹, Guido Pintacuda³, Roman I. Koning^{2, 5}, Kaspars Tars^{1, 4}  

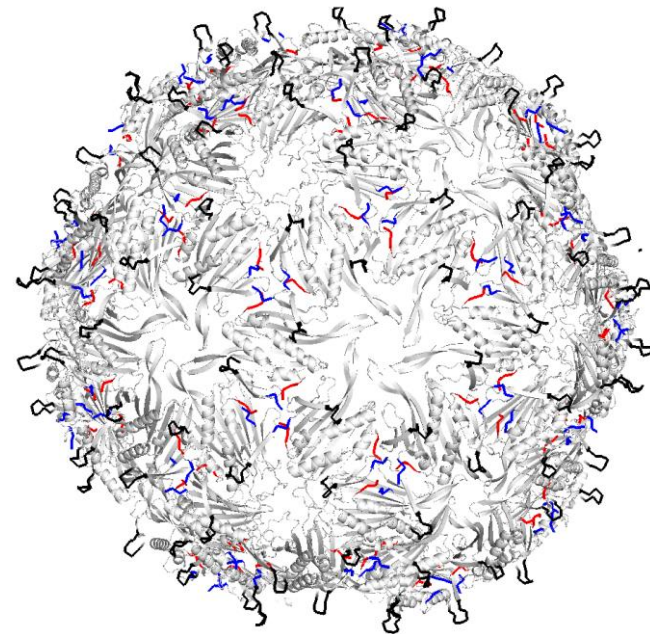
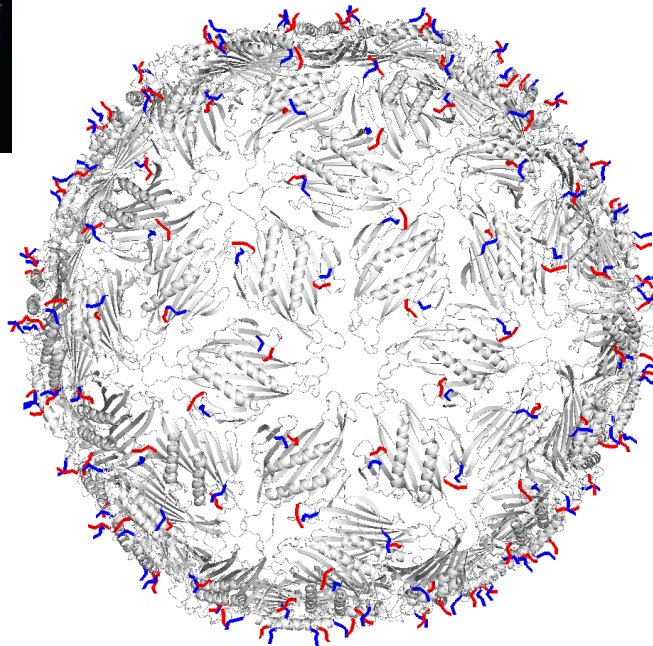
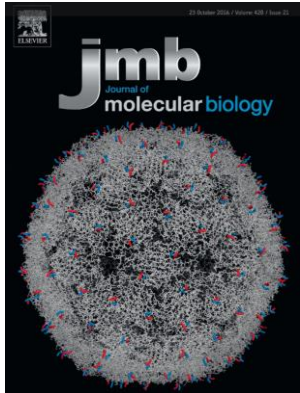
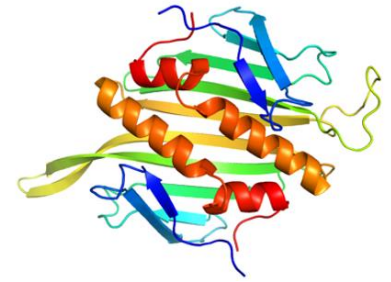
AP205 cirkulārā permutācija



AP205



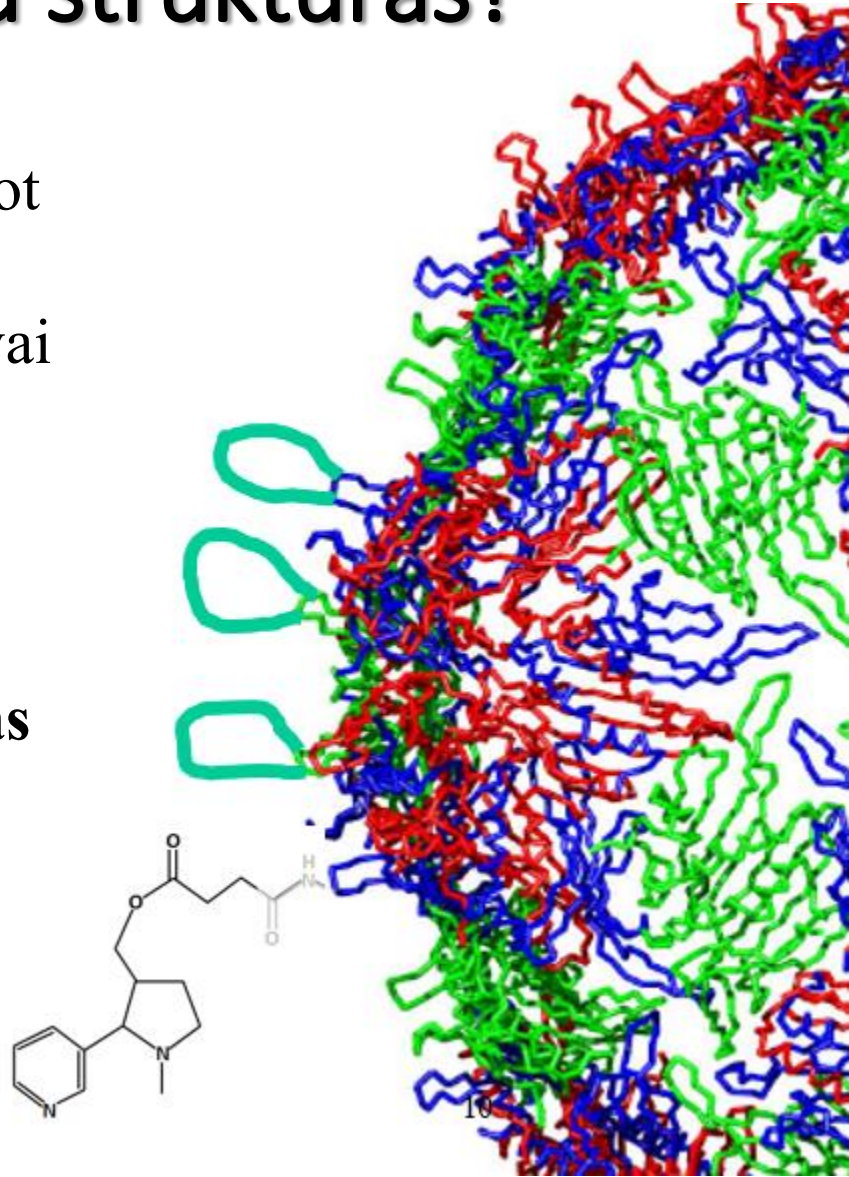
MS2



N- un C- gali
ir novietoti
uz kapsīdas
virsmas!

Kāpēc pētīt fāgu apvalku struktūras?

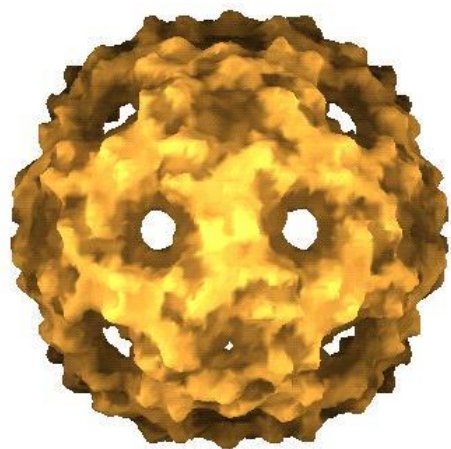
- Modificētus fāgu apvalkus var izmantot vakcīnu izstrādei
- Fāgu apvalkus var modificēt ķīmiski vai ģenētiski
- Fāgu apvalkos var pakot dažādus materiālus – gēnus, proteīnus, nanodaļiņas, u.c.
- **Zinot fāgu apvalku 3D struktūru, tās ir daudz vieglāk modificēt**
- **Dažkārt struktūra pati par sevi var norādīt uz jauniem pielietojumiem**



Fāgu apvalku un citu vīrusveidīgo daļiņu pielietojums vakcīnu izsrādē



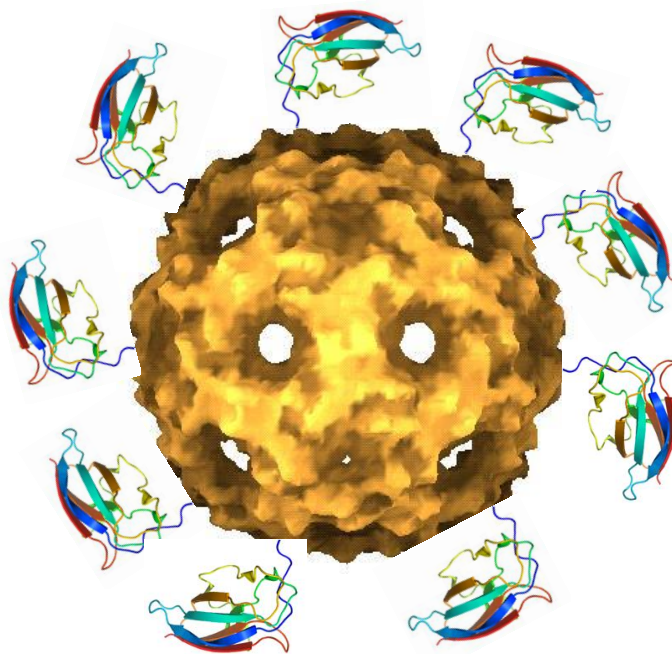
Antigēns



VVD



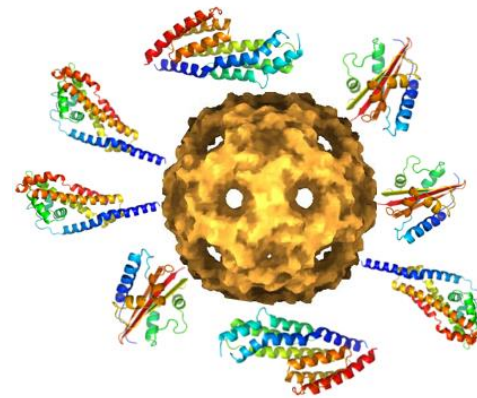
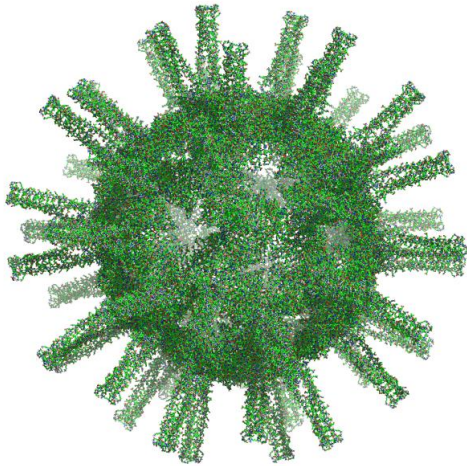
Zema imūnā
atbilde



Augsta
imūnā
atbilde

Šobrīd aktuālie projekti, kuros tiek izmantoti RNS bakteriofāgu apvalki

- Universālas pretgripas vakcīnas radīšana
- Vakcīnas radīšana pret Laimas boreliozī
- Dažādas veterinārās vakcīnas



Mūsu grupa

- Dr Andris Kazāks
- Dr Tatjana Kazāka
- Dr Jānis Rūmnieks
- Dr Kalvis Brangulis
- Doktoranti - Gints Kalniņš, Svetlana Koteloviča, Jānis Leitāns
- Maģistranti – Mihails Šišovs, Anna Kiršteina, Elīna Černooka
- Asistente – Ilva Liekniņa
- Laborante – Ināra Akopjana



Ārvalstu sadarbības partneri

- Dr. Roman Koning (Leidenes universitāte) – vīrusu un VVD struktūru noteikšana ar krio-EM
- Dr. Guido Pintacuda (CNRS, Liona, Francija), Dr. Kristaps Jaudzems (OSI, CNRS) – VVD struktūru noteikšana ar cietās fāzes KMR
- Prof. Martin Bachmann (Oksfordas universitāte, Bernes universitāte) – VVD pielietojums veterināro vakcīnu izstrādē
- Prof. Wiliam Rosenbrg (UCL, Londona), Prof. Claude Müller (Luksemburga) – VVD pielietojums vakcīnu izstrādē pret gripas vīrusu
- Dr. Yi-Pin Li (New York Department of Health) – VVD pielietojums vakcīnu izstrādē pret Laima slimību