

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Exprese proteinu NS5 viru klíšťové encefalitidy v lidských
neurálních buňkách**

Bakalářská práce

Kateřina Jaklová

Školitel: RNDr. Martin Selinger, Ph.D.

České Budějovice 2021

Jaklová K., 2021: Exprese proteinu NS5 viru klíšťové encefalitidy v lidských neurálních buňkách. [Expression of the NS5 protein of tick-borne encephalitis virus in human neural cells. Bachelor thesis, in Czech] – 51 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation

This study focuses on the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) NS5 protein in infected and NS5-transfected DAOY HTB-186 human neural cells. TBEV NS5 protein was shown to localize mainly on the membranes of the endoplasmic reticulum. An interesting finding was also nuclear localization, which is supported by the obtained data from both, confocal microscopy and subcellular fractionation.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 12. 4. 2021

.....

Kateřina Jaklová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala především svému školiteli RNDr. Martinu Selingerovi PhD. za velkou trpělivost, ochotu a poskytnutí cenných rad při vypracování mé práce. Velký dík patří také všem členům Laboratoře aplikované biochemie za skvělé pracovní prostředí a mým rodičům a všem známým, kteří mě v mém studiu a psaní bakalářské práce podporovali.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Flaviviry.....	1
1.1.1 Rozdělení.....	1
1.1.2 Rozšíření.....	2
1.2 TBEV	3
1.2.1 Subtypy.....	3
1.2.2 Rozšíření.....	3
1.2.3 Přenos	4
1.2.4 Epidemiologická situace	5
1.3 Molekulární a genetická charakteristika TBEV.....	6
1.3.1 Stavba virionu	6
1.3.2 Replikační cyklus TBEV.....	7
1.4 Protein NS5.....	9
1.4.1 Lokalizace	10
2 Cíl práce	12
3 Materiál	13
3.1 Buněčné linie	13
3.2 Plasmidy.....	13
3.3 Virus.....	14
3.4 Protilátky.....	15
4 Metodika	16
4.1 Transfekce.....	16
4.2 Infekce	17
4.3 Příprava vzorků pro imunofluorescentní konfokální mikroskopii.....	18
4.4 Subcelulární frakcionace.....	19
4.5 Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA metody.....	21
4.6 SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE).....	22
4.7 Western blot (WB).....	24
5 Výsledky	25
5.1 Detekce TBEV NS5 v transfekovaných buňkách pomocí konfokální mikroskopie.....	25
5.2 Detekce TBEV NS5 v infikovaných buňkách pomocí konfokální mikroskopie.....	29
5.3 Kvantifikace fluorescenčního signálu pro TBEV NS5 v jádře a cytoplasmě.....	33

5.4 Subcelulární frakcionace a SDS-PAGE.....	34
5.5 Western blot (WB).....	37
5.6 Kvantifikace chemiluminiscentního signálu pomocí programu ImageJ.....	38
6 Diskuze.....	39
7 Závěr	44
8 Seznam použitých zkratk	45
9 Seznam použitých zdrojů.....	47

1 Úvod

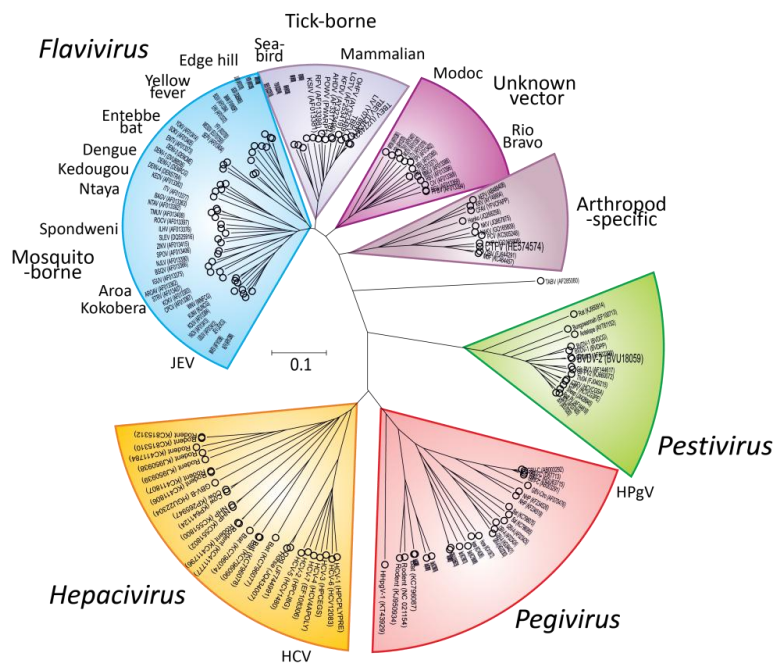
Klíšťová encefalitida (z angl. tick-borne encephalitis, TBE) je onemocnění způsobené virem klíšťové encefalidity (z angl. tick borne encephalitis virus, TBEV), který se řadí do čeledi *Flaviviridae*. Tato nemoc postihuje centrální nervový systém a každoročně je hlášeno přibližně 10 000 případů TBE po celém světě (Kaiser, 2016). Poprvé byla TBE popsána v roce 1931 v Rakousku (Schneider, 1931).

1.1 Flaviviry

Flaviviridae je čeleď pozitivních, jednovláknových, obalených RNA virů o velikosti genomu přibližně 9-13 kb, které jsou přenášeny členovci, především klíšťaty a komáry, a mohou infikovat i člověka či jiné savce. Mezi viry přenášené komáry se řadí zejména virus žluté zimnice, virus dengue (DENV), virus japonské encefalidity, západonilské viry a virus Zika (Simmonds et al., 2017). Naopak viry přenášené klíšťaty mohou způsobovat například TBE či řadu dalších onemocnění (virus Omské hemoragické horečky či virus Kyasanurského lesa). U řady flavivirů nebyl dosud identifikován cyklus přenosu, například virus Rio Bravo (Gaunt et al., 2001).

1.1.1 Rozdělení

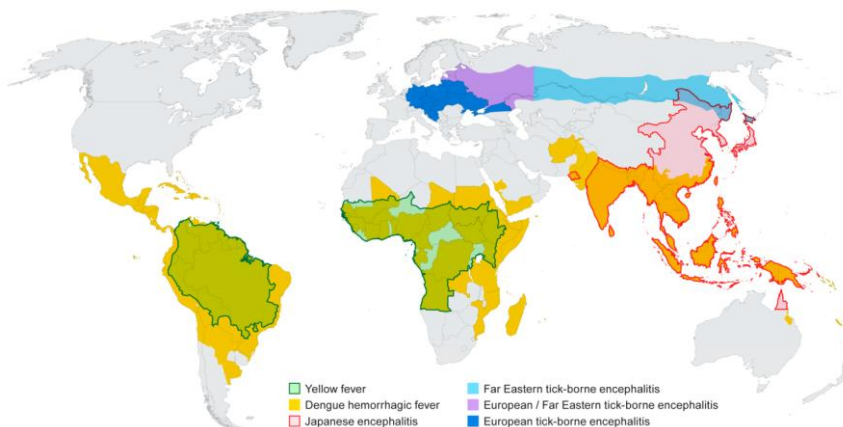
Čeleď *Flaviviridae* se taxonomicky dělí do čtyř rodů. Rod *Pestivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* a *Flavivirus* (viz Obr. 1). Pestiviry infikují převážně prasata a přežvýkavce a patří sem například virus klasického moru prasat či bovinní virová diarea, známé infekční onemocnění skotu. Nejznámějším virem rodu *Hepacivirus* je poté virus hepatitidy C, což je hlavní lidský patogen způsobující chronické onemocnění jater, včetně cirhózy nebo rakoviny. Členové rodu *Pegivirus* způsobují infekce u lidí i zvířat, avšak nebyli jasně spojeni s určitým onemocněním (Payne, 2017). Nejvýznamnějším rodem je rod *Flavivirus*, který zahrnuje 53 dosud identifikovaných druhů (Simmonds et al., 2017). Jak již bylo řečeno, většina druhů rodu *Flavivirus* je přenášena členovci, a proto jsou také často označovány jako arboviry (McLachlan, Dubovi, 2016). Primárními hostiteli jsou obvykle savci a ptáci, u nichž se infekce projevuje od asymptomatické až po hemoragickou horečku či závažné neurologické onemocnění. TBEV spadá právě do tohoto rodu společně s virem žluté zimnice, DENV či virem Zika.



Obrázek 1: Fylogenetické vztahy čeledi *Flaviviridae* (Simmonds et al., 2017).

1.1.2 Rozšíření

Flaviviry jsou rozšířeny celosvětově, avšak každý jednotlivý druh se vyskytuje v určité specifické oblasti (viz Obr. 2). V tropických a subtropických oblastech Afriky a Jižní Ameriky cirkuluje především virus žluté zimnice, v tropických oblastech Asie, Oceánie, Afriky, Austrálie a Ameriky poté DENV. Virus japonské encefalitidy je rozšířen nejvíce v jihovýchodní Asii a TBEV v Evropě a severní Asii (Simmonds et al., 2017).



Obrázek 2: Mapa rozšíření jednotlivých druhů rodu *Flavivirus* (Holbrook, 2017).

1.2 TBEV

TBEV je hlavní virový patogen u lidí způsobující onemocnění centrálního nervového systému známé jako TBE. Infekce TBEV může probíhat i bez zjevných symptomů, avšak symptomatické případy mají obvykle neurologické projevy (Pulkkinen et al., 2018). V případě neurologických projevů se přibližně u 50 % pacientů nemoc projevuje jako meningitida, u 40 % jako meningoencefalitida a u 10 % jako encefalomyelitida (Kaiser, 2016).

1.2.1 Subtypy

Existují tři blízké příbuzné subtypy TBEV (Ecker et al., 1999): evropský, sibiřský (ruský) a dálnovýchodní subtyp (Sudhindra, 2018). Sibiřský a dálnovýchodní subtyp tvoří dvě samostatné linie, které sdílejí společného předka, a objevily se podstatně dříve než subtyp evropský (Tonteri et al., 2013).

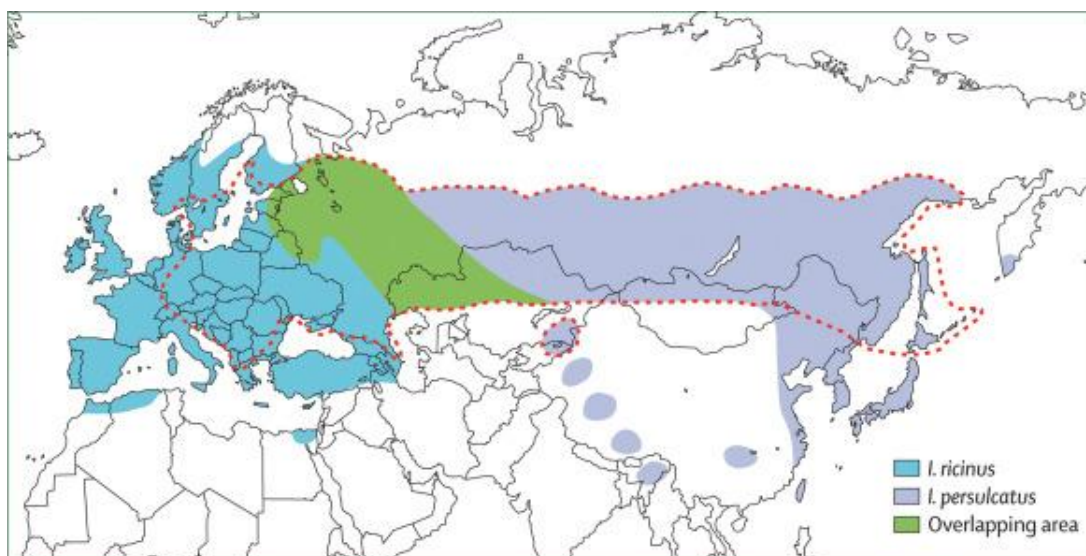
Nejmírnější příznaky se objevují u infekce evropským subtypem, která se rozděluje na 2 fáze. Přibližně 65 % pacientů se zotavuje na konci první fáze, která začíná 2-18 dnů po infekci jako klasické horečnaté a chřipkové onemocnění s bolestí hlavy, únavou či nevolností. Trvá 1-8 dní. Ve druhé fázi onemocnění dochází k rychlému nástupu horečky a k neurologickému poškození. Infekce dálnovýchodním subtypem je obvykle závažnější a po inkubační době se projevuje rychlým nástupem horečky, zvracením, bolestmi hlavy, fotofobií a často dochází i k neurologickým komplikacím a paralýzám. Počet úmrtí je také mnohem vyšší, až kolem 20-30 %, než u infekce evropským subtypem, kde je počet úmrtí kolem 1-2 %. U přeživších se také často vyskytují trvalé neurologické následky, včetně parézy dolních končetin a atrofie svalů. Infekce sibiřským subtypem je obvykle spojena s chronickými infekcemi (Guerrant et al., 2011).

1.2.2 Rozšíření

Rozšíření TBEV je omezeno zejména na Evropu a Asii s ohnisky v biotopech, ve kterých se klíšťata nejčastěji vyskytují (Orlíková et al., 2020). Evropský subtyp je nejrozšířenější v západní, severní a východní Evropě a evropských částech Ruska. Sibiřský subtyp převládá v regionech mezi Japonskem, pobaltskými státy a Bosnou. Dálnovýchodní subtyp je nejčastější mezi nejvýchodnějšími japonskými a ruskými ostrovy, pobaltskými státy a vyskytuje se i v některých oblastech Číny a Mongolska (Plotkin et al., 2018). V některých oblastech lze narazit také na více subtypů současně (Růžek et al., 2019).

1.2.3 Přenos

Celkem bylo identifikováno osm druhů klíšťat, která mohou přenášet TBEV. Evropský subtyp je přenášen klíštětem obecným (*Ixodes ricinus*), zatímco sibiřský a dálnovýchodní subtyp klíštětem sibiřským (*Ixodes persulcatus*) (viz Obr. 3, Plotkin et al., 2018).



Obrázek 3: Geografické rozložení *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus* v Evropě a Asii (Sudhindra, 2018).

TBEV mohou přenášet všechna vývojová stádia klíštěte, tedy larva, nymfa i dospělec. Při nepoužívání ochranných pomůcek a nedodržování postupů je možné se nakazit i při manipulaci a odstraňování klíštěte. Virus je přenášen transovariálně nebo přímo při sání na teplokrevných obratlovcích (lesní a polní savci, hlodavci, hmyzožravci). Transovariální přenos je perzistentní přenos viru, při němž virové částice pronikají až do vaječnicků (ovarií) samiček a samička poté klade už přímo infikovaná vajíčka. Zřídka může k přenosu dojít také pitím nepasterizovaného mléka, ať už ovčího, kozího či kravského, nebo konzumací nepasterizovaných sýrů či jiných výrobků z tepelně nezpracovaného mléka. Výjimečně je možný i přenos transfúzí a transplantovanými orgány (Orlíková et al., 2020).

1.2.4 Epidemiologická situace

Ročně je po celém světě hlášeno více jak 10 000 případů TBE. Výskyt v celé Evropě se pohybuje od 0,5 do 45 případů na 100 000 obyvatel ročně. Významnou roli hrají také faktory jako je teplota, vlhkost, lidská činnost, pokrytí vakcínou nebo zásahy do zalesněných regionů. Rizikové faktory pro infekci TBEV zahrnují cestování a pobyt v rizikových oblastech zejména od dubna do listopadu (Sudhindra, 2018). V průměru pouze 1-3 % klíšťat je infikováno TBEV, což znamená, že přibližně 1 z každých 100-300 kousnutí vede k onemocnění (Kaiser, 2016). Obecně je míra infekce mnohem nižší než míra infekce například u onemocnění lymfské boreliózy (Sudhindra, 2018).

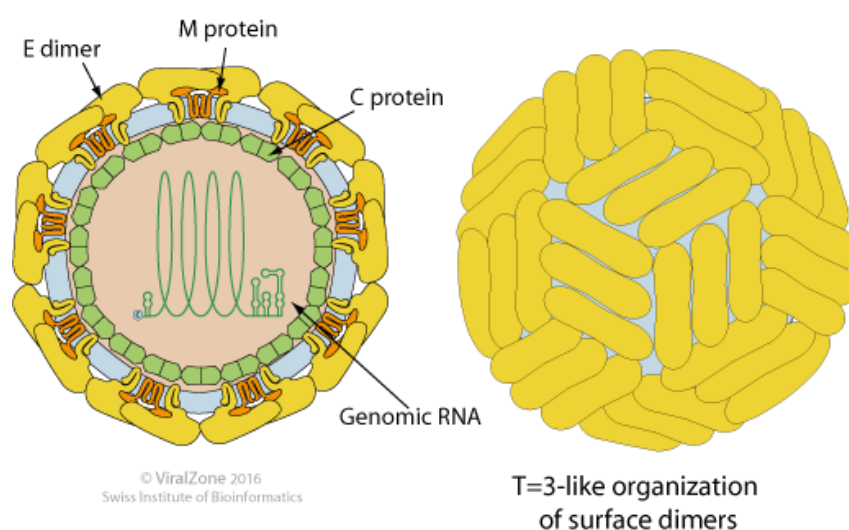
Závažnost TBE se zvyšuje s věkem. Dosud není známa žádná specifická léčba, nemoci lze pouze zabránit aktivní imunizací (Kaiser, 2008). Očkování proti TBE inaktivovanou vakcínou je doporučeno všem osobám, u nichž hrozí vystavení nákaze. Základní očkování se skládá ze tří dávek a k prvnímu přeočkování dochází po 3 letech. Poté následuje přeočkování už jen jednou za 5 let. Příkladem používané vakcíny může být vakcína FSME-IMMUN nebo Encepur (Orlíková et al., 2020).

Většina případů je hlášena z Ruska a z pobaltských států (Sudhindra, 2018), nicméně Česká republika se také řadí mezi země s nejvyšším výskytem TBE v Evropě. V roce 2019 bylo hlášeno celkem 774 případů, z toho 447 případů bylo zaznamenáno u mužů a 327 případů u žen. Incidence se v posledních pěti letech zvýšila z 3,37 na 7,27 případů na 100 000 obyvatel a byla pozorována ve většině krajů. 92 % onemocnění vyžadovalo hospitalizaci a pět osob nákaze podlehl (Orlíková et al., 2020).

1.3 Molekulární a genetická charakteristika TBEV

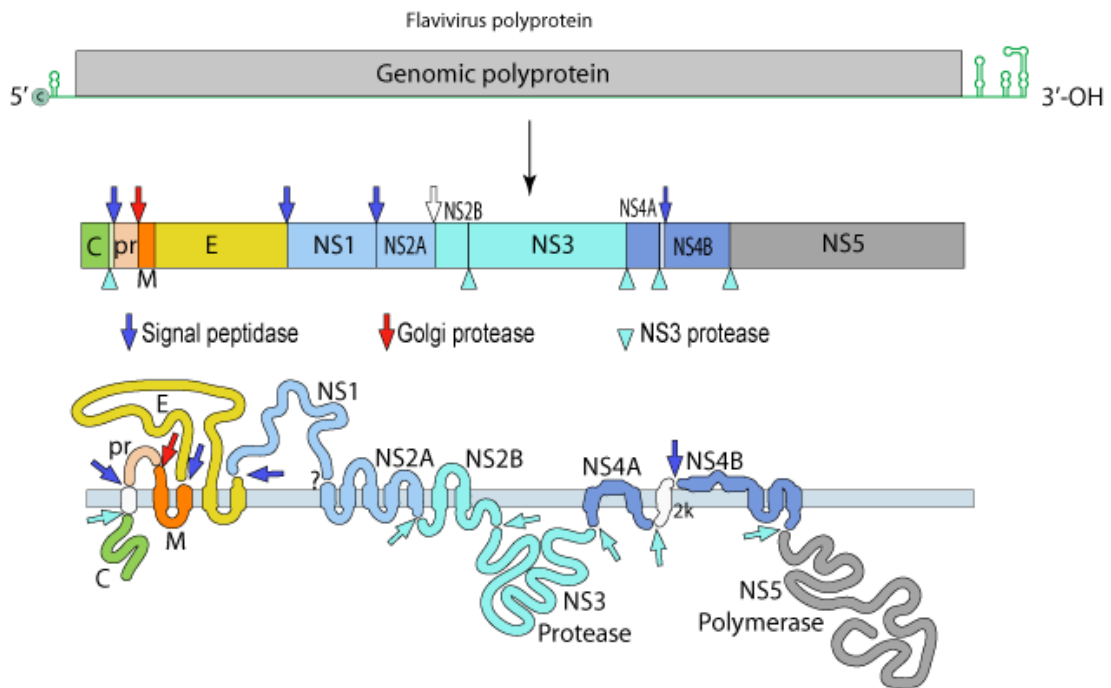
1.3.1 Stavba virionu

Virion TBEV má kulovitý tvar o průměru 50 nm a genom viru je tvořen jedním vláknem RNA pozitivní polaritě o délce 10-11 kb. Povrchové strukturální proteiny jsou uspořádány v ikosahedrál (dvacetistěnné) symetrii (viz Obr. 4, Hulo et al., 2011). Viriony obsahují tři strukturální proteiny: kapsidový protein (C), hlavní obalový protein (E) a membránový protein (M). E protein je virový hemaglutinin, který zprostředkovává zejména vazbu na receptory (Simmonds et al., 2017).



Obrázek 4: Struktura virionu viru klíšťové encefalitidy (Hulo et al., 2011).

Genom obsahuje jeden otevřený čtecí rámec ohraničený nekódujícími oblastmi. Na 5' konci je tato oblast dlouhá přibližně 150 nukleotidů, na 3' konci 400-700 nukleotidů. Otevřený čtecí rámec kóduje jediný polyprotein (o délce zhruba 3400 aminokyselin). Translatovaný polyprotein je následně štěpen virovými a hostitelskými proteázami na jednotlivých 10 proteinů: 3 již zmíněné strukturální proteiny a 7 nestrukturních. Mezi nestrukturní proteiny patří NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5 (viz Obr. 5, Gritsun et al., 2003).

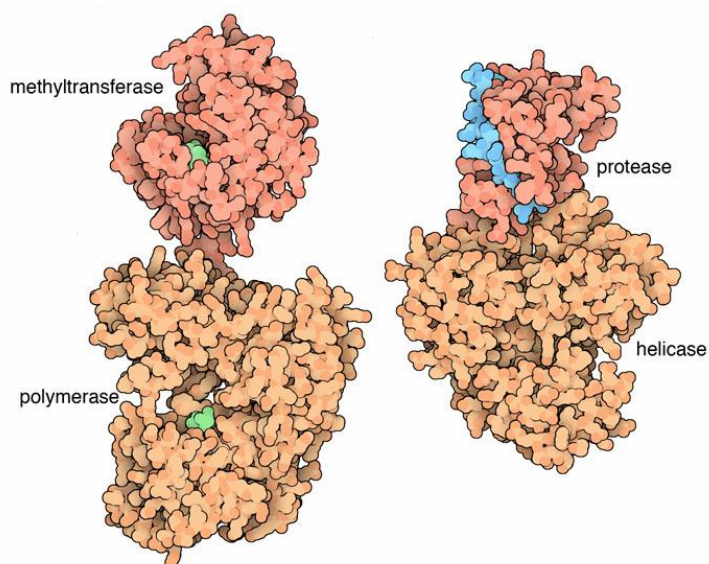


Obrázek 5: Schéma genomu viru klíšťové encefalidity včetně strukturálních a nestrukturních proteinů (Hulo et al., 2011).

1.3.2 Replikační cyklus TBEV

Připojení E proteinu k hostitelským receptorům zprostředkovává internalizaci virionu do hostitelské buňky endocytózou. V rámci endozomu dochází ke snížení pH, a tím indukované fúzi virové membrány s hostitelskou endozomální membránou. Genom RNA je uvolněn do cytoplazmy (Hulo et al., 2011). V rámci cytoplazmy je virová genomová RNA rozpoznána hostitelským translačním aparátem, což vede k syntéze polyproteinu. Virový polyprotein je poté zpracován ko-translačně a post-translačně hostitelskými a virovými proteázami za vzniku již zmíněných strukturálních a nestrukturních proteinů (Hulo et al., 2011). Pro následnou replikaci genomu TBEV je klíčová, stejně jako u jiných RNA virů, přítomnost sekundárních RNA struktur a asistence virových a hostitelských proteinů (Albentosa-González et al., 2020). Probíhá na invaginovaném povrchu endoplazmatického retikula v tzv. cytoplazmatických virových továrnách, což jsou intracelulární kompartmenty, které zvyšují účinnost virové replikace (Hulo et al., 2011). Flavivirová replikace je semikonzervativní a asymetrická (Albentosa-González et al., 2020). Uvolňování nových vironů probíhá exocytózou (Hulo et al., 2011).

Většina nestrukturních proteinů TBEV má více než jednu funkci. Například C konec NS5 proteinu působí jako virová RNA-dependentní RNA polymeráza a N konec jako methyltransferáza. C konec NS3 proteinu působí jako helikáza a N konec poté jako proteáza. Oba proteiny jsou důležité pro zahájení replikace viru (viz Obr. 6, Gritsun, Gould, 2014).



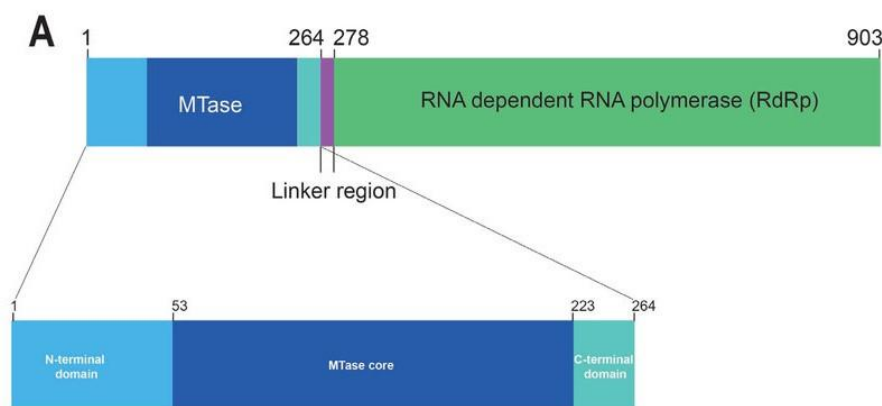
Obrázek 6: Struktura NS5 (vlevo) a NS3 (vpravo) proteinu (Goodsell, 2008).

Funkce jiných nestrukturních proteinů jsou méně známy, nicméně NS1 glykoprotein je translokován přes endoplazmatické retikulum a vylučován mimo buňky společně s viriony u savců, ale ne v buňkách například komárů. Jeho ukotvení do membrán je zprostředkováno zejména glykosyl-fosfatidylinositolem. Protein NS1 hraje důležitou roli v imunopatologii, jelikož indukuje tvorbu ochranných protilátek, které se rovněž podílí na komplementární lýze infikovaných buněk. Protein NS2A se nachází ve spojení s komplexem NS3 helikázy a proteinem NS5. Protein NS2B může také souviset s replikací díky jeho modulační aktivitě membránové propustnosti a zároveň tvoří společně s proteinem NS3 komplex virové proteázy NS2B3. Hydrofobní protein NS4A ve spojení s proteinem NS1 pravděpodobně ukotvuje polymerázový komplex na membránu endoplazmatického retikula a podílí se na přeskupení membrán vyvolaných virem (Gritsun, Gould, 2014).

1.4 Protein NS5

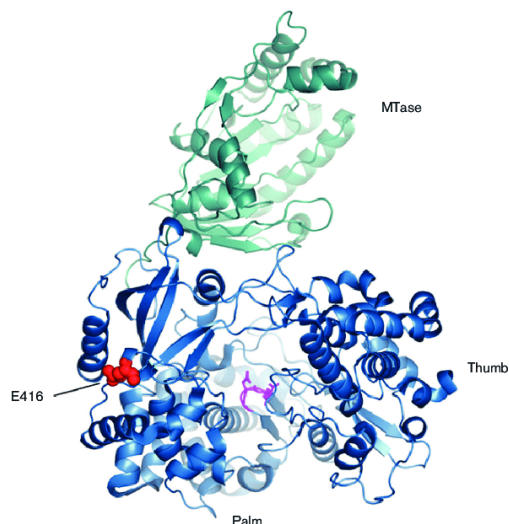
Gen pro NS5 je v rámci flavivirového genomu největší (délka genu pro kmen TBEV Hypr je 2709 bazí) a kóduje protein o velikosti přibližně 105 kDa, který je zodpovědný hlavně za replikaci virového genomu a skládá se z 900 aminokyselin (Best, 2017). Mimo jiné je NS5 také zodpovědný za inhibici signální dráhy interferonu typu I (INF- α), kdy blokuje signalizaci JAK-STAT, což je buněčná dráha přenášející signál z interferonového receptoru skrz fosforylační kaskádu do jádra (Best, 2017). Buněčná antivirová odpověď vyvolaná INF- α představuje silnou překážku virové infekce a právě potlačení této dráhy je jejím důležitým determinantem (Best, 2017). Někdy se využívá také k vývoji antivirotik proti nejrozličnějším flavivirovým infekcím, například proti infekci DENV (Dwivedi et al., 2017).

NS5 obsahuje dvě funkční domény: C-terminální RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRP) a N-terminální methyltransferázu (MTáza), která methyduje virovou RNA čepičku, čímž zabraňuje její degradaci hostitelskými RNázami podobně jako u mRNA (viz Obr. 7, Best, 2017).



Obrázek 7: Domény MTáza a RdRP (Chatrin et al., 2017).

Doména RdRP (RdRPD) se skládá ze tří subdomén (Finger, Thumb a Palm, viz Obr. 8), které jsou strukturně konzervovány napříč virovými RdRPD. Oblast této domény obsahuje lokalizační sekvence, které jsou nezbytné pro interakce s jinými virovými a hostitelskými proteiny (Dwivedi et al., 2017).



Obrázek 8: Subdoménová struktura NS5 proteinu (Griesemer et al., 2016).

1.4.1 Lokalizace

Předpokládá se, že většina funkcí proteinu NS5 probíhá v cytoplazmě, kde je lokalizována replikace virové genomové RNA. Cytoplazmatická lokalizace NS5 byla experimentálně prokázána například dle studie Werme et al. (2008) nebo Zheng et al. (2018). Kromě toho bylo ale také zjištěno, že v určitých případech je významná část NS5 směřována i do jádra, kde navazuje interakce s buněčnými faktory, které ovlivňují normální expresi několika hostitelských genů ve prospěch replikace viru (Albentosa-González et al., 2020). Jaderná lokalizace byla například zjištěna v buňkách infikovaných DENV, kde NS5 protein lokalizuje do jádra bez jasné role v replikaci nebo patogenezí (Tay et al., 2016).

Pro TBEV NS5 nebyla jaderná lokalizace pozorována, přičemž cytoplazmatická lokalizace byla dokumentována pouze v případě neinfikovaných buněk exprimujících NS5 s fúzním peptidem pro imunolokalizaci (Werme et al., 2008, Zheng et al., 2018). Dle predikčního programu cNLS Mapper (Kosugi et al., 2009), který umožňuje predikovat přítomnost jaderného lokalizačního signálu (NLS) na základě aminokyselinové sekvence, byl NLS u TBEV NS5 (kmen Hypr) detekován na dvou místech v rámci RdRPD (viz Tab. I). Sekvence proteinu DENV NS5 (DENV-2 NS5, viz Tab. II) byla použita jako pozitivní kontrola, přičemž bylo identifikováno 10 možných NLS sekvencí. Identifikované sekvence NLS nebyly shodné.

Tabulka I: Predikované sekvence NLS v rámci TBEV Hypr NS5 (cNLS Mapper).

Předpokládaný NLS (TBEV Hypr NS5)		
Poz.	Sekvence	Skóre
615	TNIKVQLIRMMEGEGVIEAADAHPRLLRVE	4.6
687	KTRKDIGEWHSAGLSSWEEVPFCSHHFHE	4

Tabulka II: Predikované sekvence NLS v rámci DENV-2 NS5 (cNLS Mapper).

Předpokládaný NLS (DENV-2 NS5)		
Poz.	Sekvence	Skóre
212	RFTMRHKKATYEQDVDLGSSTRVWRKGEKP	4.8
323	TCCKRKGYYSPHTDGRRTATRENRSRVAL	4.3
397	RRKKAVEDLWQLENFECWRKVWNMCILR	4
478	WQEKRGINWVWCQERWLSWKDEHYKSMP	4
478	WQEKRGINWVWCQERWLSWKDEHYKSMPHT	4
492	RWLSWKDEHYKSMPHTGIHVSPYRMIKIRWW	4.2
874	KQGWKSGRIKPWYGKNYATCEPLQGRKKSG	5.5
899	RKKKSGHYKCHSLSKLCSLWLHLRCKKS	4.5
898	GRKKKSGHYKCHSLSKLCSLWLHLRCKK	4.5
899	RKKKSGHYKCHSLSKLCSLWLHLRCKKSGKP	4.5

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo charakterizovat lokalizaci proteinu TBEV NS5 v rámci infikovaných buněk kmenem TBEV Hypr a buněk transfekovaných savčím expresním konstruktem pCAGGS-NS5 kódujícím tento protein.

Konkrétními cíli byly optimalizace transfekce lidské neurální buněčné linie DAOY HTB-186 s následnou imunolokalizací proteinu TBEV NS5 v rámci infikovaných a transfekovaných buněk za použití konfokální mikroskopie v kombinaci s markery pro jednotlivé buněčné orgány. Finálně pak potvrzení získaných dat pomocí subcelulární frakcionace.

3 Materiál

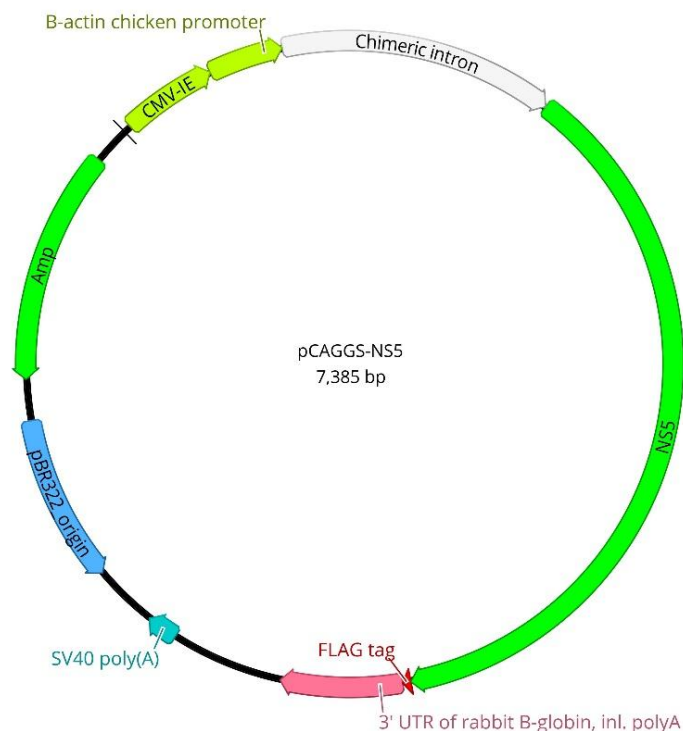
3.1 Buněčné linie

K provedení veškerých experimentů byla využita buněčná linie lidského meduloblastomu DAOY HTB-186 (ATCC) pocházejícího od čtyřletého chlapce (Jacobsen et al., 1985). Tato buněčná linie byla udržována dle pokynů v DMEM médiu (DMEM Low Glucose, Biosera) obsahující také 10 % fetální bovinní sérum, antibiotika a antimykotika (amphotericin B 0,25 µg/ml, penicillin G 100 units/ml, streptomycin 100 µg/ml) a glutamin. Udržována byla pravidelným pasážováním a kultivována při 37°C a 5 % CO₂.

3.2 Plasmidy

Transfekce lidské buněčné linie byla prováděna za použití komerčního reagens PolyJet a plasmidu pCAGGS-NS5 o koncentraci 0,505 µg/µl. Jako negativní kontrola byl použit pCAGGS o koncentraci 0,422 µg/µl.

Plasmid pCAGGS je designován pro expresi zaklonovaných genů v savčích buňkách a kombinuje CMV-IE enhancer s promotorem pro kuřecí β-aktin, chimerický intron a terminátor pro králičí β-globulin. Gen pro NS5 byl zaklonován společně s proteinovým tagem FLAG (DYKDDDDK) pro možnou detekci pomocí FLAG specifických protilátek (viz Obr. 9).



Obrázek 9: Plasmid pCAGGS-NS5. Schéma vytvořeno v programu Geneious (M. Selinger).

3.3 Virus

Veškerá práce s infekčním materiálem byla prováděna v BSL2 laboratořích Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. K infekci byl použit vysoce patogenní evropský kmen TBEV Hypr (4. pasáž v mozcích sajících myší: GenBank, přístupové číslo: U39292). Jako negativní kontrola byla použita mozková suspenze z neinfikovaných myší (Mock).

3.4 Protilátky

V této práci byly použity následující protilátky (viz Tab. III).

Tabulka III: Seznam použitých protilátek.

Protilátka	Výrobce	Experiment	Poměr a množství
Anti-Calnexin	Abcam (#ab22595)	transfekce č. 2	1:200, 50 μ l/jamku
Anti-COX4	Invitrogen (#MA5-15078)	transfekce č. 1	1:200, 50 μ l/jamku
Anti-FLAG	Sigma (#F1804-200UG)	transfekce č. 1 transfekce č. 2	1:200, 50 μ l/jamku
Anti-NS3	Dr. M. Bloom (NIAID, Montana, USA)	infekce	1:5000, 100 μ l/jamku
Anti-NS5 (4)	vyrobena v Laboratoři aplikované biochemie (PřF JU)	transfekce č. 3 infekce sub. frakcionace	1:1000/1500, 100 μ l/jamku 1:1000, 10 ml/membránu
Anti-GAPDH [EPR16891]	Abcam (#ab181602)	sub. frakcionace	1:2000, 5 ml/membránu
HRP Anti-Guinea Pig	Novex (#A18769)	sub. frakcionace	1:1000, 10 ml/membránu
HRP Anti-Rabbit IgG (H+L)	VectorLabs (#PI-1000)	sub. frakcionace	1:1000, 10 ml/membránu
Anti-Rabbit IgG (H+L) DyLight 488	VectorLabs (#DI-1488)	transfekce č. 1 transfekce č. 2	1:400, 100 μ l/jamku
Anti-Mouse IgG DyLight 594	Abcam (#ab96881)	transfekce č. 1 transfekce č. 2	1:400, 100/80 μ l/jamku
Anti-Guinea Pig IgG Alexa Fluor 594	Abcam (#ab150188)	transfekce č. 3 infekce	1:400, 100 μ l/jamku
Anti-Chicken IgY DyLight 488	Abcam (#ab96947)	infekce	1:400, 100 μ l/jamku

4 Metodika

4.1 Transfekce

Den před samotným procesem transfekce byly nejprve buňky nasazeny v odpovídajícím počtu na dva různé typy panelů v závislosti na typu experimentu. Pro přesné stanovení počtu buněk ve vzorcích bylo využito počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky a spočteno pomocí následujícího vzorce: $c = A \times 2 \times 10\,000$ [b/ml], kdy c je výsledná koncentrace buněk v 1 ml suspenze a A je stanovený počet buněk. Schéma a údaje o počtu nasazených buněk jsou zahrnuty v Tabulce IV.

Tabulka IV: Schéma nasazených buněk pro proces transfekce.

Typ panelu	Experiment	Počet buněk	Celkový objem
96-ti jamkový	transfekce č. 1	15 000 a 20 000	200 µl/jamku
96-ti jamkový	transfekce č. 2	20 000 a 60 000	200 µl/jamku
96-ti jamkový	transfekce č. 3	20 000	200 µl/jamku
6-ti jamkový	sub. frakcionace	500 000	2 ml/jamku

Druhý den byla provedena transfekce v poměru 1:3 (µg DNA: µl PolyJet) a pro přípravu transfekční směsi bylo použito DMEM médium (DMEM Low Glucose, Biosera) bez fetálního bovinního séra, antibiotik a glutaminu. Byl připraven vždy Mix 1 a Mix 2 pro každý jednotlivý plasmid, tedy pCAGGS a pCAGGS-NS5 (viz Tab. V). Po smíchání mixů se nechala transfekční směs 15 minut inkubovat při pokojové teplotě a poté bylo do každé jamky přidáno ke 100 µl čerstvého média 10 µl odpovídající transfekční směsi. Transfekce probíhala stejným způsobem také u vzorků pro subcelulární frakcionaci, přičemž k 1 ml čerstvého média bylo na konci přidáno 100 µl transfekční směsi. Odběr vzorků proběhl vždy 24 hodin po transfekci.

Tabulka V: Schéma transfekční směsi.

Mix 1		Mix 2	
Plasmid [µg]	DMEM [µl]	PolyJet [µl]	DMEM [µl]
0,1	4,9	0,3	4,7

4.2 Infekce

Den před infekcí došlo opět k nasazení buněk na dva typy panelů podle typu experimentu. Nasazení probíhalo stejným způsobem jako u procesu transfekce a schéma s údaji o počtu nasazených buněk je uvedeno v Tabulce VI. Transfekce č. 3 a infekce probíhala zároveň na stejném sklíčku.

Tabulka VI: Schéma nasazených buněk pro proces infekce.

Typ panelu	Experiment	Počet buněk	Celkový objem
96-ti jamkový	infekce	15 000	200 µl/jamku
6-ti jamkový	sub. frakcionace	500 000	2 ml/jamku

Druhý den byla provedena infekce kmenem TBEV Hypr. Schéma celého procesu je zaznamenáno v Tabulce VII. Množství virové suspenze na jednu jamku bylo spočteno podle níže uvedené rovnice:

$$\frac{\text{MOI} \times \text{počet buněk}}{\text{titr virové suspenze [PFU/ml]}} = \text{objem virové suspenze [ml]}$$

Tabulka VII: Schéma procesu infekce.

Experiment	Počet buněk	Multiplicita infekce	Koncentrace [PFU/ml]	Objem virové suspenze	Celkový objem
infekce	15 000	5	$2,08 \times 10^8$	0,36 µl	100 µl/jamku
sub. frakcionace	500 000	5	$2,08 \times 10^8$	12,01 µl	1 ml/jamku

Po dvou hodinách inkubace s virem byla virová suspenze odstraněna. Buňky byly promyty v pufovaném fyziologickém roztoku (PBS)¹ a následně bylo přidáno čerstvé kompletní médium. Odběr byl proveden vždy 24 hodin po infekci.

¹ 10× PBS, pH 7,4 [14,4 Na₂HPO₄ (27,2 g Na₂HPO₄·7H₂O), 80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH₂PO₄]

4.3 Příprava vzorků pro imunofluorescentní konfokální mikroskopii

24 hodin po transfekci či infekci byly vzorky promyty v PBS a fixovány pomocí 4% paraformaldehydu (Roti®-Histofix). Po 15-ti minutové fixaci při pokojové teplotě byly buňky 3× promyty PBS po intervalech 5 minut a byly uskladněny při teplotě 4°C.

Další den byly nejprve připraveny veškeré roztoky, které se před použitím přefiltrovaly (0,22 µm filtr). Buňky byly permeabilizovány inkubací 15 minut v 0,1% Tritonu® X-100 (Serva) v PBS. Poté byly vzorky 3× promyty PBS a bylo k nim přidáno 50 mM NH₄Cl v PBS pro blokování formaldehydové autofluorescence. Inkubace byla provedena 2× 10 minut a před přidáním 3% BSA (Roti®-Albumin Fraktion V) v PBS pro blokování nespecifických vazeb byly vzorky opět 2× promyty PBS. Inkubace v 3% BSA v PBS trvala 1 hodinu a probíhala při pokojové teplotě. Poté byly přidány primární protilátky v 1% BSA v PBS, které se inkubovaly 1 hodinu při pokojové teplotě nebo přes noc ve 4°C (seznam použitých primárních protilátek s podrobnými informacemi uveden v Tab. III).

Po inkubaci došlo opět 5× k promytí PBS po intervalech 5 minut a byly přidány sekundární protilátky v 1% BSA v PBS, které se tentokrát inkubovaly vždy ve tmě 1 hodinu při pokojové teplotě (seznam použitých sekundárních protilátek pro jednotlivé experimenty je uveden v Tab. III). Po hodině byly vzorky opět 5× promyty PBS a došlo k přípravě samotných preparátů, která se skládala z odstranění přebytečného plastu a silikonového těsnění, vysušení vzorků, přidání montovacího média s DAPI (Roti®-Mount FluorCare DAPI), přiložení krycího sklíčka a nanesení laku v okolí sklíčka. Hotové preparáty byly uskladněny v lednici při 4°C a dále zpracovávány pomocí konfokálního mikroskopu Olympus Fluoview FV10i a následný export snímků probíhal v softwaru FV10-ASW (ver.04.02).

4.4 Subcelulární frakcionace

Subcelulární frakcionace byla prováděna pomocí kitu Thermo Scientific Subcellular Protein Fractionation (#78840). Došlo k postupné separaci a přípravě cytoplazmatických, membránových, rozpustných jaderných, chromatinově vázaných a cytoskeletálních proteinových extraktů, které byly následně použity pro imunodetekci TBEV NS5 pomocí Western blotu (WB).

U adherentních buněk DAOY HTB-186 došlo nejprve k jejich uvolnění pomocí trypsinizace. Buňky byly následně resuspendovány v 0,5 ml kultivačního média a centrifugovány při 300× g po dobu 5 minut. Po centrifugaci byly buňky promyty v PBS a opět zcentrifugovány 5 minut při 500× g. Poté byl pipetou opatrně odebrán veškerý supernatant tak, aby pelet zůstal co nejsušší.

Jako první byl k peletu přidán cytoplazmatický extrakční pufr (CEB) způsobující selektivní permeabilizaci buněčné membrány a uvolnění cytoplazmatického obsahu. CEB byl uložený na ledu a obsahoval inhibitory proteáz (100× HaltTM Protease Inhibitor Cocktail, #87786), které byly předem přidány do všech pufrů v poměru 1:100. Přidaný objem jednotlivých pufrů ke každému vzorku je zaznamenán v Tab. VIII.

Tabulka VIII: Objemy jednotlivých pufrů o konkrétním objemu buněk.

Počet buněk	CEB [μ l]	MEB [μ l]	NEB [μ l]	NEB+ [μ l]	PEB [μ l]
$0,5 \times 10^6$	100	100	50	50	50

Inkubace proběhla 10 minut při 4°C a poté došlo k centrifugaci při 500× g po dobu 5 minut a k odebrání supernatantu do čistých zkumavek na leď obsahující už jen čistý cytoplazmatický extrakt.

K peletu byl následně přidán membránový extrakční pufr (MEB) uložený na ledu a rozpouštějící membrány mitochondrie, endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu. Po přidání byly vzorky zvortexovány 5 sekund na nejvyšší rychlost a inkubovány 10 minut při 4°C. Poté došlo k centrifugaci 5 minut při 3000× g a čistý membránový extrakt byl převeden do nových zkumavek.

Ihned na to byl k peletu přidán jaderný extrakční pufr (NEB) poskytující rozpustný jaderný extrakt. Poté došlo ke zvortexování 15 sekund při nejvyšší rychlosti a inkubaci po dobu 30 minut při 4°C. Centrifugace probíhala 5 minut při 5000× g a čistý jaderný extrakt byl opět přenesen do nových zkumavek.

Mezitím byl připraven extrakční pufr pro jaderné proteiny vázané na chromatin (NEB+) obsahující kromě inhibitorů proteáz také 5 µl 100 mM CaCl₂ a 3 µl mikrokokální nukleázy (300 jednotek, #88216) na 100 µl NEB pokojové teploty. Po přidání NEB+ došlo ke zvortexování 15 sekund na nejvyšší rychlost a k inkubaci 15 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byly vzorky opět zvortexovány 15 sekund a zcentrifugovány 5 minut při 16 000× g. Chromatinově vázaný nukleární extrakt byl převeden do nových zkumavek.

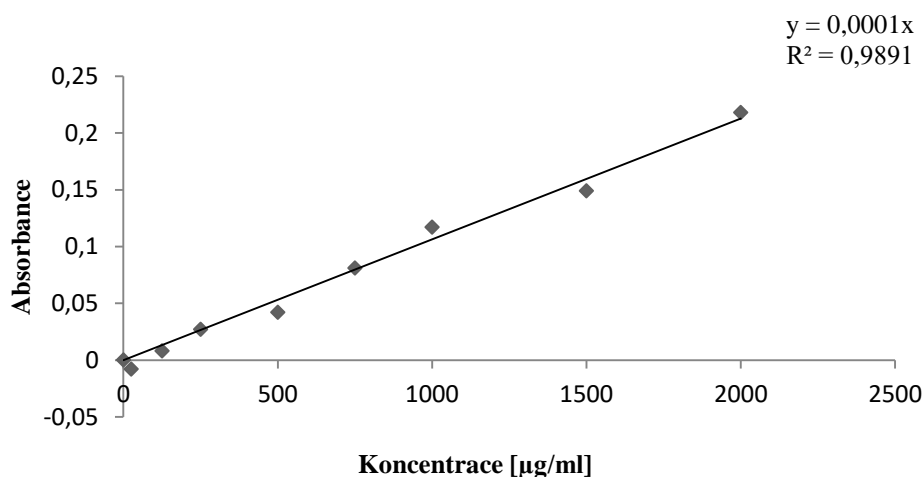
Jako poslední byl přidán pelet extrakční pufr (PEB) pokojové teploty. Opět proběhlo zvortexování po dobu 15 sekund a inkubace 10 minut při pokojové teplotě. Centrifugace probíhala 5 minut při 16 000× g a konečný cytoskeletální extrakt byl přenesen do nových zkumavek. Získané vzorky byly uskladněny při -80°C.

4.5 Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA metody

Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích získané metodou subcelulární frakcionace bylo provedeno pomocí kitu Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay (#23225). BCA proteinový test kombinuje redukci Cu^{2+} na Cu^{1+} proteinem v alkalickém médiu s vysoce citlivou a selektivní kolorimetrickou detekcí kationtu (Cu^{1+}) kyselinou bicinchoninovou (BCA).

Příprava vzorků byla následující: k 10 μl každého vzorku získaného subcelulární frakcionací bylo přidáno 200 μl směsi reagensů, která byla připravena dle instrukcí výrobce v poměru 50:1 (pufry A:B). K sestavení kalibrační křivky byly na destičku ve stejném objemu přidány i BSA standardy o známých koncentracích (A = 2000 $\mu\text{g/ml}$, B = 1500 $\mu\text{g/ml}$, C = 1000 $\mu\text{g/ml}$, D = 750 $\mu\text{g/ml}$, E = 500 $\mu\text{g/ml}$, F = 250 $\mu\text{g/ml}$, G = 125 $\mu\text{g/ml}$, H = 25 $\mu\text{g/ml}$), ke kterým byla ve stejném objemu přidána také směs reagensů. Vzorek kalibrační křivky „I“ o koncentraci 0 $\mu\text{g/ml}$ byl považován za slepý vzorek (blank). Poté došlo k inkubaci 30 minut při 37°C, byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm a sestrojena kalibrační křivka (viz Obr. 10). Nakonec byla dopočítána přesná koncentrace pro jednotlivé vzorky, se kterou se dále počítalo při přípravě vzorků pro SDS-PAGE.

Graf na Obr. 10 zachycuje závislost koncentrace a absorbance na základě hodnot naměřených u druhého biologického opakování.



Obrázek 10: Kalibrační křivka.

4.6 SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Metoda SDS-PAGE byla použita k separaci jednotlivých proteinů a probíhala ve 12% polyakrylamidových gelech. Principem je separace proteinů ve stejnosměrném elektrickém poli podle jejich velikosti. Gelem prochází stejnosměrný elektrický proud, díky kterému proteiny záporně nabitě pomocí dodecylsírany sodného (SDS) migrují skrz gel směrem ke kladně nabitě anodě. Na základě různé pohyblivosti jednotlivých proteinů dochází k separaci. První část gelu, tzv. separační gel, byl připraven dle Tab. IX.

Tabulka IX: Schéma pro přípravu 12% separačního gelu.

Látka	Množství
30% AA ²	8 ml
4 x separační pufr ³	5 ml
ddH ₂ O	6,8 ml
10% APS	200 µl
TEMED	8 µl
2,2,2-trichlorethanol (TCE)	100 µl

Inned po smíchání byl roztok pro separační gel nalit do předem připravené aparatury. Pro získání vodorovné hladiny gelu byla směs převrstvena 30% isopropanolem (v/v). Po ztuhnutí byl 30% isopropanol odstraněn, dutina promyta a zbytek vody byl opatrně vysušen filtračním papírem. Byl připraven 5% zaostřovací gel (viz Tab. X), do kterého byl po nalití na separační gel vložen hřebínek s potřebným množstvím jamek (10 či 15).

Tabulka X: Schéma pro přípravu 5% zaostřovacího gelu.

Látka	Množství
30% AA	660 µl
4 x zaostřovací pufr ⁴	1 ml
ddH ₂ O	2,3 ml
10% APS	40 µl
TEMED	4 µl
TCE	20 µl

² Rotiphorese® Gel 30, 37,5:1

³ 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS

⁴ 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4% SDS

V průběhu tuhnutí zaostřovacího gelu byly připraveny vzorky, které byly poté nanášeny do jednotlivých jamek. Množství vzorku bylo spočítáno podle koncentrace získané metodou BCA (viz Kap. 4.5). Celkový objem byl 16 μl a poměr vzorku a přidané barvy ($4\times$ LB DTT⁵) 3:1 (tedy 12:4 μl). Požadované množství proteinů bylo 4 000 ng a množství H₂O bylo dopočítáno podle následující rovnice:

$$\frac{4\ 000}{x} = y + z = 12$$

x = koncentrace vzorku [μl]

y = množství vzorku [μl]

z = množství přidané H₂O [μl]

Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl opatrně vyjmut hřebínek a gely byly umístěny do elektroforetické aparatury, která se zalila $1\times$ elektrodovým pufr⁶ a do jednotlivých jamek byly napipetovány jednotlivé vzorky v množství 15 μl na jamku. Jako velikostní standard byl použit Protein Marker VI (10-245) prestained (AppliChem, #A8889), který byl do každého gelu nepipetován v objemu 6 μl . Elektroforetická separace probíhala po dobu 90 minut ve stejnosměrném elektrickém poli při napětí 100 V.

Gely byly následně vyjmuty z aparatury, promyty destilovanou vodou a analyzovány na úspěšnost separace. Ta byla provedena fotodokumentací fluorescenčního signálu TCE excitovaného UV světlem ve fotodokumentačním zařízení GENESys, V1.5.2.0. Zdokumentované gely byly posléze použity v rámci WB. Po jeho dokončení byly proteiny v gelu barveny pomocí PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Scientific, #24620).

⁵ 0,313 M Tris-HCl, pH 6,8, 10 % SDS, 50 % glycerol, 0.05 % bromfenolová modř, 50 mM dithiotreitol (DTT)

⁶ 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % SDS

4.7 Western blot (WB)

WB je metoda pro detekci a charakterizaci proteinů založená na principu imunochromatografie, kdy jsou proteiny rozděleny podle jejich molekulové hmotnosti a přeneseny nejčastěji na nitrocelulózovou či PVDF (polyvinylidendifluorid) membránu (Bhandari, 2017).

Po dokončení metody SDS-PAGE byly nejprve PVDF membrány inkubovány 3-5 minut ve 100% methanolu a použité papíry v blotovacím pufru (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glycin, 20% methanol). Po inkubaci došlo k přípravě „blotovacího sendviče“ (viz Obr. 11), odstranění bublin a zapnutí aparatury (20 V, 1 A, 30 minut).



Obrázek 11: Obecné schéma vytvořeného „blotovacího sendviče“ (Bhandari, 2017).

Membrány s navázanými proteiny byly následně blokovány za neustálého míchání 1 hodinu při pokojové teplotě v blokovacím roztoku z 5% odtučněného sušeného mléka v PBS-T⁷. Detekce zájmového proteinu byla provedena inkubací membrán s primárními protilátkami (viz Tab. III) naředěnými v blokovacím roztoku. V závislosti na typu experimentu byly primární protilátky s membránami inkubovány buďto 1 hodinu při pokojové teplotě, nebo přes noc při 4°C (vždy za stálého míchání). Pro detekci navázaných primárních protilátek byly použity sekundární protilátky (viz Tab. III) konjugované s křenuvou peroxidázou (HRP) pro následnou chemiluminiscenční detekci, což je detekce emise viditelného světla generovaného chemickou reakcí. Inkubace membrán se sekundárními protilátkami probíhala vždy 1 hodinu při pokojové teplotě. Vždy před přidáním sekundární protilátky a po inkubaci sekundární protilátkou byly membrány promyty 3× v PBS-T. Pro detekci navázaných sekundárních protilátek konjugovaných s HRP byl použit WesternBright™ Quantum kit (Advansta, #K-12042-D20) použitý dle instrukcí výrobce (smíchání roztoků A a B v poměru 1:1).

⁷ PBS, 0,05% Tween

5 Výsledky

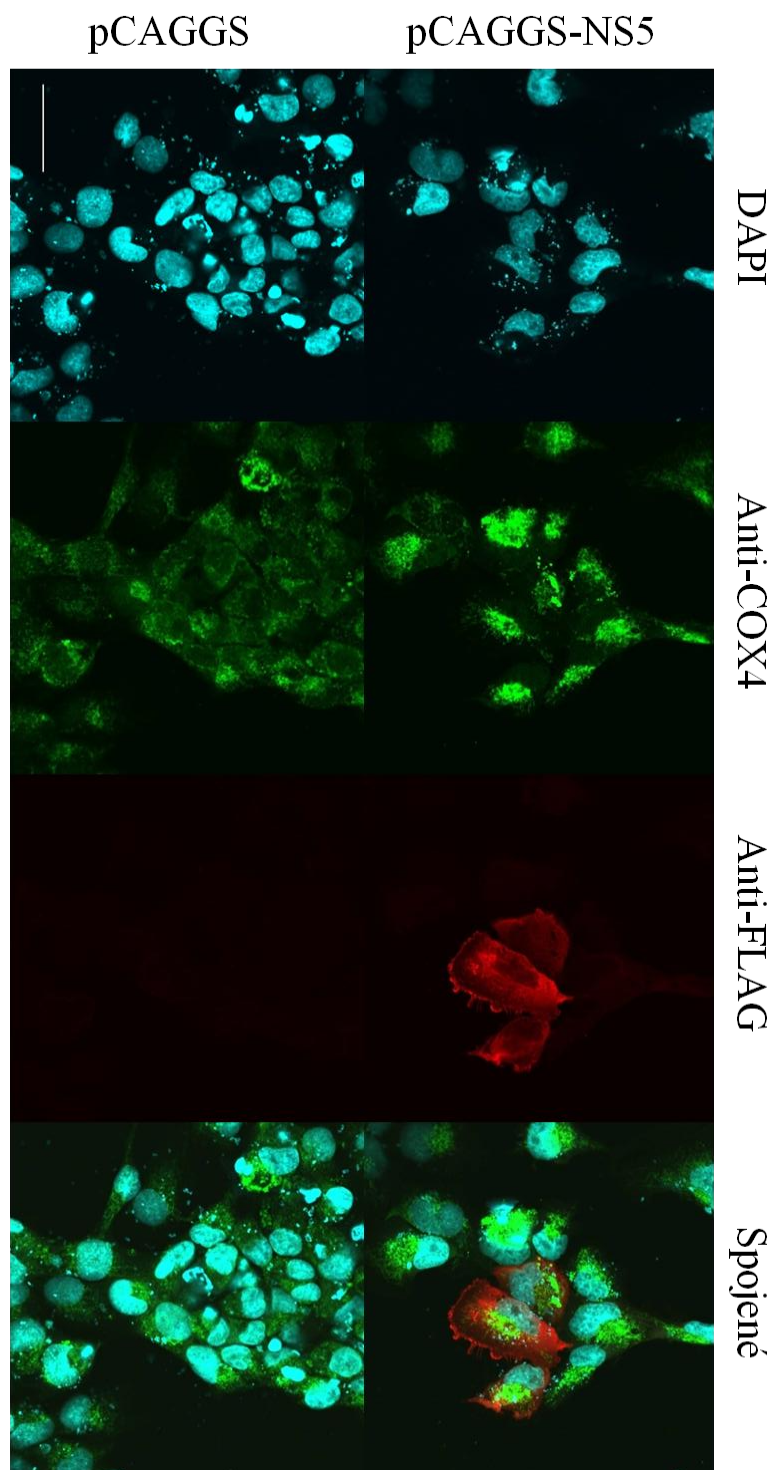
5.1 Detekce TBEV NS5 v transfekovaných buňkách pomocí konfokální mikroskopie

Každý pokus transfekce vektorem pCAGGS-NS5 byl proveden ve dvou biologických opakováních, přičemž hodnoty intenzit laserů na konfokálním mikroskopu a následné upravování signálu bylo provedeno se stejnými hodnotami pro všechny vzorky.

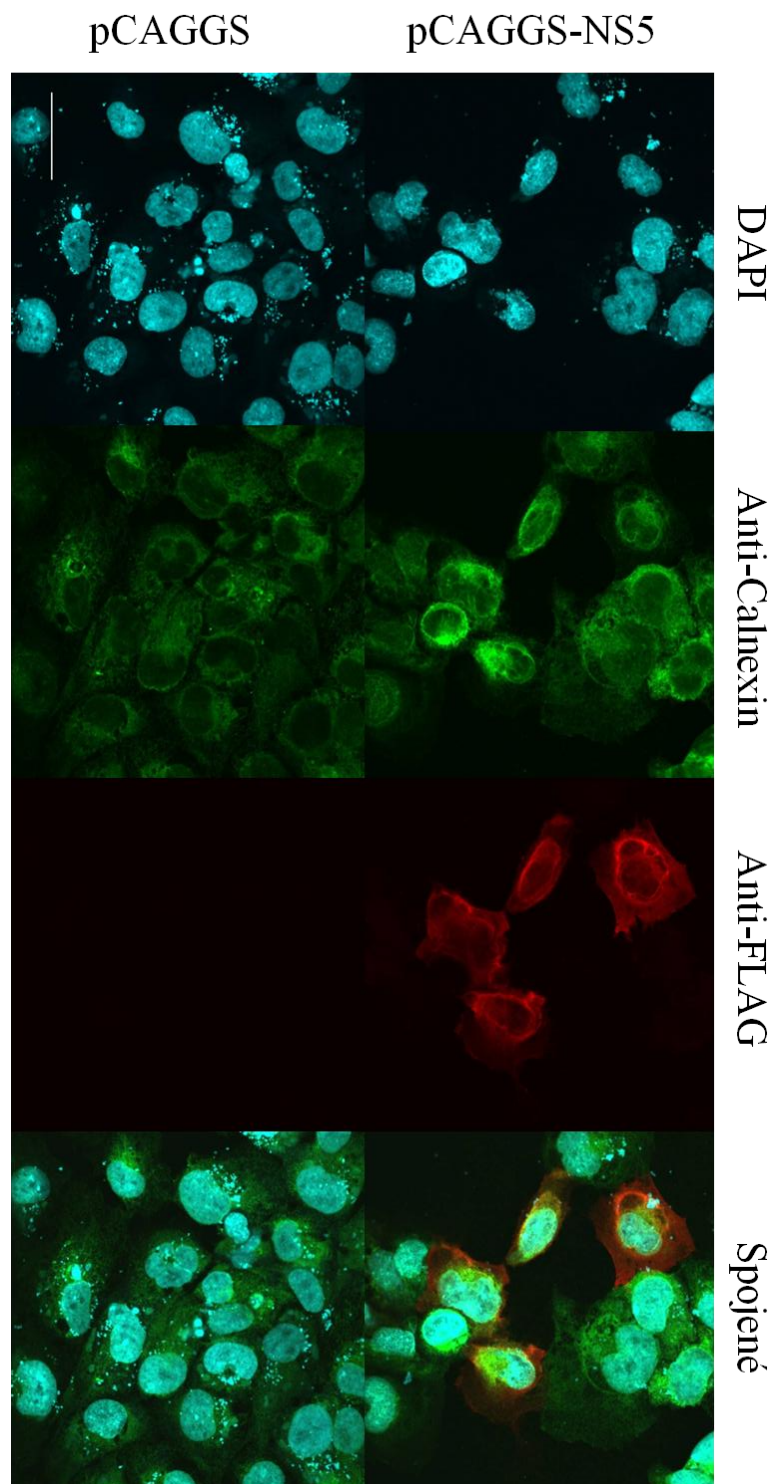
Primární optimalizační pokusy vedly k negativním výsledkům z důvodu malého množství buněk ve vzorcích, proto byly vyzkoušeny různé počty buněk na jamku (15 000, 20 000, 60 000, viz Tab. IV), z čehož nejlepší výsledky byly patrné u 20 000 buněk.

Aby bylo možné přesně definovat lokalizaci NS5-FLAG v rámci buněčných kompartmentů, byla nejprve provedena ko-lokalizace NS5 pomocí Anti-FLAG společně s markery pro mitochondrie (COX4) a endoplazmatické retikulum (Calnexin). Jádra byla obarvena pomocí DAPI. V případě transfekce č. 3 byl NS5 detekován samostatně přímo pomocí protilátky Anti-NS5 (4) vyrobené v Laboratoři aplikované biochemie na PřF JU.

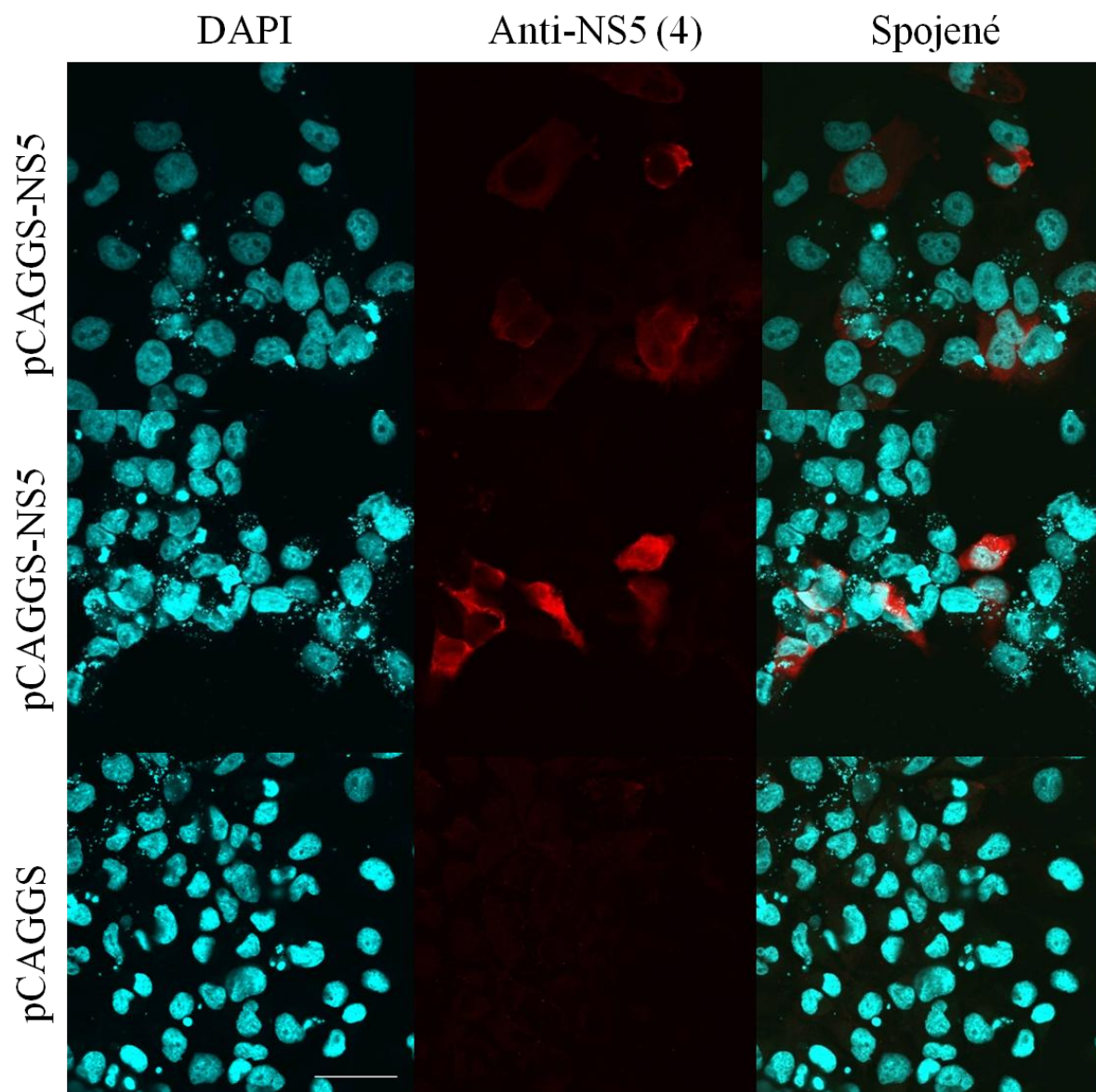
Na Obr. 12 (ko-lokalizace COX4 a NS5-FLAG), Obr. 13 (ko-lokalizace Calnexinu a NS5-FLAG) a Obr. 14 (lokalizace NS5) jsou zobrazeny reprezentativní výsledky ze dvou biologických opakování, přičemž pro každé opakování bylo zdokumentováno 10-20 snímků pro každou variantu. Výsledky ukazují na významnou lokalizaci v endoplazmatickém retikulu se sporadickou jadernou lokalizací.



Obrázek 12: Transfekce č. 1: Buňky DAOY HTB-186 byly transfekovány plasmidy pCAGGS-NS5 a pCAGGS a fixovány po 24 hodinách. Následně byla provedena imunodetekce mitochondriálním markerem COX4 a NS5-FLAG. Zvětšení 60× a měřítko 250 μm.



Obrázek 13: Transfekce č. 2: Buňky DAOY HTB-186 byly opět transfekovány plasmidy pCAGGS-NS5 a pCAGGS a fixovány po 24 hodinách. Imunodetekce v případě transfekce č. 2 byla provedena markerem cytoplazmatického retikula Calnexinem a NS5-FLAG. Zvětšení 60× a měřítko odpovídá 250 μm.



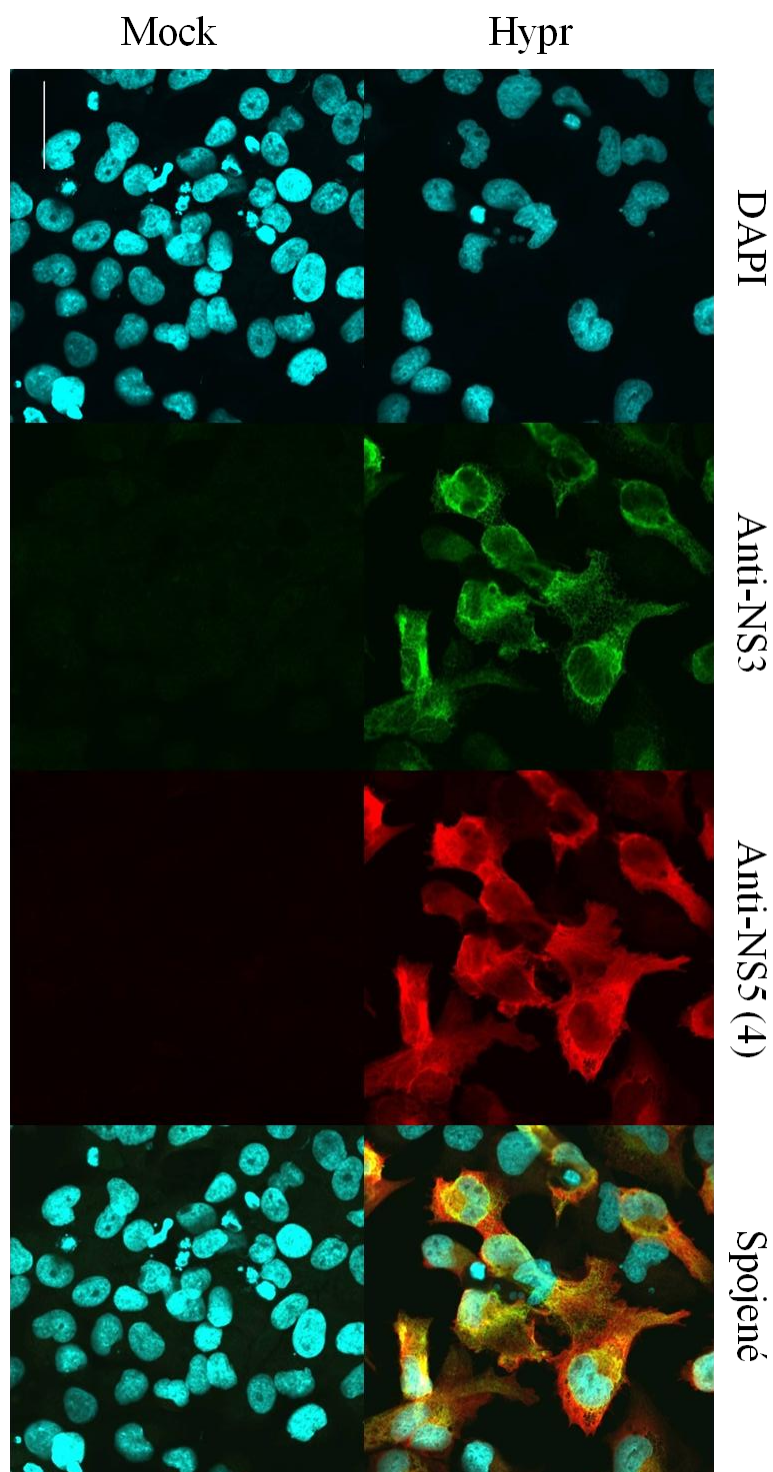
Obrázek 14: Transfekce č. 3: Buňky DAOY HTB-186 byly transfekovány plasmidy pCAGGS-NS5 a pCAGGS a fixovány po 24 hodinách. Imunodetekce NS5 byla provedena primární protilátkou Anti-NS5 (4). První řádek na Obr. 14 znázorňuje Anti-NS5 (4) po inkubaci přes noc při 4 °C a druhý řádek inkubaci jednu hodinu při pokojové teplotě. Zvětšení 60× a měřítko odpovídá 250 μm.

5.2 Detekce TBEV NS5 v infikovaných buňkách pomocí konfokální mikroskopie

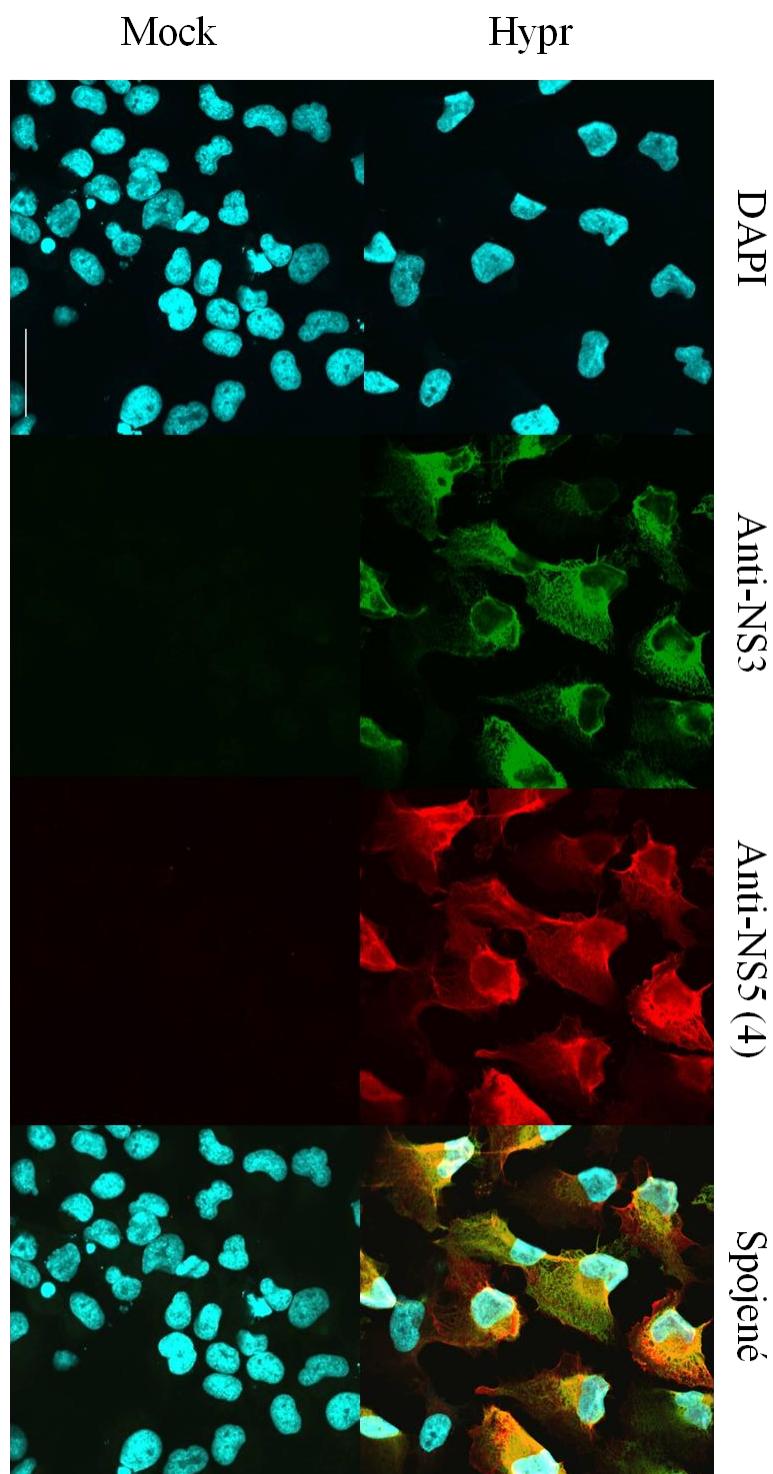
Detekce TBEV NS5 v infikovaných buňkách byla provedena ve dvou biologických opakováních a pro obě opakování byl počet nasazených buněk 15 000 na jamku. Inkubace primární protilátkou Anti-NS5 (4) trvala buďto přes noc při 4 °C, anebo 1 hodinu při pokojové teplotě (shodné podmínky jako v případě transfekce č. 3).

Hodnoty intenzit laserů na konfokálním mikroskopu a následné upravování signálu bylo provedeno opět se stejnými hodnotami pro všechny vzorky. Jádra byla standardně obarvena pomocí DAPI. Aby došlo k potvrzení specifity protilátek proti NS5, byla provedena současně detekce dalšího virového proteinu NS3, který se společně s NS5 podílí na tvorbě replikačního komplexu. Reprezentativní výsledky ko-lokalizace proteinu NS3 pomocí Anti-NS3 protilátky a proteinu NS5 pomocí Anti-NS5 (4) primární protilátky jsou zaznamenány na Obr. 15 (inkubace primární protilátky přes noc při 4°C), Obr. 16 (inkubace primární protilátky 1 h při pokojové teplotě) a Obr. 17 (jaderná lokalizace TBEV NS5).

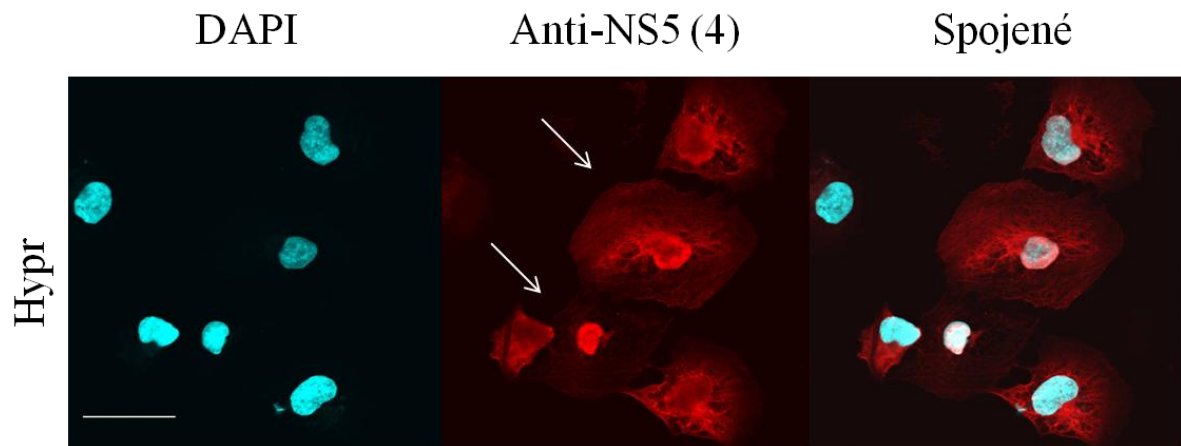
Porovnáním intenzity signálu pro TBEV NS5 na Obr. 15 a Obr. 16 jsou výsledky téměř totožné, přičemž z hlediska lokalizace opět nejvíce převažovala oblast endoplazmatického retikula (jak u NS5, tak i NS3). V rámci detekce TBEV NS5 v infikovaných buňkách byly zaznamenány případy buněk s téměř výlučně jadernou lokalizací (Obr. 17), jednalo se však pouze o jednotky buněk. Signál pro NS5 a NS3 se dle očekávání z větší části překrýval, neboť, jak již bylo řečeno, oba proteiny tvoří společně replikační komplex v rámci invaginací membrán endoplazmatického retikula.



Obrázek 15: Infekce č. 1: Buňky DAOY HTB-186 byly infikovány TBEV (kmen Hypr) a jako negativní kontrola byla použita mozková suspenze z neinfikovaných myši (Mock). Fixace proběhla 24 hodin po infekci a inkubace primárními protilátkami (Anti-NS5 (4) a Anti-NS3) probíhala přes noc při 4 °C. Zvětšení 60× a měřítko odpovídá 250 μm.



Obrázek 16: Infekce č. 2: Buňky DAOY HTB-186 byly infikovány TBEV (kmen Hypr) a jako negativní kontrola byla použita mozková suspenze z neinfikovaných myši (Mock). Fixace proběhla 24 hodin po infekci a inkubace primárními protilátkami (Anti-NS5 (4) a Anti-NS3) probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě. Zvětšení 60× a měřítko odpovídá 250 μm.



Obrázek 17: Jaderná lokalizace NS5: Buňky DAOY HTB-186 byly infikovány TBEV (kmen Hypr) a jako negativní kontrola byla použita mozková suspenze z neinfikovaných myší (Mock). Fixace proběhla 24 hodin po infekci a inkubace primárními protilátkami (Anti-NS5 (4) a Anti-NS3) probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě. Zvětšení 60× a měřítko odpovídá 250 μm . Signál pro NS5 je zaznamenán i v oblastech jader značených pomocí DAPI, což může naznačovat jadernou lokalizaci tohoto proteinu.

5.3 Kvantifikace fluorescenčního signálu pro TBEV NS5 v jádře a cytoplazmě

Pro detailnější analýzu jaderné lokalizace proteinu NS5 v závislosti na přítomnosti virových faktorů byla kvantifikována intenzita fluorescence v rámci cytoplazmy a jádra u transfekovaných i infikovaných buněk, a to za použití programu ImageJ. K výpočtu celkové fluorescence buňky (CTCF) byl použit níže uvedený vzorec, kde IntDen označuje integrovanou hustotu, Area se rovná ploše vybraného objektu a Mean je průměr naměřených hodnot na pozadí:

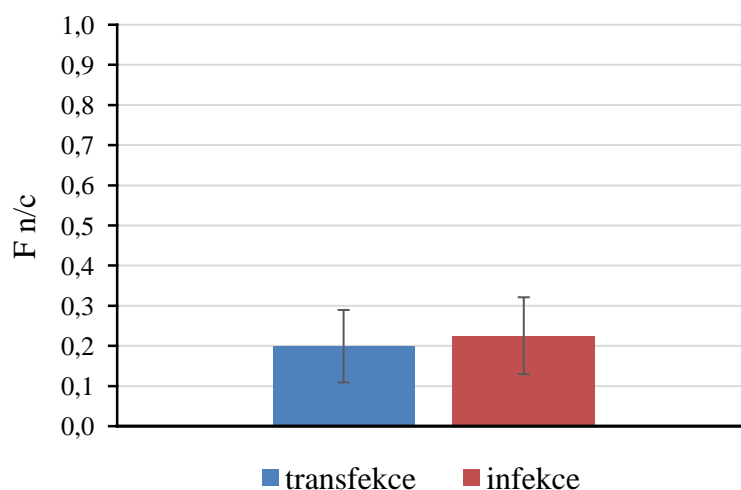
$$CTCF_c = \text{IntDen} - (\text{Area}_{\text{whole cell}} \times \text{Mean})$$

$$CTCF_n = \text{IntDen} - (\text{Area}_{\text{nucleus}} \times \text{Mean})$$

Byla provedena kvantifikace fluorescenčního signálu pro celou buňku (CTCF_c) a pouze jádro (CTCF_n), přičemž cytoplazmatický signál byl vypočítán rozdílem hodnot pro CTCF_c a CTCF_n:

$$CTCF_{\text{cyt}} = CTCF_c - CTCF_n$$

Fluorescenční signál byl měřen u stejného množství transfekovaných i infikovaných buněk a z poměru střední hodnoty fluorescence (F) jádra a cytoplazmy (F n/c) byl sestrojen graf na Obr. 18.



Obrázek 18: Střední hodnota fluorescence: Graf na Obr. 18 shrnuje výpočty poměrů střední hodnoty fluorescence (F) jádra a cytoplazmy u transfekovaných (modré označení, n = 20) a infikovaných (červené označení, n = 20) buněk.

5.4 Subcelulární frakcionace a SDS-PAGE

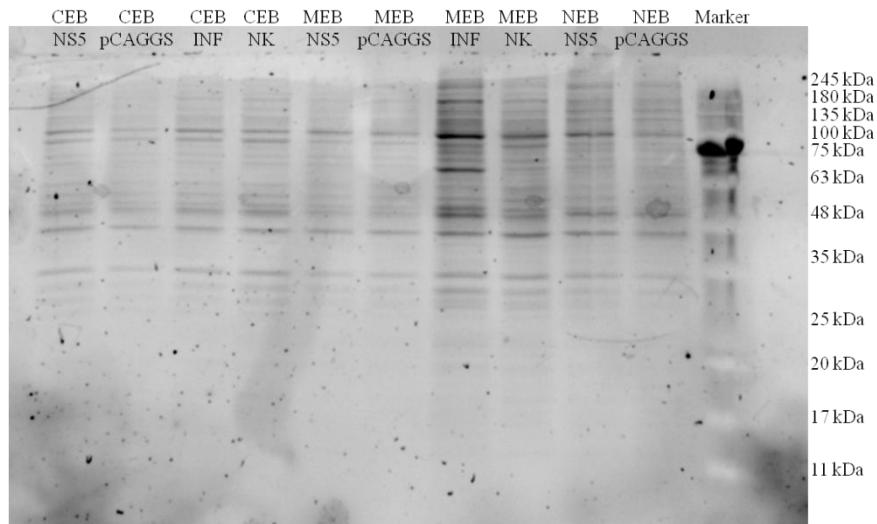
Pro potvrzení výsledků lokalizace TBEV NS5 z konfokální mikroskopie byla následně provedena detekce TBEV NS5 v subcelulárních frakcích získaných z infikovaných i transfekovaných buněk. Tato metoda spočívala v přípravě jednotlivých cytoplazmatických, membránových, rozpustných jaderných, chromatinově vázaných a cytoskeletálních proteinových extraktů pomocí pufrů pro jednotlivé buněčné frakce (CEB, MEB, NEB, NEB+, PEB).

Subcelulární frakcionace byla provedena ve třech biologických opakováních a celkem bylo vytvořeno vždy 5 vzorků pro jednotlivé varianty:

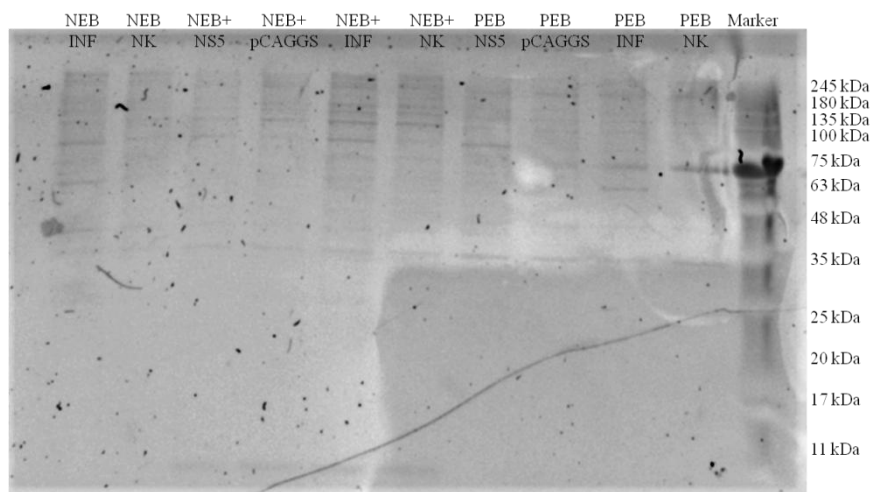
- 1) transfekci plasmidem pCAGGS-NS5
- 2) transfekci plasmidem pCAGGS
- 3) infekci TBEV (kmen Hypr)
- 4) infekci negativní kontrolou (Mock)

Dohromady bylo vygenerováno 20 vzorků pro jedno biologické opakování a separace proteinových extraktů z jednotlivých frakcí byla provedena metodou SDS-PAGE, která probíhala ve 12% polyakrylamidových gelech. Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena pomocí BCA metody (viz Kap. 4.5). Byla změřena absorbance, vytvořena kalibrační křivka (BSA standardy) a dopočítána přesná koncentrace jednotlivých vzorků. Množství proteinů nanesených na jamku bylo vždy 4 000 ng a celkový objem vzorku na jednu jamku činil 15 μ l.

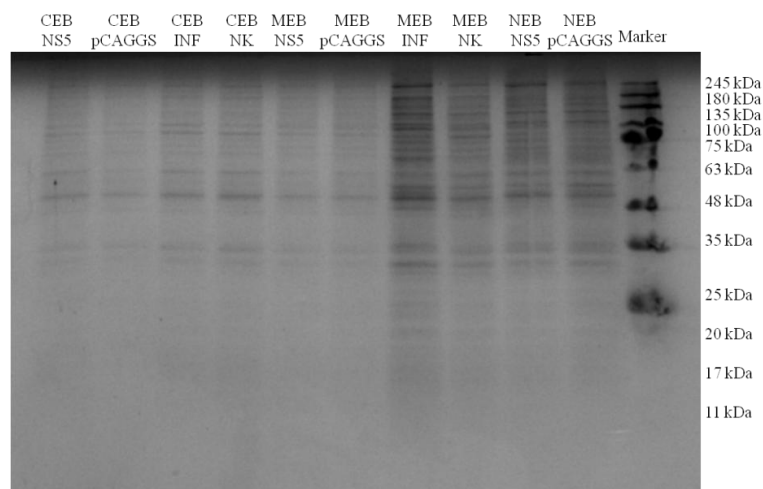
Proteiny separované metodou SDS-PAGE byly nejprve analyzovány na úspěšnost separace pomocí fluorescence TCE navázaného na proteiny (Obr. 19 a 20). Analýza separace a úspěšnost blotování byly poté ověřeny barvením proteinů v gelu pomocí PageBlue Protein Staining Solution, které bylo provedeno po blotování. Výsledky jsou zaznamenány na Obr. 21 a 22.



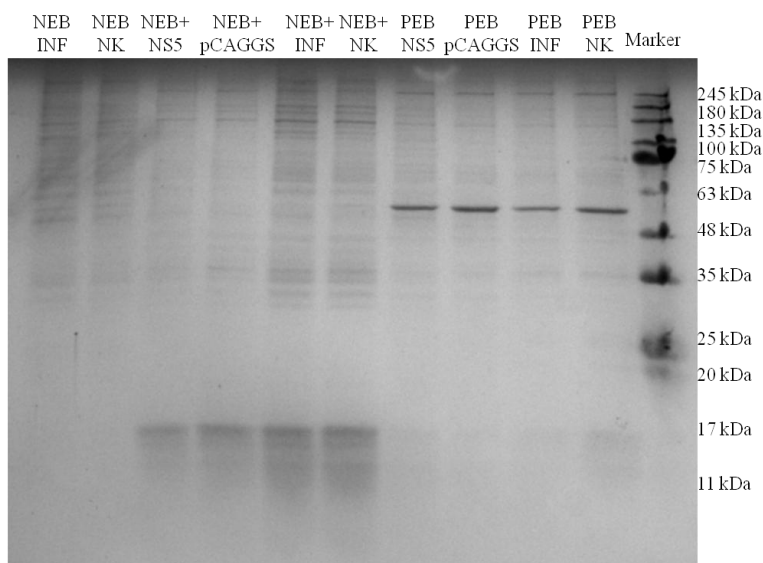
Obrázek 19: Separace gelu č. 1, vyvolávání signálu TCE: Separované vzorky cytoplazmatického extraktu (CEB), membránového extraktu (MEB) a poloviny vzorků jaderného extraktu (NEB). NS5 značí vzorky transfekované plasmidem pCAGGS-NS5, pCAGGS označuje vzorky transfekované pouze pCAGGS, INF značí vzorky infikované kmenem TBEV Hypr a NK označuje vzorky infikované Mock. Použitý marker (Protein Marker VI (10-245) prestained) je viditelný na konci řady.



Obrázek 20: Separace gelu č. 2, vyvolávání signálu TCE: Separované vzorky druhé poloviny jaderného extraktu (NEB), chromatinově vázaného extraktu (NEB+) a cytoskeletálního extraktu (PEB). NS5 značí opět vzorky transfekované plasmidem pCAGGS-NS5, pCAGGS označuje vzorky transfekované pouze pCAGGS, INF značí vzorky infikované kmenem TBEV Hypr a NK označuje vzorky infikované Mock. Použitý marker (Protein Marker VI (10-245) prestained) je viditelný na konci řady.



Obrázek 21: PageBlue barvený gel č. 1: Separované vzorky cytoplazmatického extraktu (CEB), membránového extraktu (MEB) a poloviny vzorků jaderného extraktu (NEB). NS5 značí opět vzorky transfekované plasmidem pCAGGS-NS5, pCAGGS označuje vzorky transfekované pouze pCAGGS, INF značí vzorky infikované kmenem TBEV Hypr a NK označuje vzorky infikované Mock. Použitý Protein Marker VI (10-245) prestained je viditelný opět na konci řady.

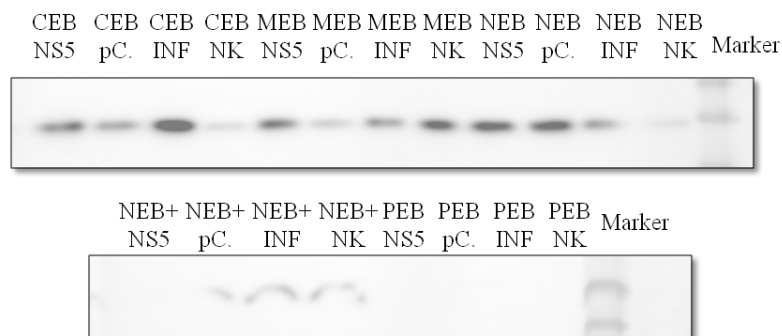


Obrázek 22: PageBlue barvený gel č. 2: Separované vzorky druhé poloviny jaderného extraktu (NEB), chromatinově vázaného extraktu (NEB+) a cytoskeletálního extraktu (PEB). NS5 značí vzorky transfekované plasmidem pCAGGS-NS5, pCAGGS označuje vzorky transfekované pouze pCAGGS, INF značí vzorky infikované kmenem TBEV Hypr a NK označuje vzorky infikované Mock. Protein Marker VI (10-245) prestained) je umístěn opět na konci řady.

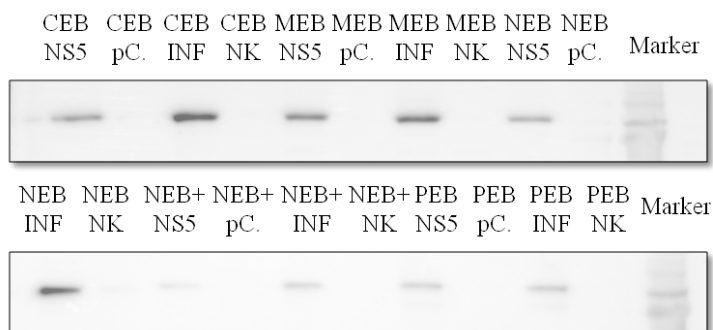
5.5 Western blot (WB)

Metoda WB byla použita k detekci TBEV NS5 v rámci jednotlivých subcelulárních frakcí, přičemž kromě lokalizace NS5 byla zjišťována také lokalizace proteinu GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza). GAPDH je enzym o velikosti přibližně 37 kDa, který tvoří základní složku glykolytické dráhy, kdy katalyzuje zejména izomeraci glyceraldehyd-3-fosfátu na 1,3-bisfosfoglycerát (Jakubovics et al., 2014). GAPDH byl použit především jako cytosolický marker a jako kontrola množství nanesených vzorků v případě cytoplazmatické frakce (Johnson, 2012).

Veškeré pokusy byly provedeny ve třech biologických opakováních. Výsledky lokalizace GAPDH jsou zaznamenány na Obr. 23 a výsledky lokalizace TBEV NS5 na Obr. 24.



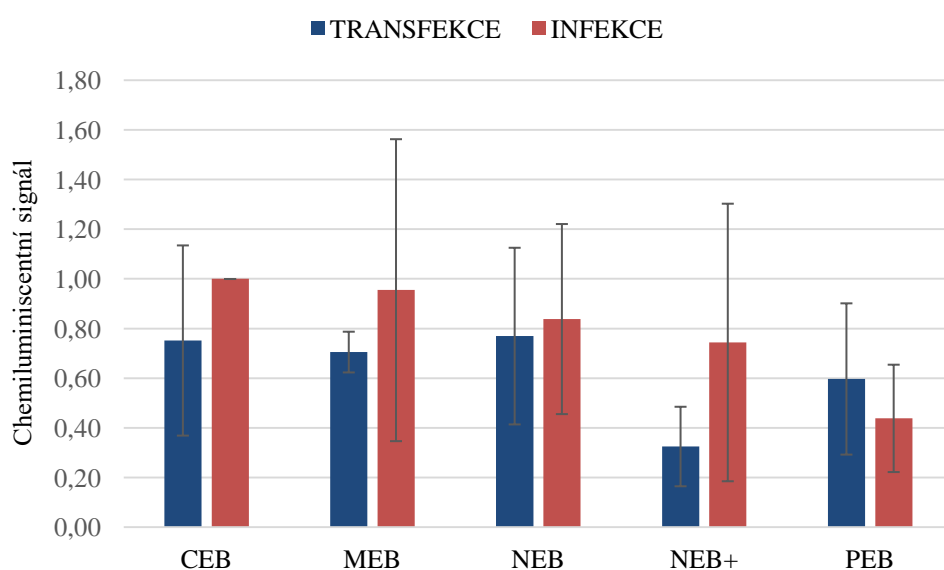
Obrázek 23: Western blot 1: Detekce GAPDH po inkubaci s primární protilátkou Anti-GAPDH a sekundární protilátkou Anti-Rabbit-HRP. CEB označuje cytoplazmatické frakce, MEB membránové frakce, NEB značí jaderné frakce, NEB+ chromatinově vázané frakce a PEB frakce cytoskeletální. NS5 značí vzorky transfekované plasmidem pCAGGS-NS5, pC. označuje vzorky transfekované pouze pCAGGS, INF značí vzorky infikované kmenem TBEV Hypr a NK označuje vzorky infikované Mock.



Obrázek 24: Western blot 2: Detekce NS5 po inkubaci s primární protilátkou Anti-NS5 (4) a sekundární protilátkou Anti-Guinea Pig-HRP. CEB označuje cytoplazmatické frakce, MEB membránové frakce, NEB značí jaderné frakce, NEB+ chromatinově vázané frakce a PEB cytoskeletální frakce. NS5 značí vzorky transfekované plasmidem pCAGGS-NS5, pC. označuje vzorky transfekované pouze pCAGGS, INF značí vzorky infikované kmenem TBEV Hypr a NK označuje vzorky infikované Mock.

5.6 Kvantifikace chemiluminiscentního signálu pomocí programu ImageJ

Pro detailnější porovnání lokalizace TBEV NS5 v rámci jednotlivých buněčných frakcí byl chemiluminiscentní signál kvantifikován u všech biologických opakování pomocí programu ImageJ. Vstupní množství proteinu v každém vzorku bylo totožné (4 000 ng), z tohoto důvodu jsme neprovedli žádnou další normalizaci. Z jednotlivých průměrů byl poté sestrojen graf na Obr. 25 zachycující relativní hodnoty vztažené k signálu CEB INF (100% = 1,00). Signál pro NS5 byl detekován ve všech frakcích, avšak nejvíce ve frakcích CEB, MEB a NEB, přičemž hodnoty mezi procesem transfekce a infekce se neliší.



Obrázek 25: Kvantifikace chemiluminiscentního signálu pro NS5: Graf na Obr. 25 zachycuje relativní hodnoty vztažené k signálu CEB INF (ten brán jako 1). Transfekce plasmidem pCAGGS-NS5 je označena modře a infekce TBEV Hypr červeně. Na svislé ose jsou uvedeny naměřené hodnoty signálů a názvy na vodorovné ose značí jednotlivé frakce: cytoplazmatická frakce (CEB), membránová frakce (MEB), jaderná frakce (NEB), frakce vázaná na chromatin (NEB+) a cytoskeletální frakce (PEB).

6 Diskuze

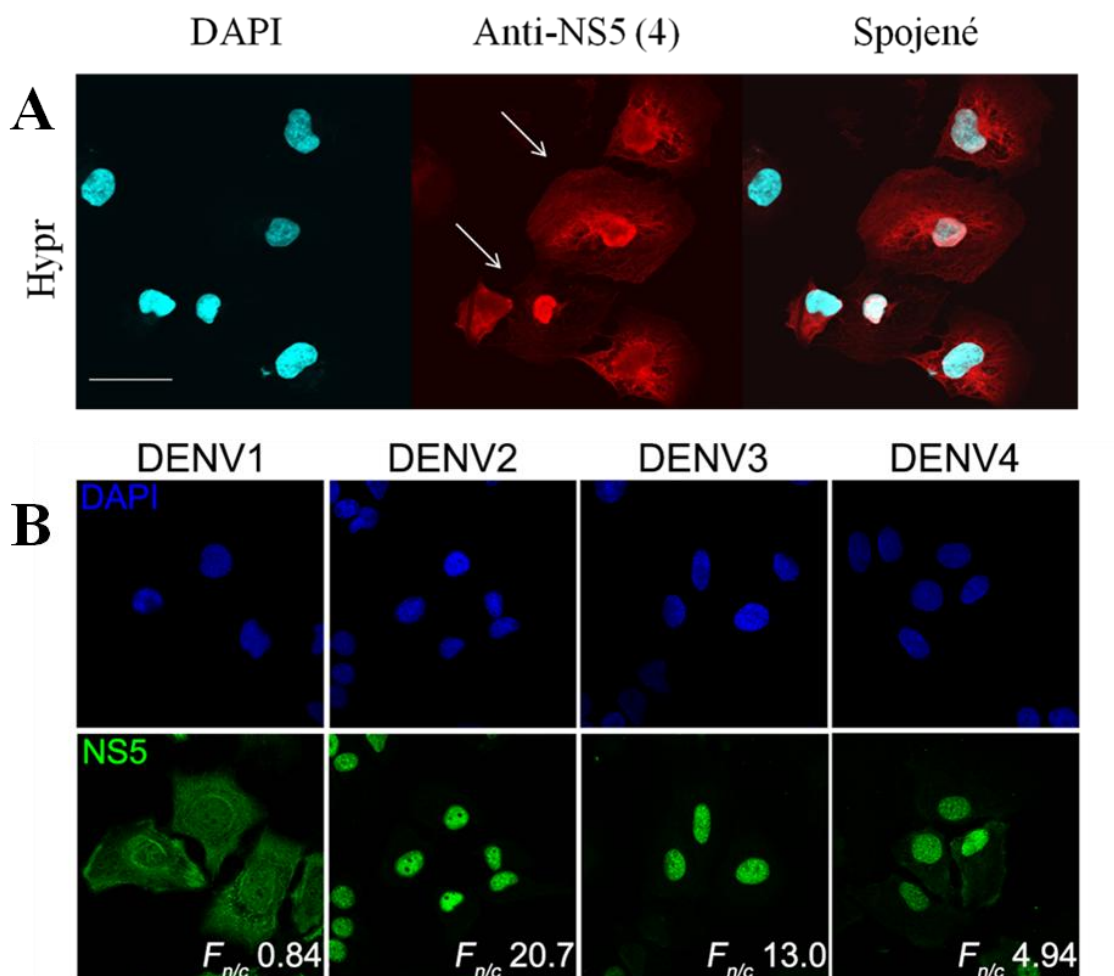
TBEV (čeleď *Flaviviridae*) způsobuje onemocnění centrálního nervového systému známé jako TBE. Do čeledi *Flaviviridae* spadají společně s TBEV i jiné celosvětově rozšířené viry jako například DENV, virus Zika či virus žluté zimnice (Simmonds et al., 2017). Každoročně je hlášeno přibližně 10 000 případů TBE po celém světě a v současné době neexistuje žádná specifická léčba, nemoci lze pouze zabránit aktivní imunizací (Orlíková et al., 2020). Vzhledem k hlavní roli při flavivirové replikaci by mohl NS5 protein představovat jeden z možných cílů pro návrh antivirotik a údaje získané v rámci této práce by mohly pomoci v dalším výzkumu.

Flavivirový protein NS5 obsahuje dvě funkční domény s enzymatickou aktivitou, a to N-terminální metyltransferázovou doménu (MTáza) a C-terminální RNA-dependentní RNA polymerázovou doménu (RdRPD) (Best, 2017). RdRPD dále obsahuje lokalizační sekvence nezbytné pro interakce s jinými virovými a hostitelskými proteiny, například s proteinem NS3 (RNA helikáza), který se společně s proteinem NS5 podílí na tvorbě replikačního komplexu (Dwivedi et al., 2017). Předpokládá se, že většina funkcí tohoto proteinu probíhá v cytoplazmě, konkrétně v membránových soustavách endoplazmatického retikula, kde dochází k replikaci a tvorbě nových virionů (Hulo et al., 2011). U DENV však byla překvapivě dokumentována migrace proteinu NS5 do jádra, ovšem bez jasné role v replikaci nebo patogenezí (Tay et al., 2016).

Detekce proteinu TBEV NS5 v transfekovaných buňkách byla již experimentálně provedena (Werme et al., 2008, Zheng et al., 2018). V obou pracích NS5 protein lokalizoval výhradně v rámci cytoplazmy. Nicméně vzhledem k absenci jakýchkoliv dat v rámci infikovaných buněk bylo cílem této práce charakterizovat lokalizaci TBEV NS5 v transfekovaných (pCAGGS-NS5) a infikovaných lidských neurálních buňkách DAOY HTB-186.

Za použití programu cNLS Mapper (Kosugi et al., 2009) byl predikován NLS i v rámci TBEV NS5 (kmen Hypr). Jako pozitivní kontrola pro predikci NLS byl použit DENV-2 NS5, u něhož byla jaderná lokalizace experimentálně potvrzena (Tay et al., 2016). cNLA Mapper identifikoval celkem 10 možných NLS sekvencí v rámci DENV-2 NS5, zatímco pro TBEV NS5 byly identifikovány pouze dvě (Tab. I a II), přičemž aminokyselinové sekvence predikovaných NLS pro TBEV a DENV-2 NS5 nebyly shodné. Tato data indikovala možnou jadernou lokalizaci pro TBEV NS5, a proto bylo rozhodnuto toto zjištění experimentálně ověřit.

Dle výsledků imunodetekce a následné konfokální mikroskopie byla lokalizace proteinu TBEV NS5 v rámci transfekovaných (pCAGGS-NS5) i infikovaných (TBEV Hypr) buněk převážně cytoplazmatická (F n/c poměry 0,20 a 0,23). Výlučně jaderná lokalizace byla zaznamenána pouze u procesu infekce, a to v řádu jednotek buněk. Naproti tomu lokalizace DENV NS5 analyzovaná v práci Tay et al. (2016) poukázala na téměř výlučně jadernou lokalizaci pro sérotypy DENV-2, DENV-3 a DENV-4 (F n/c 20,7, 13,0 a 4,94, viz Obr. 26). Dalším zajímavým zjištěním v rámci zmiňované studie byla naprosto rozdílná lokalizace pro sérotyp DENV-1, kdy, podobně jako v případě TBEV, NS5 lokalizoval převážně v cytoplazmě.



Obrázek 26: Porovnání lokalizace TBEV NS5 a DENV NS5: Na horním obrázku (A) je vidět cytoplazmatická a jaderná lokalizace NS5 u TBEV (kmen Hypr). Zvětšení 60× a měřítko odpovídá 250 μm. Dolní obrázek (B) ukazuje převážně cytoplazmatickou lokalizaci NS5 u DENV-1 a jadernou lokalizaci NS5 u DENV-2, DENV-3 a DENV-4 (Tay et al., 2016).

Pro potvrzení pozorované jaderné lokalizace TBEV NS5 bylo přistoupeno k detekci TBEV NS5 v jednotlivých organelárních frakcích pomocí metody subcelulární frakcionace, a to v rámci transfekovaných i infikovaných buněk. Separace proteinových extraktů z jednotlivých frakcí poté probíhala metodou SDS-PAGE a detekce cílových proteinů byla provedena pomocí WB, kde byly detekovány proteiny GAPDH a TBEV NS5.

GAPDH byl použit primárně jako cytosolický marker pro ověření čistoty jednotlivých frakcí (Johnson, 2012), zejména pak jaderné a cytoplazmatické. Výsledky lokalizace GAPDH byly poměrně překvapivé, jelikož signál pro GAPDH byl zaznamenán ve všech frakcích s výjimkou PEB (cytoskeletární frakce). Kromě očekávaných cytoplazmatických frakcí byl GAPDH zaznamenán zejména ve frakcích jaderných (Obr. 23). Tato skutečnost by mohla být způsobena faktem, že GAPDH kromě své role v glykolýze iniciuje také kaskádu programované buněčné smrti - apoptózy (Sen et al., 2008). Bylo zjištěno, že ve stresových podmínkách mohou apoptotické podněty aktivovat iNOS (indukovatelná NO syntáza), která nitrosyluje GAPDH, a tím aktivuje jeho import do jádra (Sen et al., 2008). V jádře GAPDH stimuluje aktivitu acetyltransferázy p300/CREB, což vede k aktivaci exprese pro-apoptického genu p53 (Sen et al., 2008). Jelikož proces transfekce i infekce může být tímto stresovým faktorem, není použití GAPDH jako cytosolického markeru pravděpodobně příliš vhodné. Alternativními možnostmi pro příští použití by mohly být například cytoskeletární proteiny vimentin, desmin nebo β -tubulin.

Kromě této proapoptické funkce GAPDH, spuštěné transfekcí či infekcí, je další možností rovněž kontaminace cytoplazmatickou frakcí v rámci ostatních analyzovaných frakcí. Tato možnost je ale vzhledem ke stabilnímu signálu v rámci frakcí MEB a NEB méně pravděpodobná, neboť v případě kontaminace by intenzita signálu pro GAPDH měla v průběhu přípravy frakcí klesat (CEB > MEB > NEB > NEB+ > PEB).

Také bylo zjištěno, že GAPDH ko-lokalizuje s virovou RNA polymerázou (NS5) v buňkách infikovaných virem japonské encefalitidy, která mění jeho subcelulární lokalizaci, což by mohlo naznačovat replikační funkci tohoto enzymu (Yang et al., 2009).

TBEV NS5 byl detekován ve všech subcelulárních frakcích, a to v rámci transfekovaných i infikovaných buněk. Poměrně silný signál v jaderných frakcích podpořil hypotézu jaderné lokalizace TBEV NS5. Většina funkcí tohoto proteinu spojená s replikací viru probíhá v cytoplazmě na membránách endoplazmatického retikula (Hulo et al., 2011), tudíž signály u těchto frakcí byly předpokládány.

I přes intenzivní výzkum není význam jaderné lokalizace NS5 stále plně objasněn. Podle předchozích výzkumů u příbuzných virů (např. Usutu virus) by mohla jaderná lokalizace souviset například s interakcí s buněčnými transkripčními faktory, které ovlivňují expresi několika hostitelských genů ve prospěch virové replikace (Albentosa-González et al., 2020). U DENV by zase jaderná lokalizace mohla dle studie De Maio et al. (2016) souviset se změnami v alternativním splicingu a u viru Zika bylo prokázáno, že jaderná lokalizace proteinu NS5 se podílí převážně na potlačení interferonového regulačního faktoru 3 (IRF3) zprostředkovaného aktivací transkripce a inhibice IFN- α , což naznačuje, že subcelulární lokalizace NS5 může být důležitá také pro funkci NS5 proteinu při vrozené imunitní supresi (Zhao et al., 2019).

V této práci byla popsána lokalizace TBEV NS5 v infikovaných a transfekovaných buňkách DAOY HTB-186, která byla převážně cytoplazmatická. Konkrétně byl NS5 protein exprimován především na membránách endoplazmatického retikula. Zajímavým zjištěním byla i jaderná lokalizace, kterou podporují získaná data z konfokální mikroskopie i subcelulární frakcionace. Je ovšem pravdou, že v porovnání s DENV-2 dochází pouze k částečné jaderné lokalizaci, nikoliv většinové. Budoucí experimenty tedy mohou být zaměřeny například na zjištění funkce TBEV NS5 v jádře nebo na prozkoumání jeho nereplikačních funkcí, což by mohlo výrazně přispět k lepšímu pochopení patogeneze TBEV.

7 Závěr

V této práci se podařilo lokalizovat protein TBEV NS5 v rámci lidské meduloblastomové linie DAOY HTB-186, a to jak v případě infekce, tak za použití savčího expresního konstruktů pCAGGS-NS5. Ko-lokalizace TBEV NS5 v rámci transfekovaných buněk v kombinaci s markery pro jednotlivé buněčné orgány byla vyhodnocena především jako cytoplazmatická na membránách endoplazmatického retikula. V případě infekce byla pozorována ko-lokalizace virových proteinů TBEV NS3 a NS5 v rámci endoplazmatického retikula a zároveň byla v pár případech zaznamenána také jaderná lokalizace TBEV NS5. Subcelulární frakcionace odhalila přítomnost TBEV NS5 ve všech analyzovaných frakcích (cytoplazmatická, membránová, jaderná, chromatinově vázaná i cytoskeletální), přičemž žádná z frakcí jednoznačně nepřevažovala.

8 Seznam použitých zkratek

Blank	slepý vzorek
Calnexin	marker endoplazmatického retikula
CEB	cytoplazmatický extrakční pufr
COX4	mitochondriální marker
C protein	kapsidový protein
CTCF	celková fluorescence buňky
DAPI	montovací médium
DENV	virus dengue
E protein	hlavní obalový protein
F	střední hodnota fluorescence
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
HRP	křenová peroxidáza
INF- α	interferon typu I
IRF3	interferonový regulační faktor 3
MEB	membránový extrakční pufr
Mock	mozková suspenze z neinfikovaných myší
M protein	membránový protein
MTáza	methyltransferáza
NEB	jaderný extrakční pufr
NEB+	extrakční pufr pro jaderné proteiny vázaný na chromatin
NLS	jaderný lokalizační signál

PBS	pufrovaný fyziologický roztok
PBS-T	pufrovaný fyziologický roztok obsahující Tween
PEB	pelet extrakční pufr
PVDF	polyvinylidendifluorid
RdRP	RNA-dependentní RNA polymeráza
RdRPD	doména RdRp
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová elektroforéza
TCE	2,2,2-trichlorethanol
TBE	klíšťová encefalitida
TBEV	virus klíšťové encefalitidy
WB	Western blot

9 Seznam použitých zdrojů

- Albentosa-González L., Clemente-Casares P., Sabariego R., Mas A. (2020): Polymerase activity, protein-protein interaction, and cellular localization of the Usutu virus NS5 protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64: e01573-19.
- Best S. M., Morris K. L., Shannon J. G., Robertson S. J., Mitzel D. N., Park G. S., Boer E., Wolfenbarger J. B., Bloom M. E. (2005): Inhibition of Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling by a Tick-Borne Flavivirus and Identification of NS5 as an Interferon Antagonist. *Journal of Virology* 79(20): 12828-12839, doi:10.1128/JVI.79.20.12828-12839.
- Best S. M. (2017): The many faces of the flavivirus NS5 protein in antagonism of type I interferon signaling. *Journal of Virology* 91: e01970-16.
- Bhandari B. (2017): Western Blot Technique: Principle, Procedures and Uses. *Learn Microbiology Online*, <https://microbeonline.com>.
- Bogovič P., Strle F. (2017): Tick-Borne Encephalitis. ISBN 978-953-51-3471-8.
- Chatrin Ch., Talapatra S., Canard B., Kozielski F. (2017): The structure of the binary methyltransferase-SAH complex from Zika virus reveals a novel conformation for the mechanism of mRNA capping. *Oncotarget* 9(10): 18632/oncotarget.23223.
- De Maio F. A., Risso G., Iglesias N. G., Shah P., Pozzi B., Gebhard L. G., Mammi P., Mancini E., Yanovsky M. J., Andino R., Krogan N., Srebrow A., Gamarnik A. V. (2016): The Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and Modulates Splicing. *PLoS Pathog* 12(8): e1005841, doi:10.1371/journal.ppat.1005841.
- Dwivedi V. D., Tripathi I. P., Tripathi R. Ch., Bharadwaj S., Mishra S. K. (2017): Genomics, proteomics and evolution of dengue virus. *Briefings in Functional Genomics* 1–11.
- Ecker M., Allison S. L., Meixner T., Heinz F. X. (1999): Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology* 80: 179-185.

- Gaunt M.W., Sall A.A., de Lamballerie X., Falconar A.K.I., Dzhivanian T.I., Gould E.A. (2001): Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography, *Journal of General Virology* 82: 1867-1876.
- Goodsell D. S. (2008): Molecule of the Month: Dengue Virus. *Educational portal of PDB-101*, doi: 10.2210/rcsb_pdb/mom_2008_7.
- Gough N. R. (2008): Nuclear GAPDH Triggers Apoptosis. *Science Signaling* 1(27): ec247, doi: 10.1126/scisignal.127ec247.
- Griesemer S., Kramer L., Van Slyke G., Pata J., Gohara D., Cameron C., Ciota A. (2016): Mutagen resistance and mutation restriction of St. Louis encephalitis virus. *The Journal of general virology* 98, doi: 10.1099/jgv.0.000682.
- Gritsun T. S., Gould E. A. (2014): Tick-borne Encephalitis Viruses. *Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier*, ISBN 9780128012383.
- Gritsun T. S., Lashkevich V. A., Gould E. A. (2003): Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research* 57: 129-146.
- Guerrant R. L., Walker D. H., Weller P. F. (2011): Tropical Infectious Diseases. *Saunders* 1156 p., ISBN 978-0-7020-3935-5.
- Hulo C., De Castro E., Masson P., Bougueleret L., Bairoch A., Xenarios I., Le Mercier P. (2011): ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *ExPASy – SIB Bioinformatics Resource Portal*, database issue: D576-82.
- Holbrook M.R. (2017): Historical Perspectives on Flavivirus Research. *Viruses* 9(5): 97.
- Jacobsen P. F., Jenkyn D. J., Papadimitriou J. M. (1985): Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 44(5): 472-85, doi: 10.1097/00005072-198509000-00003.
- Jakubovics N. S., Yassin S. A., Rickard A. H. (2014): Chapter Two - Community Interactions of Oral Streptococci, *Advances in Applied Microbiology. Academic Press* 87: 43-110, ISBN 9780128002612.
- Ji W., Luo G. (2020): Zika virus NS5 nuclear accumulation is protective of protein degradation and is required for viral RNA replication. *Virology* 541: 124-135.

- Johnson M. (2012): Loading Controls for Western Blots. *MATER METHODS* 2:114, doi: //dx.doi.org/10.13070/mm.en.2.114.
- Kaiser R. (2008): Tick-borne encephalitis. *Infectious disease clinics of North America* 22(3): 561-575.
- Kaiser R. (2016): Tick-borne encephalitis. *Nervenarzt* 87(6): 667-80.
- Kosugi S., Hasebe M., Tomita M., Yanagawa H. (2009): Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 10171-10176.
- Kumar A., Bühler S., Selisko B., Davidson A., Mulder K., Canard B., Miller S., Bartenschlager R. (2013): Nuclear Localization of Dengue Virus Nonstructural Protein 5 Does Not Strictly Correlate with Efficient Viral RNA Replication and Inhibition of Type I Interferon Signaling. *Journal of Virology* 87(8): 4545-4557.
- Ladner C. L., Yang J., Turner R. J., Edwards R. A. (2004): Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal Biochem* 326(1): 13-20, doi: 10.1016/j.ab.2003.10.047.
- McLachlan N.J., Dubovi E.J. (2016): Fenner's veterinary virology. *Academic Press* 602 p., ISBN 978-0-12-800946-8.
- Orlíková H., Lenz P., Kynčl J. (2020): Klíšťová encefalitida v České republice v roce 2019 – zpráva o epidemiologické situaci v kontextu předcházejících let. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 29(5): 211-219.
- Payne S. (2017): Family Flaviviridae. *Viruses* 15: 129-139, ISBN 9780128031094.
- Plotkin S. A., Orenstein W. A., Offit P., Edwards K. M. (2018): Plotkin's Vaccines (7th Edition). *Elsevier* 1720 p., ISBN 978-0-323-35761-6.
- Pulkkinen L., Butcher S., Anastasina M. (2018): Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View. *Viruses* 10, 350 p.
- Růžek D., Avšič-Županc T., Bordered J., Chrdle A., Eyera L., Karganovah G., Kholodilov I., Knap N., Kozlovskaya L., Matveev A., Miller A. D., Osolodkin D. I., Överby A. K., Tikunova N., Tkachev S., Zajkowska J. (2019): Tick-borne encephalitis in Europe and

- Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Research* 164: 23-51.
- Schneider H. (1931): Uber epidemische akute Meningitis serosa. *Wiener klinische Wochenschrift* 44: 350-352.
- Selinger M., Tykalová H., Štěrba J., Věchtová P., Vavrušková Z., Lieskovská J., Kohl A., Schnettler E., Grubhoffer L. (2019): Tick-borne encephalitis virus inhibits rRNA synthesis and host protein production in human cells of neural origin. *PLoS Negl Trop Dis* 13(9): e0007745., <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007745>.
- Sen N., Hara M. R., Kornberg M. D., Cascio M. B., Bae B., Shahani N., Thomas B., Dawson T. M., Dawson V. L., Snyder S. H., Sawa A. (2008): Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 10(7): 866-73, doi: 10.1038/ncb1747.
- Simmonds P., Becher P., Bukh J., Gould E. A., Meyers G., Monath T., Muerhoff S., Pletnev A., Rico-Hesse R., Smith D. B. Stapleton J. T., ICTV Report Consortium (2017): ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology* 98: 2-3.
- Sudhindra P. (2018): The Microbiology of Central Nervous System Infections. *Academic Press* 344 p., ISBN 978-0-12-813806-9.
- Tay M. Y., Smith K., Ng I. H., Chan K. W., Zhao Y., Ooi E. E., Lescar J., Luo D., Jans D. A., Forwood J. K., Vasudevan S. G. (2016): The C-terminal 18 Amino Acid Region of Dengue Virus NS5 Regulates its Subcellular Localization and Contains a Conserved Arginine Residue Essential for Infectious Virus Production. *PLoS Pathog* 12(9): e1005886.
- Tonteri E., Kipar A., Voutilainen L., Vene S., Vaheri A., Vapalahti O., Lundkvist A. (2013): The Three Subtypes of Tick-Borne Encephalitis Virus Induce Encephalitis in a Natural Host, the Bank Vole (*Myodes glareolus*). *PLoS ONE* 8(12): e81214.
- Werme K., Wigerius M., Johansson M. (2008): Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cellular Microbiology* 10(3): 696-712.

- Yang S. H., Liu M. L., Tien C. F., Chou S. J., Chang R. Y. (2009): Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) interaction with 3' ends of Japanese encephalitis virus RNA and colocalization with the viral NS5 protein. *Journal of Biomedical Science* 16(40), doi: <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-40>.
- Zhang W., Chipman P. R., Corver J., Johnson P. R., Zhang Y., Mukhopadhyay S., Baker T. S., Strauss J. H., Rossman M. G., Kuhn R. J. (2003): Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature structural biology* 10(11): 907-912.
- Zhao Z., Tao M., Han W., Fan Z., Imran M., Cao S., Ye J. (2019): Nuclear localization of Zika virus NS5 contributes to suppression of type I interferon production and response. *Journal of General Virology*, doi: 10.1099/jgv.0.001376.
- Zheng Z., Yang J, Jiang X., Liu Y., Zhang X., Li M., Zhang M., Fu M., Hu K., Wang H., Luo M. H., Gong P., Hu Q. (2018): Tick-Borne Encephalitis Virus Nonstructural Protein NS5 Induces RANTES Expression Dependent on the RNA-Dependent RNA Polymerase Activity. *The Journal of Immunology* 201: 53-68.