

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Optimalizace metod transfekce genu pro NS2A viru
klíšťové encefalitidy do neurálních buněk a imunodetekce
jimi produkováného proteinu NS2A**

Bakalářská práce

Alžběta Průdková

Školitel: Mgr. Hana Tykalová Ph.D.

České Budějovice 2024

Prudkova A., 2024: Optimalizace metod transfekce genu pro NS2A viru klíšťové encefalidity do neurálních buněk a imunodetekce jimi produkováného proteinu NS2A. [Optimization of gene transfection methods for NS2A protein tick-borne encephalitis virus into neural cells and immunodetection of NS2A protein produced by them. Bachelor thesis, in Czech] – p 47., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation

The aim of this work is to optimize the detection methodology of the NS2A protein of tick-borne encephalitis virus by polyclonal serum derived against NS2A partial peptide. Optimisation of detection was conducted in both NS2A protein-transfected cells and TBEV Hypr-infected cells. The NS2A protein's specific signal was detected exclusively in a method that used fluorescent confocal microscopy. The NS2A protein is found in the endoplasmic reticulum, most likely in membrane vesicles.

Čestné prohlášení

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

České Budějovice, 12. 4. 2024

.....

Alžběta Průdková

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala především své školitelce Mgr. Hance Tykalové Ph.D. za velkou trpělivost, ochotu a poskytnutí cenných rad při vypracovávání mé práce. Velké díky patří také všem členům Laboratoře aplikované biochemie za příjemné pracovní prostředí a mé rodině a všem známým, kteří mě v mém studiu a psaní bakalářské práce podporovali.

Obsah

1 ÚVOD	1
1.1 FLAVIVIRIDAE	1
1.2 TBEV	2
1.2.1 SUBTYPY VIRU	2
1.2.2. PŘENOS VIRU	3
1.2.3. PATOGENEZE VIRU	4
1.2.4 EKOLOGIE A EPIDEMIOLOGIE	4
1.2.5. PREVENCE A LÉČBA	5
1.3 STRUKTURA TBEV	6
1.3.1 VIRION	6
1.3.2 REPLIKAČNÍ CYKLUS TBEV	7
1.3.3 NESTRUKTURNÍ PROTEINY TBEV	8
1.4 PROTEIN NS2A	9
2 CÍL PRÁCE	12
3 MATERIÁL	13
3.1 BUNĚČNÉ LINIE	13
3.2 PLASMIDY	13
3.3 PROTILÁTKY	15
3.4 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	16
3.5 VIRUS	17
4 METODIKA	18
4.1 IMUNIZACE A PŘÍPRAVA PROTILÁTEK	18
4.2 TRANSFEKCE A PŘÍPRAVA PROTEINOVÉHO VZORKU	18
4.3 MĚŘENÍ VIABILITY	20
4.4 MĚŘENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ POMOCÍ BCA METODY	21
4.5 POLYAKRYLAMIDOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (SDS-PAGE)	21
4.6 IMUNOBLOT	22
4.7 BARVENÍ SILVER BLUE	23
4.8 FLUORESCENČNÍ KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE	23
5 VÝSLEDKY	25
5.1 VIABILITA V TRANSFEKOVANÝCH VZORCÍCH	25
5.2 OPTIMALIZACE PODMÍNEK DETEKCE NS2APEP	26
5.3 OPTIMALIZACE DETEKCE PROTEINU NS2A V TRANSFEKOVANÝCH BUŇKÁCH POMOCÍ IMUNOBLOTU	26
5.4 OPTIMALIZACE DETEKCE PROTEINU NS2A V INFIKOVANÝCH BUŇKÁCH POMOCÍ IMUNOBLOTU	27
5.5 OPTIMALIZACE DETEKCE PROTEINU NS2A V TRANSFEKOVANÝCH A INFIKOVANÝCH BUŇKÁCH POMOCÍ FLUORESCENČNÍ KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE	31
6 DISKUSE	38
7 ZÁVĚR	41
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	42

1 Úvod

Klíšťová encefalitida je virové onemocnění, které napadá lidský centrální nervový systém. Je způsobena arbovirem, přesněji virem klíšťové encefalitidy. Virus patří do čeledi *Flaviviridae*, rodu *Orthoflavivirus* (Postler, 2023). Tímto onemocněním je ročně zasaženo přibližně 10 000 pacientů z Evropy a Asie. K přenosu na člověka dochází prostřednictvím sání klíšťat, ve výjimečných případech po konzumaci nepasterizovaného mléka či mléčných výrobků. Na klíšťovou encefalitidu v současnosti neexistuje lék, aktivní imunizací se však může snížit šance nákazy (Kaiser, 2016). U více než 90 % osob očkovaných proti klíšťové encefalitidě dochází k navození ochranné imunity. Efektivita vakcinace záleží na mnoha proměnných, jako je věk pacienta, počet podaných dávek během očkovacího plánu či druh vakcíny (Pugh, 2022).

1.1 Flaviviridae

Čeď *Flaviviridae* se dělí do čtyř rodů: *Orthoflavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* a *Pegivirus*. U infekce lidským pegivirem (HPgV) je vyšší pravděpodobnost rozvoje lymfomů (Yu, 2022) avšak dosud nebyl tento virus spojen s žádným konkrétním onemocněním (Fama, 2020). Členové rodu *Pestivirus* jsou původci význačných chorob jak u volně žijících zvířat po celém světě, tak i těch hospodářských (Sakoda, 2011). Na lidské zdraví mají největší dopad zástupci rodů *Orthoflavivirus* a *Hepacivirus*. Kromě infekce způsobené virem hepatitidy C, jsou lidské infekce flaviviry převážně akutní povahy (Sakoda, 2011). *Orthoflavivirus* je skupina malých virů s jednořetězcovou RNA pozitivní polarity. Velikost genomu je přibližně 9–13 kb (Simmonds et al., 2017). Rozšíření zástupců čeledi *Flaviviridae* je téměř celosvětové. Každý rod má však svou specifickou lokaci (Pierson, 2020).

Většina těchto virů infikuje ptáky či savce, včetně člověka, a je přenášena krevsajícími členovci, klíšťaty a komáry. Mezi komáry přenášené orthoflaviviry patří virus dengue (DENV), virus žluté zimnice (YFV), virus Zika (ZIKV) či virus západonilské horečky (WNV) a virus japonské encefalitidy (JEV) (Simmonds et al., 2017). Viry, jež jsou přenášeny klíšťaty zahrnují virus klíšťové encefalitidy (TBEV), virus Langat (LGTV), virus Omské hemoragické horečky (OHFV) nebo virus Kyasanurského lesa (KFDV) (Gritsun, 2003).

1.2 TBEV

TBEV je nejrozšířenějším patogenem, který se přenáší prostřednictvím klíšťat. Pro infekci tímto virem jsou charakteristické především neurologické projevy. Tyto symptomy mohou vést k dlouhodobým neurologickým komplikacím či smrti. Onemocnění TBEV může probíhat i asymptomaticky. Morbidita a mortalita TBEV závisí na mnoha proměnných, mimo jiné také na subtypu viru, kterým je pacient nakažen (Pulkkinen, 2018).

Přes 10 000 pacientů z Evropy a Asie ročně onemocní klíšťovou encefalitidou (Kaiser, 2016). Incidence v České republice je jedna z nejvyšších v Evropě spolu s pobaltskými státy a Slovinskem (Orlíková, 2020). „V České republice bylo v roce 2020 nahlášeno 854 případů klíšťové encefalitidy, z toho 503 u mužů a 351 u žen. S incidencí 7,98 na 100 000 obyvatel se Česko stalo zemí s nejvyšším počtem onemocněním napříč EU/EHP“ (The European Environment and Health Process). Skupinou s výrazně horším průběhem onemocnění a častějšímu trvalými následky jsou starší lidé (Orlíková, 2021).

1.2.1 Subtypy viru

Nejrozšířenějšími subtypy TBEV jsou evropský, sibiřský a dálnovýchodní (Ecker, 1999). Nicméně nedávno byly popsány ještě další dva subtypy, a to bajkalský a himalájský (Abdiyeva, 2020).

Virus klíšťové encefalitidy se vyskytuje v Evropě a Asii. Evropský subtyp se nachází v centrální a východní Evropě, evropské části Ruska, v části Skandinávie i na jihu Evropy. Ve východní části Ruska, v Číně a Japonsku je rozšířený dálnovýchodní subtyp. Sibiřský subtyp se vyskytuje na evropské i asijské části Ruska a ve výjimečných případech i v některých evropských státech (Dumpis, 1999). Himalájský subtyp byl popsán v Číně v oblasti tibetské plošiny Čching-chaj a bajkalský v oblasti jezera Bajkal a severním Mongolsku (Abdiyeva, 2020).

Evropský subtyp způsobuje nejméně závažné onemocnění TBEV a probíhá ve dvou fázích. V první fázi se dostaví horečka a ve druhé fázi se mohou objevit neurologické potíže až u 30 % nakažených, jako je meningitida, encefalitida či meningoencefalitida. Mortalita evropského subtypu dosahuje 2 % (Abdiyeva, 2020).

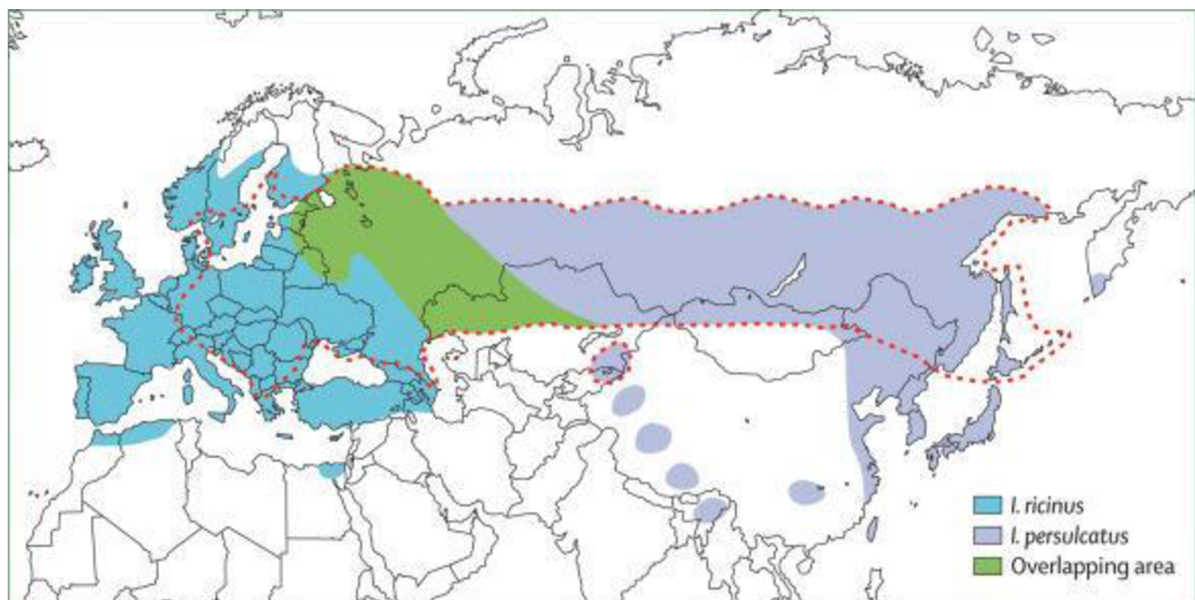
Infekce dálnovýchodním subtypem je nejzávažnější z celé skupiny. U pacientů má za následek poruchy centrálního nervového systému, které se mohou vyvinout do fokální meningoencefalitidy či polyencefalitidy. Onemocnění je doprovázeno ztrátami vědomí a během

rekonvalescence se může dostavit dlouhotrvající únava. U závažnějších případů dochází k velkému poškození neuronů v různých částech mozku a míchy. Onemocnění je závažnější u dětí než u dospělých. K úmrtí dochází u 20 až 40 % nakažených (Guerrant, 2011).

Naopak sibiřský subtyp lze charakterizovat méně těžkou akutní fází. Místo toho má však tendenci k rozvoji chronické infekce. Počet smrtelných případů se pohybuje do 8 % (Gritsun, 2003).

1.2.2. Přenos viru

Evropský subtyp TBEV je přenášen klíštětem obecným (*Ixodes ricinus*), kdežto dálnovýchodní a sibiřský klíštětem sibiřským (*Ixodes persulcatus*) (viz obr. 1) (Lindquist, 2008).



Obrázek 1: Geografické rozšíření přenašečů TBEV *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus* v Evropě a Asii. Modrá barva značí rozšíření *I. ricinus*, fialová barva *I. persulcatus*. Zelená plocha představuje překrývající se oblast výskytu obou druhů. Přerušovaná červená čára ohraničuje území, kde se vyskytuje TBEV (převzato z Lindquist, 2008).

Hlavními hostiteli a rezervoáry viru v přírodě jsou menší druhy hlodavců, savci a ptáci. Klíště se nakazí sáním krve z infikovaného jedince nebo společným sáním s infikovaným klíštětem na stejném hostiteli. Infikovaná klíšťata mohou virus přenášet po zbytek života a v jakémkoliv životním stádiu, tedy jako larva, nymfa i dospělý jedinec. Člověk do styku s přenašečem přichází nejčastěji při pobytu v přírodě, zejména v zalesněné krajině, a to při rekreačních činnostech. (Dumpis, 1999; Labuda, 1993). Nejčastěji přenos probíhá během sání krve. Byly

také popsány případy, kdy k přenosu viru došlo prostřednictvím nepasterizovaného kravského, kozího či ovčího mléka a mléčných výrobků (Dumpis, 1999). Přenos viru byl již také zaznamenán díky transplantacím orgánů (Růžek, 2019).

1.2.3. Patogeneze viru

Inkubační doba onemocnění je nejčastěji 7-14 dnů (maximální rozmezí 2-28 dnů) (SÚKL, 2020). K rozvoji onemocnění klíšťovou encefalitidou musí virus překonat řadu bariér, které obratlovci používají ke své ochraně. Kůže, která představuje prvotní překážku pro přísání klíštěte je ihned prolomena. Sliny klíšťat obsahují farmakologicky aktivní látky, které potlačují pocit svědění a bolesti a také modulují primární odpověď imunitního systému v místě sání. To je prospěšné pro klíště, které má tedy více času k infikování jedince. Poté se virus lokálně replikuje v kožních buňkách a následně v Langerhansových buňkách, neutrofilech a makrofázích. Tyto buňky nejspíše slouží jako vektory transportu virových částic do lymfatických uzlin (Valarcher, 2015).

Druhou bariérou, se kterou se virus setkává, je imunitní reakce vyvolaná samotnou virovou infekcí v místě vstupu infekce. Po nové replikaci se virus šíří do dalších orgánů, zejména do retikuloendoteliálního systému (sleziny, jater a brzlíku) a způsobuje tak virémii (Valarcher, 2015)

Třetí překážkou je hematoencefalická bariéra, která vytváří dvě oddělená prostředí. Lze ji charakterizovat jako přechod mezi mozkovými kapilárami a mozkovou tkání. Skládá se z endoteliálních buněk, které jsou propojeny těsnými spoji, z astrocytů a pericytů. Jak virus dokáže překonat tuto bariéru je třeba ještě více objasnit (Růžek, 2019). K migraci T lymfocytů do centrální nervové soustavy, konkrétně do šedé hmoty, dochází díky infekci neuronů. Cytotoxická odpověď T lymfocytů může vést k rozpoznání a cílení na infikované neurony (Valarcher, 2015). Jakmile virus překoná hematoencefalickou bariéru a dostane se do centrální nervové soustavy, způsobuje onemocnění jako je meningoencefalitida, meningoencefalomyelitida či meningitida (Růžek, 2019).

1.2.4 Ekologie a epidemiologie

Aby byla klíšťata schopna přísátí a přenosu infekce na jedince, potřebují k tomu vhodné podmínky. Aktivita klíšťat začíná v jarních měsících a trvá až do listopadu, kdy teploty začínají klesat a blížit se bodu mrazu. Možnost nákazy člověka závisí nejen na teplotě, ale i vlhkosti,

proočkovanosti v dané lokalitě či činnosti člověka. Také cestování do oblastí s vysokým výskytem klíšťat lze považovat za rizikové (Lindquist, 2008).

Díky změnám v charakteru přírody a klimatu se epicentra nákazy přesouvají i do vyšších nadmořských poloh, kdy do 600 m. n. m. je riziko nákazy vysoké. Výskyt klíšťové encefalidity v Evropě se rozšířil více na sever i na západ, do zemí a oblastí, kde se dříve nevyskytoval (Süss, 2003).

1.2.5. Prevence a léčba

K preventivním opatřením lze zařadit prevenci přisátí klíštěte a imunizaci proti viru klíšťové encefalidity. Ke snížení rizika přisátí klíštěte patří oblečení s dlouhými rukávy a nohavicemi, používání repelentů a časně vyjmutí klíštěte (ČLS JEP, 2020).

Nakazit se může každý člověk bez ohledu na věk, který nemá specifické ochranné protilátky. Očkování inaktivovanou vakcínou proti TBEV je doporučeno všem osobám, které se mohou setkat s nákazou. Podávaná vakcína může být FSME-IMMUN či Encepur, doporučeno pro Evropu (SÚKL, 2020). Na světě existuje v současné době šest různých vakcín proti klíšťové encefalitidě (Kříha 2021).

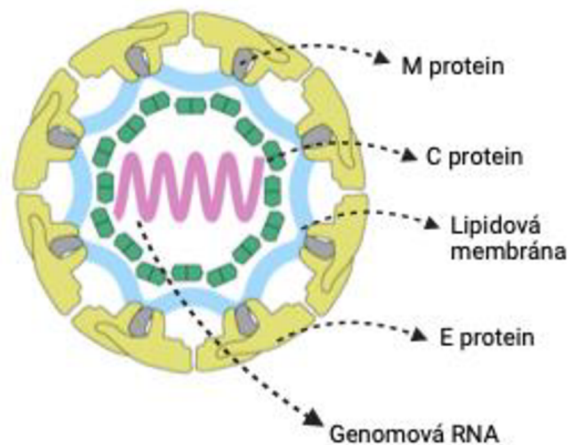
V Rusku a Kazachstánu je po přisátí klíštěte odborníky doporučováno podat hyperimunní imunoglobulin jako postexpoziční profylaxi. Pro obavu ze zhoršení průběhu infekce se tento postup v Evropě ale nedoporučuje. Toto tvrzení vychází z toho, že ne veškeré protilátky neutralizují virus (Kříha, 2021). Lidské monoklonální protilátky proti TBEV, jež byly připraveny v nedávné době, vykazaly vysokou virus-neutralizační aktivitu. Zmíněné protilátky představují velký potenciál a mohou sloužit pro profylaktické i terapeutické účely (Agudelo, 2021).

Antivirotika proti flavivirovým infekcím nebyla doposud schválena (Neufeldt, 2018). Nicméně častou strategií ve vývoji flavivirových léčiv je cílení na nestrukturní virové proteiny, mezi něž se řadí i protein NS2A (Chong, 2019).

1.3 Struktura TBEV

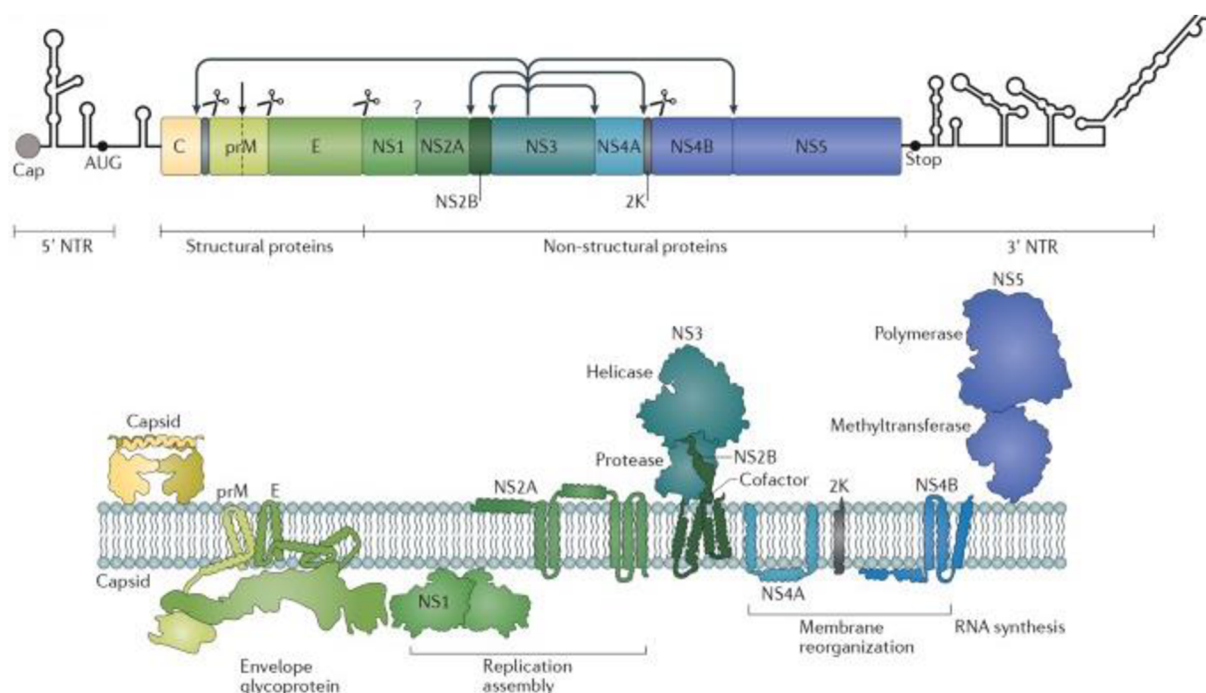
1.3.1 Virion

Virion TBEV je kulovitý o průměru 50 nm. Genom viru je tvořen jediným vláknem RNA pozitivní polarity o délce 11 kb. Virion sestává ze tří strukturních proteinů: kapsidového proteinu C, membránového proteinu M a hlavního obalového proteinu E (viz obr. 2 a 3) (Pulkkinen, 2018).



Obrázek 2: Struktura virionu viru klíšťové encefalitidy. Růžová barva představuje genomovou RNA, E protein je vyznačen světle zeleně, C protein pak tmavě zeleně. Modrá barva značí lipidovou membránu a šedá M protein. (upraveno z Pulkkinen, 2018).

Genom viru klíšťové encefalitidy se skládá z jednoho otevřeného čtecího rámce, který je ohraničený nekódujícími oblastmi. Ten pak kóduje jediný polyprotein, který je translatován a následně štěpen hostitelskými i virovými proteázami na jednotlivé proteiny (viz Obr. 3). Již výše zmíněné 3 strukturní proteiny a dále pak na 7 nestructurních: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Barrows, 2018).

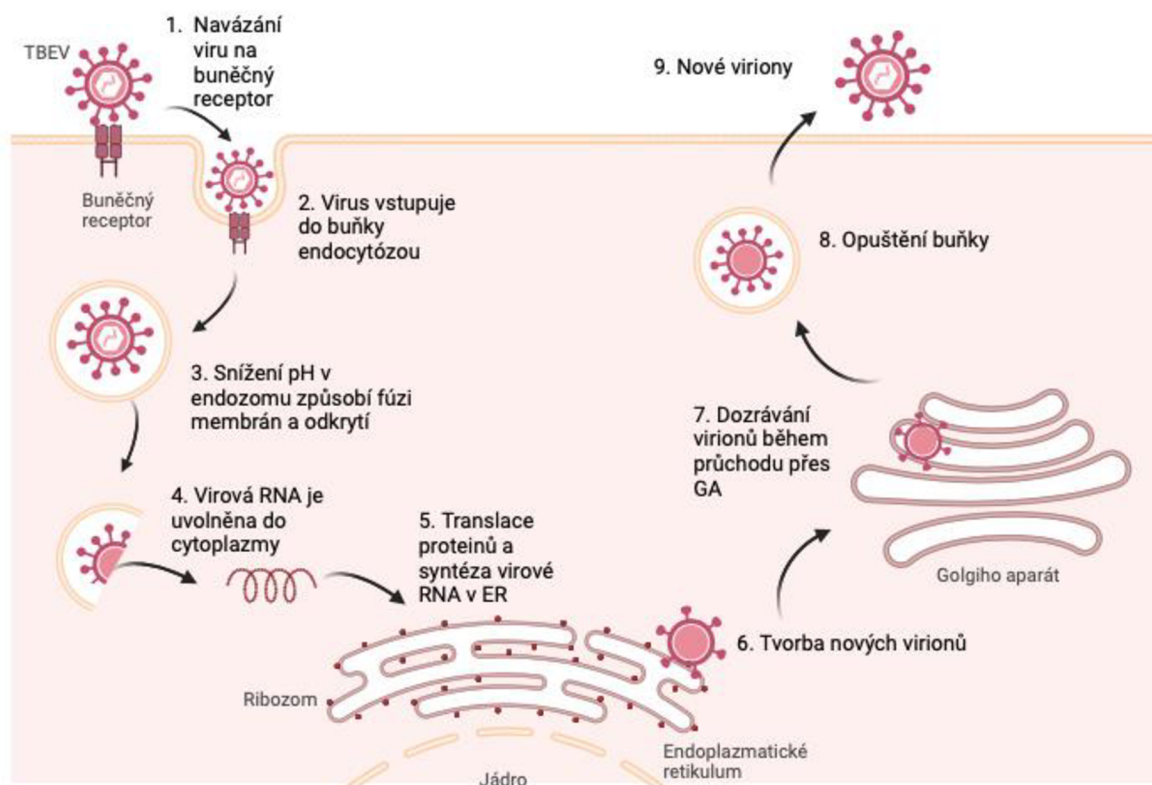


Obrázek 3: Obecné schéma genomu flavivirů a uspořádání strukturních a nestrukturních proteinů na příkladu DENV. V horní části je zobrazen otevřený čtecí rámec a předpokládané sekundární struktury nepřekládaných oblastí 5' a 3'. Štěpení polyproteinu virovými a buněčnými proteázami na jednotlivé proteiny je vyobrazeno schématicky – buněčnými peptidázami (nůžky), virovou proteázou (propojené šipky), furinem (samostatná šipka) v Golgiho aparátu, neznámou proteázou (otazník). Ve spodní části obrázku je naznačen otevřený čtecí rámec kódující DENV (převzato z Neufeldt, 2018).

1.3.2 Replikační cyklus TBEV

Pro úspěšné vytvoření nových virových částic klíšťové encefalitidy v hostitelské buňce je zapotřebí několika kroků (viz obr. 4). Virová částice se naváže na specifický receptor na buněčném povrchu, avšak konkrétní receptory pro TBEV nebyly dosud objeveny (Kopecký, 1999). Po navázání virion vstupuje do buňky pomocí endocytózy. Díky nízkému pH v pozdním endozomu se spouští fúze virových a endozomálních membrán, což vede k uvolnění virové RNA (vRNA) do cytoplazmy (Pulkkinen, 2018). Virové proteiny jsou dále syntetizovány ribozomy na povrchu drsného endoplazmatického retikula. Replikace genomu probíhá v endoplazmatickém retikulu, konkrétně ve virech indikovaných invaginací membrány. Tyto intracelulární kompartmenty zvyšují účinnost virové replikace (Miorin, 2013). Replikace vRNA a vbalování viru jsou navzájem propojeny. Oba procesy jsou lokalizovány velmi blízko sebe. Nebyl však objeven specifický signál pro proces vbalování flavivirové vRNA do virionu

(Barrows, 2018). Po ukončení procesu vbalování nezralé částice procházejí přes Golgiho aparát, kde dozrávají. Zralé částice pak vystupují z infikované buňky (Apte-Sengupta, 2014).



Obrázek 4: Schéma životního cyklu TBEV (vytvořeno v BioRender.com). Zkratky: GA – Golgiho aparát.

1.3.3 Nestrukturní proteiny TBEV

Zatímco strukturní proteiny slouží jako stavební jednotky virové částice, nestrukturní proteiny mají esenciální význam v replikačním cyklu TBEV či sbalení nové vRNA (Chong, 2019).

Protein NS1 se účastní replikace viru. NS3 je proteáza zodpovědná za štěpení virového polyproteinu a je také enzymem účastnícím se replikace virového genomu. Zatímco protein NS2B zastává důležitou funkci vbalování RNA u JEV, je také proteázovým kofaktorem NS3 (Kumar, 2022). Helikázová doména NS3 proteinu u YFV také napomáhá vbalování viru. Mimo jiné také inhibuje indukci interferonu (Mackenzie, 1998). Protein NS2A je součástí replikačního komplexu a také vbalování nové virové RNA do vzniklých částic (Apte-Sengupta, 2014). NS4A indukuje přeskupení membrány a autofagii kdežto NS4B moduluje imunitní odpověď hostitele potlačením signalizace α/β interferonu a helikázové aktivity NS3. Protein NS4B má také důležitou funkci v replikaci viru a virus-hostitel interakci (Zou, 2014). Protein

NS5 působí jako RNA-dependentní RNA polymeráza a methyltransferáza (Apte-Sengupta, 2014).

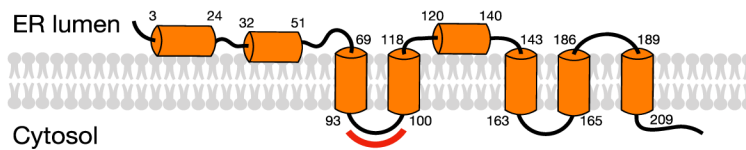
1.4 Protein NS2A

Nestrukturní protein NS2A viru klíšťové encefalitidy má hydrofobní charakter, je tedy zabudovaný do membrány. Zároveň se jedná o malý transmembránový protein o velikosti 23–25 kDa (Xuping, 2013). U DENV a Kunjin viru (KUNV) se protein NS2A a NS4A nacházejí ve virem indikovaných membránách a membránových váčcích (Mackenzie, 1998). Protein NS2A nejspíše umožňuje důležité protein-proteinové interakce s faktory přítomnými jak v cytosolu, tak i v endoplazmatickém retikulu (Leung, 2008). Též se účastní sestavování (vbalování) nových virionů či tvorby transmembránových komplexů membránových váčků. Na zásadní roli se společně podílejí v procesu sestavování nových virových částic také nestrukturní proteiny NS2B, NS3 a NS4. Interakce mezi proteiny NS2A-NS4 je pro proces vbalování esenciální (Tang, 2023).

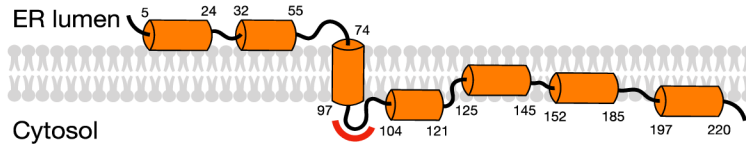
Protein NS2A může také interagovat i s jinými strukturními a nestrukturními proteiny, například prM-E, NS2B-NS3, NS4A či NS4B, kdy jsou všechny tyto proteiny nepostradatelnou součástí vbalování nové vRNA do virionů (viz obr. 7) (Barnard, 2021). U KUNV kolokalizuje protein NS2A s vRNA a interaguje s NS3 a NS5 v tzv. replikačním komplexu (Xie, 2013).

Je známo, že u proteinu NS2A v případě DENV, YFV a ZIKV jsou pro sestavování virionů důležité klastry bazických aminokyselin v N-terminální části (asi 22-27 AK), dále bazická smyčka (asi 95-104 AK) a bazická smyčka v C-terminální části (asi 184-193 AK) (Voßmann, 2015). Avšak napříč flaviviry se lokalizace těchto reziduí může lišit i s ohledem na rozdílnou predikci membránové topologie (viz obr. 5 a 6) (Barnard, 2021). Jednou z velkých překážek ke studiu flavivirového proteinu NS2A je nedostatek spolehlivých protilátek proti tomuto proteinu (Zhang, 2019). Nejčastěji se detekují krátké fragmenty NS2A. Několik studií prokázalo, že protein NS2A je významným modulátorem funkce hostitelské interferonové odpovědi (Wu, 2017).

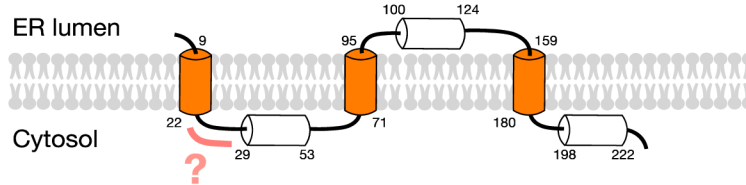
DENV



ZIKV

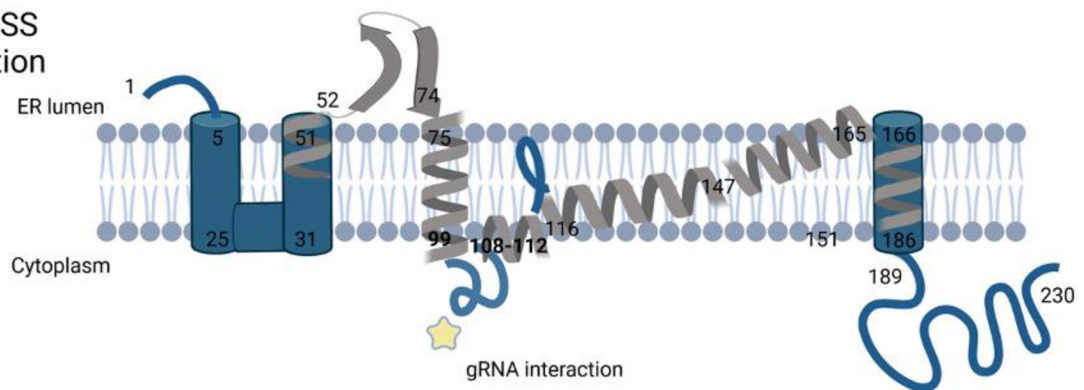


YFV

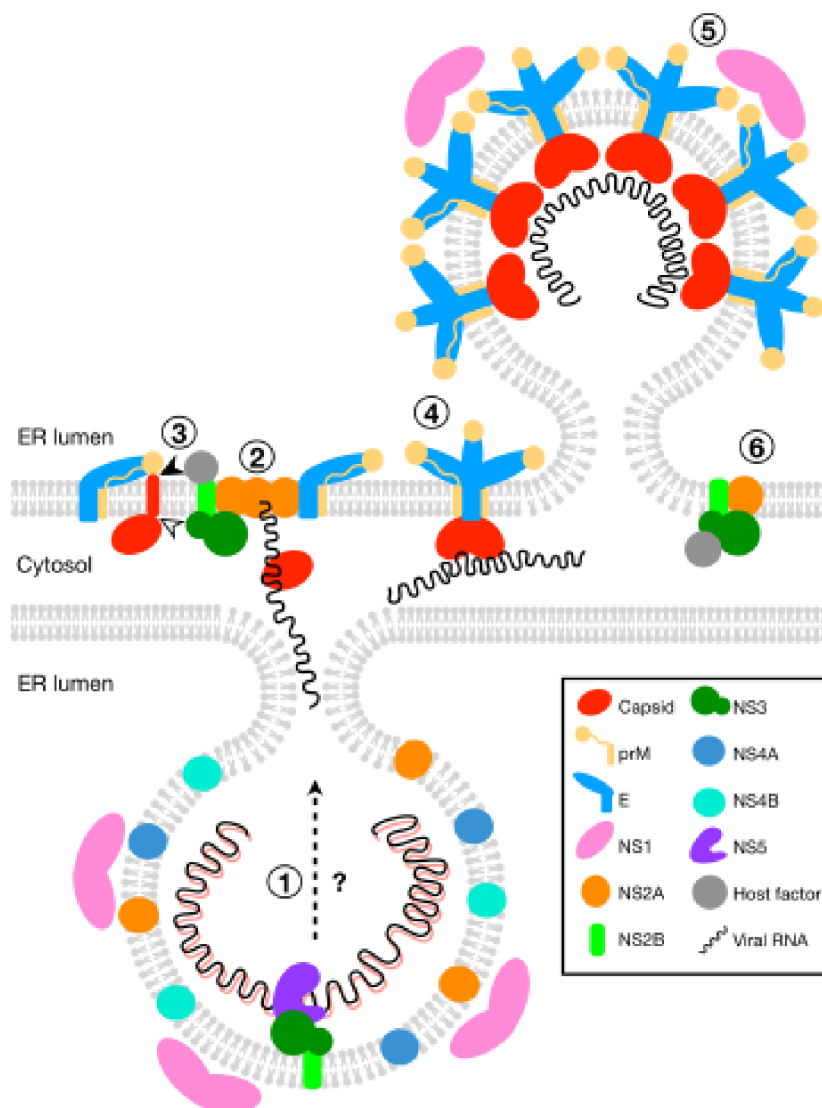


Obr. 5: Membránová topologie proteinu NS2A u flavivirů. Charakterizované transmembránové domény (oranžová) a domény, které neprocházejí membránou, (bílá) zjištěné pro NS2A flavivirů. Červeně je označena část NS2A, která interaguje s vRNA. Predikce téhož místa (otazník) u YFV. Zkratky: DENV – virus dengue, ZIKV – virus zika, YFV – virus žluté zimnice, ER – endoplazmatické retikulum (převzato z Barnard, 2021).

EMBOSS prediction



Obr. 6: Predikce membránové topologie proteinu NS2A TBEV. Žlutá hvězda označuje předpokládané místo, kde dochází k interakci proteinu NS2A s vRNA. C-koncová část (aminokyseliny 189-230) by měla být imunogenní a byla použita pro přípravu polyklonální protilátky v této práci. Zkratky – ER lumen – lumen endoplazmatického retikula, gRNA – vRNA (nepublikované výsledky Mgr. Hana Tykalová Ph.D., vytvořeno v Biorender.com).



Obr. 7: Model vbalování u flavivirů. 1. Po replikaci vRNA může blíže neurčený RNA vázající protein (potencionálně NS2A, NS3 nebo DDX56) přenést nově replikovanou genomovou RNA z replikačního komplexu na protein NS2A. 2. NS2A interaguje s vRNA prostřednictvím 3' UTR, stejně jako komplexy prM-E a NS2B-NS3. Hostitelská signaláza se také přidružuje do tohoto komplexu, možná díky asociaci s proteinem NS2B. 3. Signaláza (černá šipka) a proteáza NS2B-NS3 (bílá šipka) štěpí spojení kapsidy a prM v ER, respektive cytosolu. 4. Kapsidové dimery pak mohou interagovat s trimery prM-E heterodimerů a tvořit tak „vbalovací jednotku“ virionu flaviviru. 5. Virové membránové proteiny pohánějí proces pučení, který může být dále stabilizován NS1. 6. Hostitelské proteiny komplexu pro remodelaci endozomální membrány („endosomal sorting complexes required for transport“ ESCRT) usnadňují membránové štěpení a uvolňují sbalený nezralý virion do lumenu ER v místě vbalování pravděpodobně díky interakci s NS3. Zkratky: ER – endoplazmatické retikulum, UTR – nepřekládaná oblast (převzato z Barnard, 2021).

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo optimalizovat metodiku detekce proteinu NS2A viru klíšťové encefalitidy s využitím potencionálně specifického polyklonálního séra proti NS2A. Dílčími cíli pak byly následující body:

- osvojení si metodiky (práce s tkáňovými kulturami, transcientní transfekce, imunoblot, konfokální mikroskopie)
- optimalizace transcientní transfekce plasmidu nesoucí NS2A do lidské neurální linie
- optimalizace podmínek imunodetekce proteinu NS2A (imunoblot a konfokální mikroskopie) v rámci transfekovaných buněk.

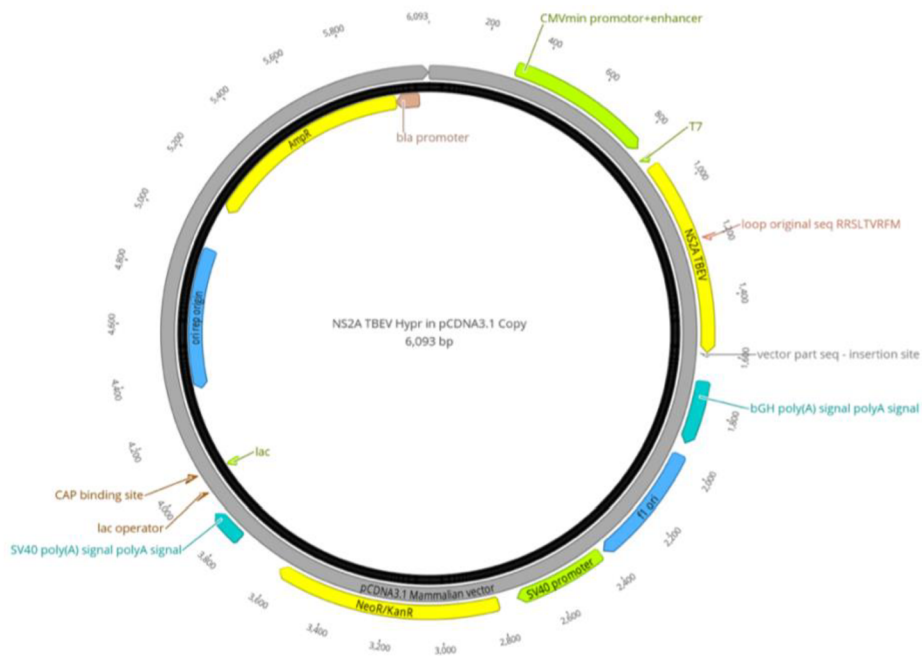
3 Materiál

3.1 Buněčné linie

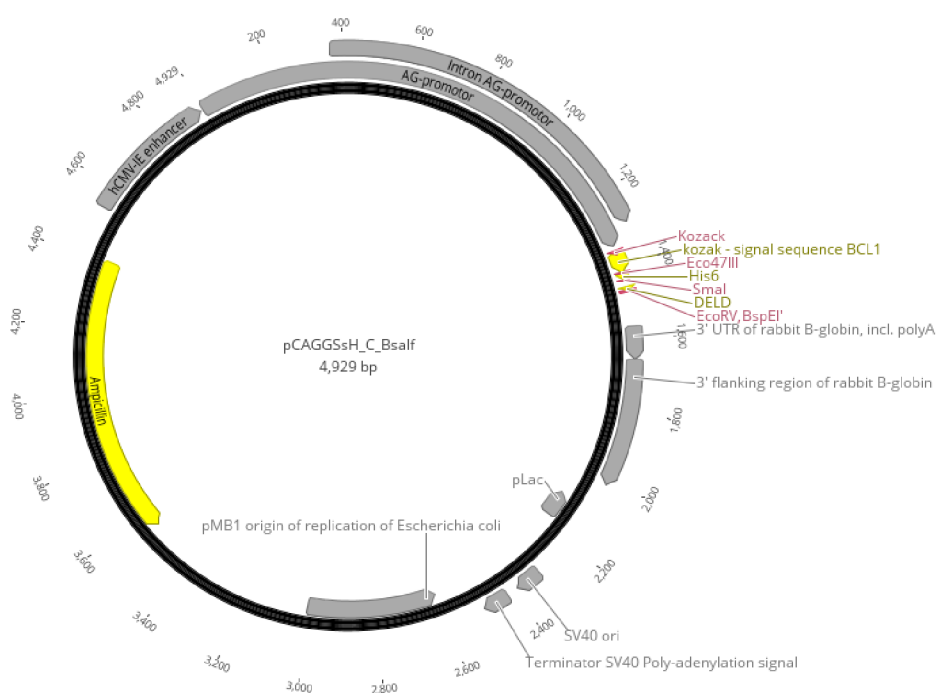
U experimentů byla použita buněčná linie lidského meduloblastomu DAOY HTB-186 (ATCC). Tato buněčná linie byla kultivována v DMEM médiu se stabilním glutaminem (DMEM Low Glucose, Biosera, MS01V71004) obsahujícím 10 % fetální bovinní sérum (RG20210003, Cytiva) a 1% směs antibiotik a antimykotik (amphotericin B 0,25 µg/ml, penicillin G 100 jednotek/ml, streptomycin 100 µg/ml) (MS01L9100C, Merck). Buněčná linie byla udržována pravidelným pasážováním (1x za 3 dny) a kultivována při 37 °C v prostředí 5 % CO₂ (Thermo Scientific, HERACELL. VIOS 160i).

3.2 Plasmidy

V pokusech byl použit plasmid Hypr NS2A wt_pcDNA3.1 (NS2A wt) (GenScript, U764THJ110-5/PK94074) (obr. 8) a plasmid Hypr NS2A mut_pcDNA3.1 (NS2A mut) (GenScript, U764THJ110-5/PK95218). Mutace je zanesena v místě, kde se na základě porovnání s jinými flaviviry (konkrétně se ZIKV) očekává interakce s vRNA (obr. 6 – naznačeno hvězdou). Mutace by měla tuto interakci narušit a zabránit tak interakci (bazické aminokyseliny arginin nahrazeny alifatickou aminokyselinou alaninem). V budoucnu by se měla studovat právě tato interakce a porovnávat s nemutovaným plazmidem. V těchto plazmidech byla exprese genu NS2A regulována promotorem CMV (cytomegalovirus). Pro negativní kontrolu se užil plasmid pCAGGS (EV) (obr. 9), který kombinuje CMV enhancer s AG promotorem (Vienna BioCenter Core Facilities).



Obrázek 8: Plasmid NS2A wt (Mgr. Hana Tykalová Ph.D., schéma vytvořeno v programu Geneious Prime).



Obr. 9: Plasmid EV (schéma vytvořeno v programu Geneious Prime, RNDr. Martin Selinger Ph.D.)

3.3 Protilátky

Přehled použitých protilátek v této práci je uveden v tabulce (viz Tab. I a Tab. II).

Tabulka I: Seznam použitých protilátek v metodě imunoblotu, zkratky: Lab. apl. biochem. – Laboratoř aplikované biochemie PřF JU, GP – morče, Go – koza, Rb – králík

Metoda	Název protilátky	Výrobce	Poměr
Optimalizace detekce proteinu NS2A v transf. a inf. buňkách	Anti-NS2A (GP)	Lab. apl. biochem.	1:1000
	HRP Anti-Guinea Pig (Go)	Invitrogen (#A18769)	1:2500
Optimalizace detekce GAPDH v transf. a inf. buňkách	Anti-GAPDH (Rb)	Abcam (#ab181602)	1:1000
	HRP Anti-Rabbit (Go)	ABclonal (#ASO14)	1:2500
Optimalizace detekce proteinu NS5 v inf. buňkách	Anti-NS5 (GP 4)	Lab. apl. biochem.	1:1000
	HRP Anti-Guinea Pig (Go)	Invitrogen (#A18769)	1:1000
Optimalizace detekce kontrolního peptidu NS2A	Anti-NS2A (GP)	Lab. apl. biochem.	1:500, 1:1000, 1:5000
	HRP Anti-Guinea Pig (Go)	Invitrogen (#A18769)	1:2500

Tabulka II: Schéma použitých protilátek v imunofluorescenční konfokální mikroskopii (IF), zkratky: Lab. apl. biochem. – Laboratoř aplikované biochemie PřF JU, GP – morče, Rb – králík

Buňky a číslo jamky	Název protilátky	Výrobce	Poměr
transfekované 1-6	Anti-NS2A (GP)	Lab. apl. biochem.	1:400, 1:500, 1:1000
	Anti-Calnexin (Rb)	Abcam (#ab22595)	1:1000
	Anti-GP ALEXA Fluor 594	Abcam (#ab150188)	1:400
	Anti-Rb DayLight 488	Abcam (#ab181448)	1:400
infikované 1-6	Anti-NS2A (GP)	Lab. apl. biochem.	1:400, 1:500, 1:1000
	Anti-E (Rb)	Lab. apl. biochem.	1:1000
	Anti-GP ALEXA Fluor 594	Abcam (#ab150188)	1:400
	Anti-Rb DayLight 488	Abcam (#ab181448)	1:400

U jamek 7 a 8 u transfekovaných a infikovaných buněk byly použity pouze sekundární protilátky ve stejných poměrech, jako u jamek 1-6. Cílem bylo porovnat případné pozadí vybraných sekundárních protilátek.

3.4 Chemikálie a roztoky

Chemikálie a roztoky použité v této práci jsou vypsané níže (Tab. III).

Tabulka III: Seznam použitých chemikálií a roztoků

Metoda	Roztok/Chemikálie	Složení
Transfekce	Trypanová modř	0,5 % (w/v) trypan. modři v PBS
	PBS	14 mM NaCl, 0,15 mM KH ₂ PO ₄ , 1,8 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,27 mM KCl, pH = 7,2
	RIPA lyzační pufr	0,1 % (w/v) SDS, 1 % (w/v) NP-40, 25 mM TRIS-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1 % (v/v) deoxycholát sodný
Gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)	4x separační gel	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS
	4x zaostřovací gel	1,0 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS
	30% Akryl amid (AA)	Rotiphorese® (Carl Roth), Gel 30, 37,5:1
	TEMED	Tetramethylethylendiamin (Serva)
	10 % APS	10 % (w/v) APS v destilované vodě
	TCE	2,2,2-trichlorethanol (Sigma-Aldrich)
	5× LB redukující	0,313 M Tris-HCl, pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) glycerol, 0,05 % (w/v) bromfenolová modř, 50 mM dithiotreitol (DTT)
	5× LB neredukující	0,313 M Tris-HCl, pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) glycerol, 0,05 % (w/v) bromfenolová modř
	1x elektrodový pufr	0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % (w/v) SDS

Western blot	1x blotovací pufr	0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glycin, 20 % (v/v) methanol
	5% mléko	5 % (w/v) odtučněné sušené mléko v PBS
	PBS-T	0,05 % (w/v) Tween 20 v PBS
Barvení Blue Silver	fixační roztok	50 % (w/v) ethanol, 2 % (v/v) kyselina fosforečná
	barvicí roztok	10 % (v/v) kyselina fosforečná, 100 g síranu amonného, 1,2 g Coomasie Blue G-250, 20 % (v/v) methanol
Konfokální mikroskopie	roztok pro blokování	50mM NH ₄ Cl v PBS

3.5 Virus

V laboratořích BSL2 Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích byla prováděna veškerá práce s infekčním materiálem. Infikovalo se kmenem Hypr, subtyp evropský. Pasáž byla provedena 4 × v mozcích sajících myši, dále 1 × v buňkách Vero E6. Jako negativní kontrola byl použit supernatant z neinfikovaných Vero E6 buněk. Tento materiál byl pro tuto práci poskytnut školitelkou Mgr. Hanou Tykalovou Ph.D.

4 Metodika

4.1 Imunizace a příprava protilátek

NS2A protein TBEV je obtížné produkovat (v bakteriích) a purifikovat pro případnou imunizaci (Zhang, 2019). Proto se na základě *in silico* analýzy (v programu Geneious Prime) predikovala imunogenní část proteinu (obr. 6), a to konkrétně C-koncovou částí 187–230 aminokyselin (obr. 11). Zároveň by také měla zasahovat do cytoplazmy a tím pádem být více přístupná pro rozpoznání protilátkou. Tento peptid byl nechán komerčně nasyntetizovat (GenScript) a tímto peptidem bylo imunizováno morče. V této práci byla tato část proteinu NS2A použita jako pozitivní kontrola v metodě imunoblotu (NS2Apep).



Obr. 11: Sekvence proteinu NS2A TBEV. Oranžová část označuje mutaci, konkrétně 93LRSNLTVREM101, která byla změněna na 93LASALTVAEM101. Modrá část označuje C-koncovou část, která byla použita pro imunizaci (vytvořeno v programu Geneious Prime, Mgr. Hana Tykalová, Ph.D.)

4.2 Transfekce a příprava proteinového vzorku

Transfekce je proces, při kterém je cizí nukleová kyselina dopravena do eukaryotické buňky. Před samotným procesem transfekce byly buňky nasazeny jeden den předem v počtu upřesněném v tabulce do odpovídajícího kultivačního panelu v závislosti na experimentu (viz Tab. IV). Buňky byly uvolněny trypsinizací, smíchaný s Trypanovou modří v poměru 1:1

a spočítány v Bürkerově komůrce. Po spočtení buněk byl připravena buněčná suspenze o přesné koncentraci buněk v kompletním kultivačním médiu. Buněčná suspenze byla pak napipetována do panelů dle experimentu. Panel s buňkami byl vložen do inkubátoru na 24 hodin.

Tabulka IV: Zobrazení počtů nasazených buněk pro následnou transfekci.

Typ panelu	Experiment	Počet buněk	celkový objem
6 jamkový	transfekce č. 1-2	750 000	1000 µl/jamka
6 jamkový	transfekce č. 3-4	1 000 000	1000 µl/jamka

Další den bylo médium vyměněno za kompletní čerstvé. Poté byla provedena transfekce ve třech různých poměrech transfekčního reagens (Polyjet, SignaGen Laboratories, #61759) pro optimalizaci nejvhodnějších podmínek pro transfekci. Zvolené poměry transfekčního reagensu ku plasmidové DNA byly 1:1,5; 1:2; 1:3 (w/v). Přesné údaje pro transfekci jsou vyobrazeny v tabulce V, pro IF v tabulce VI. K naředění transfekčního reagensu bylo použito médium DMEM (DMEM High Glucose, Biosera, 017BS765) bez bovinního séra, antibiotik a glutaminu. Byl připraven roztok plazmidu (objemy byly 100 µl plazmidu a 100 µl transf. reagens) „MIX 1“ a „MIX 2“, vždy pro každý jednotlivý plazmid, tedy NS2A wt, NS2A mut a kontrolní vektor EV. Množství všech plazmidů byl 1 µg. MIX 2 byl třikrát promíchán a ihned smíchán s MIX 1 a tato směs znova třikrát promíchána. Poté se transfekční směs nechala 15 minut inkubovat při pokojové teplotě a následně bylo do každé jamky přidáno požadované množství (viz Tab. V) transfekční směsi a krátce promícháno. Po 5 hodinách proběhla výměna média za čerstvé.

Tabulka V: Schéma transfekčních poměrů a směsi pro 6 jamkový panel

koncentrace [µg/µl]	množství plazmidu na jamku [µg]	celkové množství transfekční směsi [µl]
NS2A wt 1:1,5	1.000	200
NS2A wt 1:2	1.000	200
NS2A wt 1:3	1.000	200
NS2A mut 1:1,5	1.000	200
NS2A mut 1:2	1.000	200
NS2A mut 1:3	1.000	200
EV 1:1,5	0.422	200
EV 1:2	0.422	200
EV 1:3	0.422	200

Tabulka VI: Schéma transfekčních poměrů a směsi pro IF – 8 jamkový panel na sklíčku

koncentrace [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	množství plazmidu na jamku [μg]	celkové množství transfekční směsi [μl]
NS2A wt 1:2	0,3	50
NS2A mut 1:2	0,3	50
EV 1:2	0,3	50

24 hodin po transfekci byla změřena viabilita (viz 4.2 Měření viability), z jamek bylo odebráno kultivační médium a buňky byly promyty v PBS. Následně byl přidán lyzační pufr s inhibitory proteáz v poměru 1:100. Buňky byly lyzovány za stálého třepání na ledu po dobu 15 minut. Poté byly vzorky odebrány a sonikovány 15 min při 24 °C (20 kHz, 2 pulzy, 8 sekund) (Powersonic 610, Hwashin) a následně zcentrifugovány 10 min při 4 °C s rychlostí 14000 RCF (MPW-150R MPW Med. Instruments), aby se oddělily pevné částice ze vzorku, které by mohly způsobit komplikace v pozdějších krocích. Poté byl odebrán supernatant do nových zkumavek a takto zpracované vzorky byly uchovávány při -80 °C.

Infekční vzorky byly poskytnuty školitelkou Mgr. Hanou Tykalovou Ph.D., a to konkrétně vzorek „lyzát“, což byly infikované buňky po dobu 48 hodin, promyté v PBS a následně byly zlyzovány v RIPA pufru. Dalším poskytnutým vzorkem byl „pelet“. To byly buňky, které se v době 48 hodin po infekci uvolnily z monolayeru (předpokládala se pokročilejší fáze infekce s pokročilým cytopatickým efektem a případně vyšším množstvím virových proteinů). Tyto buňky byly ze supernatantu zcentrifugovány, promyty v PBS a zlyzovány v RIPA pufru.

4.3 Měření viability

Po 24 hodinách po transfekci bylo odebráno médium a k buňkám přidáno kompletní čerstvé médium společně s Alamar Blue (AlamarBlue™ Cell Viability Reagent, DAL1025, Invitrogen) v poměru 1:10 (Alamar Blue: bun. suspenze). Poté byly buňky inkubovány při 37 °C a 5 % CO₂ (Thermo Scientific, HERACELL VIOS 160i) hodinu a půl. Po uplynutí inkubační doby byl za tmy odebrán technický triplikát do 96 jamkového panelu. Tento triplikát se odebral i z jamky s negativní kontrolou a jamky, kde bylo pouze médium s Alamar Blue (k odečtení pozadí). Byla změřena fluorescence (excitace 550 nm, emise 590 nm) na přístroji Microplate Reader (Synergy H1, BioTek) a poté se buňky promyly 3x PBS a pokračovalo se lýzou buněk (viz 4.1 Transfekce).

4.4 Měření koncentrace proteinů pomocí BCA metody

Koncentrace klarifikovaných proteinových lyzátů byla změřena za pomoci BCA metody. Z každého proteinového vzorku a bylo odebráno 10 μ l a smícháno spolu s 200 μ l komerčního reagens (směs pufrů A: B v poměru 50:1). (Pierce TM BCA Protein Assay Kit, #RB232670, Thermo Fisher Scientific). Byly připraveny BCA standardy o známé koncentraci (0 μ g/ml - 2000 μ g/ml). Vzorky byly inkubovány 30 minut při 37 °C (MS inkubátor, Biotech), byla změřena absorbance při 562 nm na přístroji Microplate Reader (Synergy H1, BioTek).

4.5 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

SDS-PAGE byla použita pro separaci jednotlivých proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Elektroforéza probíhala ve 12 % polyakrylamidovém gelu. Nejprve byl připraven tzv. separační gel dle Tab. VII. a směs byla nalita mezi skla. K získání vodorovné hladiny byl separační gel převrstven 30 % isopropanolem. Jakmile separační gel zpolymeroval, isopropanol byl odstraněn a zbylý prostor byl doplněn 5 % zaostřovacím gelem (viz Tab. VII) mezi skla byl vložen hřebínek. Do polyakrylamidového gelu byl přidán TCE, díky kterému je možno separované proteiny vizualizovat v gelu za pomoci UV, a to bez použití jakýchkoliv protein-vázajících barviv.

Tabulka VII: Příprava jednoho 12 % separačního a 5 % zaostřovacího gelu

	Zaostřovací gel	Separací gel
Látka	Množství [μ l]	Množství [μ l]
30 % AA	165	2000
4x separační/ 4x zaostřovací pufr	250	1250
ddH ₂ O	575	1700
10 % APS	10	50
TEMED	1	2
TCE	5	25

Následně byly připraveny vzorky k nanášení do jamek v gelu. K jednotlivým vzorkům byla přimíchána barva (5 \times LB DTT/bez DTT) v poměru 4:1. Jednotlivé vzorky smíchané se

vzorkovým pufrem s DTT byly zahřívány 5 min na 95 °C (Mixing Block, MB-102, Bioer) a poté byly zchlazeny na ledu. Vzorky se vzorkovým pufrem bez DTT byly ponechány 5 min při pokojové teplotě. Po inkubaci vzorků byla elektroforetická aparatura s gely uvnitř zalita 1× elektrodo­vým pufrem a jamky byly precizně promyty. Dále byly vzorky naneseny do jednotlivých jamek, včetně velikostního standardu Protein Marker IV (AppliChem #A8889) (velikostní standard v objemu 5 µl). Po dobu 90 min probíhala elektroforetická separace při napětí 120 V ve stejnosměrném elektrickém poli (PowerPac™ Universal, Bio-Rad). Po ukončení elektroforézy byly gely promyty destilovanou vodou a poté byly vyfoceny ve fotodokumentačním zařízení GENESys, V1.5.2.0 (G: Box, Syngene). Následně byly gely použity v metodě Imunoblot.

4.6 Imunoblot

Tato metoda slouží k detekci specifického proteinu ze směsi za použití specifické protilátky. Rozdělené proteiny jsou z gelu přeneseny na PVDF membránu (polyvinylidendifluorid) (Mahmood, 2012).

Gely z SDS-PAGE metody byly opláchnuty destilovanou vodou a poté ekvilibrovány v 1× blotovacím puf­ru. Blotovací papíry byly navlhčeny 1× blotovacím pufrem. PVDF membrána byla aktivována inkubací ve 100 % methanolu po dobu 5 min a poté ekvilibrována v 1× blotovacím puf­ru. Následně byl sestaven „blotovací sendvič“ (viz obr. 10) a vložen do blotovací aparatury (SD20, Cleaver Scientific), pomocí skleněné tyčinky byly odstraněny případné vzduchové bubliny. Blotování probíhalo 1 hodinu při 20 V (EV231, Consort). Poté byly gely opláchnuty destilovanou vodou a obarveny metodou Silver Blue (viz 4.7 Barvení Silver Blue).

Dále byly membrány blokovány v roztoku 5 % odtučněného sušeného mléka 3 ml/membrána za neustálého míchání (VWR tube rotator eu plug, VWR) přes noc při pokojové teplotě. Poté byly membrány inkubovány s primární protilátkou v roztoku 5 % odtučněného sušeného mléka 3 ml/membrána přes noc při 4 °C za stálého míchání. Po skončení inkubace byly membrány 3× promyty v PBS-T po dobu 10 minut. Po navázání primárních protilátek a promytí, byly přidány sekundární protilátky 3 ml/membrána a byly inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě za stálého míchání. Membrány byly promyty 3× 10 minut v PBS-T. Případná terciální protilátka byla inkubována 1 h při pokojové teplotě za stálého míchání 3 ml/membrána s následným promytím v PBS-T 3x 10 minut. K detekci byly použity sekundární/terciální protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (HRP).

K chemiluminiscenčnímu vyvolání byl použit komerční kit (Clarity™ Western ECL Substrate, #170-5061, Bio-Rad). Dle instrukcí výrobce se smíchaly reagens v poměru 1:1 a membrána byla inkubována se substrátem 5 minut a následně byla vložena do průhledné fólie. Chemiluminiscenční signál byl zaznamenán ve fotodokumentačním zařízení GENESys, V1.5.2.0 (G: Box, Syngene).



Obr. 10: Schéma vytvořeného „blotovacího sendviče“ (vytvořeno v BioRender.com).

4.7 Barvení Silver Blue

Gely byly opláchnuty v destilované vodě a fixovány v roztoku ethanolu a kyseliny fosforečné 20 minut za stálého třepání (Rocker 25, Labnet). Poté byly za stálého třepání gely promyty 2 × po 20 minutách v destilované vodě a obarveny roztokem Blue Silver přes noc. Následující den byly promývány v destilované vodě až bylo pozadí odbarveno. Pak byly gely vyfoceny ve fotodokumentačním zařízení GENESys, V1.5.2.0 (G: Box, Syngene).

4.8 Fluorescenční konfokální mikroskopie

Buňky byly nasazeny do 8 jamkového panelu (flexiPerm®, Sarstedt) na sklíčko a další postup byl stejný jako u transfekce (viz kap. 4.1), přičemž celkové množství transfekční směsi bylo 50 µl/jamka. V případě infekce byly buňky kultivovány ve stejném objemu jako při transfekci a po 24 hodinách, kdy nastala výměna média, byla přidána infekční suspenze 50 µl/jamka. Počty nasazených buněk se lišily v závislosti na experimentu (viz Tab. VIII).

Tabulka VIII: Vyobrazení počtů nasazených buněk pro následnou transfekci/infekci

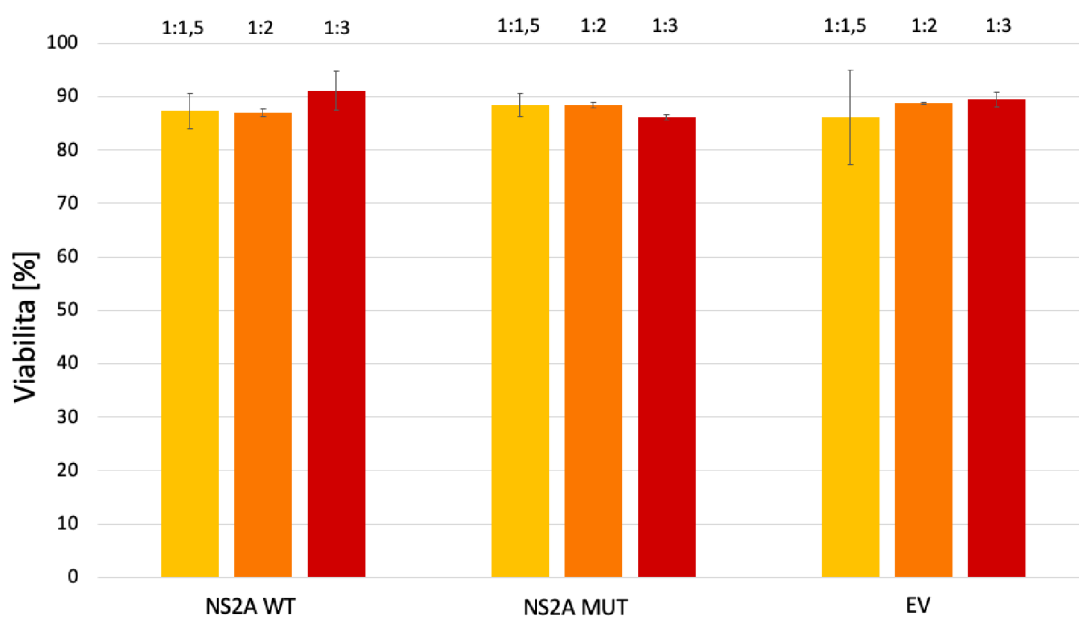
8 jamkový	transfekce (24/48 h) č. 1	40 000	300 μ l/jamka
8 jamkový	transfekce č. 2 (48 h)	20 000	300 μ l/jamka
8 jamkový	infekce č. 1 (48 h)	40 000	300 μ l/jamka
8 jamkový	infekce č. 2 (48 h)	20 000	300 μ l/jamka

Den po transfekci/infekci byly buňky promyty v PBS a fixovány pomocí 4 % paraformaldehydu (Roti®-Histofix, 359287781, Carl Roth) po dobu 15 minut při pokojové teplotě a následně byly buňky 3× promyty v PBS po 5 minutách a byly uchovány v lednici při 4 °C až do následného značení. Roztoky použité v této metodě se před použitím přefiltrovaly (0,22 μ m filtr). Buňky byly permeabilizovány pomocí 0,1 % Tritonu X-100 (Serva) v PBS po dobu 15 minut. Poté byly vzorky 3× promyty v PBS a blokovaly se v roztoku pro blokování 2× 10 minut. Před přidáním 3 % BSA (Roti®-Albumin Fraktion V) v PBS pro blokování nespecifických vazeb byly vzorky opět 2× promyty v PBS. Blokování nespecifické vazby protilátek probíhalo v 3 % BSA v PBS 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byly přidány primární protilátky v 1 % BSA v PBS, které se inkubovaly 1 hodinu při pokojové teplotě v objemu 200 μ l/jamka (seznam použitých protilátek je uveden v Tab. II). Poté byly jamky opět 2× promyty v 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 v objemu 200 μ l/jamka (seznam použitých protilátek je zaznamenán v Tab. II). Po hodině byly vzorky 5× promyty PBS a došlo k přípravě samotných preparátů. Sklíčka se ponechala za tmy na stole, aby došlo k vysušení vzorků. Dále bylo přidáno montovací médium Vectashield (H1800), které obsahuje barvivo DAPI, které slouží k barvení jader. Poté bylo přiloženo krycí sklíčko a nanesen byl lak v okolí sklíčka. Hotové preparáty byly uskladněny v lednici při 4 °C. Pomocí konfokálního mikroskopu Olympus Fluoview FV10i byly vzorky pozorovány a foceny, následná úprava snímků probíhala v softwaru FV10-ASW (ver.04.02). Intenzita laserů na konfokálním mikroskopu a následné úpravy signálu byly u všech pokusů s transfekovanými či infikovanými vzorky vždy identické. Barvivo DAPI, které standardně barví jádra buněk, je již obsažené v montovacím médiu. U transfekovaných vzorků bylo naznačeno endoplazmatické retikulum pomocí detekce markerového proteinu Calnexinu. Pro potvrzení infekce byl u infikovaných vzorků detekován protein E TBEV.

5 Výsledky

5.1 Viabilita v transfekovaných vzorcích

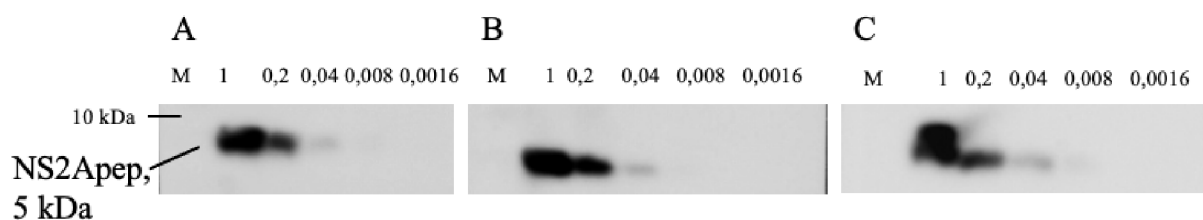
Nejprve bylo potřeba optimalizovat podmínky transfekce studovaného genu TBEV NS2A do buněk. Pro zvolení co nejšetrnějších a zároveň nejúčinnějších podmínek byla měřena viabilita buněk po transfekci. Měření viability bylo provedeno ve dvou biologických opakováních. Výsledek sloužil k posouzení vhodnosti transfekčních podmínek s ohledem na zachování co nejvyšší viability pro další experimenty a k výběru podmínek pro přípravy vzorků pro fluorescenční konfokální mikroskopii. U poměrů 1:2 a 1:3 (plazmid: transfekční reagens) nebyly výrazné rozdíly ve viabilitě oproti poměru 1:1,5. Po zkušenosti z předchozích experimentů ohledně transfekční účinnosti byly z těchto dvou poměrů zvoleny transfekční podmínky 1:2 jako nejvhodnější, proto byla zvolena i zde. Tato koncentrace vykazovala nejvíce konzistentní hodnoty životaschopných buněk napříč všemi vzorky, a to 87 % pro NS2A wt, 88,5 % pro NS2A mut a 88,7 % pro kontrolní vektor EV (obr. 12).



Obr. 12: Viabilita v buňkách DAOY – HTB 186 transfekovaných expresními vektory pro NS2A. Graf zachycuje relativní podíl životaschopných buněk v procentech v různých vzorcích vztahených k viabilitě kontrolních buněk bez transfekce (100 %). Vodorovná osa značí určité skupiny vzorků. Jednotlivé poměry jsou vyznačeny stejnou barvou – žlutě: 1:1,5 (plazmid: transf. reagens), oranžově: 1:2 (plazmid: transf. reagens), červeně: 1:3 (plazmid: transf. reagens). Zkratky: NS2A wt – protein NS2A wild type, NS2A mut – mutovaný protein NS2A, EV – kontrolní vektor.

5.2 Optimalizace podmínek detekce NS2Apep

Nejprve bylo potřeba ověřit, zda testovaná polyklonální protilátka rozpoznává NS2Apep a ověřit si tak úspěšný výsledek imunizace. Detekce NS2Apep (5 kDa) probíhala při třech různých koncentracích primární protilátky a pěti různých ředěních zásobního NS2Apep. Ředění primární protilátky, která byla použita v této metodě, byly 1:500, 1:1000 a 1:5000. Koncentrace NS2Apep byly 1 μg , 0,2 μg , 0,04 μg , 0,008 μg a 0,0016 μg . Tento pokus probíhal v redukovjících podmínkách. Připravené polyklonální sérum úspěšně detekuje NS2Apep, vytvořené antisérum je specifické proti antigenu, kterým se imunizovalo. S použitím všech 3 ředění protilátky byla detekce úspěšná, detekční limit pro koncentraci zásobního roztoku NS2Apep byl 0,008 μg . Pro použití v dalších experimentech bylo vybráno ředění primární protilátky 1:1000 a pro ověření, že daná metoda probíhá standardně byl NS2Apep použit jako pozitivní kontrola, a to v množství 0,008 μg . Tato koncentrace byla vybrána proto, aby bylo možné detekovat daný peptid a jeho signál byl porovnatelný s očekávanými výsledky detekce.



Obr. 13: Optimalizace podmínek detekce NS2Apep pomocí testovaného polyklonálního séra. A: ředění primární protilátky 1:500, B: ředění primární protilátky 1:1000, C: ředění primární protilátky 1:5000. Koncentrace NS2A peptidu je uvedena v μg (postupně 1, 0,2, 0,04, 0,008 a 0,0016). Zkratky: M – velikostní standard NS2Apep – NS2A kontrolní peptid.

5.3 Optimalizace detekce proteinu NS2A v transfekovaných buňkách pomocí imunoblotu

Samotná detekce proteinu NS2A probíhala metodou imunoblotu. Velikost detekovaného proteinu je 23-25 kDa. Pro ověření rovnoměrného nanášení vzorků byl ještě detekován protein GAPDH o velikosti 37 kDa. Tento protein je kódován jedním z „housekeeping“ genů. Detekce a inkubace těchto proteinů probíhaly na totožné membráně vždy postupně v jednotlivých protilátkách.

Buňky DAOY HTB-186, které byly lyzovány 24 hodin po transfekci se v prvotních pokusech použily v počátečním množství 750 000 buněk na jamku (6 jamkový panel) při transfekci. Po

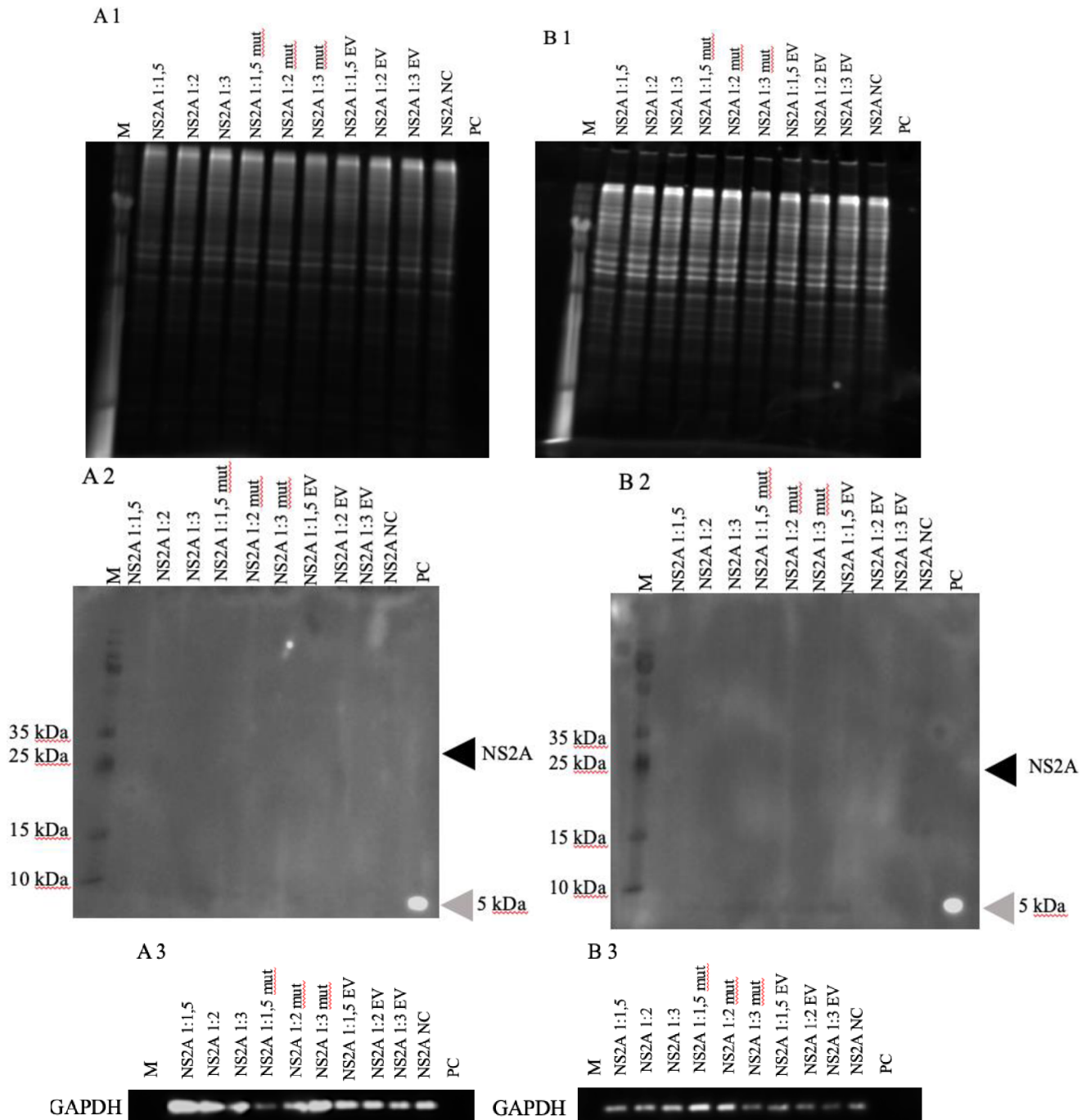
měření koncentrace proteinů ve vzorcích se ukázalo, že vzorky disponují nízkou koncentrací. Proto bylo zvýšeno počáteční množství buněk na 1 milion na jamku, díky čemuž se i zvýšila koncentrace proteinů ve vzorcích. V průběhu pokusů se nedařilo po provedení imunodetekce získat specifický signál, proto bylo množství nanesených proteinů na jamku zvyšováno od 3,5 µg na 6 µg a 10 µg v průběhu jednotlivých experimentů. Pro zvýšení šance detekce proteinu NS2A bylo zvoleno množství 10 µg, které bylo dodrženo ve třech biologických opakováních. Ve všech opakováních byly vzorky analyzovány jak v redukujících, tak neredukujících podmínkách. Po skončení elektroforézy před přenosem na membránu byla ověřena separace proteinů vizualizací fluorescence TCE navázaného na proteiny a následně po blotování byla ověřena úspěšnost přenosu barvením gelů v Silver Blue. Všechny vzorky byly správně nanesený a separovány, výsledky jsou zaznamenány na obr.14. Ani po zvýšení množství vstupního materiálu na maximální množné se nepodařilo detekovat protein NS2A v analyzovaných vzorcích, pozitivní kontrola NS2Aep však detekována byla. Reprezentativní obrázek je zobrazen na obr.14

5.4 Optimalizace detekce proteinu NS2A v infikovaných buňkách pomocí imunoblotu

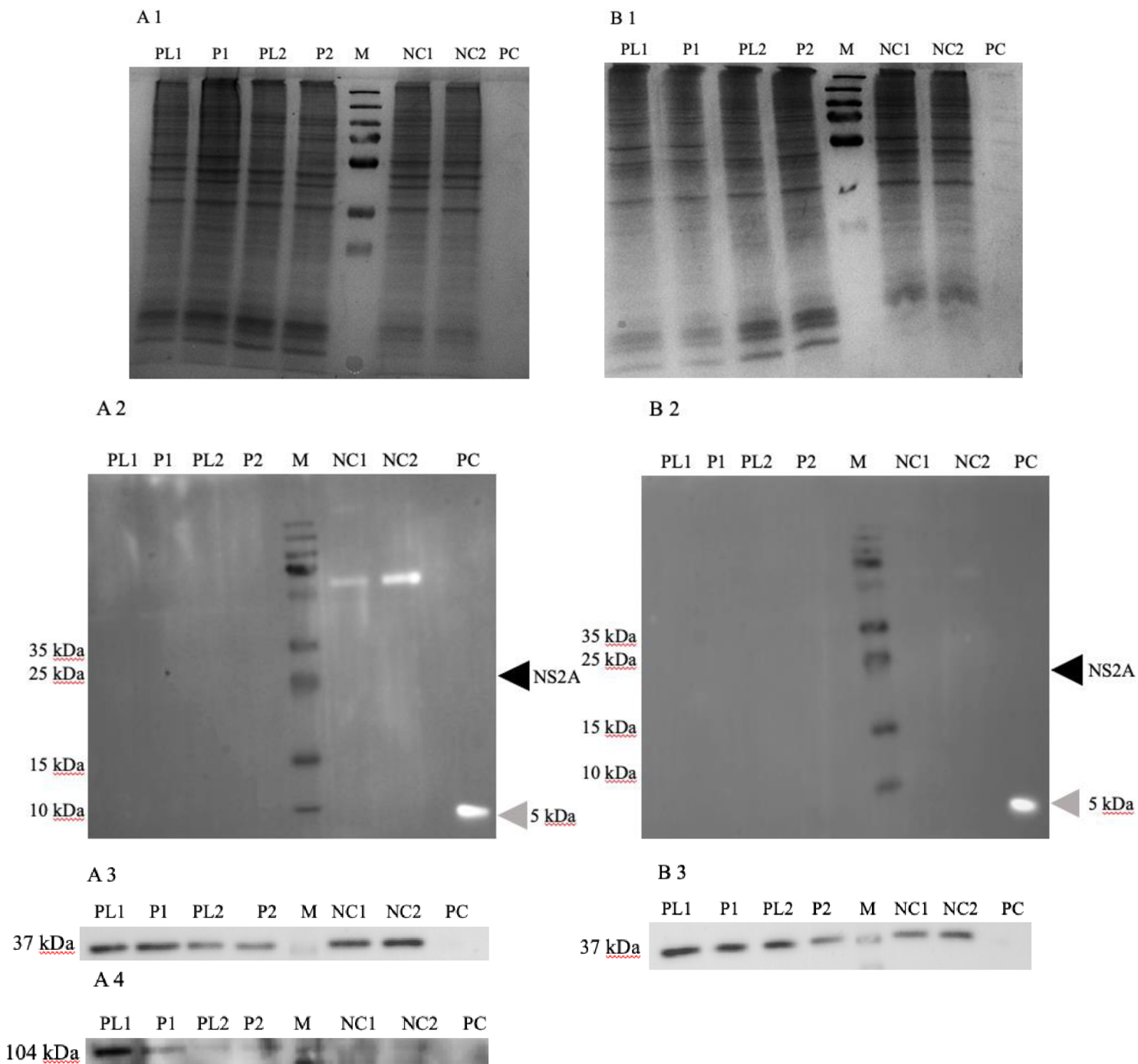
Pro ověření úspěšné infekce byl ve vzorcích detekován též protein NS5 TBEV, který je nejabundantnějším nestrukturním proteinem TBEV o velikosti 105 kDa. Veškeré pokusy byly provedeny ve třech biologických opakováních. Množství naneseného proteinového lyzátu bylo 10 µg. Ani v jednom z opakování se u vzorků z infikovaných buněk nepodařilo pomocí imunoblotu detekovat protein NS2A ani v redukujících či neredukujících podmínkách. U optimalizace detekce proteinu NS2A pomocí imunoblotu se objevil nespecifický signál v negativních kontrolách (cca 70 kDa), tzn. ve vzorcích bez infekce. V pokusu ověření infekce proteinu NS2A u infikovaných vzorků pomocí detekce proteinu NS5, se objevil nespecifický signál v negativních kontrolách, viz obr.15 (cca 100 kDa). Vzorek „lyzát“ byly infikované buňky po dobu 48 hodin, promyté v PBS a následně byly zlyzovány v RIPA pufru. Vzorek „pelet“ byly buňky, které se v době 48 hodin po infekci uvolnily z monolayeru (předpokládala se pokročilejší fáze infekce s pokročilým cytopatickým efektem a případně vyšším množstvím virových proteinů). Tyto buňky byly ze supernatantu zcentrifugovány, promyty v PBS a zlyzovány v RIPA pufru.

Jako další možnost pro zvýšení citlivosti detekce proteinu NS2A v infikovaných buňkách bylo vyzkoušeno i terciální značení za použití terciální protilátky, která rozpoznávala protilátku

sekundární (protilátka Anti-Goat, Vector Laboratories (PI 9500), poměr 1:1000, 3 ml/membrána). Reprezentativní obrázek z terciálního značení je vyobrazen na obr. 15, protein NS2A ale nebyl detekován. Bylo vyzkoušeno i prodloužené snímání chemiluminiscenčního signálu, avšak bez specifického signálu NS2A.



Obr.14: Optimalizace podmínek detekce proteinu NS2A v transfekovaných buňkách pomocí imunoblotu. Vizualizace signálu TCE v redukujících (A1) a neredukujících (B1) podmínkách po elektroforetické separaci, detekce proteinu NS2A – vzorky v redukujících (A2) a neredukujících (B2) podmínkách pomocí imunoblotu, detekce proteinu GAPDH v redukujících (A3) a neredukujících (B3) podmínkách. Zkratky: M – velikostní standard, NS2A – protein NS2A wild type (~25 kDa), NS2A mut – protein NS2A mutovaný (~25 kDa), NS2A EV – kontrolní vektor, NS2A NC – negativní kontrola, PC – pozitivní kontrola, 1:1,5 – transfekční poměr (plasmid: transf. reagens), 1:2 - transfekční poměr (plasmid: transf. reagens), 1:3 - transfekční poměr (plasmid: transf. reagens), černá šipka – očekávaný signál proteinu NS2A, šedá šipka – signál NS2Apep (5 kDa) PC.



Obr. 15: Optimalizace detekce proteinu NS2A v infikovaných buňkách pomocí imunoblotu. Barvení gelů Silver Blue, redukující (A1) a neredukující (B1) podmínky, detekce proteinu NS2A – vzorky v redukujících (A2) a neredukujících (B2) podmínkách, detekce proteinu GAPDH v redukujících (A3) a neredukujících (B3) podmínkách, detekce proteinu NS5 v redukujících (A4) podmínkách. Zkratky: PL – proteinový lyzát, P – peleta, M – velikostní standard, NC – negativní kontrola, PC – pozitivní kontrola, 1 – první sada vzorků, 2 – druhá sada vzorků, černá šipka – očekávaný signál proteinu NS2A, šedá šipka – signál NS2Apep (5 kDa) PC.

5.5 Optimalizace detekce proteinu NS2A v transfekovaných a infikovaných buňkách pomocí fluorescenční konfokální mikroskopie

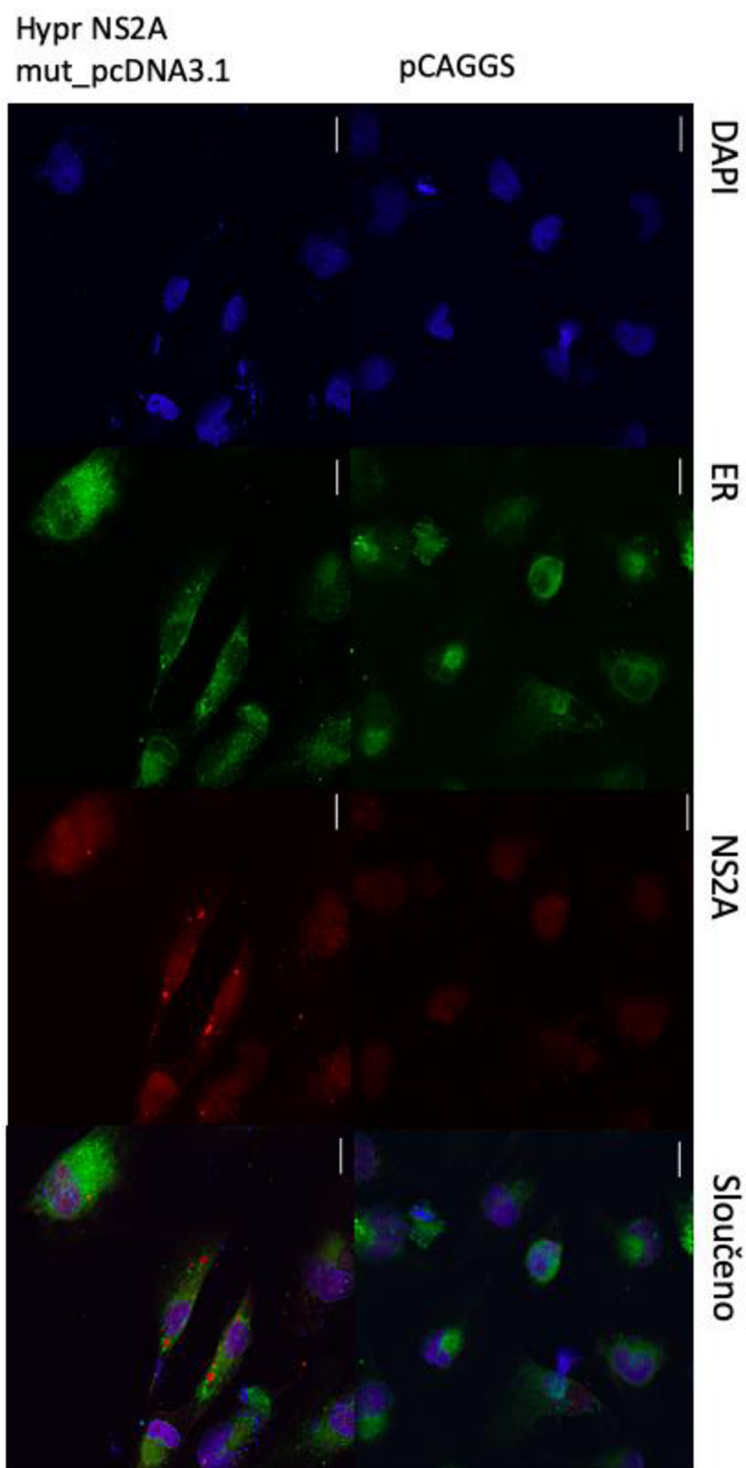
Po neúspěšné detekci proteinu NS2A pomocí imunoblotu byla vyzkoušena detekce proteinu NS2A pomocí IF jak u transfekovaných, tak infikovaných buněk. Buňky DAOY HTB-186 ve výchozím počtu 20 000 - 40 000 buněk na jamku byly transfekovány konstrukty NS2A wt, NS2A mut a EV, poměr plazmidu ku transfekčnímu reagens byl 1:2 a vzorky byly analyzovány v intervalech 24 a 48 hodin. Koncentrace primární protilátky vhodná pro značení byla postupně optimalizována na jak transfekovaných, tak infikovaných vzorcích v poměrech 1:400, 1:500 a 1:1000. U transfekovaných vzorků byl u ředění primární protilátky 1:500 a 1:1000 nejspíš detekován signál proteinu NS2A, ale nebyl dostatečně silný a nedalo se s jistotou interpretovat, že je skutečně specifický. Z těchto důvodů se od zmíněných ředění upustilo a nadále byl používán pouze poměr primární protilátky 1:400. Za těchto podmínek byl experiment proveden ve třech biologických opakováních.

Vzorky pro detekci NS2A během přirozené infekce byly připraveny v DAOY HTB-186 buňkách infikovaných TBEV Hypr, 5 MOI po dobu 48 hodin s koncentrací 20 000 buněk na jamku. U infikovaných vzorků byla použita též ředění primární protilátky 1:400, 1:500 a 1:1000. U všech ředění byl detekován protein NS2A i protein E TBEV, ale kvalita signálu byla nejlepší pro nejvyšší množství použité protilátky.

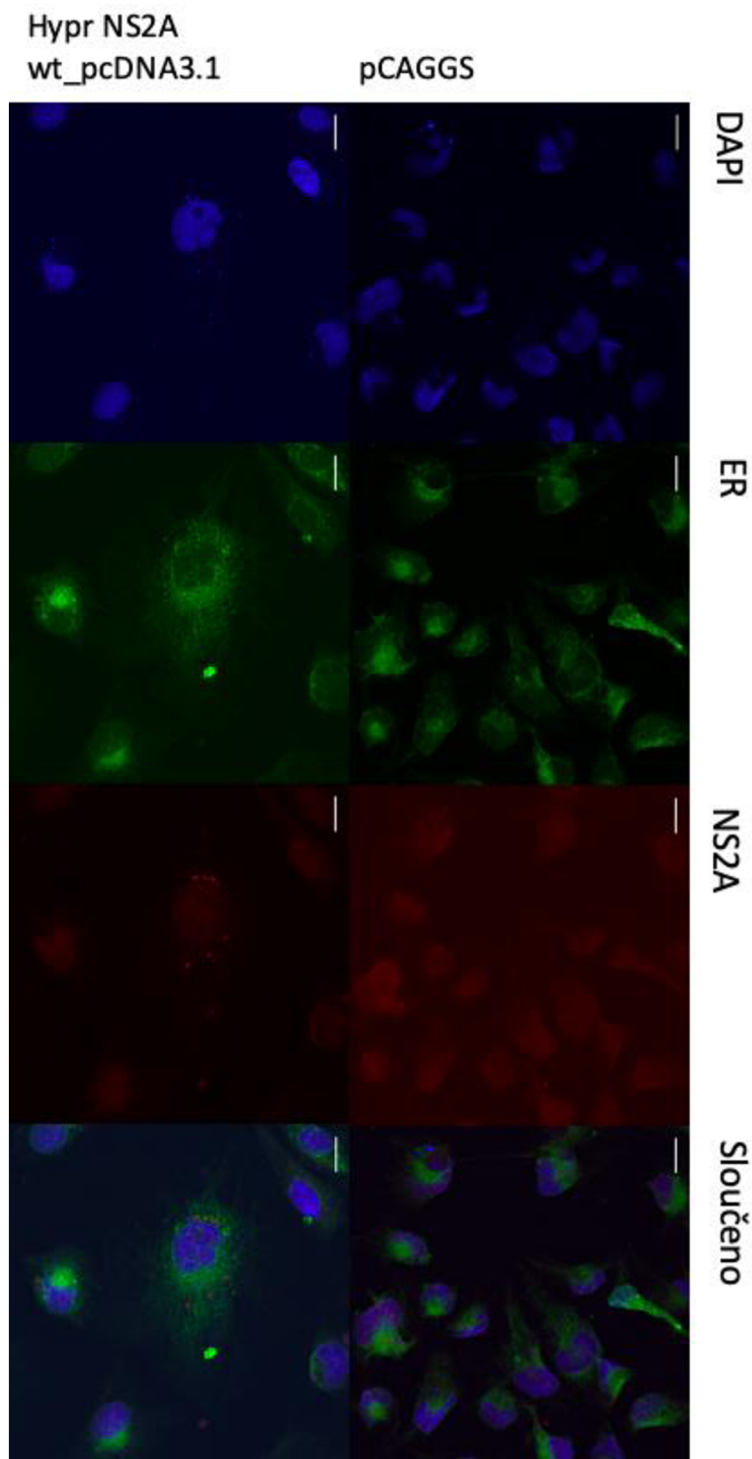
Po transfekci, v kratším časovém intervalu 24 hodin nebyl detekován žádný specifický signál pro NS2A, byl prodloužen interval od transfekce na 48 hodin. Koncentrace 40 000 buněk na jamku se ukázala jako nevhodná, jelikož jamky byly příliš hustě porostlé, a proto byla koncentrace nadále snížena na 20 000 buněk na jamku.

U transfekovaných vzorků (wild type i mutovaný protein NS2A) 48 hodin po transfekci a infikovaných vzorků 48 po infekci byl detekován specifický signál proteinu NS2A (obr. 16 a 17), který má charakter několika ohraničených kulatých ložisek, často blízko jádra. Nebyla detekována přímá kolokalizace proteinu NS2A a endoplazmatického retikula (absence žluté barvy). Tato ložiska byla tímto signálem spíše obklopena, takže NS2A se zřejmě nacházel v membránových váčcích endoplazmatického retikula. U transfekovaných vzorků wild type i mutovaný protein NS2A se lokalizace a vzhled signálu proteinu NS2A neliší. V porovnání s infikovanými vzorky se ale liší tvarem, viz obr. 18, 19 a 20. U transfekovaných vzorků lze detekovat ohraničené, kulovité útvary, u infekčních vzorků jsou to povětšinou neohraničená

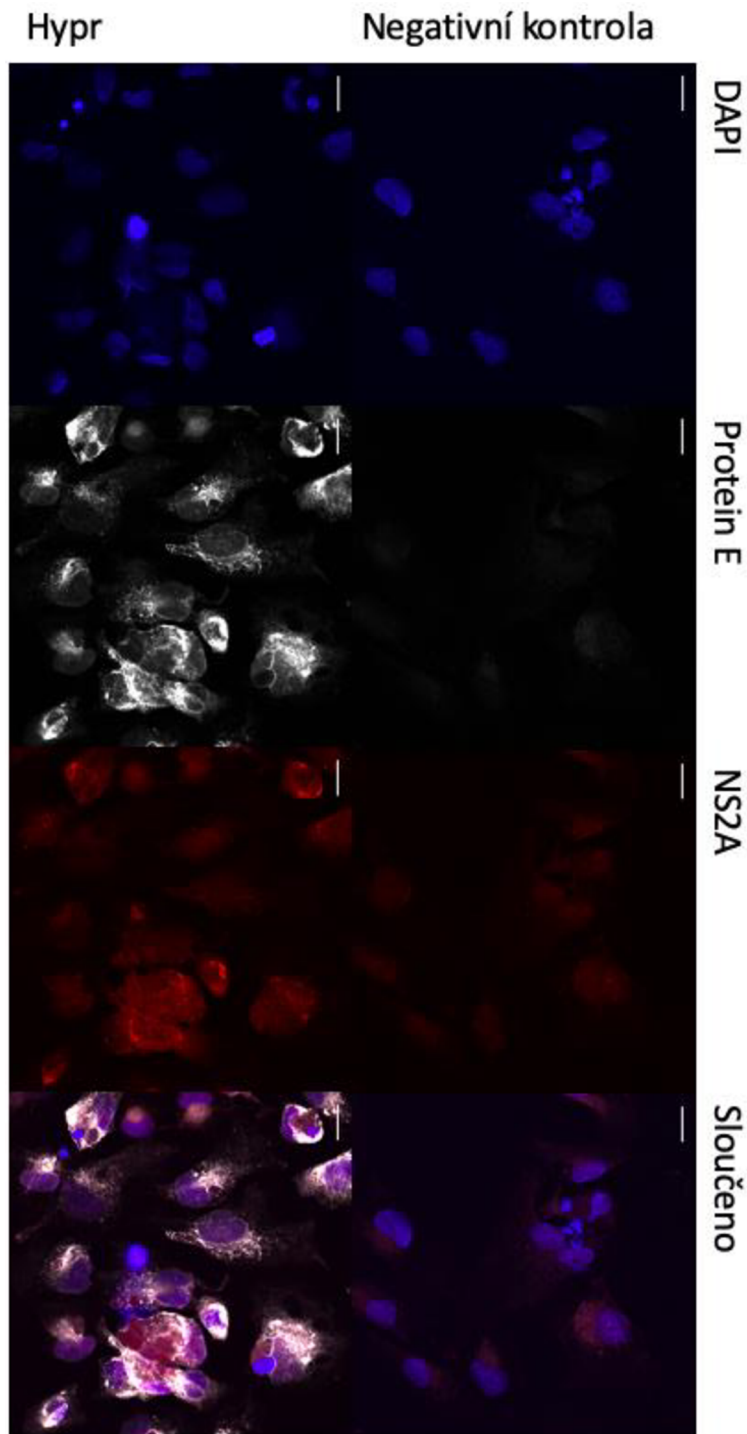
ložiska rozptýlená i více do cytoplazmy. Během infekce byla kolokalizace proteinu NS2A s proteinem E částečná, ne však u všech buněk. Intenzita signálu, a tedy nejspíše i množství proteinu E v buňkách byla výrazně vyšší než pro NS2A protein.



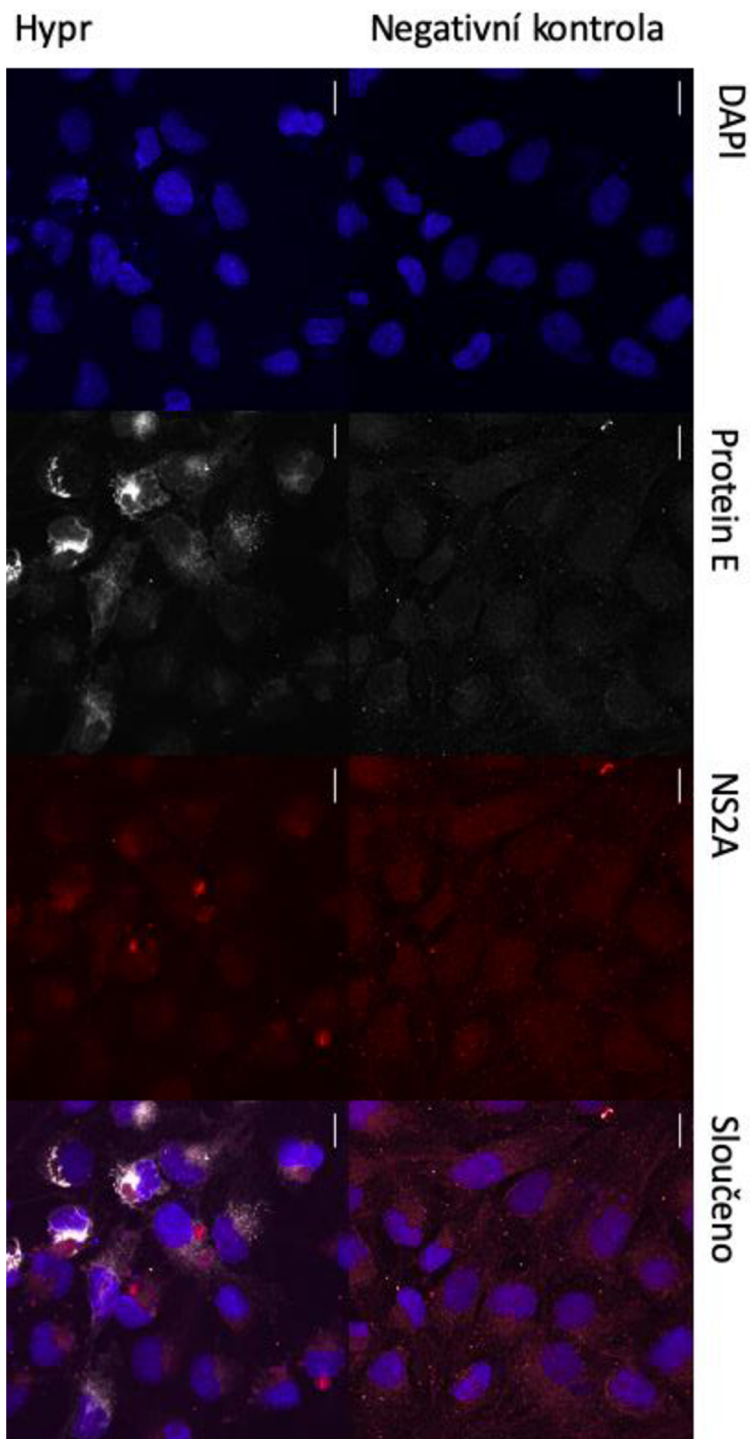
Obr.16: Detekce proteinu NS2A mut v transfekovaných buňkách pomocí imunofluorescenčního značení. Buňky DAOY HTB-186 byly transfekovány NS2A mut jako negativní kontrola posloužil kontrolní vektor EV. Fixace proběhla 48 hodin po transfekci, primární protilátka proti NS2A byla použita v ředění 1:400. Zvětšeno 60x, měřítko odpovídá 4 mikrometrům. Modrá barva (DAPI) značí jádra buněk, zelená barva (Calnexin) značí endoplazmatické retikulum (ER) a červená barva (NS2A) značí protein NS2A mut TBEV. Poslední fotografie slučuje všechny tři signály dohromady.



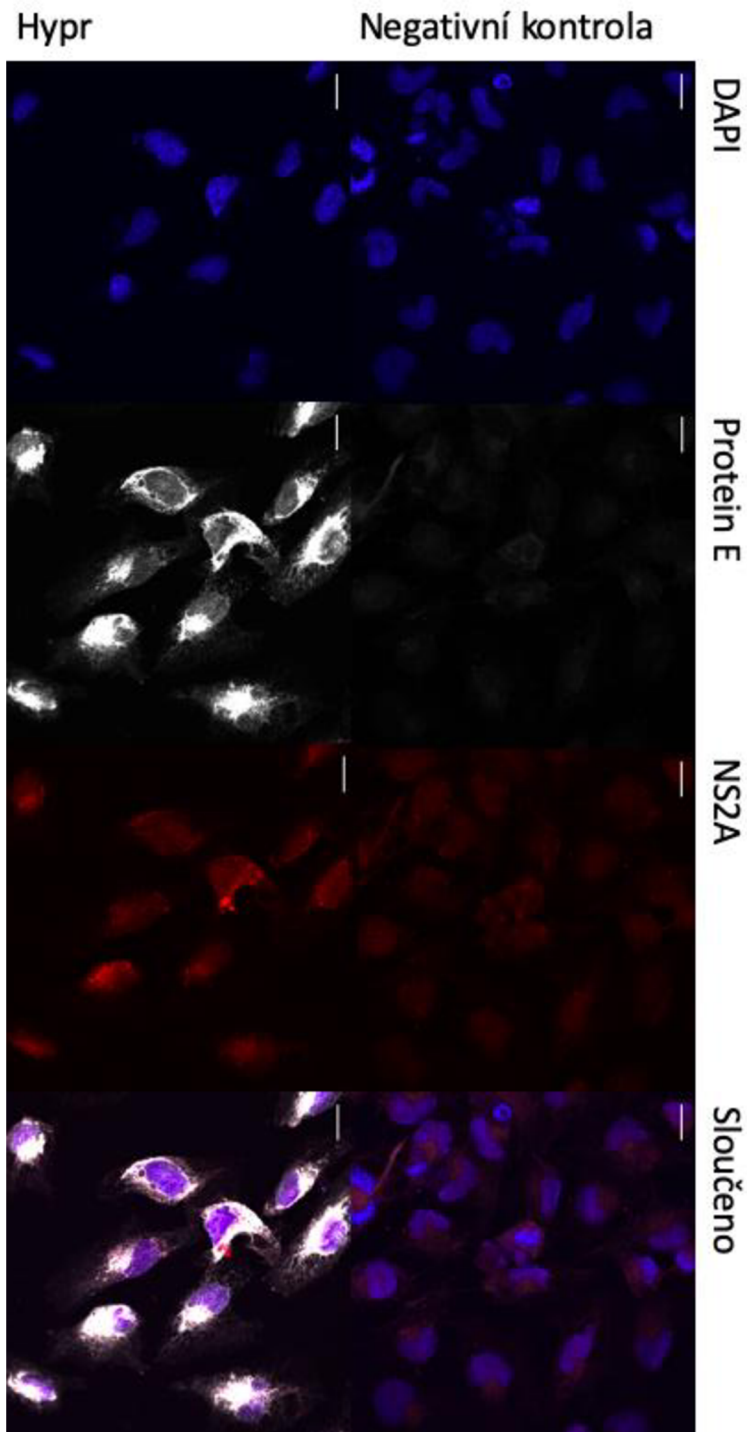
Obr.17: Detekce proteinu NS2A wt v transfekovaných buňkách pomocí imunofluorescenčního značení. Buňky DAOY HTB-186 byly transfekovány NS2A wt, jako negativní kontrola posloužil kontrolní vektor EV. Fixace proběhla 48 hodin po transfekci, primární protilátka proti NS2A byla použita v ředění 1:400. Zvětšeno 60x, měřítko odpovídá 4 mikrometrům. Modrá barva (DAPI) značí jádra buněk, zelená barva (Calnexin) značí endoplazmatické retikulum (ER) a červená barva (NS2A) značí protein NS2A TBEV. Poslední fotografie slučuje všechny tři signály dohromady.



Obr. 18: Detekce proteinu NS2A v infikovaných buňkách pomocí konfokálního mikroskopu. Buňky DAOY HTB-186 byly infikovány TBEV, kmen Hypr, jako negativní kontrola byly použity neinfikované buňky DAOY HTB-186. Fixace proběhla 48 hodin po infekci, primární protilátka byla použita v ředění 1:400. Zvětšeno 60x, měřítko odpovídá 4 mikrometrům. Modrá barva (DAPI) značí jádra buněk, šedá barva (protein E) značí protein E TBEV a červená barva (NS2A) značí protein NS2A TBEV. Poslední fotografie slučuje všechny tři signály dohromady.



Obr. 19: Detekce proteinu NS2A v infikovaných buňkách pomocí konfokálního mikroskopu. Buňky DAOY HTB-186 byly infikovány TBEV, kmen Hypr, jako negativní kontrola byly použity neinfikované buňky DAOY HTB-186. Fixace proběhla 48 hodin po infekci, primární protilátka byla použita v ředění 1:500. Zvětšeno 60x, měřítko odpovídá 4 mikrometrům. Modrá barva (DAPI) značí jádra buněk, šedá barva (protein E) značí protein E TBEV a červená barva (NS2A) značí protein NS2A TBEV. Poslední fotografie slučuje všechny tři signály dohromady.



Obr. 20: Detekce proteinu NS2A v infikovaných buňkách pomocí konfokálního mikroskopu. Buňky DAOY HTB-186 byly infikovány TBEV, kmen Hypr, jako negativní kontrola byly použity neinfikované buňky DAOY HTB-186. Fixace proběhla 48 hodin po infekci, primární protilátka byla použita v ředění 1:1000. Zvětšeno 60x, měřítko odpovídá 4 mikrometrům. Modrá barva (DAPI) značí jádra buněk, šedá barva (protein E) značí protein E TBEV a červená barva (NS2A) značí protein NS2A TBEV. Poslední fotografie slučuje všechny tři signály dohromady.

6 Diskuse

Protein NS2A TBEV je jedním z nejméně prozkoumaných nestrukturních proteinů. U flavivirů podobných TBEV je popisován jako protein, který má velmi důležitou roli v procesu vbalování nové vRNA a tvoří tzv. replikační komplex (Xie, 2013). Samotná exprese proteinu NS2A u DENV inhibuje imunitní odpověď zprostředkovanou interferonem α/β (Liu, 2006). Protein NS2A u DENV a KUNJ se vyskytuje ve virem indukovaných membránových váčcích (Leung, 2008).

Protože se protein NS2A TBEV dosud příliš neprozkoumal, porovnání odpovídajících metod z jiných experimentů jsou omezená. Metodou imunoblotu se nepodařilo detekovat protein NS2A jak v transfekovaných, tak infikovaných buňkách. U transfekovaných buněk se v příštích experimentech může prodloužit čas z 24 hodin po transfekci na 48 hodin po transfekci, než se buňky budou lyzovat. Interval více než 24 hodin by možná mohl být příznivější pro následnou detekci tohoto proteinu, jelikož v buňkách může být obsažen ve větším množství. Přechodná transgenová exprese prospívá replikaci plazmidových vektorů v případě, že doba produkce bude delší než 2 nebo 3 dny. Po této době je výsledek významný, protože nereplikující se plazmidy se během buněčného dělení ztrácejí (Jäger, 2015).

U infikovaných buněk byl dodržen interval od infekce 48 hodin. I po zvyšování vstupního množství materiálu (množství celkového proteinového lyzátu naneseného na gel) či terciálním značení se přesto nepodařilo protein NS2A detekovat metodou imunoblotu. Na detekci NS2A pomocí imunoblotu nemělo vliv zachování/narušení disulfidických můstků (redukující/neredukující podmínky). Detekce proteinu NS2A možná nebyla dosažena tím, že metoda imunoblotu využívá denaturujících podmínek. Tyto podmínky mohou způsobit změnu epitopu. Zejména pokud není epitop, který protilátka rozeznává lineární, ale je závislý na určité konformaci, kterou protein zaujímá, pak často navržená protilátka tento denurací „pozměněný“ epitop nemusí rozpoznat. Většina nelineárních epitopů jsou v metodě imunoblotu narušena či pozměněna. V dalších experimentech by se mohlo více zaměřit na konformace epitopů a navrhnout k nim protilátky proti fragmentům bílkovin, které pokrývají 50-150 aminokyselin jedinečné sekvenční oblasti cílové bílkoviny v porovnání s jinými bílkoviny tohoto druhu. Tato strategie využití rekombinantních fragmentů proteinů je označována jako Protein Epitope Signature Tags (PrEST) (Forsström, 2015). Naopak u metody IF se protein NS2A detekovat podařilo. Tato metoda neprobíhá v denaturovaných podmínkách, avšak za použití fixačního roztoku. Různé fixační roztoky mohou zakonzervovat anebo skrýt epitop pro

jeho možnou detekci protilátkou během imunofluorescenčního značení. V tomto případě jej navržená protilátka rozpoznala (Im, 2019).

Pomocí IF byl detekován specifický signál proteinu NS2A. Byl detekován v oblasti endoplazmatického retikula, a to nejčastěji v ohraničených útvarech, nejspíše tedy v membránových váčcích. Tyto virem indukované membránové útvary zvyšují účinnost virové replikace (Miorin, 2013). U KUNV a DENV se protein NS2A vyskytuje také v membránových váčcích (Mackenzie, 1998), je tedy dost pravděpodobné, že v případě TBEV tomu bude obdobně. V porovnání buněk transfekovaných a infikovaných se lokalizace lehce lišila. U transfekovaných buněk (obr.16 a 17) lze zřetelně rozpoznat ohraničená místa, nejčastěji kulovitého tvaru, kde byl signál detekován nejvíce. U infikovaných buněk (obr. 18, 19 a 20) takovéto zřetelně ohraničené útvary často nejsou, pozorovaný signál je více disperzní. To může být ovlivněno tím, jak buňky reagují pouze na vektor nesoucí protein NS2A, či na celou infekci TBEV. Lokalizace v buňce je závislá na funkci, kterou daný protein má a jakých procesů se účastní. Proto se detekovaný signál může lišit, protože interaguje s různými proteiny v různých procesech (Stow, 2005). Je možné, že absence ostatních strukturních a nestrukturních proteinů u transfekovaných buněk mění i intercelulární lokalizaci proteinu NS2A. U transfekovaných buněk bylo značeno i endoplazmatické retikulum, detekovaný signál proteinu NS2A se vyskytoval pouze zde. U buněk infikovaných byl značen protein E TBEV. Tento protein je jedním ze strukturních proteinů a je to hlavní obalový protein (Pulkkinen, 2022). Protein NS2A byl u některých infikovaných buněk částečně kolokalizován s proteinem E. Protein E se v infikovaných buňkách nacházel ve větším množství než protein NS2A, tudíž byl u něj detekován silnější signál. V jedné studii (Zhang, 2019) bylo popsáno, že protein NS2A ZIKV se váže na prM, E, NS2B a NS3 (ale neváže se na C, NS4B ani NS5) způsobem, který není závislý na vRNA.

V dalších experimentech by u infikovaných buněk mohlo být naznačeno společně s NS2A i endoplazmatické retikulum, aby se dala lépe porovnat lokalizace proteinu NS2A a případná kolokalizace s proteinem E. Případně se mohou naznačit další membránové struktury, např. Golgiho aparát a jeho různé části.

Většina publikovaných prací, které studují funkce NS2A flavivirů, detekuje exprimovaný protein se značkou (TAG), zřídka je detekce NS2A proteinu zkoumána v přirozeně infikovaných buňkách (Zhang, 2019).

V této práci se podařilo optimalizovat detekci proteinu NS2A TBEV v transfekovaných a infikovaných buňkách za pomoci IF navrženou protilátkou. Metoda imunoblotu byla v detekci proteinu NS2A neúspěšná jak u transfekovaných, tak u infikovaných buněk. Bylo také potvrzena lokalizace proteinu NS2A v buňce, a to v oblasti endoplazmatického retikula, nejspíše v membránových váčcích. Protein NS2A byl detekován pouze 48 hodin po transfekci či infekci. V intervalu 24 hodin po transfekci či infekci nebyl detekován specifický signál, nejspíše kvůli nižšímu celkovému množství proteinu krátce po transfekci anebo v časných fázích infekce. V dalších experimentech by mohla být použita navržená protilátka k lepšímu pochopení sbalování nové vRNA, replikačního cyklu TBEV a spolupráce dalších strukturních i nestructurních proteinů v těchto procesech (Barnard, 2021).

7 Závěr

V této práci byl detekován protein NS2A TBEV pomocí navržené protilátky v buňkách DAYO HTB 186, a to jak v případě infekce, tak i za použití plazmidu NS2A wt a plazmidu NS2A mut. Specifický signál se podařilo detekovat pomocí IF jak u infikovaných, tak u transfekovaných buněk 48 hodin po transfekci. Nejlepší podmínky značení primární protilátkou u transfekovaných a infikovaných buněk bylo v poměru 1:400. Bylo zjištěno, že protein NS2A se vyskytuje v oblasti endoplazmatického retikula, a to nejspíše v membránových váčcích. Lokalizace proteinu NS2A se u transfekovaných a infikovaných buněk mírně lišila. Pomocí imunoblotu se detekce proteinu NS2A nezdařila.

8 Seznam použitých zdrojů

Abdiyeva K., Turebekov N., Yegemberdiyeva R. et al. (2020). Vectors, molecular epidemiology and phylogeny of TBEV in Kazakhstan and central Asia. *Parasites Vectors* 13 504.

Agudelo M., Palus M., Keeffe J. R., Bianchini F., Svoboda P., Salát J., Peace A., Gazumyan A., Cipolla M., Kapoor T., Guidetti F., Yao K. H., Elsterová J., Teislerová D., Chrdle A., Hönig V., Oliveira T., West A. P., Lee Y. E., Rice C. M., MacDonald M. R., Bjorkman P. J., Růžek D., Robbiani D. F., Nussenzweig M. C. (2021). Broad and potent neutralizing human antibodies to tick-borne flaviviruses protect mice from disease. *Experimental Medicine*. 218 5.

Apte-Sengupta S., Sirohi D., Kuhn R. J. (2014). Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Current Opinion in Virology*. 9 134-142.

Barnard T. R., Abram Q. H., Lin Q. F., Wang A. B., Sagan S. M. (2021). Molecular determinants of Flavivirus virion assembly. *Trends in Biochemical Sciences* 46 78-390.

Barrows N. J., Campos R. K., Liao K. C., Prasanth K. R., Soto-Acosta R., Yeh S. C., Schott-Lerner G., Pompon J., Sessions O. M., Bradrick S. S., and Garcia-Blanco M. A. (2018). Biochemistry and molecular biology of flaviviruses. *Chemical Reviews*. 118 4448-4482.

Česká vakcinologická společnost ČLS JEP (2020). Doporučený postup České vakcinologické společnosti pro prevenci a očkování proti klišťové encefalitidě [online]. <https://www.vakcinace.eu/doporuceni-a-stanoviska>.

Dumpis U., Crook D., Oksi J. (1999). Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases* 882-890.

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.

Fama A., Larson M., Link B., Habermann T., Feldman A., Call T., Ansell S., Liebow M., Xiang J., Maurer M., Slager S., Nowakowski G., Stapleton J., Cerhan J. (2020). Human pegivirus infection and lymphoma risk: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 71 1221-1228.

Forsström B., Axnäs B.B., Rockberg J., Danielsson H., Bohlin A., Uhlen M. (2015). Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One*.10 e0121673.

Gritsun T. S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S. L., Frolova M. P., Pogodina V. V., Lashkevich V. A., Gould E. A. (2003). Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *Journal of Virology* 77 25-36.

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.

Holbrook M. (2017). Historical perspectives on flavivirus research. *Viruses* 5 97.
<http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC158465.pdf&type=spc&as=fsme-immun-spc>.

Chong H. Y., Leow Ch. Y., Majeed A. B. A., Leow Ch. H. (2019). Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. *Virus research* 274 197770.

Im K., Mareninov S., Diaz M. F. P., Yong W. H. (2019). An introduction to performing immunofluorescence staining. *Methods in Molecular Biology*. 1897 299-311.

Jäger V., Büssow K., Schirrmann T. (2015). Transient recombinant protein expression in mammalian cells. *Animal Cell Culture. Cell Engineering* vol 9. 27–64.

Kaiser R. (2016): Tick-borne encephalitis. *Nervenarzt* 87 667–680.

Kopecký J., Grubhoffer L., Kovář V., Jindrák L., Vokurková D. (1999). A putative host cell receptor for tick-borne encephalitis virus identified by anti-idiotypic antibodies and virus affino blotting. *Intervirology*. 42 9-16.

Kříha M.F., Chrdle A., Růžek D., Chmelík V. (2021). What we know and still do not know about tick-borne encephalitis? *Epidemiology, Mikrobiology, Immunology*. 70 189-198.

Labuda M., Nuttall P. A., Kozuch O., et al. (1993). Nonviremic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia*. 49 802–5.

Kumar S., Verma A., Yadav P., Dubey S. K., Azhar E. I., Maitra S. S., Dwivedi V. D. (2022). Molecular pathogenesis of Japanese encephalitis and possible therapeutic strategies. *Archives of Virology*. 167 1739-1762.

Leung J. Y., Pijlman G. P., Kondratieva N., Hyde J., Mackenzie J. M., Khromykh A. A. (2008). Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *Journal of Virology*. 82 4731-4741.

Lindquist L., Vapalahti O. (2008). Tick-borne encephalitis. *The Lancet* 371 1861-1871.

Liu W. J., Wang X. J., Clark D. C., Lobigs M., Hall R. A., Khromykh A. A. (2006). A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *Journal of Virology*. 80 2396–2404.

Mackenzie J. M., Khromykh A. A., Jones M. K., Westaway E. G. (1998). Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology*. 245 203-215.

Mahmood T., Yang P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 4 429-34.

Miorin L., Romero-Brey I., Maiuri P., Hoppe S., Krijnse-Locker J., Bartenschlager R., Marcello A. (2013). Three-dimensional architecture of tick-borne encephalitis virus replication sites and trafficking of the replicated RNA. *Journal of Virology*. 87 6469-81.

Neufeldt C., Cortese M., Acosta E. et al. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature Reviews Microbiology* 16 125–142.

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)* 29 211-219.

Orlíková H., Lenz P., Vlčková I., Kynčl J. (2021). Klíšťová encefalitida v České republice v roce 2020. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 30 236–245.

Pathogenesis of Viral Infections and Diseases. (2011). *Fenner's Veterinary Virology.* 43–74.

Pierson T. C., Diamond M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nature Microbiology* 5 796–812.

Postler T. S., Beer M., Blitvich B. J. et al. (2023). Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family *Flaviviridae*. *Archives of Virology* 168 224.

Pugh S. J., Moisi J. C., Kundi M., Santonja I., Erber W., Angulo F. J., Jodar L. (2022). Effectiveness of two doses of tick-borne encephalitis (TBE) vaccine. *Journal of Travel Medicine* 29 2.

Pulkkinen L. I. A., Barrass S. V., Domanska A., Överby A. K., Anastasina M., Butcher S. J. (2022). Molecular organisation of tick-borne encephalitis virus. *Viruses.* 14 792.

Pulkkinen L. I. A., Butcher S. J., Anastasina M. (2018). Tick-borne encephalitis virus: A Structural View. *Viruses* 10 350.

Růžek D. et al. (2015). Klíšťová encefalitida. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-5305-8.

Růžek D., Avšič Županc T., Borde J., Chrdle A., Eyer L., Karganova 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.

Sakoda Y. (2011): *Pestivirus* 61 239-248.

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.

Stow J., Teasdale R. (2005). Expression and localization of proteins in mammalian cells. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics*.

SÚKL (2020). Souhrn údajů o přípravku FSME-IMMUN 0,5 ml.

Süss J. (2003). Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*. 21 S19-35.

Tang J., Xu C., Fu M., Liu C., Zhang X., Zhang W., Pei R., Wang Y., Zhou Y., Chen J., Miao Z., Pan G., Yang Q., Chen X. (2023). Sterile 20like kinase 3 promotes tick-borne encephalitis virus assembly by interacting with NS2A and prM and enhancing the NS2A-NS4A association. *Journal of Medical Virology*. 95 1-15.

Valarcher J., Hägglund S., Juremalm M., Blomqvist G., Renström L., Zohari S., Leijon M., Chirico J. (2015). Tick-borne encephalitis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 34 453-466.

Voßmann S., Wieseler J., Kerber R., Kümmerer B.M. (2015). A basic cluster in the N terminus of yellow fever virus NS2A contributes to infectious particle production. *Journal of Virology*. 89 4951-4965.

Wu R. H., Tsai M. H., Tsai K. N., Tian J. N., Wu J. S., Wu S. Y., Chern J. H., Chen C. H., Yueh A. (2017). Mutagenesis of Dengue virus protein NS2A revealed a novel domain responsible for virus-induced cytopathic effect and interactions between NS2A and NS2B transmembrane segments. *Journal of Virology*. 91 1836-16.

Xie X., Gayen S., Kang C., Yuan Z., Shi P. Y. (2013). Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *Journal of Virology*. 87 4609-22.

Xuping X., Shovanlal G., CongBao K., Zhiming Y., Pei-Yong S. (2013). Membrane topology and function of Dengue Virus NS2A protein. *Journal of Virology*. 87 8.

Yu Y., Wan Z., Wang J. H., Yang X., Zhang C. (2022). Review of human pegivirus: Prevalence, transmission, pathogenesis, and clinical implication. *Virulence* 13 324-341.

Zhang X., Xie X., Xia H., Zou J., Huang L., Popov V. L., Chen X., Shi P. Y. (2019). Zika Virus NS2A-mediated virion assembly. *American Society for Microbiology*. 10 5.

Zou J., Xie X., Lee le T., Chandrasekaran R., Reynaud A., Yap L., Wang Q. Y., Dong H., Kang C., Yuan Z., Lescar J., Shi P. Y. (2014). Dimerization of flavivirus NS4B protein. *Journal of Virology*. 88 3379-91.