

**Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích**

**Příprava rekombinantního proteinu NS1
viru klíšťové encefalitidy**

Bakalářská práce

Paula Helebrandová

2012

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc

Školitel specialista: Mgr. Jiří Černý

Bakalářská diplomová práce

Helebrandová P., 2012: Příprava rekombinantního proteinu NS1 viru klíšťové encefalitidy. [Preparation of the Tick-borne encephalitis virus recombinant protein NS1]. Bc. Thesis, in Czech., 60 p., Faculty of Science, The University of South Bohemian, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The NS1 is one of seven non-structural proteins of the tick-borne encephalitis virus. NS1 protein share a high degree of homology among flaviviruses. Protein self-induces protective immune responses against flaviviruses and therefore is frequently used as a marker of viral infection.

The structure and function of the NS1 protein remain essentially unknown yet. More accurate description of tertiary and quaternary structure could open the way for research of its role in life cycle of the TBEV virus and other flaviviruses and can lead for the development of new anti-viral vaccination and/or treatment.

The main aim of this study was to prepare sufficient amount of tick-borne encephalitis virus NS1 protein to produce polyclonal antibodies and do functional and structural analyses. Therefore NS1 protein was expressed as his-tagged fusion protein in bacterial expression system. Our results showed that tick-borne encephalitis virus NS1 is difficult to express and yields are too low to follow-up analyses yet.

Bakalářská práce byla financována z výzkumného centra 39-LC 06009, MSM6007665801, z grantu Grantové agentury ČR GA302/11/1901, GAP302/12/2490 a GA206/09/1782.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to [v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou] 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.

V Českých Budějovicích

.....

Paula Helebrandová

Člověk se stane takovým, s jakými lidmi má tu možnost se setkat a jaké si k sobě pustí. Já měla štěstí. Proto bych touto cestou chtěla poděkovat svému vedoucímu práce Prof. Liborovi Grubhoffrovi za příležitost účastnit se práce na tomto vědeckém projektu a za rady a čas, které mi věnoval.

Dr. Jankovi Štěrbovi za pomoc a cenné rady a v neposlední řadě, za to že si mě před třemi roky všiml a dal mi šanci zapojit se do laboratorního dění.

Také svému školiteli specialistovi Mgr. Jirkovi Černému, kterého jsem mohla otravovat kdykoli s čímkoli a i když to semnou neměl lehké, vážím si toho, že vytrval a nikdy to se mnou nevzdal.

Také bych chtěla poděkovat Dr. Aleně Zíkové a Mgr. Petru Koníkovi za ochotu a pomoc s přípravou vzorků na HPLC a MS a Doc. Ivaně K. Smatanové za možnost nahlédnout do tajů biomolekulární krystalografie. A všem členům Laboratoře molekulární ekologie vektorů a patogenů za příjemnou atmosféru.

Mé velké díky patří i Anýzce, Verče, Štěpánce a Káče. Holky bez Vás bych se už zbláznila.

Poděkování patří i mým potkánkům, díky jejichž roztomilosti bylo vše snesitelnější.

Největší díky však patří mým rodičům za lásku, pochopení a podporu při studiu.

Děkuji Vám všem.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍLE PRÁCE	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1. FLAVIVIRY	3
3.1.1. Zařazení	3
3.1.2. Struktura flavivirového genomu	4
3.1.3. Flavivirové strukturní proteiny	5
3.1.4. Flavivirové nestrukturní proteiny	6
3.1.5. Flavivirový nestrukturní protein 1	8
3.1.6. Replikační cyklus flavivirů	12
3.1.7. Flavivirové vakcíny	13
3.2. VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY	14
3.2.1. Klasifikace	14
3.3.2. Způsob a průběh nemoci	14
4. MATERIÁL A METODY	16
4.1. MATERIÁL	16
4.1.1. Použité primery	16
4.1.2. Chemikálie a kity	17
4.1.2.1. Použité chemikálie a roztoky	17
4.1.2.2. Kity	18
4.1.2.3. Klonovací a expresní plasmidy	19
4.1.2.4. Bakteriální kmeny	19
4.2. METODY	20
4.2.1. Expresse rekombinantního proteinu NS1 v savčích buňkách	20
4.2.1.1. Izolace genové RNA viru klíšťové encefalitidy a příprava virové cDNA	20
4.2.1.2. PCR amplifikace sekvence kódující NS1	20
4.2.1.3. Vložení sekvence kódující NS1 do pCR®2.1-TOPO®	21
4.2.1.4. Vložení sekvence kódující NS1 do pcDNA™3.1/V5-His	24
4.2.1.5. Transfekce savčích buněk	26
4.2.2. Expresse rekombinantního proteinu NS1 v bakteriích	27
4.2.2.1. Amplifikace kódující sekvence NS1	27

4.2.2.2. Klonování pomocí Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kit	28
4.2.2.3. Expres rekombinantního proteinu v BL21 Star™(DE3) <i>E. coli</i>	28
4.2.3. Purifikace NS1 a analýza jeho přítomnosti.....	29
5. VÝSLEDKY	33
5.1. Expres rekombinantního proteinu NS1 v savčích buňkách	33
5.1.1. PCR amplifikace DNA kódující protein NS1	33
5.1.2. pCR®2.1-TOPO®	33
5.1.3. Vložení sekvence kódující NS1 do pcDNA™3.1/V5-His.....	36
5.1.4. Transfekce savčích buněk	38
5.2. Expres rekombinantního proteinu NS1 v bakteriích	39
5.2.1. Champion™ pET Directional TOPO®.....	39
5.3. Purifikace rekombinantního proteinu NS1 a analýza jeho přítomnosti	41
5.3.1. Purifikace rekombinantního proteinu pomocí 'Co-MAC Purification Kits'	41
5.3.2. Purifikace rekombinantního proteinu pomocí AKTA HPLC machine.....	42
5.3.3. Hmotnostní spektrometrie.....	44
6. DISKUZE	45
7. ZÁVĚR	49
8. POUŽITÉ ZKRATKY	50
9. LITERATURA	52

Všechny použité manuály a získané sekvence jsou přítomny v elektronické příloze (Přílohy) na CD, které doplňuje tuto tištěnou verzi.

1. ÚVOD

Protein NS1 je jeden ze sedmi nestrukturních proteinů viru klíšťové encefalitidy. Tento 39 kDa velký protein, jehož sekvence je vysoce konzervovaná u všech flavivirů, je silně produkován v infikovaných buňkách. Protein se vyskytuje v mnoha posttranslačních modifikacích, z nichž některé jsou uvolňovány v rozpustné formě mimo buňku. Protein sám o sobě indukuje ochrannou imunitní odpověď a je často využíván jako marker naznačujících prodělání virové infekce.

Struktura a funkce proteinu NS1 při replikaci a maturaci viru nejsou dosud známy. Přesnější popis terciální a kvarterní struktury proteinu může otevřít cestu k výzkumu jeho role v životním cyklu viru i k vývoji nových antivirotik.

Cílem této práce bylo připravit metodiku pro produkci rekombinantního proteinu NS1 v dostatečném množství pro další strukturní a funkční analýzy.

2. CÍLE PRÁCE

Hlavní náplní tohoto projektu bylo vytvoření rekombinantního proteinu NS1.

Byly vytyčeny následující cíle práce:

- vložit cDNA kódující studovaný protein do plazmidu vhodného pro jeho expresi
- připravit buněčné linie exprimující studovaný protein
- nalézt optimální podmínky pro expresi a purifikaci proteinu
- exprimovat a purifikovat rekombinantní protein
- výsledky ověřit pomocí metody Western Blotting a MS analýzy

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. FLAVIVIRY

3.1.1. Zařazení

Flaviviry (třída *Flaviviridae* a rod *Flavivirus*) jsou původci širokého spektra nemocí. Mohou způsobovat různé asymptomatické infekce, mírná horečnatá onemocnění, často doprovázená bolestmi hlavy, až po těžké encefalidity, meningitidy, hepatitidy, a hemoragické horečky někdy doprovázené šokovými syndromy (Liendenbach , 2001). Mezi flaviviry patří členovci přenášené viry (arboviry). Viry pak dále přenáší obratlovci, kteří jsou infikováni komáry nebo klíšťaty (Gould, 2008). Rod flavivirus zahrnuje 70 potvrzených druhů (ICTV, 2012), a ty tvoří tři skupiny, rozdělené na základě způsobu přenosu, a to komáry přenášené viry, klíšťaty přenášené viry a viry, u nichž zatím není znám přenašeč. Flaviviry jsou také klasifikovány na základě sérologické zkřížené reaktivity (Maeda, 2013). Skupina flavivirů přenášených komáry obsahuje virový komplex Aroya, komplex Dengue virů, virovou skupinu Ntaya, virovou skupinu Japonské encefalidity a virovou skupinu viru Žluté horečky. Skupina flavivirů přenášených klíšťaty pak obsahuje virové skupiny přenášené klíšťaty na savce a na mořské ptáky (viz. Tab. 1).

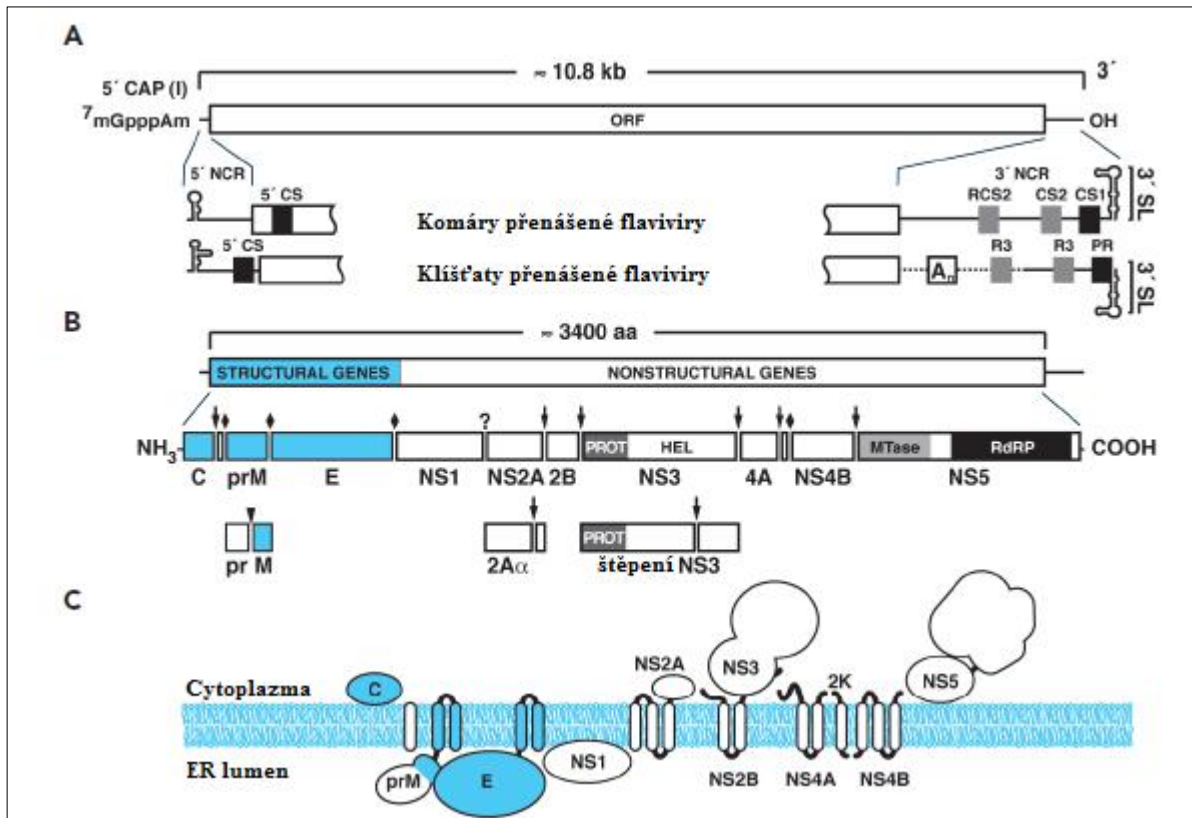
Rozdělení flavivirů podle způsobu šíření	Antigenní skupiny komplexů	Viry
Komáry přenášené flaviviry	Virový komplex Aroya	Bussuquara virus, Iguape virus, Naranjal virus
	Komplex Dengue virů	Dengue virus (DENV) 1, DENV 2, DENV 3, DENV 4
	Skupina virů Japonské encefalidity	Virus japonské encefalidity, Caci paocre virus, Murray Valley encephalitis virus, West Nile virus, Kunjin virus, Usutu virus, Kokobera virus
	Virová skupiny Ntaya	Bagaza virus, Ntaya virus, Tembusu virus, Zika virus
	Virová skupina Žluté zimnice	Banzi virus, Bouboui virus, Edge Hill virus, Jugra virus, Saboya virus, Sepik virus, Uganda virus, Wesselsbron virus, Virus Žluté horečky
Klíšťaty přenášené flaviviry	Skupina virů přenášených klíšťaty na savce	Virus omské hemoragické horečky, Louping ill virus, Kyasanur Forest disease virus, Powassan virus, Royal Farm virus
	Skupina virů přenášených klíšťaty na mořské ptáky	Kadam virus, Meaban virus, Saumarez Reef virus, Tyuleniy virus
Flaviviry bez známého přenašeče	Virová skupina Entebbe netopýrů	Entebbe bat virus, Yokose virus
	Virová skupina Modoc	Apoi virus, Cowbone Ridge virus, Jutiapa virus, Modoc virus, Sal Vieja virus, San Perlita virus
	Virová skupina Rio Bravo	Bukalasa bat virus, Carey Island virus, Dakar bat virus, Montana myotis leukoencephalitis virus, Phnom Penh bat virus
	Prozatímně hmyzí skupina v rodě flavivirů	Cell fusing agent virus, Tamana bat virus, Kamiti River virus

Tab. 3.1: Seznam flavivirů členěný podle způsobu šíření a skupin antigenních komplexů (převzato z: Maeda, 2013).

3.1.2. Struktura flavivirového genomu

Flavivirové viriony mají v průměru zhruba 50nm (Murphy, 1980). Flavivirový genom se skládá z jednořetězcové RNA pozitivní polaritě (+ssRNA) o velikosti přibližně 11 kb. Genom je na 5' konci zakončen 7-methylguanidinovou čepičkou (7-mG) typu I - m⁷GppAmpN₂ (Cleaves, 1979). Další metylace na N₂ zbytku (čepička typu II), která byla také zaznamenána u mRNA hostitelských buněk u flavivirů chybí. Na rozdíl od buněčné mRNA flavivirový genom postrádá 3' polyadenylový konec, výjimkou jsou přibližně 100 nukleotidů dlouhé homopolyadenylové sekvence uvnitř variabilní oblasti některých izolátů viru klíšťové encefalitidy (TBEV) (Wallner, 1995). Genom VKE kóduje jeden dlouhý otevřený čtecí rámeček (ORF) (viz. Obr. 3.1), který ohraničuje 5' a 3' nekódující oblasti (UTR) o velikosti zhruba ~100 nt (5'UTR) a 400 až 700 nt (3'UTR) (Markoff, 2003). Organizace 3'UTR se velmi liší mezi komáry a klíšťaty přenášenými flaviviry. Třebaže 3'UTR flavivirového genomu vykazují velkou variabilitu, podobné modely konzervovaných sekvencí a struktur byly nalezeny u všech flavivirů (Markoff, 2003). Největší strukturální podobnost je u dlouhé 3'vlásky (3'SL) (90 až 120 nt), která se na úrovni nukleotidové sekvence různí mezi komáry a klíšťaty přenášenými flaviviry (Thurner, 2004). Těsně před 3'SL, se nachází oblast o velikosti 25 nt (CS1), která je velmi dobře konzervovaná u komáry přenášených flavivirů a páruje se s komplementární sekvencí (5'CS) nacházející se na začátku genu kódujícího protein C, vzdáleného více než 10 kilobází proti směru transkripce. Podobné vzdálené párování mezi těmi to oblastmi se vyskytuje i u virů přenášených klíšťaty (Kofler, 2006). Komplementarita mezi těmito cyklizačními sekvencemi se ukazuje být nezbytnou pro replikaci flavivirů, zejména pro výběr RNA sloužící jako templát pro replikaci (Khromykh, 2001).

Translace je u flavivirů závislá na čepičce. Během překladu jednoho dlouhého ORF je vytvářen velký polyprotein, který je ko- a posttranslačně štěpen na 10 různých proteinů. N- koncová první čtvrtina tohoto polyproteinu kóduje strukturální proteiny (C-prM-E), zbylá část pak nestrukturní proteiny (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-2K-NS4B-NS5). Hostitelská signální peptidáza je zodpovědná za štěpení mezi proteiny C/prM, prM/E, E/NS1 a 2K-NS4B. Virem kódovaná serinová proteáza NS2B-NS3 pak štěpí spojení mezi NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K a NS4B/NS5 (Rice, 1985). Enzym zodpovědný za štěpení NS1/NS2A spoje je dosud neznámý (Lai, 1994).



Obr. 3.1: Struktura flavivirového genomu a jeho exprese.

3.1.3. Flavivirové strukturní proteiny

Kapsidový protein C

Kapsidový protein C je základním flavivirovým proteinem o velikosti ~11 kDa. Nabité zbytky jsou soustředěny ve shluku na N- a C-koncích polyproteinu a odděleny interní hydrofobní oblastí, která zprostředkovává spojení s membránou (Ma, 2004). Vznikající protein C (anchC), obsahuje C-koncovou hydrofobní kotvu, která slouží jako signální peptid pro translokaci proteinu prM do endoplasmatického retikula (ER). Tato hydrofobní doména je vyštěpena z dokončeného proteinu C serinovou proteázou (Lobigs, 1993). Protein C se skládá do kompaktních dimerů (Dokland, 2004). Dnes není přesně známo, jak se dimery organizují uvnitř nukleokapsidy, ale interakce s RNA nebo DNA může způsobit, že izolované dimery proteinu C se začnou formovat v nukleokapsidové částice (Kiermayr, 2004).

Membránový glykoprotein (pr)M

Glykoproteinový prekurzor proteinu M (prM) je velký zhruba 26 kDa. Je nasměrován do ER pomocí C-koncové hydrofobní domény kapsidového proteinu (Yamshchikov, 1994). Protein prM se formuje velmi rychle a dopomáhá ke správnému poskládání proteinu E (Konishi, 1993). Hlavní funkcí proteinu prM je předcházet tomu, aby protein E nebyl během sekreční dráhy předčasně maturován. (Guirakhoo, 1992). Přeměna nezralé virové částice na zralý virion se děje během sekreční dráhy a děje se ve stejnou dobu jako odštěpení proteinu prM na fragmenty pr a M prostřednictvím furinu v Golgiho aparátu nebo některým jiným příbuzným enzymem. Následujícím štěpením se ze vzniklého heterodimeru pr-M odloučí fragment pr a vytvoří se heterodimery proteinu E a M (Stiasny, 1996).

Obalový glykoprotein E

Protein E (~53kDa) je hlavním proteinem povrchu flavivirových virionů a způsobuje navázání viru na buněčný receptor a následnou fúzi virové membrány s buněčnou. Protein E je syntetizován jako membránový protein typu I (membránou prochází pouze jednou; C konec polypeptidu je na vnitřní straně membrány) obsahující 12 konzervovaných cysteinů, které vytvářejí disulfidické můstky (Chambers, 1990). Správné skládání a jeho stabilizace probíhá za nízkého pH a sekrece proteinu E závisí na současné expresi s proteinem prM. Nativní forma proteinu E se skládá v prodlouženou strukturu bohatou na β -listy. Protein E tvoří homodimery, přičemž každá podjednotka proteinu E se skládá ze tří domén: I, která formuje β -barel; II, která vyčnívá podél virového povrchu mezi transmembránovou oblastí homodimerové podjednotky; a III, která udržuje imunoglobulinový tvar (Lorenz, 2002).

3.1.4. Flavivirové nestrukturní proteiny

Nestrukturní protein NS1 (viz. 3.1.5)

Nestrukturní proteiny NS2A a NS2B

Protein NS2A je relativně malý (~22 kDa) hydrofobní protein, jehož N-konec způsobuje štěpení mezi NS1-NS2A za pomoci dosud neznámého hostitelského enzymu (Falgout, 1995). Cytosolické štěpení mezi proteiny NS2A/NS2B se uskutečňuje serinovou proteázou, což naznačuje transmembránové umístění proteinu NS2A (Chambers, 2005). U některých flavivirů je potvrzená jeho přítomnost na subcelulárních stranách RNA replikace, kde interaguje s replikačními komponenty proteinů NS3 a NS5 a stejně tak s 3'UTR genomové RNA flavivirů (Mackenzie, 1998).

Protein NS2B je také malý (~14 kDa) s membránou spojený protein. Formuje stabilní komplexy s NS3 a hraje roli jako kofaktor pro NS2B-NS3 serinovou proteázu (Falgout, 1991).

Nestrukturní protein NS3

NS3 je velký (~70 kDa) multifunkční protein, vykonávající několik aktivit potřebných k vytvoření flavivirového polyproteinu a k RNA replikaci. N-koncová třetina proteinu je katalitickou doménou pro štěpení spoje NS2B-NS3 serinovou proteázou (Chamberst, 1990). Navíc, štěpení NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A a NS4B/NS5 spojů dopomáhá k vytvoření C-konce zralého kapsidového proteinu (Yamschikov, 1994). Také se vyznačuje RNA stimulovanou nukleosidovou trifosfátázovou aktivitou (NTPáza), která defosforyluje 5' konec genomové RNA před přidáním 7mG čepičky (Warrener, 1993). Protein NS3 má rovněž helikázovou aktivitu, přičemž helikáza je zodpovědná za ATP-dependentní RNA rozdělení vláken během replikace (Assanberg, 2009).

Nestrukturní proteiny NS4A a NS4B

Proteiny NS4A a NS4B jsou malé (~16 kDa a ~27 kDa) hydrofobní proteiny, důležité pro interakci existující mezi proteiny NS1 a NS4A (Lindenbach, 1999). Protein NS4A se také shlukuje u replikačních komplexů (Miller, 2006).

Proteiny NS4B a NS3 se nacházejí spolu na dvouřetězcové RNA v ER membránových strukturách a předpokládá se, že představují místa RNA replikace (Miller, 2006). Protein NS4B má nejsilnější antagonistický efekt, který vyžaduje buď správné zpracování heterodimeru NS4A-NS4B pomocí NS2B-NS3 serinové proteázy nebo expresi NS4B s N-koncovým signálním peptidem (Munoz-Jordan, 2005).

Nestrukturní protein NS5

Protein NS5 je velký (~103 kDa), velmi konzervovaný, multifunkční protein s methyltransferázovou (MTáza) a RNA dependentní RNA polymerázovou (RdRP) aktivitou. N-koncová oblast proteinu NS5 vykazuje podobnost s S-adenosyl-methionine (SAM)-dependentní MTázou, a purifikovaná N-koncová doména proteinu DENV-2 NS5 může přenášet metylované skupiny ze SAM na RNA substrát s 5' čepičkou (Egloff, 2002). C-konec proteinu NS5 vykazuje významnou podobnost s RNA-dependentní RNA polymerázou (RdRP) ostatních RNA virů pozitivní polarity (Koonin et. al, 1993). NS5

formuje komplex s NS3 a může stimulovat jak NTPázovou tak i RTPázovou aktivitu proteinu NS3 (Yon, 2005).

3.1.5. Flavivirový nestrukturní protein 1

Proteiny NS1 sdílí vysokou shodu proteinové sekvence u všech flavivirů. Tato sekvence kóduje polypeptid skládající se z 352 aminokyselin, o velikosti 46-55 kDa a to v závislosti na stupni glykosylačních modifikací. Poprvé byl popsán v roce 1970 v séru infikovaných myši a byl označován jako rozpustný komplementy fixující antigen (Brandt et al., 1970).

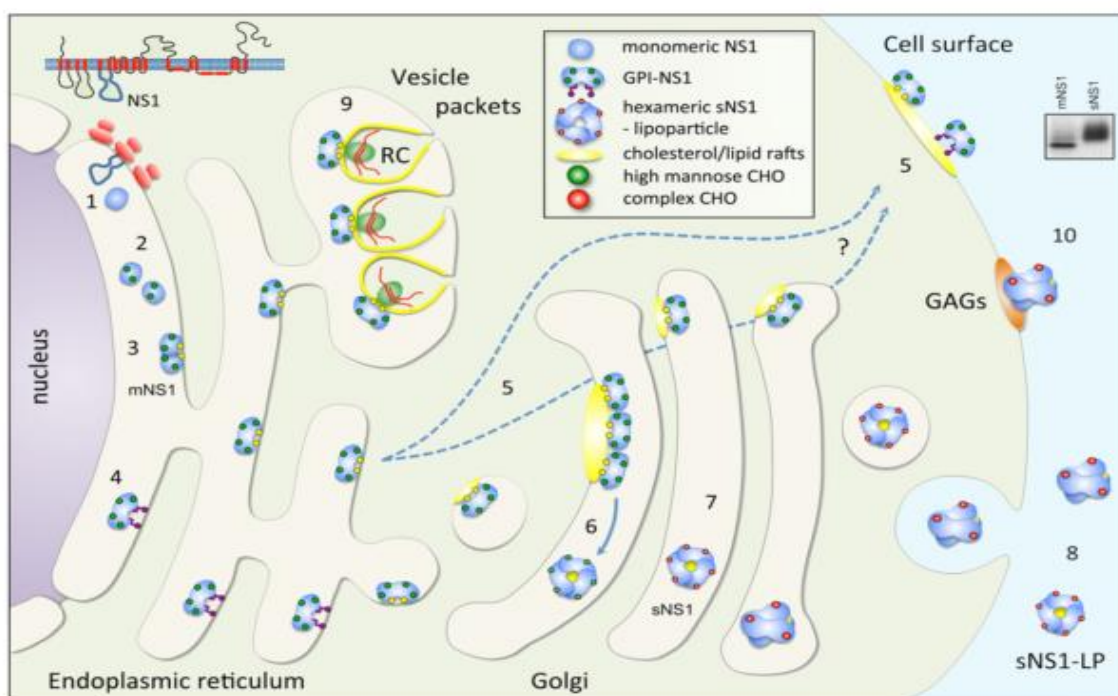
Z virového polyproteinu se protein NS1 uvolňuje jako hydrofilní monomer obsahující 12 cysteinů, které formují 6 oddělených disulfidických můstků, a které mají vliv na jeho strukturu a funkčnost (Wallis et al., 2004). Jejich rolí je stabilizace a správné složení monomeru. Poslední 3 cysteiny jsou nezbytné pro maturaci proteinu NS1, jeho sekreci a formaci oligomerů (Pryor a Wright, 1993). Protein NS1 je produkován hydrofilní monomer. Rychle ale dimerizuje a může dále vytvářet další formy. Jeho oligomerizace je běžná pro všechny flaviviry. Dimery proteinu NS1 jsou rezistentní vůči nejontovým i jontovým detergentům, ale mohou být odděleny zahříváním ($\geq 93^{\circ}\text{C}$) nebo nízkým pH (pH 2.2 – 3) (Falconar a Young, 1990). Dimerizované formy proteinu NS1 lze pak najít na třech různých místech a to: na místech virové replikace, na buněčném povrchu a jako sekretovanou formu mimo buňku (Mackenzie et al., 1998). Hexamerická forma proteinu NS1 je vysoce denzní lipoprotein, který drží pohromadě díky hydrofobním interakcím, které se dají rozrušit pomocí detergentů (Flamand et al., 1999). V savčích buňkách jsou komponenty exprimovaného proteinu NS1 zpracovány Golgiho aparátem, kde jsou obnažené uhlohydrátové zbytky upraveny a protein je pak sekretován buňkou jako rozpustný hexamer (Flamand et al., 1999). Multimerické formy se formují spontánně i v nepřítomnosti ostatních virových proteinů (Pryor a Wright, 1993).

Flavivirový protein NS1 také vykazuje širokou škálu různých glykosylačních vzorů, které se ukazují být významné pro jeho maturaci, jeho sekreci z buňky, replikační cyklus flavivirů a pro virulenci virů. Protein NS1 u všechny sérotypů DENV, JEV a YFV má společná dvě konzervovaná glykosylační místa a to na pozici asparáginu 130 a asparáginu 270 (Pryor a Wright, 1994). Dimerizované formy proteinu NS1 existují v savčích buňkách ve dvou formách a to protein NS1 spojený s membránou (mNS1), obsahující pouze vysoce manózané přípoje (Post et al., 1991) a sekretový protein NS1 (sNS1) s vysoce manózaným asparaginem v pozici 130 s heterogenním souborem komplexních cukrů

(Blitvich et al., 2001). Hmyzí buňky nemají požadovaný glykosylační aparát, proto nemohou upravit protein NS1 do komplexní uhlohydrátové formy (Flamand et al., 1999).

U viru Dengue bylo prokázáno, že jeho protein NS1 se váže k širokému spektru buněk, nalezen byl u epitelálních a fibroblastických buněk a to pomocí interakcí s glykosaminoglykany (GAG), heparinsulfátem a chondroitin sulfátem E, přestože flavivirová aminokyselinová sekvence proteinu NS1 neobsahuje žádná zřejmá vazebná místa pro GAG (Aviturnan et al., 2007).

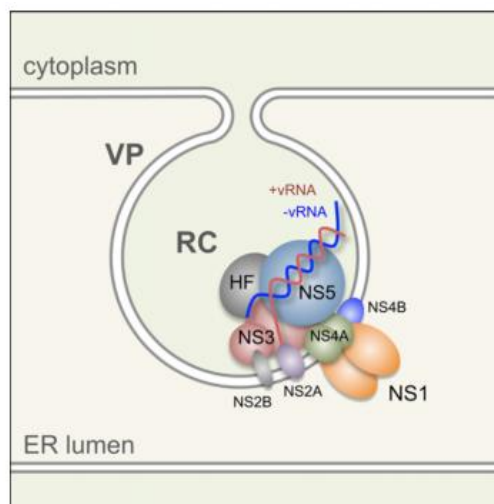
Pomocí sekvenčních analýz se prokázalo, že protein NS1 je hydrofilní protein postrádající běžnou doménu pro ukotvení v membráně. Prvním možným způsobem ukotvení proteinu NS1 v membráně se zdá být forma spojená s glykosylfosfatidylinosilem (GPI) potvrzená u viru Dengue. N-konec proteinu NS2A obsahuje hydrofobní oblast, která pravděpodobně hraje roli signální sekvence pro GPI ukotvení v membráně (viz. Obr. 3.2) (Melian et al., 2009). Posttranslační modifikace provedené v ER následované štěpením karboxylového konce hydrofobní signální sekvence kovalentně připojí takto vytvořený GPI prekurzor k proteinu NS1, ten je potom nasměřován k povrchu buňky, kde se zanoří do lipidového raftu (Jacobs et al., 2000).



Obr. 3.2: Znázornění průchodu NS1 proteinu v savčí buňce (převzato z Muller a Young, 2013).

I když představa o přesném funkční zapojení proteinu NS1 do virového replikačního cyklu je prchavá, bylo alespoň zjištěno, že protein NS1 hraje významnou roli kofaktoru ve virové replikaci (Lindenbach a Rice, 1997). Tato kolokalizace s dvouřetězcovou RNA

(dsRNA) naznačuje jeho roli při replikaci RNA jako jednoho z komponentů virového replikačního komplexu (Westaway et al., 1997). Zde by mohl plnit strukturní funkci ukotvením replikačního komplexu k membráně (viz. Obr. 3.3)(Lindenbach and Rice, 1997).



Obr. 3.3: Schéma replikačního cyklu Dengue viru (převzato z Muller a Young, 2013).

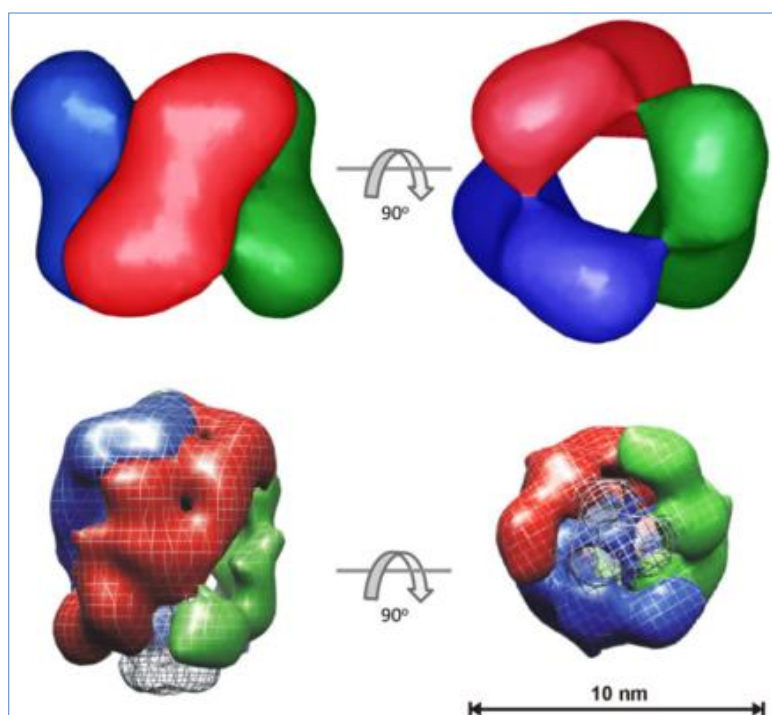
Protein sNS1 se nachází v séru během akutní fáze onemocnění flavivirovou infekcí jak u zvířat, tak i u lidí (Chung a Diamond, 2008). Během infekce virem Dengue se může protein sNS1 takto akumulovat ve velmi vysokých množstvích (okolo 50 Ig/ml) a být tak detekován v séru pacienta (Young et al., 2000). *In vivo* skretovaný virový protein NS1 interaguje s hostitelem mnoha různými způsoby, což překvapivě zahrnuje schopnost vyvolat jak ochrannou (Schlesinger et al., 1985), tak i potencionálně patogenní imunitní odpověď (Falconar, 1997) a přímo přispět k onemocnění prostřednictvím interakcí s různými buněčnými komponenty nebo dokonce interakcí s celou škálou hostitelských proteinů (Young et al., 2000).

Protein NS1 volně cirkulující v těle také slouží jako významný marker pro diagnózu nemoci (Libraty et al., 2002). Protein NS1 vykazuje pozoruhodně široké spektrum interakcí se složkami vrozené a adaptivní hostitelské imunitní odpovědi. Spousta z těchto interakcí je ještě ke všemu individuální pro každý z flavivirů, což dělá z proteinu NS1 hlavní virový imunogen (Shu et al., 2003).

Protein NS1 je tedy ne zcela překvapivě využíván různými způsoby pro imunizační experimenty, které využívají protein NS1 protein samotný nebo v kombinaci s dalšími virovými proteiny (Falconar a Young, 1991). Protein NS1 by také mohl být využit v budoucnu nejen jako komponent vakcíny druhé generace proti viru Dengue, ale stejně dobře i pro ostatní flaviviry (Miller, 2010). Pro každou vakcínu, jež bude obsahovat protein

NS1 bude ovšem nutné upravit výrobní strategii zajišťující vytvoření protilátek správné virové subtrždy a stupeň specifity epitopu, aby se zabránilo indukci autoprotilátek (Cheng et al., 2009). Je totiž dokázáno, že protilátky anti-NS1 nemají jen potenciál zajistit ochranu proti flavivirové infekci, ale díky jejich interakcím s hostitelskými komponenty, by mohli také zhoršit průběh onemocnění.

Pro žádnou z forem proteinu NS1 se zatím nedaří získat proteinovou terciální strukturu o vysokém rozlišení. To spočívá hlavně v neúspěšných pokusech o krystalizaci proteinu NS1. Nedávný objev vypovídající o tom, že sekretovaný protein NS1 obsahuje variabilní lipidové jádro, by mohl vysvětlovat tento neúspěch (Muller, 2012). Nicméně byly aspoň učiněny pokusy o vytvoření 3D struktury o nízkém rozlišení (23 Å) a to u proteinu sNS1 Denge viru typu 1 a 2. Obě strukturní rekonstrukce ukázaly pravotočivou, barelu podobnou strukturu obsahující tři asymetricky připojené oblasti, kde každá pravděpodobně představuje jednu dimerickou podjednotku (Gutsche et al., Muller et al., 2012).



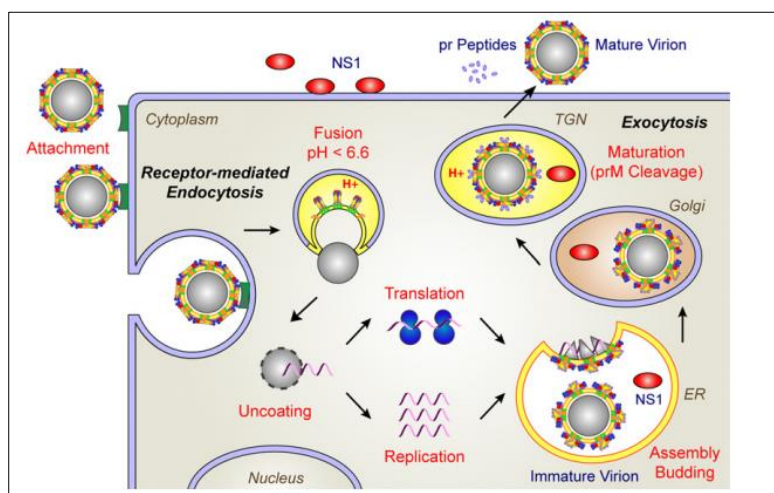
Obr. 3.4: Model a 3D rekonstrukce sNS1 (převzato z Muller et al., 2012).

I přes 40 let po té co byl nestrukturní protein 1 poprvé objeven, zůstává cílem zájmu mnoha vědců. Zatím neznáme mechanismu jeho spojení s membránou ani způsob jakým jsou vytvářeny jeho hexametry. Nevíme jakým způsobem je zapojen do replikačního komplexu a celkově neznáme jeho roli v replikaci virové RNA. Nevíme, jaký vliv mohou mít specifické interakce proteinu NS1 s hostitelskými proteiny a jak významnou roli může hrát v patogenezi flavivirových onemocnění. Není nám známá ani jeho přesná terciální a

kvartérní struktura. Tyto znalosti by nám v budoucnu mohli dopomoci k vývoji flavivirových léčiv a vakcín.

3.1.6. Replikační cyklus flavivirů

Prvním krokem virové replikace TBEV, je navázání virionu na povrch hostitelské buňky, to zprostředkovává povrchový glykoprotein E (Mandl et al., 2001). Navázání na receptor způsobí endocytózu a transport virionů do prelysozomálních endocytických váčků hostitelské buňky (Chu, 2004), kde dochází k replikaci flavivirů. Nízké pH v těchto váčcích způsobí konformační změnu virového obalového proteinu E z dimerů na trimery. Výsledkem tohoto procesu je vypuštění virové nukleokapsidy do hostitelské cytoplasmy. Virový genom přestává být krytý a použit pro proteinovou translaci. K replikaci virové RNA dochází přes produkci kopií dlouhého genomového vlákna negativní polarity, které poté slouží jako templát pro syntézu nové RNA pozitivní polarity. Povrchové proteiny prM a E jsou přemístěny během tvorby polyproteinu do lumenu endoplasmatického retikula (ER) a jejich amino-konce jsou odděleny proteolytickým štěpením hostitelskou buněčnou signalázou. RNA genom je zabalen proteinem C do nukleokapsid na cytoplasmatické straně membrány ER. Virová obálka je získána během zabudovávání nukleokapsidy do ER. Takto jsou vytvořeny nezralé viriony, které obsahují proteiny prM a E v jejich heterodimerickém uspořádání na povrchu virionu a ještě nejsou infekční (Elshuber et al., 2003). Tyto nezralé virové částice jsou transportovány hostitelskou sekreční dráhou a jejich zrání je zakončeno štěpením proteinu prM na M, hostitelskou buněčnou proteázou furinem z váčků Golgiho aparátu. Vytvoření malého proteinu M zapříčiní reorganizaci proteinu E. Takto vytvořená virová částice je vypuštěna z buňky fúzí transportního váčku s plazmatickou membránou hostitelské buňky a stává se infekční (Stadler et al., 1997).



Obr. 3.2: Schéma replikačního cyklu flyvivorů (převzato z Heinz, 2012).

3.1.7. Flavivirové vakcíny

Vývoj vakcíny proti žluté zimnici obsahující živý, oslabený virus (YFV 17D) se stala historickým mezníkem ve vytváření virových vakcín a v roce 1951 za ní byl Max Theiler oceněn Nobelovou cenou za medicínu pro úspěšné oslabení divokého typu tohoto viru sériovým pasážírováním viru v myších a kuřecích tkáňových kulturách (Monath, 2008). Ovšem kvůli téměř nezměněnému výrobnímu procesu od roku 1945, vakcína obsahovala podstatné množství proteinů z kuřecích embryí, která vyvolávala různou škálu alergických reakcí (Barrett, 2009). Aby se dosáhlo větší bezpečnosti, začala se vakcína produkovat ve Vero buňkách a nyní klinické studie vypovídají o její dobré imunogenicitě a snášenlivost (Monath, 2011).

Efektivní vakcína je rovněž dostupná pro imunoprophylaxi Japonské encefalitidy, která obsahuje jak inaktivovaný virus, tak virus oslabený. Jako substrát pro inaktivovanou vakcínu byly buď myší mozky, nebo primárně ledvinové buňky křečka a úspěšnost vakcíny se pohybuje okolo 76-95% (Halstead, 2010).

Onemocnění klišťovou encefalitidou se dá účinně předcházet vysoce purifikovanou inaktivovanou vakcínou obsahující celý virus a vyráběnou v Evropě a Rusku. Pro výrobu této vakcíny se jako substrát užívají kuřecí embryonální buňky (Lehrer, 2009). Její využití v endemických oblastech TBEV se velmi liší. K oblastem s nejvyšším pokrytím vakcinace patří Rakousko (85%) a oblast Sverdlovsk v Rusku (81%)(Romanenko,2011). Účinnost jak evropské, tak ruské vakcíny je velmi vysoká, dosahuje až 98% (Romanenko, 2011).

Sérokomplex Dengue flavivirů se skládá ze čtyř sérotypů, z nichž se každý skládá z několika genotypů, s podstatnými rozdíly v aminokyselinové sekvenci jejich proteinů E. Kvůli takto vysoké sekvenční variabilitě proteinu E nejsou protilátky proti jedné jeho variantě většinou schopny rozpoznávat variantu jinou. To vede k tomu, že takové protilátky nejsou schopny neutralizovat protein E flavivirů jiných sérotypů, než proti kterým byly vytvořeny. Pokud jedinec onemocní jedním sérotypem viru Dengue, ochrana proti tomuto sérotypu trvá pouze pár měsíců. Epidemiologická pozorování dokonce ukazují, že předešlá infekce může postiženého učinit náchylného k opětovnému prodělání nemoci s vážnějším průběhem (dengue hemoragická horečka/dengue šokový syndrom) během reinfekce dalším sérotypem viru Dengue (Guzman, 2010). Právě toto riziko představuje hlavní překážku pro vývoj a použití vakcíny proti viru Dengue.

Vývoj vakcíny se zaměřuje na dva nejdůležitější body: 1) potřebu vytvořit ochrannou imunitu proti všem čtyřem sérotypům zároveň a 2) zamezit vytvoření nežádoucích

imunitních reakcí po setkání s virem. Ideální vakcína proti virus Dengue by proto měla vytvořit doživotní imunitu proti všem čtyřem sérotypům a měly by vůči ní mít snášenlivost i děti. V současné době se mnoho vědců snaží vyvinout různé typy vakcín proti viru Dengue (Webster, 2009). Tyto pokusy zahrnují produkci běžnými způsoby oslabené živé virové vakcíny, geneticky upravené chimerické živé vakcíny (Dengue-Dengue a Dengue-virus žluté zimnice), vakcíny s inaktivovaným celým virem, vakcíny s rekombinantním proteinem E, DNA vakcíny či vakcíny s virovým vektorem exprimujícím protein E. V současné době se zdá být nejnadějnější vývoj chimerické vakcíny obsahující živého hybrida viru Dengue a viru žluté zimnice vyráběné Sanofi Pasteur a vývoj tetravalentní vakcíny obsahující chiméry všech čtyř dengue sérotypů (Coller, 2011 a Guy, 2011).

Takto dnes existují účinné tradiční živé vakcíny proti žluté zimnici a Japonské encefalitidě stejně, tak i inaktivované virové vakcíny proti Japonské encefalitidě a klíšťové encefalitidě. Ale i přes tyto úspěchy, účinná vakcína proti horečce Dengue, jedné z nejvíce četných flavivirových infekcí, není zatím dostupná. A právě protein NS1 by mohl být vhodným kandidátem na vakcínu proti tomuto flaviviru.

3.2. VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

3.2.1. Klasifikace

Klíšťovou encefalitidu má na svědomí virus klíšťové encefalidity, jeden z nejvíce převládající arbovirů Evropy a mnoha částí Asie. TBEV patří do rodu *Flavivirus* a čeledi *Flaviviridae*, která zahrnuje přibližně 70 dalších virů. Na základě sérologických a sekvenčních analýz TBEV dělíme na tři subtypy, Evropský, Sibiřský a Dálno-východní (Ecker, 1999). Evropský subtyp, jehož přenašečem je klíště *Ixodes ricinus*, Sibiřský a Dálno-východní subtyp je přenášen klíštětem *Ixodes persulcatus*, kde jeho rozšíření zasahuje až do oblastí Číny a Japonska. Za posledních 30 let bylo zaznamenáno postupné rozšiřování TBEV. Mezi faktory podporující tuto skutečnost patří nejen změny počasí, ale i faktory sociální, ekonomické, demografické. TBEV způsobuje přibližně 2000 případů Klíšťové encefalidity ročně na území Evropy a více jak 10 000 v Rusku a na Dálném východě, každoročně (Süss, 2008; Mansfield et al., 2009).

3.3.2. Způsob a průběh nemoci

Přenesení TBEV na člověka se nejčastěji děje kousnutím infikovaného klíštěte, méně často pak požitím produktů z nepasterizovaného mléka domácích zvířat nakažených virem (Dörrbecker, 2010). Klinické projevy infekce klíšťové encefalidity u lidí závisí na příslušném subtypu TBEV. Po inkubační době trvající přibližně 3 až 7 dní, se první fáze projeví nejčastěji jako chřipkové onemocnění s příznaky horečky, bolení hlavy, bolesti svalů a nevolnosti. Diagnóza TBEV se běžně provádí sérologicky a to přítomností specifických IgM protilátek v krvi. Izolace viru je pak možná pouze během první fáze v období virémie (Avšič-Županc, 1995). Poté co tyto příznaky odezní, se u 20-30% postižených rozvine sekundární fáze nemoci, zahrnující neurologické symptomy o různé závažnosti a to meningitidu, meningoencefalitidu, poliomyelitidu (Gritsun et.al., 2003). Chronické formy nemoci byly zatím popsány jen u pacientů ze Sibíře a východního Ruska. Úmrtnost se pohybuje okolo 1-2% v Evropě, na Sibíři přibližně 6-8% a na dálném východě asi 20-40% (Mandl, 2005). Projevy nemoci bývají mnohem závažnější u starších lidí než u dětí. Některé formy TBEV mají dlouho trvající či dokonce trvalé neuropsychiatrické následky. Dnes je však dostupná vakcína z formalínem inaktivovaného viru a poskytuje vysoký stupeň ochrany proti nemoci (Kunz, 2003).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Materiál

4.1.1. Použité primery

Tabulka 4.1: Použité primery

Název primeru	Sekvence	T _m [°C]	Poznámka/ Výrobce
M13 Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	53	primer na pCR 2.1 TOPO (sekvenování, diagnostika)
M13 Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	46	primer na pCR 2.1 TOPO (sekvenování, diagnostika)
T7 Forward	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	47	primer na sekvenování do pET 100 D
T7 Reverse	5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'	52	primer na vkládání do pET 100 D
T7 Forward	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	52	primer na vkládání do pcDNA 3.1
BGH Reverse	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	52	primer na vkládání do pcDNA 3.1
TBEV NS1-01	5'-AATGGATCCACCAUGGATGTTGGTTGCGCTGT-3'	56	primer na vkládání NS1 do pcDNA 3.1 přes BamHI
TBEV NS1-02	5'-TACTCTAGATCCGCAACCACCATT-3'	55	primer na vkládání NS1 do pcDNA 3.1 přes XbaI
TBEV NS1-03	5'-TACTCTAGACTACGCAACCACCATTGAG-3'	55	primer na vkládání NS1 do pcDNA 3.1 přes XbaI (UAG) a vkládání do PET 100 D
TBEV NS1-04	5'-CACCGGATCCACCATGGATGTTGGTTGCGCTGT-3'	57	primer navkládání TBEV NS1 přes BamHI a vkládání do PET 100 D
1F	5'-AGCGGGTGTTTTTCCGAGTC-3'	64	primer na RT genomové RNA TBEV

Invitrogen

Generi Biotech

4.1.2. Chemikálie a soupravy

4.1.2.1. Použité chemikálie a roztoky

Tabulka 4.2: Použité chemikálie a připravené roztoky v závislosti na metodách

Agarózová gelová elektroforéza	
TAE	40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
Agaróza	1.5 – 2% agaróza (SERVA) bez RNáz v 1x TBE pufru
Izolace plasmidů – Alkalická metoda	
Roztok I. (TEG)	25 mM Tris-HCl, pH 8; 10mM EDTA-NaOH, pH 8
Roztok II.	1% SDS; 0,2 M NaOH
Roztok III.	3 M KAc
Vkládání a restrikční analýza	
BamHI (Fermentas)	
XbaI (Fermentas)	
XhoI (Fermentas)	
HindIII (Fermentas)	
Pufr (Yellow)	1× Buffer Tango 33 mM Tris-acetate, 10 mM Mg-acetate, 66 mM K-acetate and 0,1 mg/mL BSA (Fermentas)
Ligáza	T4 DNA Ligase (Fermentas)
Tkáňové kultury	
Kultivační médium pro PS buňky	médium: L15; sérum: 10% BOFES, 1% ATB, 1% Glutamin
Kultivační médium pro HeLa buňky	médium: RPMI; sérum: 3% PTS, 1% ATB, 1% Glutamin
HEPES	100 mM HEPES, pH 7,3
Antibiotika	Geneticin (100µg/ml)
Fosfátový pufr (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
Trypsin EDTA	0,5 % Trypsin-EDTA (10×)
Média a půdy použité pro kultivaci bakterií	
SOC médium	2% 'bacto-tryptone', 0.5% 'bacto-yeast' extrakt, 0.05% NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ , 20mM glukóza; pH 7.0; sterilní
LB médium	1% 'bacto-tryptone', 0.5% 'bacto-yeast' extrakt, 1 % NaCl; pH 7.0; sterilní
LB agar	1.5% bacto-agar v LB médiu
Antibiotika	Ampicilin (zásobní roztok 100 mg/ml H ₂ O)
X-gal	
SDS-PAGE	
30% AA	Acrylamide a bisacrylamide (30:1)
Separáčnı pufr	1.5 M Tris-HCl; pH 8.8
Zaostřovací pufr	0.5 M Tris-HCl; pH 6.8
Amonium persulfát	10 % APS v dH ₂ O
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenediamine
5 × elektroforézový pufr	0,125 M Tris, 0,96 M glycın, 0,5% SDS
5× vzorkový pufr	250mM Tris-HCl (pH 6,8), 500mM dithiotreitol, 10% SDS, 0.2% bromophenol blue, 50% glycerol
5× vzorkový pufr + β-merkaptóethanol	250mM Tris-HCl (pH 6,8), 500mM dithiotreitol, 10% SDS, 0.2% bromophenol blue, 50% glycerol, 1% β-merkaptóethanol
Western Blotting	
Blotovací pufr	20% methanol, 25mM Tris-Base, 150mM glycın

Imunoblotting	
Fosátový pufr (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
5% mléko	5% odtučněné sušené mléko v PBS
Vývíječící roztok	1×BCIP/NBT (rozpuštěno v 67% DMSO)

Afinitní chromatografie	
Lyzační pufr 0.	150 mM NaCl, 50 mM Tris-base
Lyzační pufr I.	150 mM NaCl, 50 mM Tris-base, 50 mM Imidazol
Lyzační pufr II.	150 mM NaCl, 50 mM Tris-base, 500 mM Imidazol
Lyzační pufr III.	150 mM NaCl, 50 mM Tris-base, 1 M Imidazol
RNAza	RNAse A (17 500 U)(Roche)
Lysozym	Lysozyme (Pure lyophilized enzyme)(Thermo Scientific)

4.1.2.2. Soupravy

Tabulka 4.3: Použité soupravy v závislosti na metodách

Izolace virové RNA	QIAamp® Viral RNA™ Mini Kit (50) (Qiagen)
Syntéza cDNA	First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)
Polymerázová řetězová reakce	PCR H ₂ O (Top-Bio)
	PPP Master Mix (Top-Bio)
Přečištění DNA po PCR	Illustra™GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)
Izolace plasmidové DNA	GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
Agarózová gelová elektroforéza	5x Orange Loading Dye Solution (Fermentas)
	O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
	O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)
Sekvenování	Applied Biosystems Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies)
Transfekce buněčných kultur	ExGen 500 in vitro Transfection Reagent (Fermentas)
Afinitní chromatografie	Co-MAC Purification Kits (Novagen)
	Protino® Ni-NTA Columns (5 ml)(Macherey Nagel)
SDS-PAGE	Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)
	Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)
	PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas)
	PageBlue™ (Invitrogen)
Imunoblotting	Anti-His G-AP Antibody (Invitrogen)
Barvení polyakrylamidových gelů stříbrem	PageSilver™ Silver Staining Kit (Fermentas)
Sušení polyakrylamidových gelů	Gel Drying Frames (Sigma-Aldrich)

Příprava proteinového lyzátu	Lysosim (Thermo Scientific)
	Halt™ Protease Inhibitor Single-Use cocktail (100×)(Thermo-Scientific)
	DNase (Bio Labs)

4.1.2.3. Klonovací a expresní plasmidy

Tabulka 4.4: Plasmidy

Použité plasmidy	
pCR®2.1-TOPO®	Invitrogen - selekce přes ampicilin
pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA	Invitrogen - selekce přes ampicilin
pcDNA™3.1/V5-His	Uzavřená verze plasmidu pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA (Jiří Černý)
Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits	Invitrogen - selekce přes ampicilin

4.1.2.4. Bakteriální kmeny

Tabulka 4.5: Použité bakteriální kmeny

Bakteriální kmeny	Genotyp
<i>E. Coli</i> (TOP 10)	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></i>
<i>E. Coli</i> (BL21 Star™ DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)

4.2. Metody

4.2.1. Exprese rekombinantního proteinu NS1 v savčích buňkách

4.2.1.1. Izolace genové RNA viru klíšťové encefalitidy a příprava virové cDNA

Izolace virové RNA

K izolaci virové RNA jsme použili infikovanou myší mozkovou suspenzi s vysokým titrem TBEV - kmene *Hypr*. Izolaci RNA jsme provedli za použití QIAamp® Viral RNA™ Mini Kitu (Qiagen) na základě výrobcem uvedeného protokolu. Výslednou virovou RNA jsme eluovali do objemu 60 µl a následně skladovali v hlubokomrazícím boxu při – 70 °C.

Syntéza cDNA

Reverzní transkripci jsme prováděli pomocí FirstStrand cDNA Synthesis Kitu (Fermentas) přesně podle firemního manuálu. K reverzní transkripci jsme použili buď primer 1F specificky rozpoznávající 3' konec genomu TBEV nebo sadu náhodných hexamerů. Získaných 100 µl cDNA jsme uskladnili při teplotě – 70 °C.

4.2.1.2. PCR amplifikace sekvence kódující NS1

PCR se specifickými primery

K amplifikaci získaného templátu jsme použili specifické primery, po případně primery přímo určené výrobcem k jednotlivým klonováním či sekvenčním analýzám (viz. Tab. 4.1). Primery jsme navrhli podle sekvencí dostupných v online databázi GeneBank™ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Jejich délka byla zvolena tak, aby předpokládaná teplota tání určená pomocí programů Primer3+ a OligoCalc (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) byla v rozmezí od 50°C do 60°C. Rozdílem teploty tání v rámci jedné dvojice primerů byl vždy maximálně 2°C.

PCR reakce jsme připravili do 0,2 ml tenkostěnných zkumavek; v přístrojích BioER GENEPRO Thermocycler (Harlow Scientific) nebo BioRad T100 Thermocycler, za níže uvedených podmínek:

dH ₂ O.....	9,5μl	Denaturace:.....	94 °C.....	2min
PPP MasterMix.....	12,5μl	35 cyklů:		
5' Primer.....	11μl	denaturace DNA:.....	94 °C.....	30s
3' Primer.....	21μl	nasedání primerů:.....	55 °C.....	30s
<u>Templát.....</u>	<u>1μl</u>	elongace:.....	72 °C.....	1:30min
	25μl	Závěrečná elongace:.....	72 °C.....	10min
		Teplota ponechána na:	14 °C	

Agarová gelová elektroforéza

Abychom mohli oddělit a zviditelnit jednotlivé úseky DNA, použili jsme metodu agaróзовé gelové elektroforézy. K 8 μl PCR produktu jsme přidali 2 μl 5× koncentrovaného vzorkového pufru s barvivem SYBR green (Fermentas). Tuto směs jsme nanесли na 1,5% agarózový gel v TAE pufru. Separaci jsme prováděli v aparatuře HU15 Standard (SCIE PLAS) při napětí 5 V/cm, po dobu 30 minut.

Velikost jednotlivých DNA fragmentů jsme zjistili porovnáním s velikostmi fragmentů na použitém markeru [O'GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder nebo O'GeneRuler™ 100 kb DNA Ladder (Fermentas)]. Velikostně odpovídající úseky DNA jsme potencionálně z gelu vyřezali a vyizolovali z nich požadovanou DNA.

Purifikace PCR produktu

K přečištění PCR jsme použili Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) podle výrobcem doporučeného postupu.

Měření koncentrace DNA

Pro sekvenační analýzu jsme měření koncentrace DNA prováděli na mikrokapilárním spektrofotometru NanoDrop-1000 (Laboratoř molekulární biologie prvoků – Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR) v objemu 1 μl. Koncentraci pro běžné potřeby práce s DNA jsme odhadli při elektroforetické analýze.

4.2.1.3. Vložení sekvence kódující NS1 do pCR®2.1-TOPO®

Vložení PCR produktu do vektoru pCR®2.1-TOPO®

PCR produkt jsme zaligovali do vektoru pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen). Při ligaci jsme postupovali podle manuálu výrobce.

Plasmid nese rezistenci k ampicilínu a je upraven k Blue/White selekci.

Transformace One Shot TOP 10 E. Coli complement cells

Kompetentní buňky One Shot® TOP10 *E. coli* (Invitrogen), které jsme skladovali při -70 °C jsme přibližně 5 minut před doběhnutím inkubační doby ligační směsi, nechali rozpustit na ledu. Po jejich rozmražení jsme přidali celý obsah ligační reakce a celou směs jsme ponechali po 20 minut na ledu. Následně jsme provedli tepelný šok. Buňky jsme inkubovali při teplotě 42 °C po 30 sekund v dry bloku Block Heater SBH 130DC (Stuart). Díky tomu se plasmid mohl dostat přes porušenou plasmatickou membránu do bakteriální buňky. Směs jsme pak přenesli na led, aby se po dobu 2 minut chladila. Po ochlazení reakce jsme do ní přidali 200 µl S.O.C média předeřátého na pokojovou teplotu. Buňky jsme dále kultivovali 1 hodinu při teplotě 37 °C v orbitální třepačce Mixing Block MB-102 (BIOER).

Celou kultivační směs jsme poté rozdělili na dvě části (30µl a 250µl) a vyseli na Petriho misky s LB agarem a ampicilinem, vysterilizovanou očkovací bakteriální kličkou ve sterilním a odvětraném prostoru laminárního boxu BioUltra (EN 12469 certified class II cabinet; Telstar).

Pro případnou potřebu Blue/White selekce jsme na agar ještě před rozetřením buněk rozetřeli X-gal.

Misky jsme inkubovali celou noc při 37 °C v termálním inkubátoru Biological Thermostat BT120 (Laboratorní přístroje Praha).

Druhý den jsme vybrané kolonie rozčárkovali na novou bakteriální plotnu a opět kultivovali přes noc.

Skladování bakteriálních kmenů

Krátkodobě jsme vypěstované bakteriální kmeny udržovali na agarových plotnách v laboratorních lednicích při konstantní teplotě 4°C. K jejich dlouhodobému uchování jsme je naočkovali a vypěstovali v tekuté kultuře do logaritmické fáze růstu, sklídili a uskladnili v 25 % glycerolu při teplotě -70°C v hlubokomrazícím boxu.

Příprava plasmidové DNA (růst bakteriální kultury; sběr, lýza a purifikace pDNA)

K izolaci velkého množství plasmidové DNA jsme kulturu *E. coli* nesoucí plasmid kultivovali přes noc zhruba v 50 ml LB média s ampicilinem. Poté jsme ji centrifugovali 10 minut při 3000 ×g a sediment jsme resuspendovali ve 2 ml roztoku I.

Přidali jsme 4 ml čerstvě připraveného roztoku II. Opatrně promíchali otáčením zkumavky a inkubovali 5 minut při pokojové teplotě.

Přidali jsme 3 ml roztoku II. a opět opatrně promíchali otáčením zkumavky a inkubovali cca 20 minut na ledu.

Následně jsme směs centrifugovali 30 minut při 4 °C a 3000 ×g.

Odebrali jsme supernatant a zfiltrovali ho přes ručně udělaný filtr z buničiny. K supernatantu jsme přidali 0,7 objemu isopropanolu, promíchali pipetováním a inkubovali 10 minut v lednici. Po uplynutí této doby jsme centrifugovali 30 minut při 4 °C a 3000 ×g.

Sediment jsme promyli 3 ml 70 % EtOH a sediment jsme nechali vyschnout při pokojové teplotě a poté ho resuspendovali ve 300 µl dH₂O.

Přidali jsme 3 µl RNasy A (Invitrogen) a nechali inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě.

Roztok jsme extrahovali 1×1 objemem fenolu; 1×1 objemem směsi fenol/chloroform (1:1) a 1×1 objemem chloroformu.

Poté jsme přidali 1/10 objemu 3 M NaAc a 2,5 objemu 98 % ethanolu vychlazeného na -20 °C a nechali jsme inkubovat přes noc v mrazícím boxu při -20 °C.

Vysráženou DNA jsme nechali sedimentovat při maximálních otáčkách v centrifuze vychlazené na 4 °C. Získaný sediment jsme promyli 1 ml 70% EtOH vychlazeného na -20 °C a nechali dokonale vysušit při pokojové teplotě a poté rozpustili v 80 µl ddH₂O.

Elektroforeticky jsme provedli kontrolu kvality izolace plasmidové DNA.

K izolaci plasmidové DNA z malého množství zaočkované kultury (1ml) jsme použili soupravu GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) podle postupu uvedeného ve firemním manuálu tohoto produktu. Kvalitu izolace jsme následně ověřili elektroforeticky na agarózovém 1,5 % gelu v TAE pufu, přičemž výsledek jsme fotograficky zaznamenali.

Ověření přítomnosti inzertu v plasmidu

Pro určení přítomnosti inzertu v plasmidu jsme využili metodu PCR (viz. 4.2.1.2.) s vektor-specifickými primery M13-Forward a M13-Reverse. Produkty PCR jsme analyzovali elektroforeticky na 1,5 % agarózovém gelu v TAE pufru a vizualizovali pod UV světlem. Na základě výsledků jsme vybrali vzorky, které byly sekvenovány.

Purifikace PCR produktu z agarózového gelu

DNA fragmenty, které odpovídaly požadované velikosti, jsme vyřezali skalpelem a přenesly do 1 ml zkumavky. K purifikaci jsme použili Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) podle instrukcí uvedených výrobcem.

Sekvenování

Pomocí sekvenční analýzy obou vláken získaného PCR produktu jsme zjistili nukleotidové sekvence DNA vložené do plasmidu. Sekvenační reakce jsme připravili smíchaním 3 μ l DNA (75-150 ng), 0,5 μ l příslušného primeru o koncentraci 0,01M a 4 μ l dH₂O, do celkového objemu 7 μ l na reakci. Sekvenční analýza byla provedena na přístroji ABI PRISM 3130 xl firmy Applied Biosystems v Laboratoři genomiky, společná laboratoř PřF JU a BC AVČR (Biologického centra Akademie věd České republiky) za použití soupravy Applied Biosystems Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies).

Získané výsledky sekvenční analýzy jsme zpracovali v programu BioEdit (Hall, 1999).

4.2.1.4. Vložení sekvence kódující NS1 do pcDNATM3.1/V5-His

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Tab. 4.6: Štěpení plasmidu pcDNATM3.1/V5-His

	[μ l]	dH ₂ O	Pufir (FD)	pDNA	BamHI	XbaI	RNAseA
Štěpení I.	21	9	2	7	2	0	1
Štěpení II.	21	9	2	7	0	2	1
Štěpení III.	31	0	3	23	2	2	1

Tab. 4.7: Štěpení rekombinantního proteinu NS1 z plasmidu pCR[®]2.1-TOPO[®]

	[μ l]	dH ₂ O	Pufir (FD)	pDNA	BamHI	XhoI	RNAseA
Štěpení I.	21	7	4	7	2	0	1
Štěpení II.	21	7	4	7	0	2	1
Štěpení III.	31	0	6	20	2	2	1

Propagační plasmid pCR®2.1-TOPO® nesoucí nezmutovanou sekvenci NS1 proteinu jsme si naštěpili restričními endonukleázami (viz. Tab. 4.6. a Tab. 4.7). Reakci jsme nechali celou noc inkubovat v termoboxu při 37 °C, poté jsme oddělili na agarózovém gelu a velikostně odpovídající úseky jsme vyřízli a přečistili Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

Tab. 4.8: Spojení plasmidu pcDNA™3.1/V5-His a úseku kódujícího rekombinantní protein NS1 ligací.

	[μl]	dH ₂ O	Pufr	pDNA	DNA	T4lig
Vkládání	25	1,9	2,5	3,6	15	2

Ligační směs (viz. Tab. 4.8) jsme nechali inkubovat po dobu 16 hodin při 4°C.

Příprava plasmidové DNA (viz. 4.2.1.3)

Ověření přítomnosti inzertu restričními štěpením

Štěpením naší plasmidové DNA za použití více restričních endonukleáz (viz. Tab. 4.9) jsme sestrojili specifickou restriční mapu. Délku fragmentů jsme určili podle polohy proužků na gelu.

Tabulka 4.9: Použité RE

Použité RE	Restriční místa
E ₁ – BamHI	5'... G [▼] GATCC... 3' 3'... CCTAGG [▲] ... 5'
E ₂ – HindIII	5'... A [▼] AGCTT... 3' 3'... TTCGAA [▲] ... 5'
E ₃ - XbaI	5'... C [▼] TCGAG... 3' 3'... GAGCT [▲] C... 5'

Celou restriční reakci jsme připravili podle údajů uvedených v následující tabulce (viz. Tab. 4.10) a to do celkového objemu 10 μl a nechali ji probíhat přes noc v inkubátoru při teplotě 37 °C. Další den jsme výsledky reakce elektroforeticky vyhodnotili.

Tabulka 4.10: Znázornění použití jednotlivých reagensů pro restrikčních reakce [μ l].

	1.B	2.H	3.X	4.BH	5.HX	6.BX	7.BHX
DNA	5	5	5	5	5	5	5
H ₂ O	2,5	2,5	2,5	2	2	2	1,5
B (Yellow)	2	2	2	2	2	2	2
E ₁ – BamHI	0,5	-	-	0,5	-	0,5	0,5
E ₂ – HindIII	-	0,5	-	0,5	0,5	-	0,5
E ₃ – XbaI	-	-	0,5	-	0,5	0,5	0,5

4.2.1.5. Transfekce savčích buněk

Obecné zásady práce se savčími buňkami

Pro expresi rekombinantního proteinu NS1 jsme vybrali PS (buňky z prasečí sleziny) a HeLa (nádorové buňky izolované z nádoru děložního hrdla Henrietty Laksové – Scherer, 1953) linie buněk.

S buněčnými liniemi jsme pracovali sterilně v laminárních boxech **BioUltra** (EN 12469 certified class II cabinet; Telstar) s HEPA filtrací vypouštěného i nasávaného vzduchu. Všechny nástroje stejně jako hrdla kultivačních lahví jsme před použitím sterilizovali opalováním nad kahanem. Vždy jsme pracovali v ochranných latexových rukavicích.

Průběžná kultivace savčích buněk

Z plně narostlé kultivační láhve s danou buněčnou linií jsme vylili staré médium. Kultivační láhev jsme následně 2krát promyli sterilním PBS. Do velké kultivační láhve jsme následně přidali 1 ml trypsinu a láhev vložili na 10 minut do inkubátoru s teplotou 37 °C. Poté jsme uvolněné buňky homogenizovali 10 ml sterilní skleněnou pipetou a doplnili médium (60 ml) s příslušnými aditivami (viz. Tab.4.2). Z buněčné kultury jsme stranou odlili přibližně 30 ml směsi buněk a média a zbytek jsme opět kultivovali při teplotě 37°C do dosažení konfluentního porostu buněk na dně kultivační láhve (dva až tři dny).

Stav buněk jsme vyhodnocovali pozorováním pod mikroskopem AE 2000 Binocular and Trinocular Inverted Microscop (Motic).

Zjištění minimální cytotoxické koncentrace geneticínu

Z odebrané směsi buněk jsme do každé jamky z 24-ti jamkového panelu přenesli 1 ml buněčné kultury o hustotě $0,6 \times 10^5$ buněk na jamku, jak pro HeLa tak i pro PS buňky, a s různou koncentrací antibiotika geneticínu (100 až 1000 $\mu\text{g/ml}$) a dali do inkubátoru s nastavenou teplotou 37 °C a s 5% hladinou CO_2 . Pro transfekci jsme vybrali buňky vykazující optimální snášenlivost k antibiotiku. Pro pozdější transfekci jsme používali nejnižší koncentraci geneticínu, která byla pro buňky bez plasmidu smrtelná.

Transfekce savčích buněk

Vysoká kvalita DNA je kritickou hodnotou pro úspěšnou transfekci. Poměr absorbance roztoku DNA při 260 a 280 nm ($A_{260/208}$) by se v ideálním případě měl pohybovat nad hodnotou 1,8. K transfekci samotné jsme zvolili soupravu ExGen 500 in vitro Transfection Reagent (Fermentas).

Den před transfekcí jsme vyseli takové množství buněk, aby jich v den transfekce bylo požadované množství $0,6 \times 10^5$ buněk/ml.

Připravili jsme dvě jamky pro každou z linií v každé po 1 ml kultivačního média a nechali přes noc kultivovat při 37°C a 5% hladině CO_2 .

Čtyři linie buněk (2× HeLa, 2×PS) jsme transfekovali plasmidem pcDNA 3.1-NS1 (bez STOP kodónu) za použití ExGene Transfection Mixture a reakční směs jsme připravili podle instrukcí výrobce.

Transformované buňky i inkubační médium jsme sklídili po 24 a 48 hodinách a uchovávali pro další experimenty při -70°C.

Přítomnost rekombinantního proteinu NS1 jsme analyzovali pomocí Western Blotu.

4.2.2. Expresse rekombinantního proteinu NS1 v bakteriích

4.2.2.1. Amplifikace kódující sekvence NS1

Pro amplifikaci DNA kódující NS1 protein ze savčího expresního vektoru jsme použili primery TBEV-NS1 03 a TBEV-NS1 04 (viz. Tab.1.1), pro další sekvenční analýzy primery ze soupravy Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kit.

4.2.2.2. Klonování pomocí Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kit

Vkládání sekvence kódující protein NS1 do bakteriálního expresního vektoru

K vložení sekvence kódující rekombinantní protein NS1 do bakteriálního expresního vektoru jsme použili Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kit a již popsany pracovní postup (viz. 4.2.1.3).

4.2.2.3. Expese rekombinantního proteinu v BL21 Star™(DE3) *E. coli*

Transformace BL21 Star™(DE3) *E. coli*

Pro transformaci jsme přidali 5 µl plazmidu k rozpuštěné suspenzi buněk BL21 (DE3). Reakce jsme lehce promíchali, a poté ponechali stát na ledu 30 minut. Následujícím krokem byl teplotní šok a to při 42 °C 60 sekund. Opět jsme dali na 2 minuty na led, přidali 250 µl S.O.C media (vytemperovaného na pokojovou teplotu) a 60 minut inkubovali na 37 °C v třepačce.

Buňky jsme přepipetovali do 10 ml LB media s 10 µl AMP (100 mg/ml) a spolu s 200 µl 1M sterilní glukosy jsme buněčnou kulturu nechali na třepačce při 37 °C přes noc.

Narostlou kulturu jsme následující den rozpipetovali do 1 ml aliquotů v 25% glycerolu a uchovali při -70 °C v hlubokomrazícím boxu.

Expese rekombinantního proteinu NS1

Jednu ze zkumavek s bakteriální suspenzí buněk BL21(DE3) transformovaných plasmidem pET100-NS1 jsme přidali do 200 ml LB media s 200 µl 100 mg/ml ampicilínu a s 4 ml 1M glukosy a inkubovali při 37°C a po dobu cca 10 hodin. Poté jsme suspenzi dále inkubovali, ovšem při snížené teplotě 16 °C po dobu asi 3 hodin.

Kulturu jsme přelili do zkumavek a centrifugovali 10 minut při 2500 ×g a teplotě 16 °C.

Po uplynutí doby jsme kulturu 3krát promyli v LB mediu s ampicilinem bez glukosy a dále jsme inkubovali přes noc na třepačce na 16°C.

Další den jsme kulturu stočili v centrifuze vychlazené na 4°C 10 minut při 2500 ×g. Buňky jsme 3krát promyli v lyzačním pufru 0 (vychlazeném na 4 °C) a po závěrečném promytí jsme supernatant zmrazili na -70 °C.

4.2.3. Purifikace NS1 a analýza jeho přítomnosti

Purifikace rekombinantního proteinu pomocí 'Co-MAC Purification Kits'

Zamražený supernatant jsme pozvolna rozpuštěli na ledu. Po rozmražení jsme supernatant sonikovali a to 3krát 30 sekund při maximálním výkonu sonikátoru. Z proteinového lyzátu jsme odebrali a označili 1 ml a uchovali ho pro pozdější analýzu (vzorek B – kompletní frakce lyzovaných buněk).

Lyzát byl poté centrifugován v předem vychlazené centrifuze 20 minut na 10 000 ×g. Supernatantu jsme odlili do jiné nádoby a sediment rozpustili v 50 ml lyzačního pufru 0 a ze supernatantu i sedimentu odebrali opět 1 ml pro pozdější analýzu (vzorek SD – sediment a SP – supernatant). Dále jsme pracovali už jen se supernatantem.

Supernatant jsme přefiltrovali přes 0,22 μm membránu a z filtrátu odebrali 1 ml pro pozdější analýzu (vzorek Fil – frakce nanášená na kolonku). Zbylý filtrát jsme ručně za použití 25 ml stříkačky nanесли na 5 ml Co-MAC kolonku, kterou jsme předtím ekvilibrovali 25 ml lyzačního pufru 0.

Z prokleté frakce jsme odebrali 1 ml pro pozdější analýzu (vzorek F). Kolonku jsme dále promyli 20 ml lyzačního pufru I. Z proteklé frakce jsme odebrali 1 ml pro pozdější analýzu (vzorek W). Dále jsme promyli kolonku 8 ml lyzačního pufru II. Proteklé frakce jsme jímali po 1,5 ml (vzorky VZ1, VZ2,..). Aby došlo k uvolnění všech vazeb na kolonce, promyli jsme ji ještě 20 ml lyzačního pufru III. Z proteklé frakce jsme odebrali 1 ml pro pozdější analýzu (vzorek WO). Na závěr jsme pro uskladnění kolonku promyli ještě 20 ml 20% EtOH a uložili ve 4 °C.

Purifikace rekombinantního proteinu pomocí AKTA HPLC machine

Z další purifikace rekombinantního proteinu NS1 jsme vyloučili lidský faktor a spolupracovali s Laboratoří biologie protist na přístroji AKTA HPLC machine.

K purifikaci jsme použili Protino® Ni-NTA Columns (5 ml)(Macherey Nagel).

Aby bylo možno uskutečnit purifikaci na tomto přístroji, museli jsme použít jiný protokol na přípravu buněčného lyzátu.

Bakteriální kulturu jsme po rozmražení centrifugovali při 2300 ×g 10 minut v centrifuze vychlazené na 12 °C. Každý z bakteriálních peletů jsme rozsuspendovali a 3krát promyli v 25ml lyzačním pufru 0. Poté jsme centrifugovali ve 12°C 15 minut při 1600 ×g. Pelet jsme poté rozsuspendovali v 50 ml lyzačního pufru 0 a do této směsi jsme přidali 40 μl DNase A

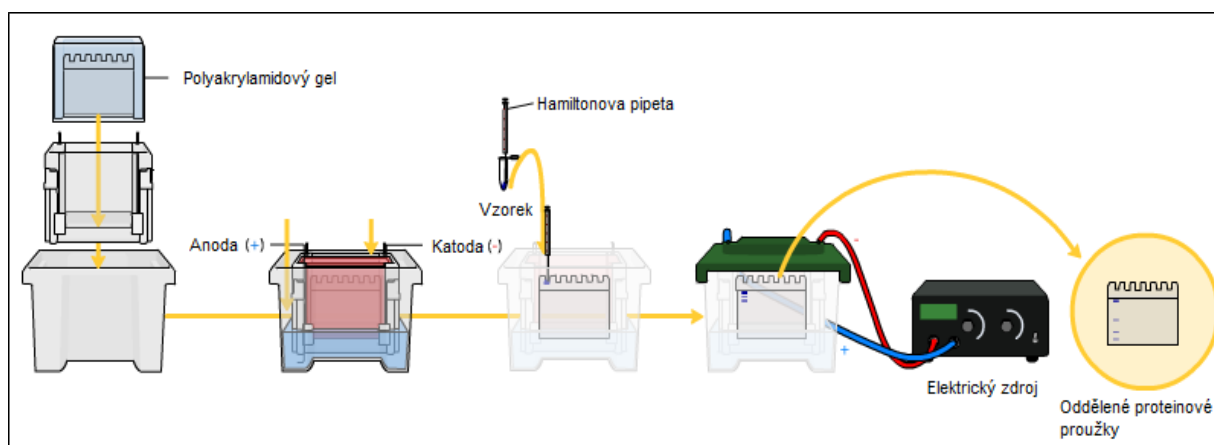
(Roche), 75 μ l lysozymu a inhibitor proteáz (Roche) v poměru 1:100. Takto připravená směs byla centrifugována 30 minut při 500 \times g při teplotě 4 °C.

Proteinový lyzát jsme následně sonikovali 5krát 20 sekund při polovičním výkonu a vždy mezi jednotlivými sonikacemi jsme ho umístili kvůli zchlazení na led a po dokončení jsme lyzát stočili v centrifuze 30 minut při 4°C a 10 000 \times g. Supernatant jsme odstranili a pelet rozpustili v cca 100 ml lyzačního pufru 0 a přefiltrovali přes 0,45 μ l filtr a použili k purifikaci.

Takto připravený proteinový roztok jsme nechali načerpat do AKTA HPLC machine, kde byl po celkovou dobu trvání programu (280 minut) vzorek rozdělen na 74 frakcí po 1,5 ml.

Ve frakcích 15-67 byl postupně zvyšován gradient imidazolu z 10mM do 500mM koncentrace.

SDS-PAGE



Obr. 4.1: Postup při sestavení SDS PAGE aparatury

Polyakrylamidové gely jsme namíchali v následujícím poměru jednotlivých složek.

Rozdělovací gel (12%) množství (5 ml)

30 % Akryl amid ... 2ml
 Rozdělovací pufr ... 1,25 ml
 dH₂O ... 1,7 ml
 10% APS ... 50 μ l
 TEMED ... 1 μ l

Zaostřovací gel (4%) množství (1 ml)

30 % Akryl amid ... 165 μ l
 Rozdělovací pufr ... 250 μ l
 dH₂O ... 575 μ l
 10% APS ... 10 μ l
 TEMED...1 μ l

SDS-PAGE probíhala na aparatuře Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio Rad)(viz. Obr. 4.1) při napětí 150 V v 1× koncentrovaném elektroforézovém pufru, přibližně 2 hodiny.

Po skončení elektroforézy jsme gel 3x promyli ve 100ml dH₂O a dobarvili v PageBlue[™] (Fermentas) přes noc a opět 3×promyli. Po promytí ve vodě jsme výsledek fotograficky zdokumentovali.

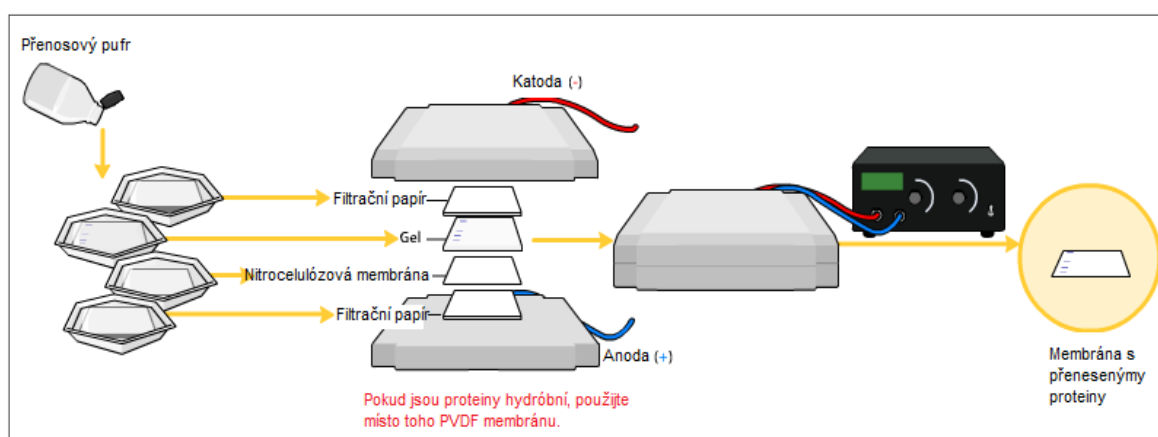
Barvení polyakrylamidových gelů stříbrem

K zviditelnění vzorků na polyakrylamidových gelech jsme použili PageSilver[™] Silver Staining Kit (Fermentas) a dodržovali jsme postup uvedený výrobcem.

Vysoušení polyakrylamidových gelů

K uchování polyakrylamidových gelů jsme využili soupravy Gel Drying Frames (Sigma-Aldrich). Při vysoušení jsme postupovali dle instrukcí výrobce.

Western Blotting



Obr. 4.2: Postup při sestavení blotovací aparatury.

Blotovací sendvič jsme sestavili podle postupu znázorněného na schématu (viz. obr.4.2.)

Přenos proteinů separovaných v SDS-PAGE probíhal za konstantního proudu 250 mA podobu 2 hodin v blotovacím pufru na blotovacím zařízení Trans-Blot[®] SD Cell (BioRad).

Membránu s navázanými proteiny jsme 2x promyli v PBS (pH 7,8) po dobu 5 minut, blokovali 1 hodinu v 5% mléku v PBS při RT a poté opět 3x 5 minut promyli v PBS. Po dobu 1 hodiny jsme membránu inkubovali s Anti-His G-AP protilátce. Protilátka se váže na 6×His-kotvu na N- konci rekombinantního proteinu a má na sobě kovalentně navázanou alkalickou fosfatázu, proto není potřeba další reakce se sekundární protilátkou.

Chromogenní reakci jsme provedli ve vyvíjejícím roztoku za použití 1×BCIP/NBT (rozpuštěno v 67% DMSO) a zastavili promytím v PBS.

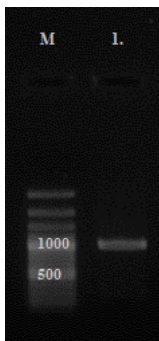
Hmotnostní spektrometrie proteinů

Identifikovat zvolený a vyříznutý vzorek proteinu nám bylo umožněno v servisním pracovišti Katedry molekulární biologie – Laboratoři Hmotnostní spektroskopie využívající metody LC-MS/MS (Liquid chromatography – Tandem Mass Spectrometry).

5. VÝSLEDKY

5.1. Exprese rekombinantního proteinu NS1 v savčích buňkách

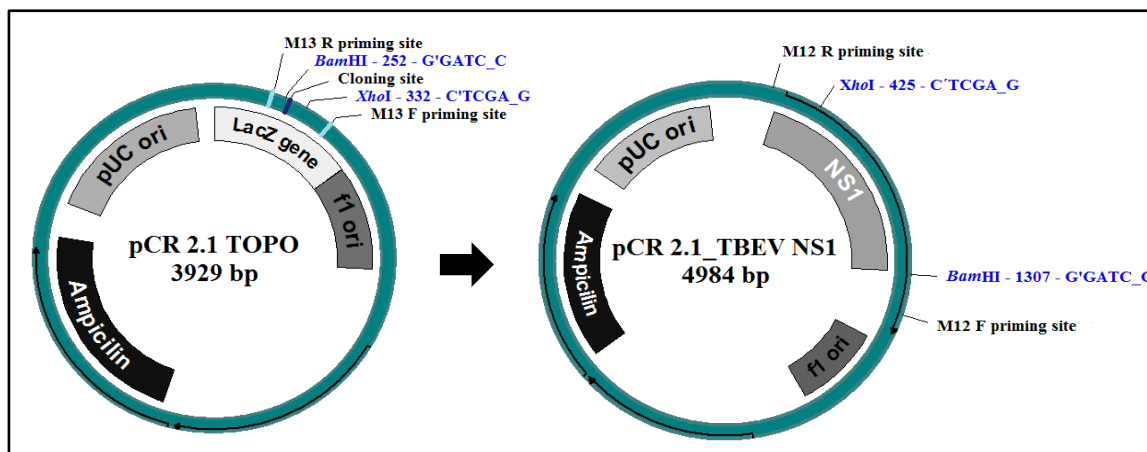
5.1.1. PCR amplifikace DNA kódující protein NS1



Sekvenci kódující nestrukturní protein NS1 jsme získali z cDNA TBEV kmene *Hypr* za použití polymerázové řetězové reakce s využitím specifických primerů TBEV NS1-01 a TBEV NS1-03 (viz Tab. 4.1). Velikost amplifikované DNA kódující protein NS1 je 1056 párů bazí (viz. Obr. 5.1).

Obr. 5.1: PCR produkt získaný specifickými primery. (1: získaný vzorek NS1; M: 100 bp DNA Ladder).

5.1.2. pCR®2.1-TOPO®



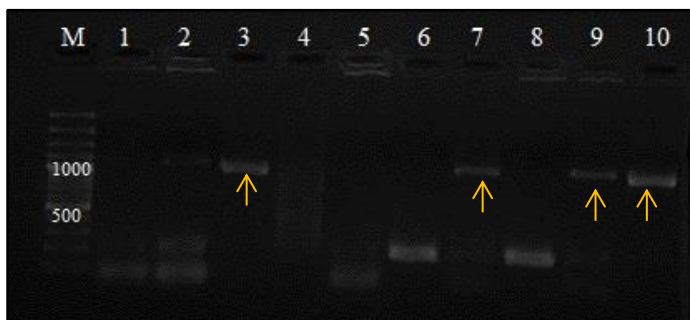
Obr. 5.2: Vložení genu pro protein NS1 do plasmidu pCR® 2.1-TOPO.

Do komerčního plasmidu pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) jsme vložili velikostně odpovídající DNA (viz. Obr. 5.2), která byla vyříznuta z gelu a vyizolována pomocí soupravy Illustra™GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) je linearizovaný plasmid obsahující 3'-thyminové (T) přesahy a topoizomerázu I kovalentně navázanou k vektoru. Metoda vkládání DNA do plasmidu pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) využívá toho, že *Taq* polymeráza přidává jednotlivé deoxyadenosiny (A) k 3' konci PCR produktu. Jejich párování s 3'thymidinovými přesahy umožňuje párování PCR produktu s vektorem a následné spojení obou molekul topoizomerázou I.

Ligační reakci na vložení inzertu do plasmidu jsme si připravili smícháním námi vytvořené a přečištěné PCR reakce plasmidu pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen). Plasmidem

pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) nesoucím vloženou sekvencí DNA kódující protein NS1 jsme následně natransformovali OneShot® (Invitrogen) kompetentní buňky, které jsme vyseli na agaróзовé plotny s ampicilinem a X-gal. Následně jsme vybrali 10 bílých kolonií, ve kterých jsme potvrdili přítomnost inzertu ve vektoru pomocí PCR za použití vektor-specifických primerů M13 F a M13R. Vzorky z PCR jsme nanесли na gel (viz. Obr. 5.3) a vybrané velikostně odpovídající úseky jsme vyřízli a přečistili. Získanou DNA jsme nechali osekvenovat (viz. Obr. 5.4). Kompletní sekvence viz Přílohy.



Obr. 5.3: Výsledky elektroforetické analýzy vybraných kolonií na přítomnost inzertu v plasmidu pCR® 2.1-TOPO (M: 100 bp DNA Ladder; 1-10: jednotlivě vybrané kolonie).

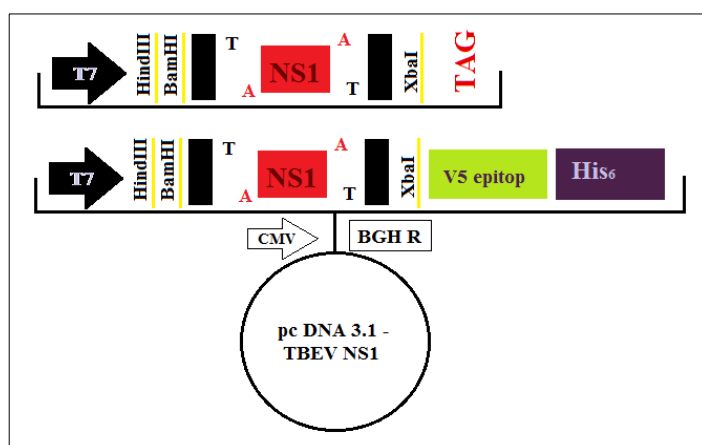
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
TBEV NS1	1	GATGTTGGTT	GCGCTGTGGA	CACGGAACGA	ATGGAGCTCC	GCTGTGGCGA	GGGCCCTGGTC	GTGTGGAGAG	AGGTCTCAGA	ATGGTATGAC	AATTATGCCT
3	1	GATGTTGGTT	GCGCTGTGGA	CACGGAACGA	ATGGAGCTCC	GCTGTGGCGA	GGGCCCTGGTC	GTGTGGAGAG	AGGTCTCAGA	ATGGTATGAC	AATTATGCCT
7	1	GATGTTGGTT	GCGCTGTGGA	CACGGAACGA	ATGGAGCTCC	GCTGTGGCGA	GGGCCCTGGTC	GTGTGGAGAG	AGGTCTCAGA	ATGGTATGAC	AATTATGCCT
9	1	GATGTTGGTT	GCGCTGTGGA	CACGGAACGA	ATGGAGCTCC	GCTGTGGCGA	GGGCCCTGGTC	GTGTGGAGAG	AGGTCTCAGA	ATGGTATGAC	AATTATGCCT
10	1	GATGTTGGTT	GCGCTGTGGA	CACGGAACGA	ATGGAGCTCC	GCTGTGGCGA	GGGCCCTGGTC	GTGTGGAGAG	AGGTCTCAGA	ATGGTATGAC	AATTATGCCT
		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TBEV NS1	101	ACTACCCGGA	GACACCGGGG	GCCCTTGCAT	CAGCCATAAA	GGAGACATTT	GAGGAGGGAA	GCTGTGGTGT	AGTCCCCAG	AACAGGCTCG	AGATGGCCAT
3	101	ACTACCCGGA	GACACCGGGG	GCCCTTGCAT	CAGCCATAAA	GGAGACATTT	GAGGAGGGAA	GCTGTGGTGT	AGTCCCCAG	AACAGGCTCG	AGATGGCCAT
7	101	ACTACCCGGA	GACACCGGGG	GCCCTTGCAT	CAGCCATAAA	GGAGACATTT	GAGGAGGGAA	GCTGTGGTGT	AGTCCCCAG	AACAGGCTCG	AGATGGCCAT
9	101	ACTACCCGGA	GACACCGGGG	GCCCTTGCAT	CAGCCATAAA	GGAGACATTT	GAGGAGGGAA	GCTGTGGTGT	AGTCCCCAG	AACAGGCTCG	AGATGGCCAT
10	101	ACTACCCGGA	GACACCGGGG	GCCCTTGCAT	CAGCCATAAA	GGAGACATTT	GAGGAGGGAA	GCTGTGGTGT	AGTCCCCAG	AACAGGCTCG	AGATGGCCAT
		210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
TBEV NS1	201	GTGGAGAAGC	TCGGTCACAG	AGCTGAATTT	GGCTCTGGCG	GAAGGGGAGG	CAAAATCTCAC	AGTGGTGGTG	GACAAGTTTG	ACCCCACTGA	CTACCGAGGT
3	201	GTGGAGAAGC	TCGGTCACAG	AGCTGAATTT	GGCTCTGGCG	GAAGGGGAGG	CAAAATCTCAC	AGTGGTGGTG	GACAAGTTTG	ACCCCACTGA	CTACCGAGGT
7	201	GTGGAGAAGC	TCGGTCACAG	AGCTGAATTT	GGCTCTGGCG	GAAGGGGAGG	CAAAATCTCAC	AGTGGTGGTG	GACAAGTTTG	ACCCCACTGA	CTACCGAGGT
9	201	GTGGAGAAGC	TCGGTCACAG	AGCTGAATTT	GGCTCTGGCG	GAAGGGGAGG	CAAAATCTCAC	AGTGGTGGTG	GACAAGTTTG	ACCCCACTGA	CTACCGAGGT
10	201	GTGGAGAAGC	TCGGTCACAG	AGCTGAATTT	GGCTCTGGCG	GAAGGGGAGG	CAAAATCTCAC	AGTGGTGGTG	GACAAGTTTG	ACCCCACTGA	CTACCGAGGT
		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
TBEV NS1	301	GGTGTCCTTG	GTTTACTGAA	AAAAGGAAAG	GACATAAAAG	TCTCCTGGAA	AAGCTGGGGC	CATTCAATGA	TCTGGAGCAT	TCTGAGGCC	CCCCGTGCCT
3	301	GGTGTCCTTG	GTTTACTGAA	AAAAGGAAAG	GACATAAAAG	TCTCCTGGAA	AAGCTGGGGC	CATTCAATGA	TCTGGAGCAT	TCTGAGGCC	CCCCGTGCCT
7	301	GGTGTCCTTG	GTTTACTGAA	AAAAGGAAAG	GACATAAAAG	TCTCCTGGAA	AAGCTGGGGC	CATTCAATGA	TCTGGAGCAT	TCTGAGGCC	CCCCGTGCCT
9	301	GGTGTCCTTG	GTTTACTGAA	AAAAGGAAAG	GACATAAAAG	TCTCCTGGAA	AAGCTGGGGC	CATTCAATGA	TCTGGAGCAT	TCTGAGGCC	CCCCGTGCCT
10	301	GGTGTCCTTG	GTTTACTGAA	AAAAGGAAAG	GACATAAAAG	TCTCCTGGAA	AAGCTGGGGC	CATTCAATGA	TCTGGAGCAT	TCTGAGGCC	CCCCGTGCCT
		410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
TBEV NS1	401	TCATGGTGGG	CACGGAAGGA	CAAAGTGAGT	GTCCCCTAGA	GAGACGGAAG	ACAGGTGTTT	TCACGGTGGC	AGAATTCGGG	GTTGGCCTGA	GAACAAAAGGT
3	401	TCATGGTGGG	CACGGAAGGA	CAAAGTGAGT	GTCCCCTAGA	GAGACGGAAG	ACAGGTGTTT	TCACGGTGGC	AGAATTCGGG	GTTGGCCTGA	GAACAAAAGGT
7	401	TCATGGTGGG	CACGGAAGGA	CAAAGTGAGT	GTCCCCTAGA	GAGACGGAAG	ACAGGTGTTT	TCACGGTGGC	AGAATTCGGG	GTTGGCCTGA	GAACAAAAGGT
9	401	TCATGGTGGG	CACGGAAGGA	CAAAGTGAGT	GTCCCCTAGA	GAGACGGAAG	ACAGGTGTTT	TCACGGTGGC	AGAATTCGGG	GTTGGCCTGA	GAACAAAAGGT
10	401	TCATGGTGGG	CACGGAAGGA	CAAAGTGAGT	GTCCCCTAGA	GAGACGGAAG	ACAGGTGTTT	TCACGGTGGC	AGAATTCGGG	GTTGGCCTGA	GAACAAAAGGT
		510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
TBEV NS1	501	CTTCTTGGAT	TTTACAGCAGG	AACCAACACA	TGAGTGTGAC	ACAGGAGTGA	TGGGAGCTGC	AGTCAAGAAC	GGCATGGCAA	TCCACACAGA	TCAAAGTCTC
3	501	CTTCTTGGAT	TTTACAGCAGG	AACCAACACA	TGAGTGTGAC	ACAGGAGTGA	TGGGAGCTGC	AGTCAAGAAC	GGCATGGCAA	TCCACACAGA	TCAAAGTCTC
7	501	CTTCTTGGAT	TTTACAGCAGG	AACCAACACA	TGAGTGTGAC	ACAGGAGTGA	TGGGAGCTGC	AGTCAAGAAC	GGCATGGCAA	TCCACACAGA	TCAAAGTCTC
9	501	CTTCTTGGAT	TTTACAGCAGG	AACCAACACA	TGAGTGTGAC	ACAGGAGTGA	TGGGAGCTGC	AGTCAAGAAC	GGCATGGCAA	TCCACACAGA	TCAAAGTCTC
10	501	CTTCTTGGAT	TTTACAGCAGG	AACCAACACA	TGAGTGTGAC	ACAGGAGTGA	TGGGAGCTGC	AGTCAAGAAC	GGCATGGCAA	TCCACACAGG	TCAAAGTCTC
		610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
TBEV NS1	601	TGGATGAGAT	CAATGAAAAA	TGACACAGGC	ACTTACATAG	TTGAACTTTT	GGTCACTGAC	CTGAGGAACT	GCTCATGGCC	TGCTAGCCAC	ACTATCGATA
3	601	TGGATGAGAT	CAATGAAAAA	TGACACAGGC	ACTTACATAG	TTGAACTTTT	GGTCACTGAC	CTGAGGAACT	GCTCATGGCC	TGCTAGCCAC	ACTATCGATA
7	601	TGGATGAGAT	CAATGAAAAA	TGACACAGGC	ACTTACATAG	TTGAACTTTT	GGTCACTGAC	CTGAGGAACT	GCTCATGGCC	TGCTAGCCAC	ACTATCGATA
9	601	TGGATGAGAT	CAATGAAAAA	TGACACAGGC	ACTTACATAG	TTGAACTTTT	GGTCACTGAC	CTGAGGAACT	GCTCATGGCC	TGCTAGCCAC	ACTATCGATA
10	601	TGGATGAGAT	CAATGAAAAA	TGACACAGGC	ACTTACATAG	TTGAACTTTT	GGTCACTGAC	CTGAGGAACT	GCTCATGGCC	TGCTAGCCAC	ACTATCGATA
		710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
TBEV NS1	701	ATGCTGACGT	GGTGGACTCA	GAGTTATTCC	TTCCGGCGAG	CCTGGCAGGA	CCCAGATCCT	GGTACAACAG	GATACCTGGC	TATTGAGAAC	AGGTGAAAGG
3	701	ATGCTGACGT	GGTGGACTCA	GAGTTATTCC	TTCCGGCGAG	CCTGGCAGGA	CCCAGATCCT	GGTACAACAG	GATACCTGGC	TATTGAGAAC	AGGTGAAAGG
7	701	ATGCTGACGT	GGTGGACTCA	GAGTTATTCC	TTCCGGCGAG	CCTGGCAGGA	CCCAGATCCT	GGTACAACAG	GATACCTGGC	TATTGAGAAC	AGGTGAAAGG
9	701	ATGCTGACGT	GGTGGACTCA	GAGTTATTCC	TTCCGGCGAG	CCTGGCAGGA	CCCAGATCCT	GGTACAACAG	GATACCTGGC	TATTGAGAAC	AGGTGAAAGG
10	701	ATGCTGACGT	GGTGGACTCA	GAGTTATTCC	TTCCGGCGAG	CCTGGCAGGA	CCCAGATCCT	GGTACAACAG	GATACCTGGC	TATTGAGAAC	AGGTGAAAGG
		810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
TBEV NS1	801	GCCATGGAAG	TACACGCCTA	TCCGAGTTAT	CAGAGAGGAG	TGTCCCAGCA	CGACCGTTAC	CATCAACGCC	AAGTGTGACA	AAAGAGGAGC	ATCTGTGAGG
3	801	GCCATGGAAG	TACACGCCTA	TCCGAGTTAT	CAGAGAGGAG	TGTCCCAGCA	CGACCGTTAC	CATCAACGCC	AAGTGTGACA	AAAGAGGAGC	ATCTGTGAGG
7	801	GCCATGGAAG	TACACGCCTA	TCCGAGTTAT	CAGAGAGGAG	TGTCCCAGCA	CGACCGTTAC	CATCAACGCC	AAGTGTGACA	AAAGAGGAGC	ATCTGTGAGG
9	801	GCCATGGAAG	TACACGCCTA	TCCGAGTTAT	CAGAGAGGAG	TGTCCCAGCA	CGACCGTTAC	CATCAACGCC	AAGTGTGACA	AAAGAGGAGC	ATCTGTGAGG
10	801	GCCATGGAAG	TACACGCCTA	TCCGAGTTAT	CAGAGAGGAG	TGTCCCAGCA	CGACCGTTAC	CATCAACGCC	AAGTGTGACA	AAAGAGGAGC	ATCTGTGAGG
		910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
TBEV NS1	901	AGTACCACAG	AGAGTGGCAA	GGTTATCCCA	GAATGGTGCT	GCCGAGCGTG	CACAAATGCCA	CCAGTGACGT	TCCGGACTGG	AACTGATTGC	TGGTATGCCA
3	901	AGTACCACAG	AGAGTGGCAA	GGTTATCCCA	GAATGGTGCT	GCCGAGCGTG	CACAAATGCCA	CCAGTGACGT	TCCGGACTGG	AACTGATTGC	TGGTATGCCA
7	901	AGTACCACAG	AGAGTGGCAA	GGTTATCCCA	GAATGGTGCT	GCCGAGCGTG	CACAAATGCCA	CCAGTGACGT	TCCGGACTGG	AACTGATTGC	TGGTATGCCA
9	901	AGTACCACAG	AGAGTGGCAA	GGTTATCCCA	GAATGGTGCT	GCCGAGCGTG	CACAAATGCCA	CCAGTGACGT	TCCGGACTGG	AACTGATTGC	TGGTATGCCA
10	901	AGTACCACAG	AGAGTGGCAA	GGTTATCCCA	GAATGGTGCT	GCCGAGCGTG	CACAAATGCCA	CCAGTGACGT	TCCGGACTGG	AACTGATTGC	TGGTATGCCA
		1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
TBEV NS1	1001	TGGAATACG	GCCAGTCCAT	GACCAGGGGG	GGCTTGTTCG	CTCAATGGTG	GTTGCG				
3	1001	TGGAATACG	GCCAGTCCAT	GACCAGGGGG	GGCTTGTTCG	CTCAATGGTG	GTTGCG				
7	1001	TGGAATACG	GCCAGTCCAT	GACCAGGGGG	GGCTTGTTCG	CTCAATGGTG	GTTGCG				
9	1001	TGGAATACG	GCCAGTCCAT	GACCAGGGGG	GGCTTGTTCG	CTCAATGGTG	GTTGCG				
10	1001	TGGAATACG	GCCAGTCCAT	GACCAGGGGG	GGCTTGTTCG	CTCAATGGTG	GTTGCG				

Obr. 5.4: Porovnání získaných sekvencí.

5.1.3. Vložení sekvence kódující NS1 do pcDNATM3.1/V5-His

K expresi rekombinantního proteinu NS1 v savčích buňkách jsme vybrali expresní vektor pcDNATM3.1/V5-His (Invitrogen). V tomto expresním systému může být rekombinantní protein exprimován s C-koncovou fúzí s V5 epitopem a poly-histagem, což umožňuje snadnou detekci a purifikaci proteinu. Rovněž je možné je ukončit překlad ihned na C-konci exprimovaného rekombinantního proteinu tím, že je na 3' konec DNA kódující exprimovaný protein vložen stop kodón (viz. Obr. 5.5). To umožňuje expresi rekombinantního proteinu o nativní sekvenci bez přidaných epitopů, které by mohli mít vliv na strukturu a funkci proteinu.

My jsme vytvořili obě tyto varianty.



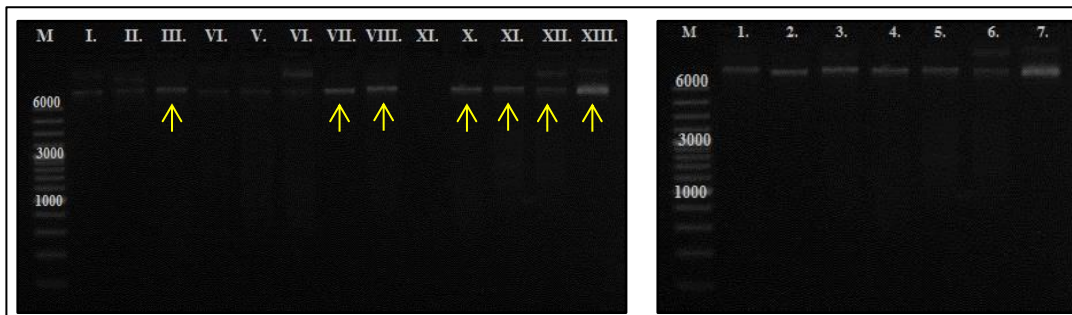
Obr. 5.5: Sekvence proteinu NS1 s a bez přítomnosti stop kodónu (TAG).

Sekvenci kódující protein NS1 jsme vložili do kruhového plasmidu pcDNA 3.1/V5-His bez topoizomerázy (uzavřená verze plasmidu pcDNATM3.1/V5-His TOPO® TA - Jiří Černý).

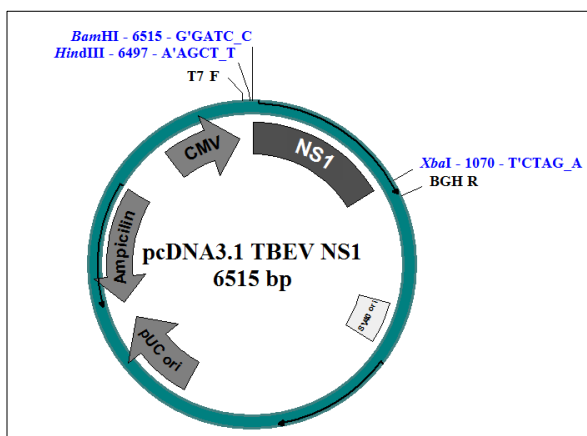
Tento plasmid jsme naštěpili restričními endonukleázami BamHI a XhoI a sekvenci kódující protein NS1 jsme vyštěpili z plasmidu pCR 2.1 TBEV NS1 restričními endonukleázami BamHI a XhoI (viz. Tab. 4.6). Obě reakce jsme pustili na gel a velikostně odpovídající úseky jsme následně vyřízli z gelu a izolovali. Takto získanou DNA proteinu a expresního plasmidu jsme spojili ligací a transformovali je do kompetentních TOP 10 *E.Coli* (viz. Obr. 5.6).

Přítomnost inzertu v plasmidu jsme ověřili restričním štěpením (sestrojili jsme specifickou restriční mapu plasmidu s vloženými inzerty a experimentálně ji ověřili) a také pomocí PCR s vektor specifickými primery T7 F a BGH R (viz. Obr. 5.7 a 5.8). Podle restriční mapy jsme pak vybrali jeden plasmid kódující fúzní protein NS1 s V5 epitopem a

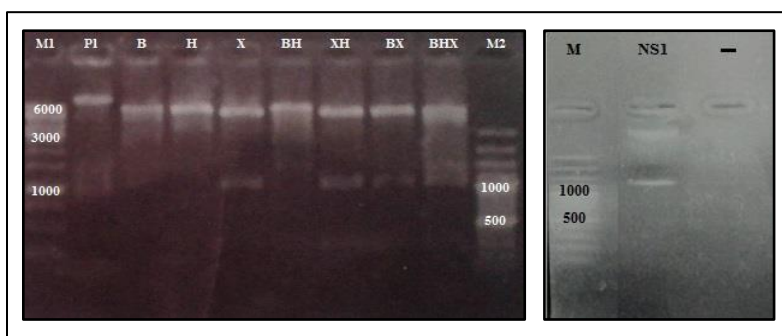
His tagem na C konci a druhý s vloženým stop kodómem (UAG) na 3' konci sekvence kódující rekombinantní protein, kterými jsme následně transfekovali vybrané savčí buňky.



Obr. 5.6: Elektroforetické vyhodnocení vybraných kolonií na přítomnost plasmidu a kontrola plasmidové DNA po purifikaci příslušnou soupravou (M: 1kbp DNA Ladder; I. – XIII: označení testovaných kolonií; 1. – 7: označení plasmidové DNA po izolaci).



Obr. 5.7: Plasmid pcDNA 3.1 TBEV NS1 s vyznačenými restrikčními místy.



Obr. 5.8: Elektroforetické vyhodnocení restrikčního štěpení plasmidu pcDNATM3.1/V5-His na přítomnost inzertu a PCR s vektor specifickými primery T7 F a BGH R (M1: 1 kbp DNA Ladder; M2: 100 bp DNA Ladder; PI: plasmid; použité RE: B – BamHI, H – HindIII, X – XbaI; M: 100 bp DNA Ladder; (-): negativní kontrola).

5.1.4. Transfekce savčích buněk

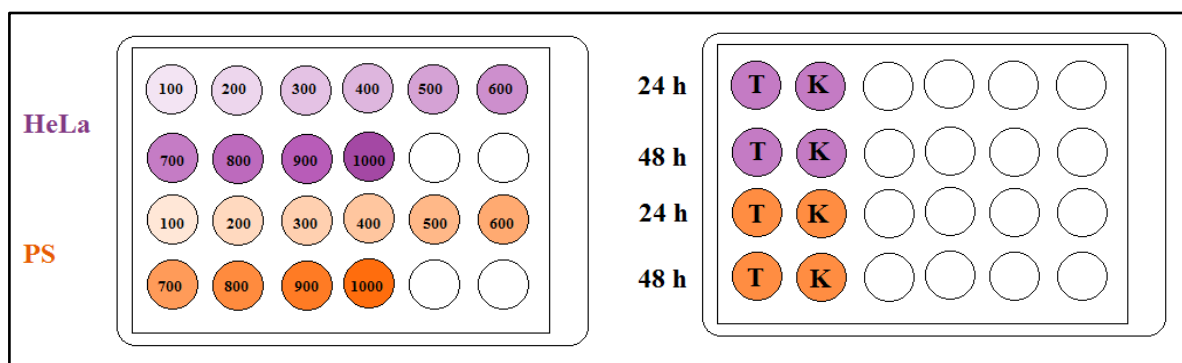
Pro transfekci jsme vybrali HeLa a PS buněčné linie.

Ještě před transfekcí bylo nutné zjistit minimální toxickou koncentraci antibiotika geneticínu, které je používáno pro selekci transfekovaných buněk. HeLa a PS buňky jsme nechali růst na 26 jamkovém kultivačním panelu v koncentracích geneticínu mezi 100 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ (viz Obr. 5.9) pro každou z buněčných linií. Podle stavu buněk jsme jak pro HeLa tak i PS buňky určili jako ideální koncentraci 300 μg geneticínu na 1 kultivačního média.

Pro transfekci jsme zvolili soupravu ExGen 500 *in vitro* Transfection Reagent (Fermentas).

ExGene 500, polyethylenimin, patří do skupiny nevirových, nelipozomálních gen přepravních reagentů. Je schopný transfekovat širokou škálu buněk jak *in vitro*, tak *in vivo*. Má nízkou toxicitu a působí i v přítomnosti nebo absenci séra.

Izolací získaný pcDNA3.1-NS1(His-tag) s vloženou sekvencí pro protein NS1, jsme změřili na nanodropu. Hodnota koncentrace DNA je kritická pro úspěšnou transfekci a poměr $A_{260/280}$ (specifická absorbance nukleových kyselin) by se v ideálním případě měl pohybovat nad hodnotou 1,8. Změřením na nanodropu jsme zjistili, že poměr $A_{260/280}$ naší plasmidové DNA činí 1,95 (73,9 ng/ml).



Obr. 5.9: Schéma rozložení jednotlivých vzorků při hledání minimální cytotoxické koncentrace geneticínu a při následné transfekci (PS: buňky z prasečího jaterního epitelu; HeLa: nádorové buňky izolované z nádoru děložního hrdla Henrietty Laksové; 100 – 1000: koncentrace Geneticínu v jednotlivých jamkách; T: jamky s transfekovanými savčími liniemi; K: kontrola - jamky s netransfekovanými savčími liniemi).

Podle manuálu výrobce pro tuto soupravu jsme transfekovali obě buněčné linie plasmidem pcDNA 3.1-NS1 (bez STOP kodónu) a expresi rekombinantního proteinu jsme ověřili sklizením transfekovaných buněk i inkubačního média po 24 a 48 hodinách, pomocí SDS PAGE a Western Blotu (viz. Obr. 5.10).

NS1 protein je tvořen sekvencí 352 aminokyselin o velikosti přibližně 39 kDa. Histagová kotva přidala našemu proteinu přibližně 3 kDa, což činí jeho předpokládanou velikost na gelu cca 42~43 kDa.

Po vyhodnocení výsledků na SDS PAGE jsme se pokusili rekombinantní protein detekovat pomocí Anti-His G-AP Antibody (Invitrogen) po přenosu na PVDF membránu. Nebyli jsme schopni detekovat expresi v žádném ze sklizených buněčných vzorků (viz. Obr. 5.10). K žádné expresi pravděpodobně ani nedošlo a velikostně odpovídající úsek na SDS PAGE gelu pravděpodobně přísluší jinému/ným proteinům.



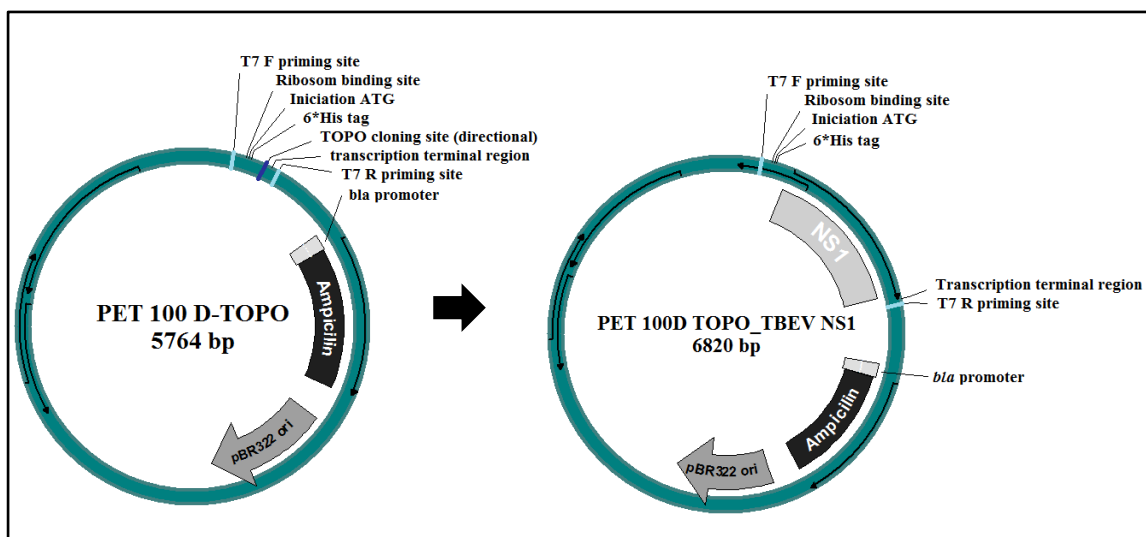
5.2. Exprese rekombinantního proteinu NS1 v bakteriích

5.2.1. Champion™ pET Directional TOPO®

Pro expresi v bakteriích jsme zvolili expresní vektor Champion™ pET Directional TOPO® (Invitrogen).

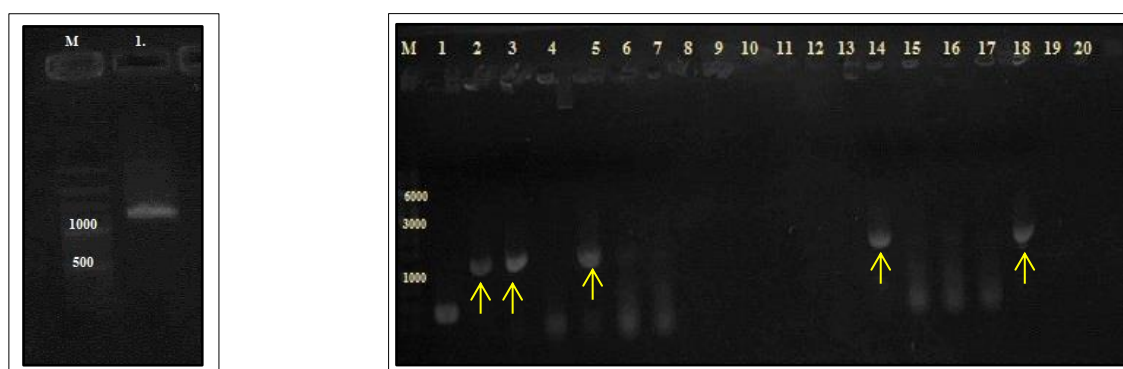
PCR produkt je do plasmidu řízeně vkládán za přidání 4 bází k forward primeru (CACC). Přesah v klonovacím vektoru (GTGG) přilne k 5' konci PCR produktu, prodlouží a přidá báze a stabilizuje PCR produkt ve správné orientaci.

6×His tag je tentokrát připojen na N'-konci peptidového řetězce (viz. Obr. 5.11).



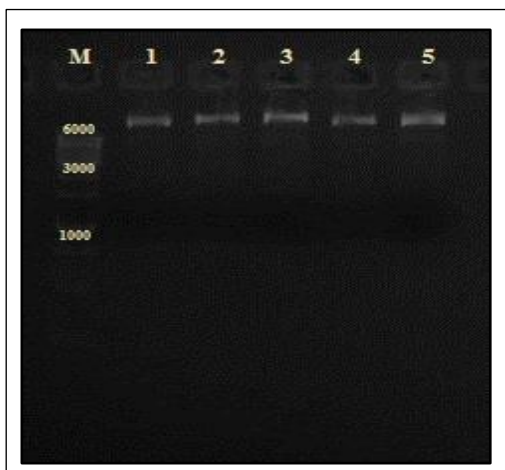
Obr. 5.11: Vložení genu pro NS1 protein do bakteriálního expresního vektoru Champion™ pET Directional TOPO®.

Vytvořili jsme si PCR produkt s „tupým koncem“ za použití námi navržených primerů TBEV NS1-03 TBEV NS1-04 (viz. Tab. 4.1) (viz. Obr. 5.12). Ten jsme následně smíchali s pET – TOPO® vektorem a transformovali jím TOP10 *E. Coli*. Takto transformované kompetentní buňky jsme vyseli na agarové plotny a vybrali jsme z narostlých kolonií a analyzovali je pomocí PCR a vektor specifických primerů T7 F a T7 R (viz. Obr. 5.13). Z vybraných pozitivních transformantů jsme izolovali plasmidovou DNA. Tuto plasmidovou DNA jsme osekvenovali (všechny sekvence viz Přílohy), abychom zajistili přítomnost exprimovaného proteinu. Plazmidy bez mutací (viz. Obr. 5.14) jsme transformovali do BL21 Star™ DE3 pro další expresi.



Obr. 5.12: PCR produkt získaný vektor specifickými primery (M: 100 bp DNA Ladder; 1: DNA).

Obr. 5.13: PCR screen transformovaných kolonií; M: 1 kbp DNA Ladder; 1. – 20: označení jednotlivých kolonií.



Obr. 5.14: Elektroforetické vyhodnocení izolace plasmidové DNA (M: 100 bp DNA Ladder; 1. – 5: označení plasmidové DNA po izolaci).

5.3. Purifikace rekombinantního proteinu NS1 a analýza jeho přítomnosti

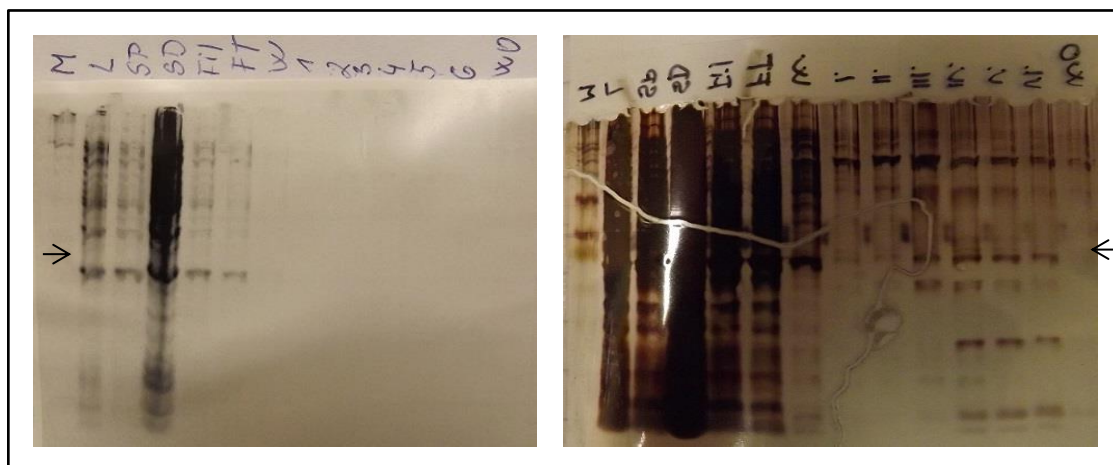
5.3.1. Purifikace rekombinantního proteinu pomocí 'Co-MAC Purification Kits'

K purifikaci rekombinantního proteinu se signálním peptidem jsme zvolili afinitní chromatografii a komerční soupravu Co-MAC Purification Kits (Novagen).

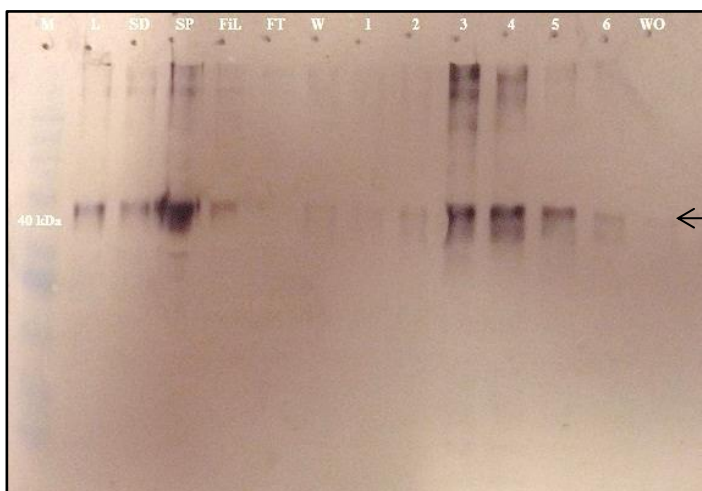
Kolonky této soupravy jsou uzpůsobeny k rychlé afinitní purifikaci proteinů spojených s 6×His tagem. His-tag kotva má vysokou afinitu k Co^{2+} iontům, což se využívá při tomto typu chromatografie.

K purifikaci jsme použili kolonky o objemu 5 ml. Purifikační kolonku jsme ekvilibrovali lyzačním pufrém 0. Takto ekvilibrovanou kolonkou jsme nechali nabít proteinovým lyzátem o celkovém objemu 50 ml. Dalším lyzačním pufrům jsme dodali imidazol v různé koncentraci, protože narušuje vazbu mezi histagovou kotvou a kobaltem. Kolonku jsme promývali lyzačním pufrém I. (50 mM imidazol), k eluci proteinu jsme použili lyzační pufr II. (500mM imidazol) a k závěrečnému vymytí všeho zbylého z kolonky jsme použili lyzační pufr III. (1 M imidazol). Z jednotlivých frakcí jsme odebírali vzorky, které jsme analyzovali pomocí SDS Page a Western Blotu.

V tomto případě jsme dosáhli exprese, ovšem velmi slabé. K vizualizaci proteinu v elučních krocích na polyakrylamidovém gelu bylo kromě obarvení PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas) zapotřebí barvení pomocí stříbra (PageSilver™ Silver Staining Kit - Fermentas) (viz. Obr. 5.15 a Obr. 15.16). Takovéto množství exprimovaného proteinu není dostačující pro žádné další využití. Pomocí westernblotu jsme ale zjistili, že, velké množství rekombinantního proteinu zůstávalo nevyužito v nerozpustné frakci po lyzi buněk, proto jsme se pokusili purifikační krok optimalizovat.



Obr. 5.15: SDS PAGE gel obarvený Page Blue Staining Solution ukazující jednotlivé frakce a SDS PAGE gel dobarvený stříbrem (M: Protein Molecular Weight Marker; L: lyzát; SP: supernatant; SD: sediment; Fil: filtrát; FT: flow-through; W: wash; 1. – 6: eluční frakce; WO: wash-out).

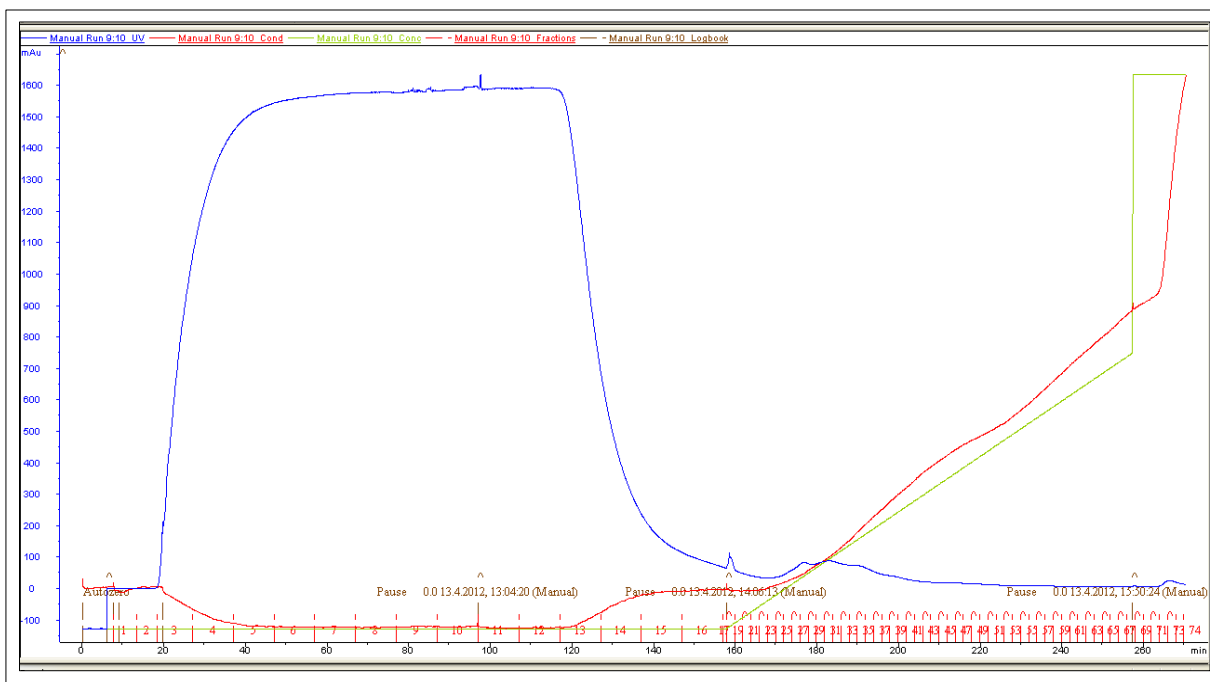


Obr. 5.16: Detekce rekombinantního proteinu pomocí Anti-His G-AP Antibody po přenosu na PVDF membránu (M: Protein Molecular Weight Marker; L: lyzát; SP: supernatant; SD: sediment; Fil: filtrát; FT: flow-through; W: wash; 1. – 6: eluční frakce; WO: wash-out).

5.3.2. Purifikace rekombinantního proteinu pomocí AKTA HPLC machine

Jako další variantu purifikace rekombinantního proteinu jsme zvolili použití AKTA HPLC machine. Jedná se o plně automatizovaný systém pro kapalinovou chromatografii proteinů spojených se signálním peptidem. Koncentrace proteinu ve vzorku je měřena pomocí UV záření a pomocí softwaru jsou monitorovány a zaznamenávány jednotlivé píky, označující přítomnost purifikovaného proteinu (viz. Obr. 5.17).

Pro purifikaci proteinu jsme v přístroji použili kolonku Protino® Ni-NTA Columns - 5 ml (Macherey Nagel), kde se histagová kotva váže s nabitými niklovými kationty.



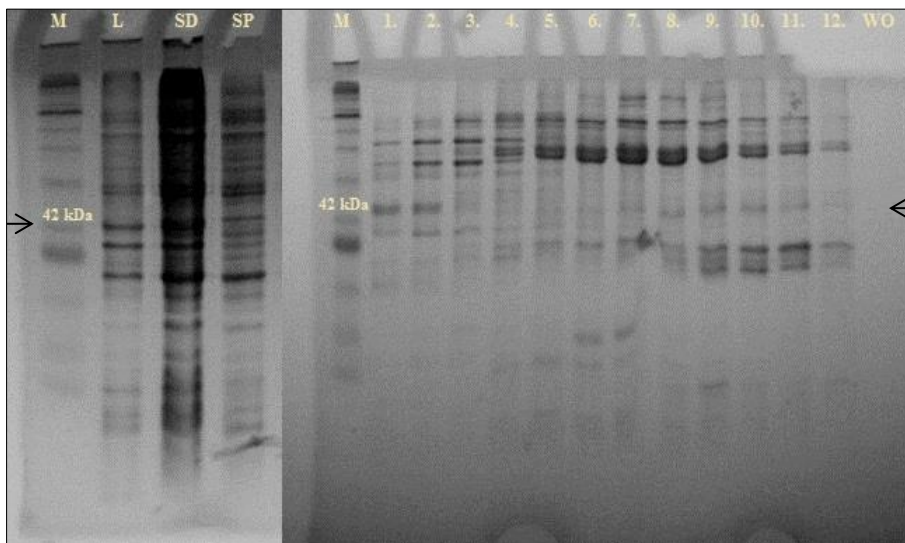
Obr. 5.17: Grafický výstup po purifikaci pomocí AKTA HPLC machine znázorňující graf závislost absorbance na čase (modrá křivka: obsah proteinu ve vzorku měřený pomocí UV záření; červená křivka: proteklé frakce; zelená křivka: koncentrace imidazolu).

K purifikaci byl použit proteinový lyzát o objemu 100 ml. V první fázi došlo k načerpání lyzátu (prvních 20 minut, frakce: 1-2); v druhé k nanášení na purifikační kolonku (dalších 140 minut, frakce: 3-16); ve třetí k postupnému vymývání proteinu navázaného histagovou kotvou na niklové kationty pomocí zvyšující se hladiny imidazolu a to od 10mM do 500 mM (následujících 100 minut, frakce: 17-67); ve čtvrté a poslední fázi byl všechen ještě potencionálně navázaný rekombinantní protein definitivně vymyt z kolonky 1M koncentrací imidazolu (posledních 20 minut, frakce: 68-74).

Z první a čtvrté fáze (SP – supernatant; WO - wash out) byl odebrán jeden kontrolní vzorek a ze třetí fáze 12 vzorků z elučních frakcí (frakce 26-38) z místa pravděpodobné eluce rekombinantního proteinu, vyčtených na základě píků zobrazených na grafu, pro SDS PAGE analýzu.

SDS PAGE analýza prokázala expresi rekombinantního proteinu bez dodatečného barvení gelu stříbrem (viz. Obr. 5.18).

Úseky velikostně odpovídající rekombinantnímu proteinu NS1 byly z gelu vyříznuty a poslány na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie (vzorky 1, 2, 10, 11).



Obr. 5.18: SDS PAGE gel vzorků z purifikace rekombinantního proteinu pomocí AKTA HPLC machine (M: Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); L: lyzát; SD: sediment; SP: supernatant; WO: wash-out; 1-12: jednotlivě testované eluční frakce).

5.3.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie provedená Petrem Koníkem v Laboratoři Hmotnostní spektroskopie Katedry molekulární biologie prokázala, že sekvence aminokyselin odpovídá rekombinantnímu proteinu NS1 (viz. Obr. 5.19).

Zároveň však ukázala přítomnost velkého množství nečistot a proto nedostačující čistotu rekombinantního proteinu pro další experimenty.

1	DVGCAVDTER	MELRCGEGLV	VWREVSEWYD	NYAYYPETPG	ALASAIKETF	EEGSCGVVPG
61	NRLEMAMWRS	SVTELNLALA	EGEANLTVVV	DKFDPTDYRG	GVPGLLKKGK	DIKVSWSKSWG
121	HSMIWSIPEA	PRRFMVGTEG	QSECPLERRK	TGVFTVAEFG	VGLRTRKVFLD	FRGEPHTECD
181	TGVMGAAVKN	GMAIHTDGSL	WMRSMKNDTG	TYIVELLVTD	LRNCSWPASH	TIDNADVDS
241	ELFLPASLAG	PRSWYNRIPG	YSEQVKGPK	YTPIVRIREE	GPGTTVTIHA	KCDKRGASVR
301	STTESGKVIP	EWCCRACMP	PVTFRTGTDC	WYAMEIRPVH	DGGGLVRSMS	VA

Obr. 5.19: MS určení rekombinantního proteinu NS1. Modře označené aminokyseliny jsou shodné s MS.

6. DISKUZE

Virus klíšťové encefalitidy (TBEV) se řadí mezi významné patogeny způsobující tisíce případů vážných neurologických onemocnění každoročně v mnoha oblastech Evropy a Asie (Mansfield, 2009). Vysoce purifikovaná inaktivovaná vakcína na TBEV byla vyvinuta na již konci 70. let minulého století, avšak z důvodu rychlé inaktivace protilátek je nutné poměrně časté přeočkování (1x za pět let) (Mandl et al., 1989). Proto se stal vývoj zdokonalené, bezpečné, efektivní a ekonomické vakcíny proti TBEV poměrně žádoucí.

Flavivirový nestrukturní protein NS1 se zdá být pro tento účel více než vhodným kandidátem. Mezi všemi flavivirovými nestrukturními proteiny pouze glykoprotein NS1 může být nalezen jak na povrchu infikovaných buněk, tak v kultivačním médiu (Schlesinger et al., 1986). Hexamerická sekretovaná forma proteinu NS1 proteinu byla původně charakterizována jako rozpustný komplement-vázající antigen přítomný v séru a tkáních infikovaných zvířat, jehož množství vzrůstá během akutní fáze infekce (Alcon, 2002). Jak extracelulární, tak i povrchový protein NS1 protein zahajuje produkci protilátek, které však nemohou neutralizovat virus, z důvodu jeho nepřítomnosti ve virionech (Jacobs et al., 1994). I přes to imunizace myši proteinem NS1 vedla k navození částečné ochrany proti pozdější infekci (Li Y et al, 2012). Protein NS1 je jedním z flavivirových proteinů s nejvíce konzervovanou sekvencí. Shoda proteinové sekvence je 90% mezi jednotlivými kmeny TBEV a 37 – 44% mezi různými flavivirovými druhy, proto by anti-NS1 protilátky mohly chránit před různými druhy flavivirů volně cirkulujícími v přírodních populacích (Bakhvalova et al., 2000).

Přesto nám mnohé o tomto nestrukturním proteinu není ještě známo. Například funkce jeho extracelulárních forem zůstává skryta. Během infekce je proti němu vyvolána silná humorální odpověď. Protilátky proti jeho formě vázané na buněčném povrchu mohou vést k lýze buněk infikovaných virem (Lindenbach, 2003). Vnitřobuněčná forma proteinu NS1 také hraje důležitou, prozatím však neznámou roli při RNA replikaci (Muylaert, 1997). Změny v glykosylaci proteinu NS1 vedou k dramatickým poruchám RNA replikace (Muylaert, 1996) a produkce viru (Crabtree, 2005).

Pokusy určit krystalovou strukturu proteinu NS1 zůstávají dodnes neúspěšné a poměrně málo se ví i o makromolekulárním uspořádání NS1 hexamerů. Byly však učiněny pokusy o 3D rekonstrukci monomerů proteinu NS1 a to u DENV 1 a DENV 2, poskytující však jen představu o nízkém rozlišení. U virů Dengue typu 1 a 2 byla zjištěná struktura s barelu podobnou konfigurací (Gutsche, 2012) (Muller, 2012).

Aplikované analýzy jednotlivých monomerů proteinu NS1 získané z rekombinantů DENV-2 viru NS1, testovaných elektronovou mikroskopií (Gutsche, 2012) a DENV-1 viru NS1 testovaného cryo-Elektron-mikroskopickou rekonstrukcí sice poskytují 3D rekonstrukci hexameru, která odhaluje barelu podobnou organizaci tří dimerických jednotek, ovšem o velmi nízkém rozlišení – 23 Å (Muller, 2012).

Proto bylo hlavním cílem mojí bakalářské práce vytvořit nestrukturní protein NS1 v množství a čistotě potřebném pro další experimentální činnost.

Pokusili jsme se k expresi rekombinantního proteinu NS1 využít dvou dostupných variant a to eukaryotního expresního systému (savčí buňky) a bakteriálního expresního systému. Výhodou exprese rekombinantního proteinu NS1 v savčích buňkách je, že tímto způsobem získané proteiny mají přirozenou sekundární a terciální strukturu i veškeré posttranslační modifikace, jelikož tento systém je v přírodě flaviviry užíván k jejich vlastní replikaci. Jejich nevýhodou je dlouhá doba produkce, poměrně složitá péče, nízký výtěžek exprimovaných proteinů a velké riziko kontaminace. Naopak exprese v bakteriálním systému je jednodušší, rychlejší a vykazuje většinou vyšší produkci rekombinantního proteinu. Nicméně proteiny produkované v bakteriálním expresním systému postrádají některé důležité posttranslační modifikace (disulfidické můstky, glykosylace atd.), které jsou pro správnou funkci proteinu NS1 životně důležité.

První pokus o expresi proteinu NS1 byl učiněn v savčích buňkách. Ty jsou přirozeným prostředím pro replikaci TBEV a tedy umožňují vytvoření všech postranslačních modifikací proteinu. Pomocí vybraného expresního vektoru je možné vytvořit protein NS1 bez signální sekvence a to ukončením překladu ihned na C-konci exprimovaného rekombinantního proteinu tím, že je na 3' konec DNA kódující exprimovaný protein vložen stop kodón. To umožňuje expresi rekombinantního proteinu o nativní sekvenci bez přidaných epitopů, které by mohli mít vliv na strukturu a funkci proteinu. My jsme se o expresi proteinu NS1 tímto způsobem pokusili, ale neúspěšně.

Zvolili jsme expresi v PS a HeLa buňkách. Dalšími vhodnými kandidáty, pro expresi proteinu NS1 by mohli být kvasinky a bakulovirus nebo hmyzí buňky. Což potvrzují různé funkční a strukturní studie proteinu NS1, pro které bylo nutné získat odpovídající množství proteinu NS1 (Muller, 2012 – hmyzí Sf9 buňky; Gutsche, 2011 – bakulovirus; Zhou, 2006 – *Pichia pastoris*).

Je třeba také vzít v potaz, že různé expresní systémy poskytují různé posttranslační modifikace (viz. Tab. 6.1).

	<i>E.coli</i>	Kvasinky	Hmyzí buňky	Savčí buňky
Posttranslační modifikace				
Skládání proteinů	Obvkle nutné dodatečné složení	V některých případech nutné dodatečné složení	Řádně složené proteiny	Řádně složené proteiny
N-glykosylace	-	Vysoký obsah manózy	Jednoduché, bez sialové kyseliny	Komplexní
O-glykosylace	-	+	+	+
Fosforylace	-	+	+	+
Acetylace	-	+	+	+
Acylace	-	+	+	+
γ-karboxylace	-	-	-	+

Tab. 6.1: Posttranslační modifikace u různých expresních systémů obecně.

Kvůli nezdaru při expresi rekombinantního proteinu NS1 ve vybraných savčích systémech jsme se rozhodli pro expresi rekombinantního proteinu NS1 v bakteriích *E. Coli*, i za cenu ztráty posttraslančních modifikací na proteinu. Detekovatelné množství rekombinantního proteinu NS1 jsme získali při dvoufázové inkubaci transformovaných buněk *E.coli* a to nejprve s přidáním glukosy a inkubaci při 37°C po dobu 10 hodin a následném snížení teploty inkubace na 16°C po dobu 3 hodin, abychom zabránil tvorbě inkluzních tělísek. Díky fúzní části proteinu, který má afinitu k Ni-NTA agarózové části kolonky, byl rekombinantní protein úspěšně purifikován až díky AKTA HPLC machine a detekován pomocí Anti-His G-AP Antibody (Invitrogen).

Tímto způsobem purifikace získaný rekombinantní protein NS1 byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie a výsledky prokázaly přítomnost proteinu NS1 proteinu se signálním 6×His peptidem o celkové molekulové hnotnosti 42,8 kDa. V testovaných vzorcích však bylo díky MS analýze bohužel zjištěno i velké množství nečistot a tedy jeho nedostatečná čistota pro další experimenty.

V budoucnu by se měli dále optimalizovat podmínky pro purifikaci rekombinantního proteinu a to především z inkluzních tělísek, pokusit se o jejich denaturaci a solubilizaci (8M urea, 6M guanidin hydrochlorid, merkptoethanol), purifikaci získaného proteinu za denaturačních podmínek a následné renaturaci proteinu, například dialýzou, ředěním či renaturací na koloně. Po případně celkovou změnou expresního vektoru (se silnějším promotorem) a expresního systému.

Díky těmto optimalizovaným podmínkám by se v budoucnosti mohlo přikročit k expresi rekombinantní proteinu NS1 v podobě blízké té nativní. Takový to protein by mohl být využit k vytvoření polyklonálních protilátek a dalším funkčním (charakterizace posttranslačních modifikací) či snad strukturním analýzám.

7. ZÁVĚR

- ✓ Podařilo se nám úspěšně vložit sekvenci kódující nestrukturní protein NS1 do savčího expresního plasmidu pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA (uzavřená verze plasmidu; Jiří Černý) a úspěšně jím transfekovat PS a HeLa savčí buňky. Expresi NS1 proteinu v nich se nám ovšem prokázat nepodařilo.
- ✓ Podařilo se nám úspěšně vložit sekvenci kódující nestrukturní protein NS1 do bakteriálního expresního plasmidu ChampionTM pET100 Directional TOPO[®] (Invitrogen) a úspěšně jím transformovat BL21 StarTM(DE3) *E. coli* a prokázat v nich expresi rekombinantního proteinu NS1.
- ✓ Rekombinantní protein se nám podařilo purifikovat pomocí AKTA HPLC machine.
- ✓ Expresi a kvalitu rekombinantního proteinu NS1 jsme ověřili pomocí Western Blotting a MS analýzy.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

AMP	ampicilín
bp	pár bází
BCPI	5-bromo-4-chloro-3'-ndolyphosphate p-toluidinová sůl
CO₂	oxid uhličitý
Co²⁺	kobaltnatý kationt
cDNA	komplementární DNA
DENV	Dengue virus
dH₂O	deionizovaná voda
ddH₂O	demineralizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
EtOH	etanol
GAG	glukosaminoglykan
GPI	glycosylfosfadidyl inositol
HeLa	nádorové buňky izolované z nádoru děložního hrdla Henrietty Laksové
HPLC	vysokoúčinnostní kapalinová chromatografie
JEV	virus japonské encefalitidy
LB medium	lysogenic broth medium
MS	hmotnostní spektrometrie
MTáza	methyltransferáza
NBT	nitro-blue tetrazolium chloride
Ni²⁺	nikelnatý kationt
NS1	nestruturní protein 1
mNS1	membránová forma nestruturního proteinu 1
sNS1	sekretovaná forma nestruturního proteinu 1
nt	nukleotid
ORF	otevřený čtecí rámec
pDNA	plazmidová DNA
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PS	ledvinnové buňky prasečího epitelu
PVDF membrána	polyvinyliden-difluoridová membrána
RE	restrikční endonukleáza
RNA	ribonukleová kyselina
RdRP	RNA dependentní – RNA polymeráza

dsRNA	dvouvláknová ribonukleová kyselina
+ssRNA	jednovláknová RNA pozitivní polarity
-ssRNA	jednovláknové RNA negativní polarity
RT	laboratorní (pokojová) teplota
RT-PCR	reverzní transkripce
SAM	S-adenosyl-methionin
SDS	sodium dodecyl-sulfát
SL	vlásenka (stem loop)
TAE	pufr Tris-acetát-EDTA
TBEV	virus klíšťové encefalidity
UTR	nekódující část genomu
UV	ultrafialové záření
YFV	virus žluté zimnice

9. LITERATURA

Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. 2002. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 40:376–381.

Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, Stuart DI, Grimes JM, Mancini EJ. 2009. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *Journal of virology* 83:12895–906.

Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerk W, Malasit P, Atkinson JP, Diamond MS. 2007. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS pathogens* 3:e183.

Avšič-Županc T, Poljak M, Matinič, A, Radšel-Medvesček, LeDuc JW, Stiasny K, Kunz C. 1995. Clinical and Diagnostic Virology Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. *Clinical and Diagnostic Virology* 4:51–59.

Bakhvalova VN, Rar V a, Tkachev SE, Matveev V a, Matveev LE, Karavanov a S, Dobrotvorsky a K, Morozova O V. 2000. Tick-borne encephalitis virus strains of Western Siberia. *Virus research* 70:1–12.

Brandt WE, Cardiff RD, Russell PK, Brandt WE, Cardiff RD, Russell PK. 1970. Dengue Virions and Antigens in Brain and Serum of Infected Mice. *Journal of Virology* 6:500–506.

Barrett AD, Teuwen DE. 2009. Yellow fever vaccine – how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Current Opinion in Immunology* (21)3:308–13.

Blitvich BJ, Scanlon D, Shiell BJ, Mackenzie JS, Pham K, Hall R a. 2001. Determination of the intramolecular disulfide bond arrangement and biochemical identification of the glycosylation sites of the nonstructural protein NS1 of Murray Valley encephalitis virus. *The Journal of general virology* 82:2251–6.

Bugrysheva J V, Matveeva V a, Dobrikova EY, Bykovskaya N V, Korobova S a, Bakhvalova VN, Morozova O V. 2001. Tick-borne encephalitis virus NS1 glycoprotein during acute and persistent infection of cells. *Virus research* 76:161–9.

Castle E, Leidner U, Nowak T, Wengler G, Wengler G. 1986. Primary structure of the West Nile flavivirus genome region coding for all nonstructural proteins. *Virology* 149(1):10-26.

Chambers TJ, McCourt DW, Rice CM. 1990. Production of yellow fever virus proteins in infected cells: identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology* 177(1):159-74.

Chamberst TJ, Weirrt RC, Grakouit A, Mccourt DW, Bazan JF, Fletterick RJ, I CMR. 1990. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein 87:8898–8902.

Chambers TJ, Droll D a, Tang Y, Liang Y, Ganesh VK, Murthy KHM, Nickells M. 2005. Yellow fever virus NS2B-NS3 protease: characterization of charged-to-alanine mutant and revertant viruses and analysis of polyprotein-cleavage activities. *The Journal of general virology* 86:1403–13.

Cheng H-J, Lin C-F, Lei H-Y, Liu H-S, Yeh T-M, Luo Y-H, Lin Y-S. 2009. Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 234:63–73.

Cleaves GR, Dubin DT. 1979. Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA. *Virology* 234:63-73.

Coller BA, Clements DE. 2011. Dengue vaccines: progress and challenges. *Current Opinion in Immunology* 23(3):391–8.

Chu JJH, Ng ML, Chu JJH, Ng ML. 2004. Infectious Entry of West Nile Virus Occurs through a Clathrin-Mediated Endocytic Pathway Infectious Entry of West Nile Virus Occurs through a Clathrin-Mediated Endocytic Pathway. *Journal of Virology* 78:10543–10555.

Chung KM, Diamond MS. 2008. Defining the Levels of Secreted Non-Structural Protein NS1 After West Nile Virus Infection in Cell Culture and Mice. *Journal of Medical Virology* 556:547–556.

Crabtree MB, Kinney RM, Miller BR. 2005. Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses. *Archives of virology* 150:771–86.

Dokland T, Walsh M, Mackenzie JM, Khromykh A a, Ee K-H, Wang S. 2004. West Nile virus core protein; tetramer structure and ribbon formation. *Structure* (London, England : 1993) 12:1157–63.

Dörrbecker B, Dobler G, Spiegel M, Hufert FT. 2010. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Medicine and Infectious Disease* 8:213-222.

Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology* 80:179–185.

Egloff M-P, Benarroch D, Selisko B, Romette J-L, Canard B. 2002. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *The EMBO Journal* 21:2757–68.

Elshuber S. 2003. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *Journal of General Virology* 84:183–191.

Falconar AK, Young PR. 1990. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1. *Journal of Virology Methods* 30(3):323–32.

Falconar AKI, Young PR. 1991. Production of dimer-specific and dengue virus group cross-reactive mouse monoclonal antibodies to the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *Journal of General Virology* 72:961–965.

Falconar AKI. 1997. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Archives of Virology* 142:897–916.

Falgout B, Pethel M, Zhang Y, Lai C. 1991. Both Nonstructural Proteins NS2B and NS3 Are Required for the Proteolytic Processing of Dengue Virus Nonstructural Proteins. *Journal of virology* 65:2467–2475.

Falgout B, Markoff L. 1995. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum . Evidence that Flavivirus NS1-NS2A Cleavage Is Mediated by a Membrane-Bound Host Protease in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Virology* 69:7232–7243.

Flamand M, Megret F, Mathieu M, Rey FA, Deubel V, Flamand M. 1999. Dengue Virus Type 1 Nonstructural Glycoprotein NS1 Is Secreted from Mammalian Cells as a Soluble Hexamer in a Glycosylation-Dependent Fashion. *Journal of Virology* 73:6104–6110.

Gould E a, Solomon T. 2008. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 371:500–9.

Gritsun TS, Lashkevich V a, Gould E a. 2003. Tick-borne encephalitis. *Antiviral research* 57:129–46.

Guirakhoo F, Bolin RA, Roehrig JT. 1992. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology* 191(2):921–31.

Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, Larquet E, Charneau P, Krey T, Mégret F, Guittet E, Rey F a, Flamand M. 2012. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:8003–8.

Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J. 2011. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 29(42):7229–41.

Guzman MG, Vazquez S. 2010. The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection 12(2):2649–2662.

Hall A. Thomas. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

Heinz FX, Stiasny K. 2012. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 30:4301–4306.

Jacobs SC, Stephenson JR, Wilkinson GW. 1994. Protection elicited by a replication-defective adenovirus vector expressing the tick-borne encephalitis virus non-structural glycoprotein NS1. *The Journal of general virology* 75 (9):2399–402.

Jacobs MG, Robinson PJ, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR. 2000. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14:1603–10.

Khromykh AA, Meka H, Guyatt KJ, Westaway EG. 2001. Essential Role of Cyclization Sequences in Flavivirus RNA Replication Essential Role of Cyclization Sequences in Flavivirus RNA Replication †. *Journal of virology* 75:6719–6728.

Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Heinz FX, Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Messner P, Heinz FX. 2004. Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles. *Journal of virology* 78:8078–8084.

Kofler RM, Hoenninger VM, Thurner C, Mandl CW, Kofler RM, Hoenninger VM, Thurner C, Mandl CW. 2006. Functional Analysis of the Tick-Borne Encephalitis Virus Cyclization Elements Indicates Major Differences between Flaviviruses Functional Analysis of the Tick-Borne Encephalitis Virus Cyclization Elements Indicates Major Differences between Mosquito-Borne. *Journal of Virology* 80:4099–4113.

Konishi E, Mason PW. 1993. Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein . Proper Maturation of the Japanese Encephalitis Virus Envelope Glycoprotein Requires Cosynthesis with the Premembrane Protein. *Journal of Virology* 67:3–7.

Koonin EV, Dolja VV. 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28(5):375-430.

Kunz C. 2003. TBE vaccination and the Austrian experience. *Vaccine* 21:S50–S55.

Lehrer AT, Holbrook MR. 2009. Tick-borne encephalitis. In: Barrett AD, Stanberry LR, editors. *Vaccine for biodefense and emerging infectious diseases*. Academic Press, Elsevier Inc 713–34.

Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. 2002. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *Consice Communications* 186:1165–1168.

Lindenbach BD, Rice CM. 1997. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *Journal of virology* 71:9608–17.

Lindenbach BD, Rice CM, 1999. Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function. *Journal of Virology* 73:4611–4621.

Lindenbach BD, Rice CM. 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Advanced Virus Research* 59:23-61.

Lai CJ, Pethel M, Jan LR, Kawano H, Cahour A, Falgout B. 1994. Processing of dengue type 4 and other flavivirus nonstructural proteins. *Archives of Virology, Supplement* (9): 359-68.

Li Y, Counor D, Lu P, Duong V, Yu Y, Deubel V. 2012. Protective immunity to Japanese encephalitis virus associated with anti-NS1 antibodies in a mouse model. *Virology journal* 9:135–148.

Lindenbach BD, Rice CM. 2001. Molecular biology of flaviviruses. *Advance in Virus research* 59:23-61.

Lobigs M. 1993. Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3. *PNAS* 90:6218–6222.

Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. 2002. Folding and Dimerization of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins prM and E in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Virology* 76:5480–5491.

Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. 2004. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *PNAS* 101:3414–3419.

Maeda A, Maeda J. 2013. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 195:33–40.

Mackenzie JM, Khromykh a, Jones MK, Westaway EG. 1998. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* 245:203–15.

Mandl CW, Heinz FX, Stöckl E, Kunz C. 1989. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology* 173(1):291-301.

Mandl CW, Kroschewski H, Allison SL, Kofler R, Holzmann H, Meixner T, Heinz FX, 2001. Adaptation of Tick-Borne Encephalitis Virus to BHK-21 Cells Results in the Formation of Multiple Heparan Sulfate Binding Sites in the Envelope Protein and Attenuation In Vivo. *Journal of Virology* 75:5627–5637.

Mandl CW. 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus research* 111:161–74.

Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks a R, Solomon T. 2009. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *The Journal of general virology* 90:1781–94.

Markoff L. 2003. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Advanced Virus Research* 59:177-228.

Melian EB, Hinzman E, Nagasaki T, Firth AE, Wills NM, Nouwens AS, Blitvich BJ, Leung J, Funk A, Atkins JF, Hall R, Khromykh A a. 2010. NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness. *Journal of virology* 84:1641–7.

Miller S, Sparacio S, Bartenschlager R. 2006. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *The Journal of biological chemistry* 281:8854–63.

Miller N. 2010. Recent progress in dengue vaccine research and development. *Current Opinion in Molecular Theory* 12(1):31-8.

Monath TP, Cetron MS, Teuwen DE. 2008. Yellow fever vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*. Saunders, Elsevier 959–1055.

Monath TP, Fowler E, Johnson CT, Balser J, Morin MJ, Sisti M, et al. 2011. An inactivated cell-culture vaccine against yellow fever. *New England Journal of Medicine* 364(14):1326–33.

Muller D a, Young PR. 2013. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral research* 98:192–208.

Muñoz-jordán JL, Laurent-rolle M, Martínez-sobrido L, Ashok M, Ian W, Mun JL. 2005. Inhibition of Alpha / Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. *Journal of Virology* 79:8004–8013.

Murphy FA. Togavirus morphology and morphogenesis. In: Schlesinger RW, ed. *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*. New York: Academic Press; 1980: 241-316.

Muller DA, Landsberg MJ, Bletchly C, Rothnagel R, Waddington L, Hankamer B, Young PR. 2012. Structure of the dengue virus glycoprotein non-structural protein 1 by electron microscopy and single-particle analysis. *The Journal of general virology* 93:771–9.

Muylaert IR, Chambers TJ, Galler R, Rice CM. 1996. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology* 222:159–68.

Muylaert IR, Galler R, Rice CM. 1997. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *Journal of virology* 71:291–8.

Post, P.R., Carvalho, R., Galler, R. 1991. Glycosylation and secretion of yellow fever virus nonstructural protein NS1. *Virus Research* 18:291–302.

Pryor MJ, Wright PJ. 1993. The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. *Virology* 194(2):769-80.

Pryor MJ, Wright PJ. 1994. Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. *The Journal of general virology* 75 (Pt 5):1183–7.

Romanenko VV, Kovalev SY, Esiunina MS, Ankudinova AV. 2011. Tactics and strategy of vaccine prevention of tick-borne encephalitis in the Sverdlovsk region. In: *TBE: new paradigms in a changing vaccination environment (13th ISW-TBE 2011)*. Vienna: Austria.

Shu P, Chen L, Chang S, Yueh Y, Chow L, Chien L, Chin C, Lin T. 2003. Comparison of Capture Immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific IgG ELISA for Differentiation of Primary and Secondary Dengue Virus Infections. *Clinical and Vaccine Immunology* 10:622–630.

Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W., Walsh, E.E., 1985. Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48. *Journal of Immunology* 135: 2805–2809.

Schlesinger JJ, Brandriss MW, Cropp CB, Monath TP. 1986. Protection against Yellow Fever in Monkeys by Immunization with Yellow Fever Virus Nonstructural Protein NS1. *Journal of Virology* 60(3):1153-1155.

Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX, Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. 1997. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin . Proteolytic Activation of Tick-Borne Encephalitis Virus by Furin. *Journal of Virology* 71:8475–8481.

Stiasny K, Allison SL, Marchler-bauer A, Kunz C. 1996. Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. Structural Requirements for Low-pH-Induced Rearrangements in the Envelope Glycoprotein of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Journal of Virology* 70:8142–8147.

Süss J. 2007. Tick-Borne Encephalitis in Europe and Beyond - the Epidemiological Situation as of 2007. *Eurosurveillance* 13:2–9.

Turner C. 2004. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *Journal of General Virology* 85:1113–1124.

Wallis TP, Huang C-Y, Nimkar SB, Young PR, Gorman JJ. 2004. Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein. *The Journal of biological chemistry* 279:20729–41.

Wallner G, Mandl WC, Kunz C. 1995. The Flavivirus 3'-Noncoding Region: Extensive Size Heterogeneity Independent of Evolutionary Relationship among Strains of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Virology* 213:169-178.

Webster DP, Farrar J, Rowland-Jones S. 2009. Progress towards a dengue vaccine. *Lancet Infect Diseases* (9)11:678–87

Warrener P, Tamura JK, Collett MS, Watkins W, Road M. 1993. RNA-Stimulated NTPase Activity Associated with Yellow Fever Virus NS3 Protein Expressed in Bacteria. *Journal of Virology* 67:989–996.

Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh a a. 1997. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *Journal of virology* 71:6650–61.

Yamshchikov VF, Compans RW. 1994. Processing of the intracellular form of the west protease : an in vitro study . Processing of the Intracellular Form of the West Nile Virus Capsid Protein by the Viral NS2B-NS3 Protease : an In Vitro Study. *Journal of Virology* 68:5765–5771.

Yon C, Teramoto T, Mueller N, Phelan J, Ganesh VK, Murthy KHM, Padmanabhan R. 2005. Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 280:27412–9.

Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W, Young PR, Hilditch PA, Bletchly C. 2000. An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 38:1053–1057.

Zhou JM, Yun-xia Tang, Dan-yun Fang, Jing-jiao Zhou, Yu Liang, Hui-yu Guo LJ. 2006. Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length. *Virus Genes* 33:27-32.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV):
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>