

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

**Kultivace viru KE *in vivo* v přítomnosti inhibitoru glykosylace: vliv na nukleotidovou sekvenci genů virových proteinů.**

**Karolína Šustrová**

Školitel : Prof. RNDr Libor Grubhoffer, CSc.

Školitel specialista : Mgr. Ján Štěrba

České Budějovice

2008

## **Bakalářská práce**

Šustrová, K., 2008. Kultivace viru KE *in vivo* v přítomnosti inhibitoru glykosylace: vliv na nukleotidovou sekvenci genů virových proteinů. [Cultivation of tick-borne encephalitis virus in the presence of inhibitor of glycosylation: its effect on nucleotide sequence of genes encoding viral proteins.] Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 33 pp.

### **Annotation:**

In this work I compared nucleotide sequences of virus genes and the resulting aminoacid sequences of viral proteins of TBE virus variant Hypr3TM with the parental virus Hypr50/CB. This comparison serves for identification of nucleotide/aminoacid substitutions resulting from virus replication in an environment with inhibited protein glycosylation. I identified four nucleotide substitutions; three of them caused also changes in amino acid sequence. When compared to a low-passaged variant Hypr5, three of the nucleotide substitutions were identical with this variant. One amino acid substitution is unique for variant Hypr3TM. This substitution caused changes in electrostatic potential of receptor domain of protein E and thus can affect the protein-protein interactions within homodimers and homotrimers at the surface of the protein and the interaction of the E protein with host-cell receptors for the TBE virus.

Projekt byl finančně podporován Výzkumným záměrem MSM 6007665801, grantem Grantové agentury ČR 524/06/1479 (řešitel L. Grubhoffer), výzkumným centrem LC 06009 MŠMT (řešitel L. Grubhoffer) a grantem Grantové agentury Jihočeské univerzity 04-GAJU-45 (řešitel J. Štěrba).

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, Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem tuto, bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích,

.....

## **PODĚKOVÁNÍ:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mému školiteli Prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc., za to že mi umožnil pracovat na tomto velmi zajímavém tématu. Dále bych chtěla poděkovat především mému školiteli-specialistovi Mgr. Jánovi Štěrbovi za velkou trpělivost, odborné rady a připomínky a také čas, který mé práci věnoval. Vděčné poděkování patří i RNDr. Danielu Růžkovi za přípravu viru Hypr3TM.

Mé poděkování patří rovněž celému kolektivu laboratoře profesora Grubhoffera za příjemné pracovní prostředí.

Zvláštní poděkování patří mým rodičům, za možnost studovat, přátelům za psychickou podporu a mému příteli Františku Farkovi za pochopení a trpělivost.

# OBSAH:

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Flaviviry.....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Genom flavivirů .....	3
2.1.2 Translace a vznik polyproteinu .....	3
2.1.3 Charakterizace jednotlivých proteinů .....	4
2.1.4 Struktura virových a subvirových částic .....	8
2.1.5 Replikační cyklus flavivirů .....	9
<b>2.2. Glykosylace virových proteinů .....</b>	<b>10</b>
2.2.1 N-glykosylované proteiny flavivirů .....	13
2.2.2 Vstup viru do buňky pomocí mannosového receptoru.....	13
<b>2.3 Pasážování .....</b>	<b>14</b>
<b>3. CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>16</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Použitý materiál a metody .....</b>	<b>17</b>
4.1.1 Materiál .....	17
4.1.2 Metody .....	18
4.1.2.1 Izolace RNA.....	18
4.1.2.2 Reversní transkripce (RT-PCR) .....	18
4.1.2.3 PCR .....	18
4.1.2.4 Agarózová elektroforéza .....	19
4.1.2.5 Purifikace PCR produktu z gelu.....	19
4.1.2.6 Sekvenování DNA .....	19
4.1.2.7 3D modely proteinu E.....	20
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>22</b>
5.1 Izolace RNA a syntéza cDNA.....	22
5.2 PCR.....	22
5.3 Sekvenční analýza .....	22
<b>6. DISKUSE.....</b>	<b>26</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>29</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>30</b>
<b>9. SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>36</b>
<b>10. PŘÍLOHA .....</b>	<b>37</b>

# 1. ÚVOD

Během našeho života jsme vystaveni milionům patogenů, mezi které patří i viry. Viry jsou z chemického hlediska velmi jednoduché částice neschopné samostatné reprodukce. Zpravidla se skládají z nukleové kyseliny obalené proteinem a některé jsou obalené membránou odvozenou od hostitelské buňky. Z hlediska reprodukce jsou viry závislé na hostiteli a využívají jeho buněčné biochemické pochody, jako je replikace, transkripce, translace, ale i glykosylace. Jestliže se virus replikuje ve svém přirozeném hostiteli nijak mu neškodí a neomezuje ho. Pokud se však stane hostitelem náhodný organismus, většinou ho rozmnožování viru více či méně postihne a často je taková nákaza pro tento organismus smrtelná. Není tomu jinak ani u viru klíšťové encefalitidy (KE), jehož přirozeným hostitelem a tedy i přenašečem je klíště *Ixodes ricinus* nebo *I. persulcatus*. Ekologie viru KE je přímo závislá na těchto klíšťatech. Závisí na nich místa výskytu KE i období v roce po která hrozí riziko nákazy. Klíště se virem KE může nakazit sáním na již infikované myši a naopak. Člověk nemá pro klíště téměř žádný ekologický význam, jedná se pouze o náhodného hostitele, proto je také pro člověka infekce tímto virem velmi nebezpečná, zpravidla způsobuje horečku a může způsobit i vážný zápal mozkových blan.

Vzhledem k tomu, že virus KE často mění hostitele, tedy je přenášen z klíštěte na savce a naopak, musí být schopen replikace v tak rozdílných organismech a tudíž musí být schopen jisté genetické variability. V mé práci se budu zabývat charakteristikou změn v nukleotidové sekvenci virových genů a aminokyselinové sekvenci proteinů viru KE vlivem adaptace viru KE kmene Hypr, varianty Hypr50/CB na prostředí bez glykosylace způsobené přítomností inhibitoru glykosylace, tunikamycinu.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Flaviviry

Flaviviry jsou malé obalené RNA viry s jednovláknovou RNA pozitivní polarity. Rod Flavivirus je zástupcem čeledi *Flaviviridae* a čítá téměř 80 virů, z nichž je asi 50% lidskými či zvířecími patogeny. Většina z nich je přenášena členovci, na obratlovce můžou být přeneseny chronicky infikovanými komáry nebo klíšťaty. Avšak z hlodavců a netopýrů byli izolovány i viry přenášené dosud neznámými hmyzími vektory (Calisher a Gould, 2003). Mezi viry přenášené komáry se řadí zejména virus žluté zimnice, virus dengue, virus japonské encefalitidy a virus západního nilu. Hlavním zástupcem virů přenášených klíšťaty je virus klíšťové encefalitidy (KE, TBEV – Tick-borne encephalitis virus), který se dále dělí, podle geografického původu a antigenních determinant, na tři subtypy a to na Evropský subtyp, jehož hlavním vektorem je *Ixodes ricinus*, subtyp Dálný východ a Sibiřský subtyp, jejichž hlavním vektorem je *I. persulcatus*. Nejvýznamnějším představitelem Evropského subtypu je kmen Neudoerfl izolovaný v Rakousku, dalším kmenem je více virulentní Hypr nebo Kumlinge (Haglund a kol., 2003). Předním představitelem subtypu Dálný východ je kmen Sofijin izolovaný v Primorskem (Hayasaka a kol., 2001). Hlavním představitelem Sibiřského subtypu je kmen Vasilchenko izolovaný v Novosibirsku (Hayasaka a kol., 2001).

Virus KE je významným lidským patogenem, jež způsobuje dvoufázové horečnaté onemocnění. První fáze přichází 3. až 7. den po infekci a projevuje se necharakteristickou horečkou, bolestmi hlavy, bolestmi svalů a většinou trvá 5 až 7 dní. Následuje týden bez příznaků a poté se u 20 až 30% infikovaných rozvine druhá fáze nemoci, která postihne centrální nervovou soustavu. V této fázi pacienti trpí závažnou meningitidou nebo meningoencefalitidou (Gritsun a kol., 2002).

Dalšími klíšťaty přenášenými viry, velmi příbuznými TBEV, jsou virus Louping ill a virus Langat, které stejně jako TBEV způsobují neurologické potíže u savců, ale pro člověka nejsou nebezpečné (Mandl a kol., 2005). Flaviviry lze dále rozdělit do 8 antigenních komplexů na bázi zkřížené reaktivity v neutralizačních reakcích (Calisher a kol., 1989).

### **2.1.1. Genom flavivirů**

Genom flavivirů je tvořen nesegmentovanou RNA pozitivní polarity o délce přibližně 11 kb. Nejvýznamnějším rysem genomu flavivirů je přítomnost jediného otevřeného čtecího rámce (ORF – open reading frame ) o velikosti asi 10 kb, což je téměř 90% genomu. Kóduje 3386 – 3433 aminokyselin (McMinn, 1997). Na obou koncích ORF jsou netranslatované oblasti (UTR – untranslated region). 5'UTR může nést čepičku typu I, která je 95 – 132 nt dlouhá. Začíná konservovaným dinukleotidem AG a obsahuje konservované elementy, které jsou důležité pro vytvoření sekundární struktury (Rice, 1996).

Sekundární a terciární struktura virové RNA má nezbytnou regulační funkci během translace, RNA replikace i při kompletování nových virových částic. Nukleotidová sekvence 5'UTR je konservovaná u členů daného antigenního serokomplexu (Brinton a Dispo, 1988). 3'UTR je ukončena konservovaným dinukleotidem CU a obsahuje i některé další konservované sekvence specifické pro komáry přenášené nebo klíšťaty přenášené viry (Rice a kol., 1986; Rice, 1996). 3'UTR má variabilní délku 114 – 624 nukleotidů. U klíšťaty (Wallner a kol., 1995) i komáry přenášených (Wang a kol., 1996) flavivirů byly zaznamenány delece i opakování sekvencí v této oblasti.

### **2.1.2. Translace a vznik polyproteinu**

Translace ORF flavivirového genomu vede ke vzniku velkého polyproteinového prekursoru, který je ko- a posttranslačně štěpen na jednotlivé proteiny hostitelskými a virovými proteázami. Na N-konci polyproteinu jsou umístěny strukturní proteiny a to kapsidový (C – capsid), membránový protein (M – membrane), který je tvořen ze svého prekursoru (prM), a obalový protein (E – envelope). Na C-konci jsou nestrukturní proteiny (NS – nonstructural) NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5.

Membránová topologie flavivirového polyproteinu je řízena vnitřními signálními sekvencemi a stop-transferovými sekvencemi (Lindenbach a kol., 2001). V jakých proteinech se tyto sekvence v polyproteinu nacházejí a jakou mají funkci je naznačeno v Tabulce 1 a na Obrázku 1.

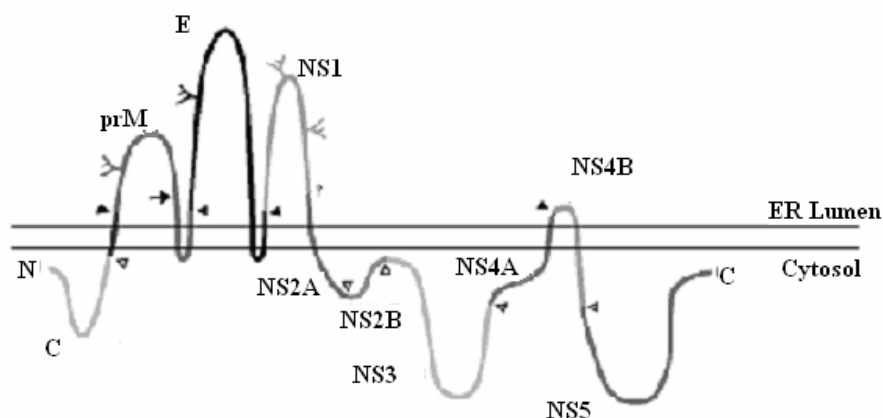


Tab. 1: Přehled membránové topologie polyproteinu flavivirů.

Protein	Lokalizace (cytosol/lumen ER)	Signální sekvence	Stop-transferová sekvence
C	Cytosol	prM	Ne
prM	Transmembránový	E	Ano
E	Transmembránový	NS1	Ano
NS1	ER	Ne	Ne
NS2A	Transmembránový	Ne	Ano
NS2B	Cytosol	Ne	Ne
NS3	Cytosol	Ne	Ne
NS4A	Transmembránový	NS4B	Ne
NS4B	Transmembránový	Ne	Ano
NS5	Cytosol	Ne	Ne

### 2.1.3. Charakterizace jednotlivých proteinů

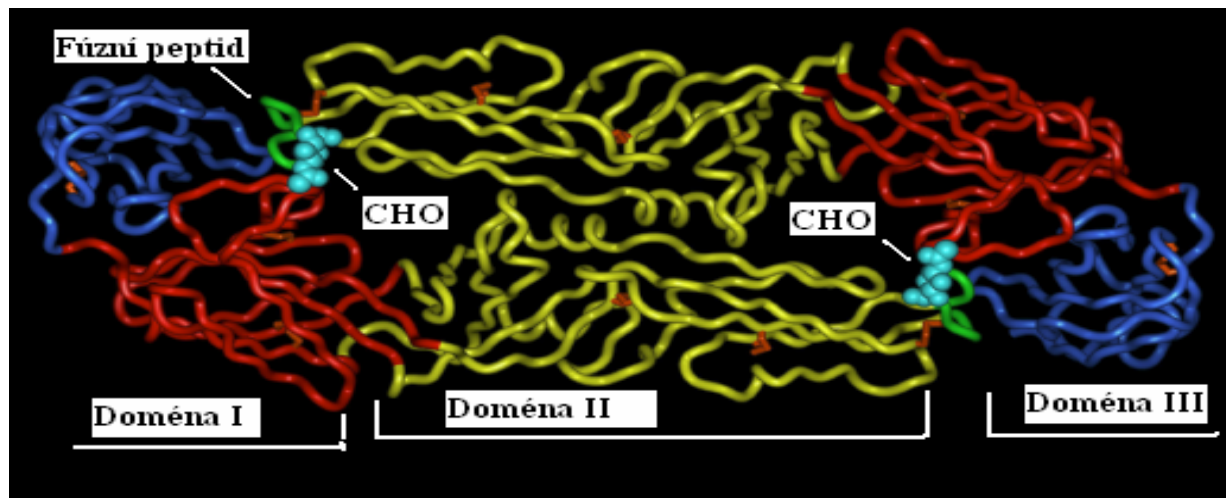
C – kapsidový (capsid) protein je vysoce bazický a spolu s genomovou RNA vytváří nukleokapsidu. Má velikost 11 kDa (Trent, 1977) a je bohatý na  $\alpha$ -helixové struktury, včetně centrální hydrofobní domény (Kofler a kol., 2002). Basické aminokyselinové zbytky na C- a N- konci umožňují specificky vázat RNA (Khromykh a Westaway, 1996). Tyto zbytky jsou odděleny krátkými hydrofóbními doménami umožňujícími interakci s membránou (Markoff a kol., 1997). C-konec proteinu C je membránovou kotvou, která je signální sekvencí pro lokalizaci prM proteinu do lumen endoplasmatického retikula (ER) (Nowak a kol., 1989). Odštěpení tohoto transmembránového segmentu dává vznik zralému proteinu C (Stosks a Lobigs, 1995).



Obrázek 1: Flavivirový polyprotein a jeho membránová topologie (Lindenbach a kol., 2001).

prM/M – membránový (membrane) protein má velikost 8 kDa. Je syntetizován jako glykosylovaný prekursor, protein prM (velikost 26 kDa). V oblasti N-konce „pr“ jsou 1 – 3 N-glykosylovaná místa (Chambers a kol., 1990) a 6 konservovaných cysteinových zbytků spojených disulfidickými můstky (Nowak a Wengler, 1987). Protein prM je důležitý pro správné sbalení proteinu E; tyto proteiny ihned po jejich syntéze tvoří heterodimerické komplexy, prM tedy slouží jako chaperon (Konishi a Mason, 1993; Lorenz a kol., 2002). K přeměně nezralých virových částic na zralé viriony dochází v Golgiho aparátu štěpením „prM“ v membráně virionů na proteiny „pr“ a „M“ pomocí hostitelské proteázy (Stadler a kol., 1997). V membráně zralých virionů se pak nachází jen protein M (Murray a kol., 1993).

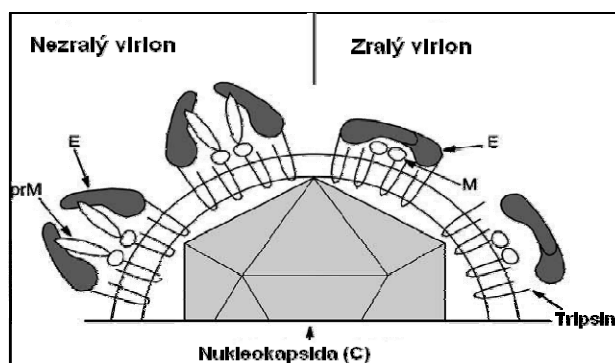
E – obalový (envelope) protein, má velikost 53 kDa, tvoří homodimery. Je hlavním povrchovým proteinem virionu, zprostředkovává vazbu na membránu hostitelské buňky a membránovou fúzi. Obsahuje 12 konservovaných cysteinů, které tvoří disulfidické můstky (Nowak a Wengler, 1987). Má podlouhlou strukturu bohatou na  $\beta$ -listy a je orientovaný paralelně s membránovým obalem virionu. Každá dílčí jednotka E proteinu je složena ze tří domén (Rey a kol., 1995).



Obrázek 2: Struktura E proteinu viru KE. CHO: postranní cukerný řetězec (Heinz, 2003).

Doména I má strukturu  $\beta$ -soudku. Na svém konci nese dva disulfidické můstky a jeden cukerný řetězec vázaný N-glykosidickou vazbou; doména II by mohla být považována za podjednotku domény I, protože je složena ze dvou nezávislých, nesouvislých dlouhých smyček, které vyčnívají z domény I. Doména II je tvořena převážně z  $\beta$ -listů, kromě dvou krátkých  $\alpha$ -helixů. Jedna ze smyček je stabilizována třemi

disulfidickými můstky. Struktura domény III je podobná konstantní imunoglobulinové doméně. Obsahuje jeden disulfidický můstek a s doménou I je spojena 15 aminokyselinami. Díky své imunoglobulinové struktuře se doména III váže na buněčný receptor (Heinz, 2003).



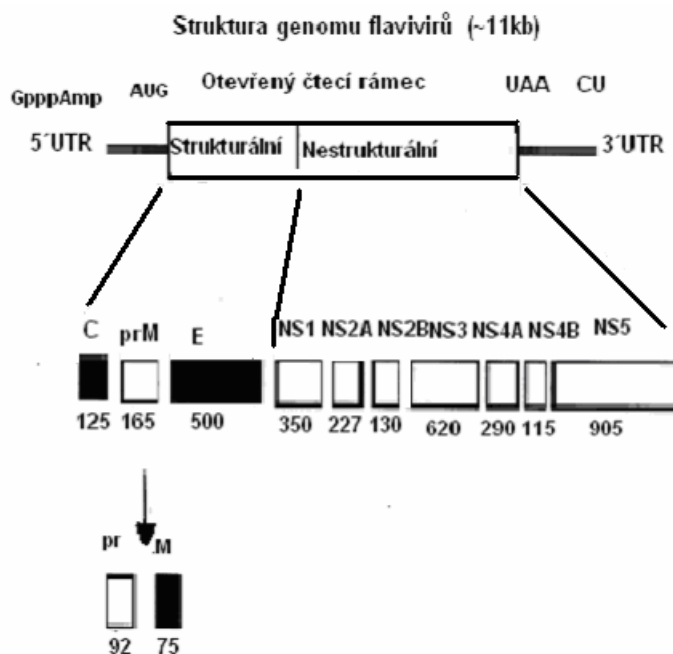
Obrázek 3: Schéma uspořádání proteinů nezralého a zralého virionu (Heinz, 2003).

NS1 – je protein o velikosti 46 kDa a obsahuje 2 glykosylační místa na Asn<sub>130</sub> a Asn<sub>208</sub> (Muyalert, 1996). Během infekce jej můžeme nalézt uvnitř infikovaných buněk, ale i na jejich povrchu a savčími buňkami je pomalu vylučován (Mason, 1989; Post a kol., 1991). Následně se proti NS1 tvoří velmi silná humorální odpověď (Falgout a kol., 1990). Od E proteinu je oddělen v ER hostitelskou proteázou (Falgout a Markoff, 1995). Ve struktuře obsahuje 12 konservovaných cysteinů, které tvoří disulfidické můstky (Lee a kol., 1989). NS1 tvoří vysoce stabilní homodimery, je silně hydrofilní a neobsahuje transmembránové domény (Winkler a kol., 1989). Muylaert a kol. pomocí imunofluorescence zjistili, že NS1 je koncentrován v oblasti kolem jádra. To svědčí o tom, že NS1 protein se zřejmě podílí na reorganizaci buněčné membrány čímž napomáhá vytvoření aktivního replikačního komplexu (Muyalert a kol., 1996). Dimerizace NS1 zvyšuje hydrofobicitu a schopnost vázat se k buněčné membráně (Winkler a kol., 1989). Během infekce je NS1 vylučován do extracelulárního prostoru, váže se k buněčným povrchům a v séru infikovaného pacienta dosahuje vysokého titru. Má schopnost oslabit rozpoznávání infikovaných buněk komplementem, tak že se naváže k regulačnímu proteinu komplementu H a posílí jeho aktivitu. Tím oslabí aktivitu komplementu, sníží vazání C3b fragmentu a C5b-9 membránového komplexu na buněčný povrch (Chung a kol., 2006).

NS2A – je relativně malý (23 kDa) hydrofóbní transmembránový protein. Ke štěpení NS2A/B dochází v cytoplasmě virovou proteázou (Falgout a Markoff, 1995).

Alternativním štěpením může být tvořena i kratší forma zkrácená na C-konci, tzv. NS2A $\alpha$  (20 kDa) (Nestorowiez a kol., 1994). NS2A je součástí replikačního komplexu a inhibuje produkci interferonů. Je významný pro uvolňování virových částic z buňky (Leung a kol., 2008). Má také význam při přemísťování RNA templátů do replikačního komplexu vázaného v membráně (Mackenzie a kol., 1998).

NS2B – je malý protein o velikosti 14 kDa. Tvoří komplex s proteinem NS3 a je jeho nezbytným kofaktorem pro proteázovou aktivitu (Chambers a kol., 1993). Interakci s proteinem NS3 zprostředkovává jeho centrální hydrofilní oblast (Chambers a kol., 1993; Falgout a kol., 1993), která je obklopena hydrofóbními oblastmi. Tyto hydrofobní oblasti pak napomáhají ukotvení proteázového komplexu v membráně (Clum a kol., 1997).



Obrázek 4: RNA genom flaviviru. Genom je tvořen jedním otevřeným čtecím rámcem (ORF – open reading frame), začíná kodonem AUG a končí kodonem UAA. ORF je na 5'a 3'konci ukončen netranslatovanou oblastí (UTR – untranslated region). 5'konec nese čepičku. 3'konec nese konservovaný dinukleotid CU (McMinn, 1997).

NS3 – je velký (70 kDa) protein s proteázovou, helikázovou a RNA-trifosfatázovou aktivitou. Oblast N-konce vykazuje významnou homologii s buněčnou serinovou proteázou (Bazan a Fletterick, 1989). Nezbytným kofaktorem pro tuto virovou proteázu je protein NS2B. NS2B/NS3 proteáza je zodpovědná za štěpení virového polyproteinu v cytoplasmě. Štěpící místa pro tuto virovou proteázu se nacházejí v polyproteinovém řetězci

mezi proteiny NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A a NS4B/NS5 (Lindenbach a kol., 2001). Oblast C-konce NS3 nese důležitou homologii s rodinou RNA helikázových proteinů (Gorbalenya a kol., 1989). V oblasti C-konce NS3 je také kódován enzym RNA-trifosfatáza; tento enzym se podílí na defosforylaci 5' konce genomové RNA před přidáním čepičky (Wengler, 1993).

NS4A – je malý, hydrofóbní protein o velikosti 16 kDa. C-konec NS4A má funkci signální sekvence pro přemístění NS4B do lumen ER (Preugschat a Strauss, 1991). Funkcí NS4A je pravděpodobně kotvit části replikačního komplexu k buněčné membráně (Mackenzie a kol., 1998).

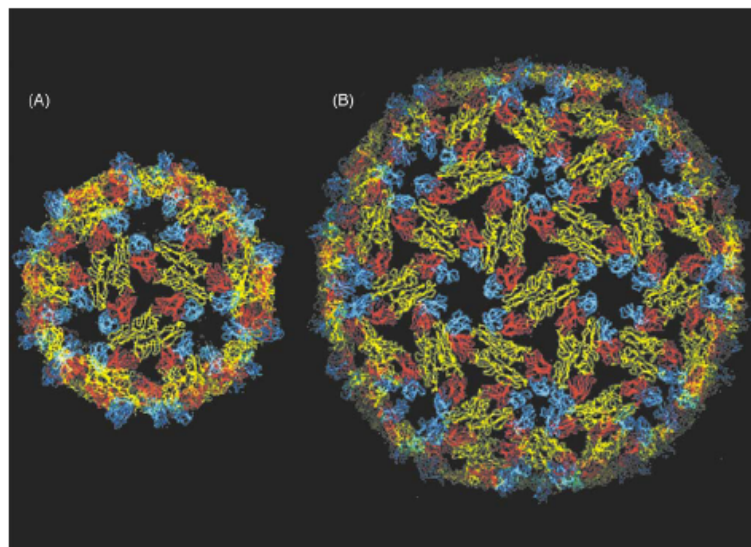
NS4B – je hydrofóbní, transmembránový protein o velikosti 27 kDa. V infikovaných buňkách se koncentruje v místě replikace RNA a v jádře, jeho přesný význam však není dosud znám (Westaway a kol., 1997).

NS5 – je největším (velikost 103 kDa) a nejvíce konservovaným proteinem flavivirů. Má funkci virové RNA polymerázy. Obsahuje Gly-Asp-Asp motiv, běžný u RNA-dependentních RNA polymeráz dalších RNA virů pozitivní polaritě (Rice a kol., 1985). Oblast N-konce je homologní s S-adenosyl-methionin-dependentními methyltransferasami, tato doména se tedy podílí na metylaci 5' čepičky (Koonin, 1993).

#### **2.1.4. Struktura virových a subvirových částic**

Flaviviry jsou sférické částice o průměru 40 až 60 nm. Jejich virion se skládá z ikozaedrální nukleokapsidy obklopené lipidovou dvouvrstvou odvozenou z hostitelské buňky. Povrch virionu je hladký, bez výběžků. Hlavní součástí povrchu virionu jsou dimery proteinu E, které tvoří síť hustě uspořádaných podjednotek (Heinz a Kunz, 1980).

Elektronová mikroskopie umožňuje získat informace o struktuře povrchu rekombinantních subvirových částic (RSP – recombinant subviral particle, anebo virus-like particles – VLP) (Ferlenghi a kol., 2001; Goto a kol., 2005). Tyto částice neobsahují kapsidu a vznikají koexpresí dvou membránových proteinů prM a E (Allison a kol., 1995 b). Stejně částice jsou tvořeny v buňkách infikovaných flavivirem jako vedlejší produkt (Lindenbach a Rice, 2001). RSP jsou 30 nm velké, jsou tedy menší než kompletní virion. Tyto částice se v infikované buňce objevují dříve než nezralé viriony. Jejich intracelulární transport, štěpení prM proteinu při dozrávání a následné uvolňování z buňky se velice podobá tvorbě plnohodnotného virionu (Schalich a kol., 1996).



Obrázek 5: (A) Uspořádání dimerů proteinu E v rekombinantních subvirových částicích (RSP) TBEV určené kryo-elektronmikroskopickou rekonstrukcí. (B) Uspořádání E proteinových dimerů ve zralém TBE virionu založené na předpokladu že kontakty mezi dimery jsou stejné jako ty u RSP, ukázané na obr. A (Ferlenghi a kol., 2001).

Povrch RSP je tvořen 30 dimery proteinu E v ikozaedrálně symetrické síti. Mezi jednotlivými podjednotkami jsou specifická místa styku, kde v doméně II je smyčka a mezi jednotkami I a III je žlábek. Tyto specifické interakce mezi dvěma molekulami proteinu E zřejmě umožňují vznik částic s ikozaedrální symetrií (Ferlenghi a kol., 2001). RSP si dokonale zachovávají imunogenitu (Heinz a kol., 1995), jejich reaktivita s monoklonálními neutralizačními protilátkami je stejná jako u plnohodnotných virionů a vykazují stejné specifické funkční aktivity v hemaglutinaci (Schalich a kol., 1996; Corver a kol., 2000).

### 2.1.5. Replikační cyklus flavivirů

Viriony se na receptor hostitelské membrány váží pomocí obalového proteinu E. Není přesně známo zda se flaviviry na vnímavých buňkách váží na jeden či více receptorů. Bylo také zjištěno, že receptorové molekuly pro flaviviry jsou u obratlovců a bezobratlých rozdílné. Schopnost flavivirů využít rozdílné buněčné receptory jim pravděpodobně skýtá velkou rozmanitost hostitelských organismů (Kopecký a kol., 1999). Jedním z významnějších buněčných receptorů je glykosaminoglykan, přítomný na mnoha typech buněk jak u obratlovců tak i u klíšťat (Kroschewski a kol., 2003).

Po vazbě virionu na receptor dojde k jeho endocytóze a posléze k hromadění virionů v endosomech (Chu a Ng, 2004). Nízké pH uvnitř endosomů indukuje reorganizaci virového proteinu E z dimerů na trimery a k jeho „vztyčení“ (Allison a kol., 1995 a), čímž zasáhne do membrány endosomu a dojde k její fúzi s virovou membránou (Heinz a Allison, 2003). To následně vede k uvolnění nukleokapsidy do cytoplasmy hostitelské buňky. Zde dojde k uvolnění virové RNA (pozitivní polarity, sloužící jako mRNA) a následuje její translace do virového polyproteinu. Z polyproteinu jsou pak pomocí hostitelských proteáz a virové proteázy NS2B/NS3 štěpeny jednotlivé proteiny. Zároveň se replikuje virová RNA – vznikají negativní řetězce RNA, které slouží jako templát pro replikaci RNA.

Během syntézy virového polyproteinu jsou obalové proteiny prM a E translokovány do lumen ER. Na cytoplasmatické straně ER dojde ke vzniku nukleokapsidy interakcí virové RNA s proteinem C. Tento proces probíhá zároveň se vznikem virového obalu, který je získán pučením nukleokapsidy do lumen ER. Vznikne neinfekční nezralý virion s proteiny prM a E v heterodimerickém seskupení; prM brání proteinu E vytvořit správnou konfiguraci, která by byla schopná předčasně se spojit s jinou membránou a fúzovat (Elshuber a kol., 2003). Během transportu hostitelským sekrečním systémem v transportních váčcích dochází k dodatečnému upravování virového obalu. Viriony se stávají zralými po štěpení proteinu prM buněčným furinem (konvertáza subtilisinového typu) v kyselých váčcích Golgiho aparátu (Stadler a kol., 1997). Tímto štěpením se uvolňuje část pr, v membráně virionu zůstávají proteiny M a dochází k reorganizaci proteinů E do formy homodimerů, které jsou schopné membránové fúze. Zralé (infekční) viriony jsou uvolněny z hostitelské buňky fúzí transportního váčku s buněčnou cytoplasmatickou membránou.

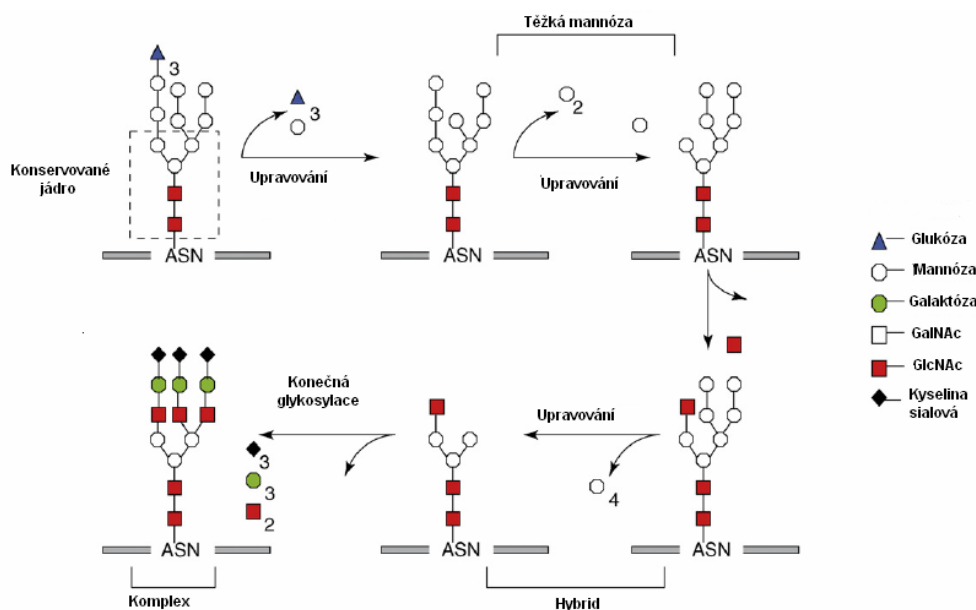
## **2.2. Glykosylace virových proteinů**

Správné sbalení proteinů do jejich funkční nativní struktury není pokaždé spontánní, ale záleží také na přítomnosti různých faktorů, enzymů a molekulárních chaperonů. Takovým místem v buňce, kde se tyto enzymy a chaperony nacházejí, je endoplasmatické retikulum (Hounsell, 1998). Dochází zde k četným ko- a post-translačním úpravám, jako je tvorba disulfidických můstků nebo připojení oligosacharidového řetězce, tedy glykosylace. ER zajišťuje kontrolu kvality, kdy mohou být uvolněny jen proteiny se

správnou strukturou. Virus využívá pro glykosylaci svých proteinů enzymatické mechanismy hostitelské buňky (Hurtley a Helenius, 1989).

Virové obalové proteiny se tvoří na ribosomech drsného ER a již v průběhu translace vstupují do ER. Translokace je zajištěna podobnými signálními sekvencemi jako u buněčných glykoproteinů (Martoligo a Dobberstein, 1998). Sbalení virových glykoproteinů je kotranslační proces a zahrnuje vznik sekundární struktury a tvorbu jednotlivých disulfidických můstků (Hurtley a Helenius, 1989).

Eukaryotické proteiny jsou glykosylovány v lumen ER a Golgiho aparátu. K proteinu, který obsahuje příslušné glykosylační místo, se v jednom reakčním kroku připojí blok 14 cukrů. Tento oligosacharid, který je původně vázán k izoprenoidu zvanému dolichol, je přenesen na aminoskupinu (-NH<sub>2</sub>) asparaginového postranního řetězce proteinu. Ke kterému asparaginovému zbytku bude oligosacharid připojen určuje jednoduchá sekvence tří aminokyselin z nichž jednou je asparagin (Ser/Thr-Xaa-Asn; Xaa může být jakákoliv aminokyselina kromě prolinu). Oligosacharidové postranní řetězce připojené v proteinu k aminoskupině asparaginu se označují jako N-vázané a jsou u většiny organismů nejběžnějším spojením v glykoproteinech (Moens a Vanderleyden, 1997).



Obrázek 6: Schéma typické N-glykosylace u savců (Vigerust a Shepherd, 2007).

Během pohybu glykoproteinu endoplasmatickým retikulem a následně Golgiho aparátem dochází k upravování navázaného oligosacharidu enzymy jako jsou glukosidáza I a II a manosidáza, čímž získává svou konečnou strukturu (konkrétní úpravy závisí jak na



enzymatickém aparátu buňky, tak na signálních sekvencích proteinu a jeho struktuře) (Vigerust a Shepherd, 2007).

Glykosylace má přímý efekt na sbalení proteinu a na jeho konečnou strukturu. V místě, kde je protein glykosylován, ovlivňuje jeho strukturní vlastnosti a pomáhá větší kompaktnosti proteinu. Avšak některé proteiny jsou schopné se sbalit do správné konformace i bez posttranslačních modifikací a N-glykany většinou mohou být ze zralých proteinů odstraněny bez změny jejich struktury (Helenius a Aebi, 2001). Jednou z nejdůležitějších rolí glykosylace je interakce nově syntetizovaného glykoproteinu s chaperony kalnexinem a kalretikulinem. Kalnexin a jeho rozpustná forma kalretikulin jsou součástí specifického glykoproteinového chaperonového systému, nazývaného kalnexin-kalretikulinový cyklus. Tento cyklus hraje významnou roli při sbalení a kontrole kvality nově vznikajících glykoproteinů v lumen ER (Trombetta a Helenius, 1998).

V eukaryotických i prokaryotických systémech plní glykosylace proteinů nejrůznější funkce, stabilizuje proteiny, chrání je před proteolytickými aktivitami, zajišťuje povrchové a vnitrobuněčné rozlišení, interakci s jinými molekulami a buňkami atd. (Moens a Vanderleyden, 1997).

Glykosylaci proteinů lze selektivně zablokovat; N-glykosylaci například antibiotikem tunikamycinem, obsahujícím glukosamin. Specificky inhibuje glykosylace asparaginových zbytků glykoproteinů zprostředkované dolichol pyrofosfátem – zabraňuje tedy N-glykosylaci proteinů (Olden a kol., 1979). Toho lze ve virologii využít při studiu významu glykosylace pro viry. Morrison využil vlastnosti tunikamycinu při studiu maturace glykoproteinu u viru vesikulární stomatitidy. Tunikamycin neměl žádný efekt na navázání glykoproteinu k vnitrobuněčným membránám nebo na transport proteinu do lumen ER. Zabraňoval ale migraci glykoproteinu přes ER do hladkých vnitrobuněčných membrán (Morrison, 1978). Dalším příkladem praktického využití tunikamycinu je důkaz důležitosti glykosylace u viru Dengue 2 (DEN2). Byly vytvořeny mutanty s jedním nebo žádným glykosylačním místem. Následně bylo potvrzeno, že N-glykosylace proteinu E sice není nezbytná pro replikaci DEN2 viru v komárech, ale N-glykosylace na aminokyselině v pozici 67 je zcela zásadní pro replikaci viru jak v savcích tak i v hmyzích buněčných kulturách *in vitro* (Bryant, 2007).

### **2.2.1. N-glykosylované proteiny flavivirů**

V genomu flavivirů můžeme najít tři proteiny, které ve své aminokyselinové sekvenci obsahují potenciální N-glykosylační místa. Dva z nich jsou membránové, prM a E. Protein prM má jedno N-glykosylované místo, protein E má 0 až 2 N-glykosylovaná místa podle druhu flaviviru. Třetím glykosylovaným proteinem je nestrukturní glykoprotein NS1, se dvěma N-glykosylovanými místy (Chambers a kol., 1990).

Glykan proteinu E viru KE pomnoženého v buňkách kuřecích fibroblastů je komplexního typu na konci s D-galaktosou a s L-fukosou připojenou k prvnímu N-acetyl-D-glukosaminu (Grubhoffer a kol., 1990). Hlavní funkcí glykoproteinu E je navázání virionu na povrch hostitelské buňky a fúze membrán (Lindenbach a kol., 2001). Funkce obalových glykoproteinů prM a E byla studována pomocí VLP (virus-like particles, viru podobné částice), které vznikají během virové infekce a z buňky jsou vylučovány dříve než plnohodnotné virové částice. VLP mají povrchové vlastnosti a fúzní schopnosti shodné s infekčními viry (Goto a kol., 2005). Absence glykosylace na prM nebo E glykoproteinu představuje pro virus sníženou schopnost uvolňovat VLP. Pokud je mutací zablokována glykosylace prM proteinu, dojde ke snížení produkce proteinu E na 60% proti běžnému stavu (Goto a kol., 2005).

Protein E může být u různých flavivirů glykosylován rozdílně. U viru Kunjin nebo viru západního nilu protein E není glykosylován vůbec; naopak E protein viru Dengue má dvě glykosylovaná místa (Chambers a kol., 1990).

Dalším N-glykosylovaným proteinem flavivirů je nestrukturní glykoprotein NS1, který má dvě vysoce konservované glykosylační sekvence (Mason, 1989). NS1 obsahuje epitopy pro obranné protilátky časného typu se schopností vázat komplement (Muylaert a kol., 1996)

### **2.2.2. Vstup viru do buňky pomocí manosového receptoru**

Hlavní cíl infekce pro virus dengue (DEN) představují makrofágy a mononukleární fagocyty. Miller a kol. (2008) zjistili, že makrofágový manosový receptor (MR) váže obalový glykoprotein E všech čtyř sérotypů DEN. MR přes svou cukry rozpoznávající doménu váže protein E produkovaný jak lidskými tak komářími buňkami. Tato vazba může být zablokována deglykosylací obalového glykoproteinu DEN. Infekci lidských makrofágů virem dengue lze též zablokovat anti-MR protilátkami (Miller a kol., 2008).

Manosový receptor je protein skládající se z několika domén. Obsahuje doménu s lektinovou aktivitou, která váže sulfatované cukry a také osm domén rozeznávajících cukry (CRD – carbohydrate recognition domain). V pořadí čtvrtá CRD je specifická pro glykany končící manosou, fukosou a N-acetyl glukosaminem. Po vazbě viru DEN na manosový receptor je tento z povrchu buňky průběžně internalizován klatrinem zprostředkovanou endocytózou, navázané ligandy disociují a receptor je opětovně vrácen na povrch buňky (Taylor a kol., 2005).

Interakce viru s buňkami imunitního systému hostitele je zcela zásadního významu pro virulenci viru a průběh nemoci. Zatímco imunitní odpověď proti virům je popisována jako Th 1, literatura v případě DEN připouští i jinou alternativu. V akutním stadiu infekce virem dengue byly objeveny IgE protilátky charakteristické pro Th 2 odpověď (Miguez-Burbano a kol., 1999). Pro Th 1 odpověď jsou charakteristické cytokiny IL-2 (IL – interleukin) a TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ; faktor transformující růst), zatímco u Th 2 odpovědi se jedná o IL-4 a IL-13 (Miller a kol., 2008). Studium produkce IL-2, IL-13 a cytokinu TGF $\beta$  u pacientů s hemoragickou horečkou dengue ukázalo, že v průběhu nemoci se dominantní Th 1 odpověď hostitele mění na Th 2 odpověď (Chaturvedi a kol., 2000).

Interakce virus-receptor jsou velmi důležité pro pochopení mechanismů vstupu viru do hostitelské buňky. Porozumění procesu patogenese nemoci je nutnou podmínkou pro vývoj bezpečné vakcíny a inhibitorů časně replikace viru (Miller a kol., 2008).

### **2.3. Pasážování**

Proces, při kterém jsou buňky/virus přenášeny do nového kultivačního prostředí se nazývá pasážování. Tato metoda se používá k množení viru, jeho uchování a v neposlední řadě také k jeho adaptaci na pozměněné podmínky. Této adaptace se využívá například při zkoumání vlastností virů, jejich schopnosti přizpůsobit se novým podmínkám a také k vývoji atenuovaných vakcín.

K pasážování lze použít různé typy buněčných kultur/linií. Primární kultury jsou odvozeny přímo z tkání lidí či zvířat. Zachovávají si počet chromozomů jako buňky orgánu či tkáně, ze kterých byly získány. Po implantaci zvířatům nevyvolávají nádorové bujení a lze je proto použít při výrobě vakcín. Sekundární kultury se množí z primárních buněk, jsou jejich druhou pasáží. Diploidní kmeny si zachovávají diploidní karyotyp normálních

buněk a lze je udržovat několik desítek pasáží, postupně však odumírají. V praxi jsou nejpoužívanějšími trvalé dlouhodobě pasážované buněčné linie. Jsou odvozeny od normální nebo nádorové tkáně a mají nepravidelný počet chromosomů. Mají charakter nádorových buněk a dají se prakticky nekonečně pasážovat. Po implantaci vyvolávají nádorové bujení a nesmějí se používat k výrobě vakcín.

Pasážování virů, včetně arbovirů, bylo využito v mnoha studiích. Představovalo základní metodu při studiích schopnosti adaptace viru KE na rozdílné hostitele (klíště vs. savec) (Chunickin a Dzhivianian, 1977; Dzhivianian 1988). Příkladem je opakované pasážování viru KE na klíšťatech *Ixodes ricinus*. Vznikl „oslabený“ virus, který se po subkutánní infekci myši projevoval nízkou neurovirulencí. Ovšem po následném pomnožení viru v savčím hostiteli došlo ke zpětnému posílení virulence pro tohoto hostitele, čím byla prokázána nestabilita varianty adaptované na klíštěcího hostitele (Dzhivianian a spol, 1988). Metodu pasážování rozsáhle použil rovněž Růžek, zabýval se charakterizací atenuovaného termosenzitivního kmene ts263 viru KE. Tento kmen se byl v malé míře replikovat i při nepermissivní teplotě, což vedlo k závěru že vytváří ‘quasispecies’, v rámci kterého je v malé míře přítomna termorezistentní varianta. Tato termorezistentní varianta byla selektována a následně sekvenována. Od parentálního termosenzitivního viru se lišila ve 2 aminokyselinách, které pro něj byly unikátní. U termorezistentní varianty byla také lokalizována delece 218 nukleotidů v úseku 3´nekódující oblasti virového genomu. Kmen ts263 vytvářel v buněčné kultuře PS, odvozené od buněk prasečích ledvin (porcine kidney stable), drobné, špatně rozeznatelné difúzní plaky. Po subkutánní inokulaci laboratorní myši nezpůsobil žádné klinické příznaky onemocnění. Termorezistentní varianta přitom produkovala v buněčné kultuře velké, jasně viditelné plaky a vyznačovala se i vysokou mírou neuroninvasivity (Růžek a kol., 2008).

### **3. CÍLE PRÁCE:**

- sekvenovat vybrané proteiny viru klíšťové encefalitidy, kmene Hypr, varianty Hypr3TM, připravené třemi pasážemi původní varianty Hypr50/CB v buňkách PS za přítomnosti tunikamycinu,
- porovnat nukleotidovou sekvenci genomů variant Hypr50/CB a Hypr3TM,
- porovnat nukleotidovou sekvenci genomů obou studovaných variant s původní variantou Hypr5,
- porovnat aminokyselinové sekvence virových proteinů u všech tří variant.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Materiál a metody

#### 4.1.1. Materiál

##### Označení a složení roztoků:

TE : 10 mM Tris-HCl (pH=8), 1mM EDTA

TAE (50x): 242 g Tris-base, 57,1 ml ledové kyseliny octové, 37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O, pH 8,5, doplněno H<sub>2</sub>O na 1000 ml.

##### Chemikálie:

EDTA (disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové), Tris-HCl, Tris-base, ledová kyselina octová, isopropanol, agaróza, barvivo SYBR Green v 5x koncentrovaném vzorkovém pufru, velikostní marker O'GeneRuler 1kb DNA Ladder, PPP Master Mix (Taq-Purple DNA Polymeráza PCR Master mix s 5mM MgCl<sub>2</sub>; Top-Bio), tunikamycin 0,5 µg/ml.

##### Buňky:

Pro tuto práci byla použita 3. pasáž buněk infikovaných virem klíšťové encefalitidy, kmen Hypr, připravená RNDr. Danielem Růžkem. Jednalo se o buněčnou linii PS odvozenou z buněk prasečí ledviny (porcine kidney stable) kultivovanou v médiu L15 s 3 % roztokem prekolostrálního telecího séra (PTS), 1 % směsí antibiotik a antimykotik a tunikamycinem o koncentraci 0,5 µg/ml (Sigma) při 37 °C.

##### Virus:

Byl použit virus KE, kmen Hypr varianta Hypr3TM. Tato varianta je 3. pasáží kmene Hypr50/CB v PS buňkách kultivovaných v přítomnosti inhibitoru N-glykosylace, antibiotika tunikamycinu.

##### Kity:

*QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen)

*RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* ( Fermentas)

*MiniElute Gel Extraction Kit* (Qiagen)

## 4.1.2. Metody

### 4.1.2.1. Izolace RNA

Pro izolaci RNA jsem použila 140  $\mu$ l buněčné kultury infikované virem KE. Izolaci RNA jsem provedla pomocí kitu *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen) přesně podle firemních instrukcí. Získaná RNA byla uchována při  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 4.1.2.2. Reversní transkripce (RT-PCR)

Pro reversní transkripci jsem použila kit *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas). Postupovala jsem přesně podle firemních instrukcí pro syntézu prvního vlákna cDNA. Získanou cDNA jsem uložila do  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 4.1.2.3. PCR (polymerázová řetězová reakce)

PCR je metoda umožňující mnohonásobnou amplifikaci zvoleného úseku DNA, za použití dvou primerů komplementárních k 3' a 5' koncovým sekvencím daného úseku. Reakční směs kromě DNA templátu a primerů obsahuje také odpovídající pufr, termostabilní DNA polymerázu, deoxynukleosidtrifosfáty a  $\text{MgCl}_2$ . Jako templát pro PCR amplifikaci jsem použila připravenou cDNA.

Postup:

1. Do 0,2 ml tenkostěnné mikrozskumavky jsem napipetovala 1  $\mu$ l cDNA, 10  $\mu$ l směsi PPP Mastermix, po 1  $\mu$ l primerů (0,01mM) a směs jsem doplnila na výsledný objem 20  $\mu$ l deionizovanou vodou.

2. K amplifikaci jsem použila Eppendorf gradient Mastercycler. Reakce probíhala podle následujícího programu: denaturace při  $95^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 min, následoval cyklus o 30 krocích, denaturace při  $95^{\circ}\text{C}$  po dobu 35 s, annealing při teplotách odpovídajících užitým kombinacím primerů (viz. Tab.1) po dobu 35 s, a elongace při  $72^{\circ}\text{C}$  po dobu 35 s. Konečná elongace při teplotě  $72^{\circ}\text{C}$  trvala 5 minut. Po ukončení všech cyklů byla teplota udržována na  $14^{\circ}\text{C}$ .

3. PCR produkt jsem uložila do  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.2.4. Agarózová elektroforéza

Produkty PCR reakce jsem separovala pomocí elektroforézy v 1% agarozovém gelu. Gel byl připraven z agarózy a 1x TAE pufru a rozvařen v mikrovlnné troubě. Po ochlazení na cca 50°C byl nalit do připravené formy s vloženými hřebínky a ponechán přibližně 40 minut tuhnout při pokojové teplotě. Do jamek v připraveném gelu jsem nanasla 20 µl PCR produktu smíchaného s 5x vzorkovým pufrům obsahujícím barvivo SYBR Green. Elektroforéza probíhala při napětí 100 V. Výsledek elektroforézy byl pozorován na přístroji *Visi-Blue™ Transilluminator* při osvětlení světlem o vlnové délce 480 nm. K odhadu velikosti amplifikovaných fragmentů jsem použila velikostní marker O'GeneRuler 1kb DNA Ladder. Velikostně odpovídající úseky jsem vyřízla pomocí skalpelu, tak aby byl co nejmenší podíl přebytečné agarózy. Tyto vzorky jsem vložila do 1,5 ml mikrozkušavky.

#### 4.1.2.5. Purifikace PCR produktu z gelu

Získanou DNA jsem z gelu purifikovala pomocí kitu *MiniElute Gel Extraction Kit* (Qiagen) přesně podle firemních instrukcí. Získanou DNA jsem uložila do -20°C.

#### 4.1.2.6. Sekvenování DNA

Pro sekvenační reakci jsem použila 4 µl DNA o koncentraci 10 ng a 1 µl příslušného primeru (0,01 mM).

##### **Sekvenace:**

Sekvenace byla provedena na přístroji ABI PRISM 3130xl firmy Applied Biosystems v Laboratoři genomiky, společné laboratoři PřF JU a BC AVČR (Biologického centra Akademie věd České republiky).

##### **Analýza sekvencí:**

Získané DNA sekvence byly analyzovány pomocí programu BioEdit (Hall, 1999) a WinGene (Hennig, 1999) a srovnány se sekvencí Hypr50/CB, a sekvencí Hypr 5.



### Charakterizace použitých primerů:

Označení primeru	Polarita	Sekvence (5' → 3')	Annealingová teplota [°C]	Pozice v genomu
1A	Sense	TGT CTA CGC TTC GCG TTG CAC ACA	55	963-986
1B	Antisense	GGA ACC CCA GCG AGA GCC TTC AGT A	55	1787-1763
2A	Sense	CGT GTT GAA TTT GGG GCT CCT CAC G	54	1693-1717
2B	Antisense	TTC GTT CCG TGT CCA CAG CGC A	54	2491-2470
2C	Sense	GGT CAT TAC TCT GTT GGG GA	45	450-469
2D	Antisense	ACA CAT CCA TTG AAG GCT TC	45	1102-1083
2E	Sense	TTG TTC ACA CCA TTT CCA CG	50	9792-9811
1F	Antisense	AGC GGG TGT TTT TCC GAG TC	45	11141-11122
1G	Sense	TGG AGA CCA GAG AGG GCC AA	50,8	8400-8419
1H	Antisense	CTT CTT GAG GTG CCA GCC CA	50,8	9231-9212
2G	Sense	GAA ATT GGG AGA ATT CGG AGT GGC G	55	9048-9072
2H	Antisense	CGC CCT CCC AAC GAG TTC ATC TTG	55	9882-9859
2K	Sense	CTG TGG GGG TTT CTG CCT CT	50,8	7606-7625
2L	Antisense	GTT TCG CTG TAC TGC TCC CG	50,8	8540-8521
1M	Sense	GCT TTC AAC AGC ATC TTC GG	49	2302-2321
1N	Antisense	TGT TAT ACC AGG ATC TGG GTC C	49	3229-3208
2M	Sense	ACT TTT GGT CAC TGA CCT GAG G	49	3105-3126
2N	Antisense	TCC ATG ATG CAC AGT CAC CA	49	4032-4013
1O	Sense	GCT GGT CCT GGA ATT GGG GC	52,8	3855-3874
1P	Antisense	GGA CCG GCC ACA GCA TCA TC	52,8	4808-4789
2O	Sense	GGT CGA GAG CGT GGT GAT AG	50,8	4627-4646
2P	Antisense	CAG GAG GTG TCG CTG TCA TC	50,8	5575-5556
1R	Sense	CCT ATG TCA ACA GAC GGC TAC T	50	5408-5429
1S	Antisense	GGC TCC TAA AGG TAA CCA AGT C	50	6358-6337
2R	Sense	GCC CGT GGC CAC CTT CTA TG	52,8	6114-6133
2S	Antisense	CCC CCC GTT CAC TCC ACA AC	52,8	6976-6957

#### 4.1.2.7. 3D modely proteinu E

Struktury proteinu E jednotlivých variant viru KE byly navrženy na základě již známých struktur tohoto proteinu, dostupných v databázi Worldwide Protein Data Bank ([www.wwpsdb.org](http://www wwpsdb.org)), která slučuje databáze RCSB PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB) ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), EBI Macromolecular Structure Databáze – PDB Europe ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), Protein Data Bank Japan ([www.pdbj.org](http://www.pdbj.org)) a Biologic Magnetic Resonance Bank ([www.bmrb.com](http://www.bmrb.com)).

Samotné modelování jednotlivých struktur probíhalo s využitím on-line servisu Pôle Bioinformatique Lyonnais Gerland, Geno 3D ([www.geno3D-pbil.ibcp.fr](http://www.geno3D-pbil.ibcp.fr)) (Combert a kol., 2002). Přesnost výsledných modelů byla vyhodnocena programem PROCHECK v 3.5.4 (<ftp.biochem.ucl.ac.uk>, R. Laskowski, European Bioinformatics Institute, Cambridge, Velká Británie) a nejpřesnější model byl použit pro zobrazení struktur proteinu E jednotlivých variant viru.

Struktury proteinů jednotlivých variant byly porovnány programem Molsoft Browser v.3.4-9b (Molsoft L.L.C, La Jolla, CA, USA). V tomto programu byly zobrazeny odchylky, vzniklé záměnou aminokyselin u proteinů, a zobrazen byl i dopad záměn na povrch molekul.

Pro výpočet elektrostatického potenciálu povrchu proteinů byl použit program Swiss-PdbViewer v.3.7 (Guex a kol., 1997)

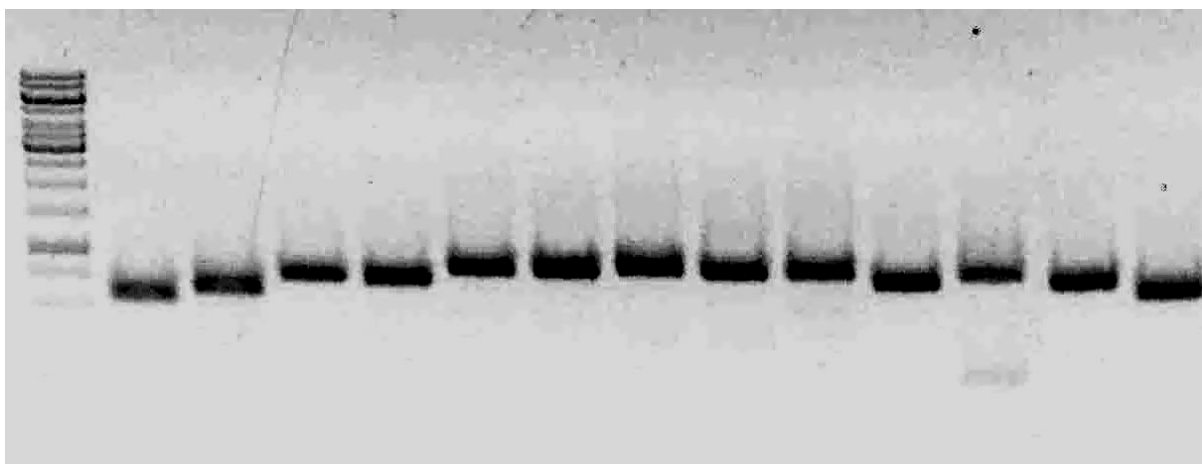
## 5. Výsledky

### 5.1. Izolace RNA a syntéza cDNA

Z infikovaných buněk se podařilo vyizolovat virovou RNA, která byla použita jako templát při RT-PCR pro syntézu prvního řetězce cDNA; cDNA pak byla syntetizována za použití primeru 1F.

### 5.2. PCR

Pomocí PCR, za použití specifických primerů, byly amplifikovány oblasti genomu nesoucí informaci pro proteiny prM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A a NS5. Kombinace primerů byly voleny tak, aby velikosti produktů byly přibližně 900bp.



Obrázek 7: Znáornění PCR produktů, které byly následně vyříznuty a použity pro sekvenování.

### 5.3. Sekvenční analýza

Sekvenovala jsem genom viru klíšťové encefalitidy kmene Hypr po třech pasážích v PS buňkách v přítomnosti tunikamycinu (označován jako Hypr3TM). Sekvenční analýze byly podrobeny oblasti nesoucí informaci pro tyto proteiny: prM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A a NS5. Získané sekvence byly porovnány se sekvencí viru KE kmene Hypr50/CB, který byl použit pro pasážování za přítomnosti tunikamycinu (kompletní sekvence viz Příloha 1). Na základě tohoto porovnání byly identifikovány celkem 4 nukleotidové záměny. Z toho 3 záměny představovaly změnu aminokyselinové sekvence

proteinů. Dále jsem porovnála variantu Hypr3TM s variantou Hypr5, která je původnější variantou viru Hypr a překonala jen pět pasáží v mozcích sajících myšek (virus, použitý při mých pokusech překonal 50 a více pasáží v mozcích sajících myšek) a je tedy méně adaptovaná na savčí buňky. Při porovnání těchto nukleotidových záměn se sekvencí varianty Hypr5 se 3 změny s touto sekvencí shodovaly (v tabulce jsou tyto změny zvýrazněny tučně). Z toho vyplývá, že pouze 1 nukleotidová záměna je unikátních pro variantu Hypr3TM a způsobila změnu aminokyselinové sekvence, jak je znázorněno v tabulce 2.

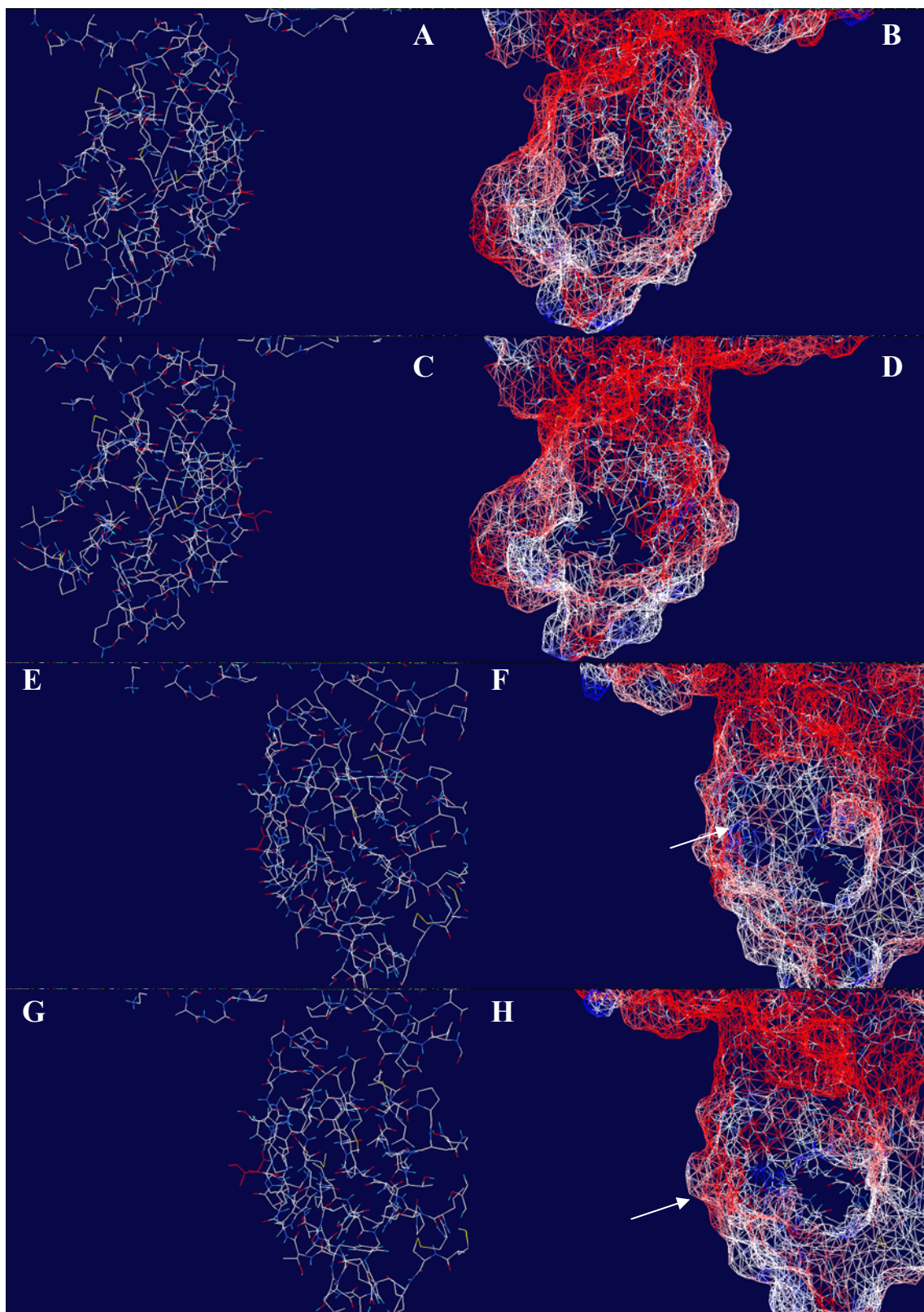
Tabulka 2: Nukleotidové a aminokyselinové změny po porovnání sekvencí Hypr3TM a Hypr50/CB.

Č.	Změna (Hypr50/CB – Hypr3TM)	Poloha v genomu	V proteinu	AMK změny (Xaa místo Xaa)	Poloha AMK v proteinu	Povaha změny *
1	G – A	1921	E	Ala → Thr	317	N – P
2	T – G	<b>2426</b>	<b>E</b>	<b>Val → Gly</b>	<b>485</b>	<b>N – N</b>
3	G – A	<b>6338</b>	<b>NS3</b>	<b>Gly → Asp</b>	<b>580</b>	<b>N – K</b>
4	A – G	<b>9783</b>	<b>NS5</b>	<b>Není</b>		

\* N – neutrální nepolární AK, P – neutrální polární AK, K – kyselá AK; Tučně jsou zvýrazněny záměny shodující se sekvencí Hypr5.

První aminokyselinová odlišnost se nachází v proteinu E v pozici 317, jedná se o záměnu Ala<sub>317</sub> → Thr<sub>317</sub>, tedy změna neutrální aminokyseliny na polární. Druhá odlišnost proti sekvenci Hypr50/CB je také v proteinu E, v pozici 485, jde o záměnu Val<sub>485</sub> → Gly<sub>485</sub>; tato záměna je synonymní, dochází ke změně nepolární aminokyseliny za nepolární a také se shoduje se sekvencí Hypr5. Další odlišnost je v proteinu NS3 v pozici 580, jedná se o změnu Gly<sub>580</sub> → Asp<sub>580</sub>, tedy změna nepolární aminokyselina na kyselou. Tato záměna se stejně jako předešlá, shoduje se sekvencí Hypr5. V proteinu NS5 byla identifikována jedna nukleotidová záměna, která však nevedla ke změně aminokyselinové sekvence, tato záměna se také shodovala se sekvencí Hypr5.

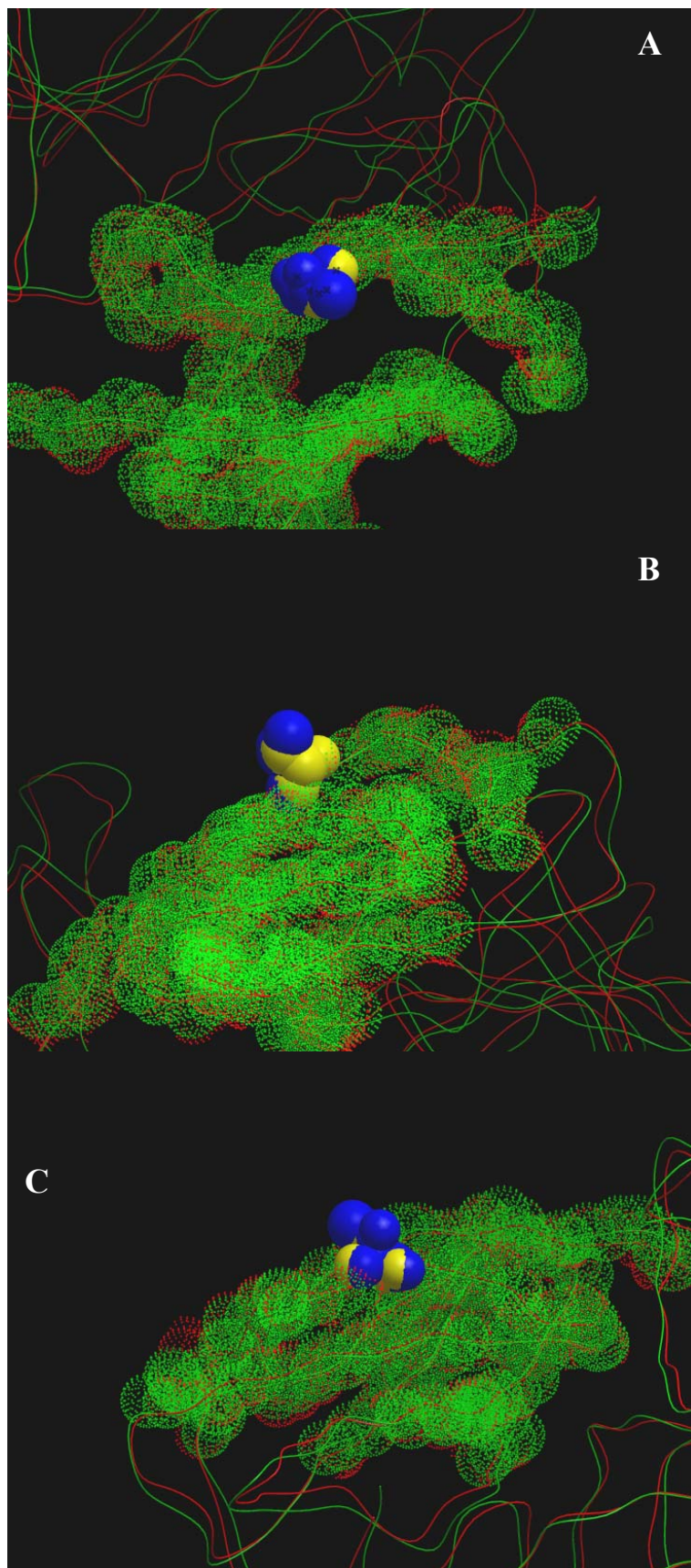
Na základě dostupných struktur proteinu E byly namodelovány struktury proteinu E obou variant, zobrazující záměnu Ala<sub>317</sub> → Thr<sub>317</sub> (Obr. 8 a 9). Na obrázku 8 je porovnání struktur a elektrostatických potenciálů na povrchu proteinů obou variant. Záměna má za následek změnu prostorového rozložení náboje na povrchu proteinu, se vznikem záporně nabitě oblasti kolem substituce (Obr. 8H, šipka) a zmenšení kladného náboje kolem smyčky III. domény proteinu (Obr. 8F, šipka). Substituce má také za následek změnu prostorového uspořádání povrchu proteinu (Obr. 9).



Obrázek 8: 3D modely proteinu E klíšťové encefalidity. A, E – zobrazení struktury části proteinu E, varianta Hypr50/CB, červenou barvou je zvýrazněna aminokyselina Ala<sub>317</sub>; B, F – zobrazení struktury části proteinu E, varianta Hypr3TM, červenou je zvýrazněna aminokyselina Thr<sub>317</sub>; C, G – zobrazení elektrostatického potenciálu na povrchu dané části proteinu E, varianta Hypr50/CB; D, H – zobrazení elektrostatického potenciálu na povrchu dané části proteinu E, varianta Hypr3TM. A, B, C, D a E, F, G, H představují



zobrazení molekuly z toho samého úhlu pohledu. U zobrazení elektrostatického potenciálu je záporný náboj znázorněn červeně a kladný modře (Swiss-PdbViewer).



Obrázek 9: Porovnání struktur proteinu E viru klíšťové encefalitidy. Zelenou barvou je znázorněn protein E u varianty Hypr50/CB, červenou barvou u varianty Hypr3TM. U části molekuly je zobrazena, odpovídajícími barvami, i prostorová organizace jednotlivých molekul. Žlutou barvou je zobrazena aminokyselina Ala<sub>317</sub> u varianty Hypr50/CB, modrou barvou aminokyselina Thr<sub>317</sub> u varianty Hypr3TM (Molsoft Browser).

## 6. DISKUSE

Cílem této práce je zjistit, jak se z genetického hlediska adaptoval virus klíšťové encefalitidy, kmen Hypr, varianta Hypr50/CB, na změněné podmínky kultivace, konkrétně na množení viru v savčích buňkách za přítomnosti tunikamycinu (tunikamycin je antibiotikum, které zabraňuje N-glykosylaci proteinů).

Životní cyklus viru KE je vázán na přenos mezi klíštětem *I. ricinus* a malými savci. V různých studiích byly pozorovány rozdíly v průběhu replikačního cyklu viru KE a adaptace na klíštěcího či savčího hostitele. V mé práci jsem porovnávala nukleotidovou sekvenci viru klíšťové encefalitidy, Hypr3TM se sekvencí varianty Hypr50/CB. Na základě tohoto porovnání jsem identifikovala 4 nukleotidové rozdíly, přičemž 3 z těchto rozdílů se shodovaly se sekvencí Hypr5. Hypr5 je původnější variantou viru, která prošla jen pěti pasážemi v mozcích sajících myšek (virus použitý v mých pokusech prodělal padesát a více pasáží v mozcích sajících myšek). Tato varianta je tedy méně přizpůsobená savčím buňkám.

V savčích buňkách dochází ke glykosylaci ve větší míře a glykany savčích proteinů jsou větší. N-glykany vázané na glykoproteiny v hmyzích buňkách jsou tvořeny převážně nízkomanosylovanými typy glykanů, kdežto savčí hostitelské buňky produkují komplexní typy N-glykanů končící N-acetylneuraminovou kyselinou. Vzhledem ke značným odlišnostem, lze očekávat, že varianta viru KE pasážovaná v jednom typu buněk (savčí vs. klíštěcí) se přizpůsobí tomuto stavu. Není tedy překvapivé zjištění, že u varianty adaptované na prostředí bez glykosylace došlo k mutacím, které měly za následek změnu nukleotidové sekvence na původnější variantu viru, která byla přizpůsobena klíštěcím buňkám. K podobným závěrům došli při studiu základní charakteristiky dvou variant viru – kmene EK-328, který byl adaptován na mozky sajících myšek a jeho derivátu adaptovaného na množení v klíštěti *Hyalomma marginatum*. Virus adaptovaný na klíště tvořil v kulturách savčích buněk malé plaky. V klíštěti se také lépe replikoval v porovnání s buňkami PEK, odvozenými od prasečích embryonálních ledvin a měl nižší neurovireulenci pro laboratorní myš. Obě varianty byly sekvenovány, přičemž v jejich genomu bylo zjištěno 15 nukleotidových rozdílů. Z toho 6 záměn představovalo také změnu v aminokyselinové sekvenci a další dvě nukleotidové záměny byly nalezeny v 5'NTR. Dvě aminokyselinové záměny byly nalezeny v proteinu E a o těchto záměnách se uvažuje jako o důvodu pro atenuaci viru adaptovaného na klíště. Již po jednom pasážování varianty viru adaptované na klíště v PEK buněčné kultuře byly pozorovány změny v tvorbě

plaků. Plaky byly velké, shodné s těmi z kmene EK-328. Sekvenací bylo zjištěno, že některé substituce byly vráceny zpět na původní variantu, tedy kmen EK-328. Virus KE se tedy zřejmě v přírodě vyskytuje jako heterogenní populace, kde převládá varianta adaptovaná na aktuálního hostitele. Pak je tedy příčinou rychlé reprodukce viru v novém hostiteli zřejmě menšinová varianta nebo nově vzniklí mutanti, kterým lépe vyhovují podmínky pro reprodukci v novém hostiteli. Varianta, které nové prostředí vyhovuje méně, se replikuje jen omezeně a projeví se znovu s další změnou hostitele (Romanova a kol., 2007).

Dalším zajímavým poznatkem v mé práci byla identifikace nukleotidové záměny, která se neshodovala se sekvencí Hypr 5, jedná se proto o záměnu unikátní pro variantu Hypr3TM. Tato odlišnost způsobila změnu aminokyselinového složení, nachází se v proteinu E v pozici Ala<sub>317</sub> → Thr<sub>317</sub> a jedná se o změnu nepolární aminokyseliny na polární. Změna se nachází v konservované oblasti III. domény. III. doména proteinu E se skládá ze šesti antiparalelních  $\beta$ -listů, které tvoří strukturu  $\beta$ -soudku. Nalezená změna je v pozici 317, což je právě uprostřed prvního  $\beta$ -listu (313 – 320) (Mukherjee, 2006). Výše popsaná struktura je podobná imunoglobulinové konstantní doméně. Mutace v této doméně zajišťují únik před neutralizačními protilátkami, jak bylo prokázáno u viru KE, viru Japonské encefalitidy, viru Louping ill a viru Dengue (Wu a kol., 2003). V oblasti III. domény bylo identifikováno několikero aminokyselinových záměn, které ovlivňovaly virulenci viru. Velmi významnou se v tomto ohledu zdá být i nesynonymní změna His<sub>390</sub> → Tyr<sub>390</sub> (Lobigs a kol., 1990; Wallner a kol., 1996), která zřejmě způsobí atenuaci viru při pasážování v mozcích sajících myšek. Stejně jako mnou identifikovaná změna se nachází v okolí důležitých znaků virulence jakými jsou Tyr<sub>384</sub> (Holzmann a kol., 1990), Gly<sub>333</sub> (Cecilia a Gould, 1991) i Asp<sub>308</sub> (Jiang a kol., 1993). Tyto změny měly za následek sníženou reaktivitu s monoklonálními protilátkami a snižovaly schopnost neurovirulence u sajících myšek.

Jak je patrné z výsledků modelování proteinu E u obou variant (pro záměnu v aminokyselině 317), je možno pozorovat změnu elektrostatického potenciálu na povrchu proteinu, kdy kromě objevení/rozšíření se negativně nabitě oblasti kolem substituce došlo také ke zmenšení pozitivně nabitě oblasti smyčky domény III. Substituovaná aminokyselina v struktuře proteinu směřuje mimo molekulu proteinu. Pozorovaná záměna tedy může stericky a elektrostaticky ovlivnit interakci s dalšími molekulami a to jak při formaci dimerů/trimerů na povrchu virionu, tak při interakci s buněčnými receptory. Elektrostatické interakce jsou přitom důležité pro vazbu proteinu E s glykoasminoglykany,



které patří mezi kandidátní receptorové molekuly pro virus KE (Kroschewzki a kol., 2003). Přítomnost tunikamycinu inhibuje kromě jiných buněčných pochodů také syntézu glykosaminoglykanů (King a Tabiowo, 1981) a jejich sulfataci (Takagaki a kol., 1998), čímž se tedy u viru množeného v buňkách v přítomnosti tunikamycinu snížila potřeba pro pozitivní náboj v receptorové doméně proteinu E.

## 7. ZÁVĚR

U viru KE kmene Hypr3TM se podařilo sekvenovat oblast genomu nesoucí genetickou informaci pro proteiny prM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A a NS5. Při porovnání získané sekvence s kmenem Hypr50/CB byly zjištěny 4 nukleotidové záměny z nichž 3 způsobily změnu aminokyselinového složení daného proteinu. Při porovnání těchto změn s variantou Hypr5 se 3 nukleotidové záměny shodovaly. V případě záměny Ala<sub>317</sub> → Thr<sub>317</sub> u proteinu se jednalo o záměnu unikátní pro variantu Hypr3TM. Tato záměna způsobila změnu elektrostatického potenciálu receptorové domény proteinu E, čímž mohla stericky a elektrostaticky ovlivnit interakci v homodimerech a homotrimerech proteinu E na povrchu virionů, jakož i interakci s receptorovými molekulami hostitelských buněk.

## 8. LITERATURA:

**Allison S. L., Schalich J., Stiasny K., Mandl C. W., Kunz C., Heinz F. X.** (1995 a). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol* 69: 695–700.

**Allison S. L., Stadler K., Mandl C. W., Kunz C., Heinz F. X.** (1995 b). Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *J Virol* 69: 5816–20.

**Bazan J. F., Fletterick R. J.** (1989). Detection of trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* 171: 637-639.

**Bot A., Smith K. A., von Herrath M.** (2004). Molecular and cellular control of T1/T2 immunity at the interface between antimicrobial defense and immunem pathology. *DNA Cell Biol* 23: 341-350.

**Briant J. E., Calvert A. E., Mesesan K., Crabtree M. B., Volpe K. E., Silengo S., Richard M. K., Huang C. Y.-H., Miller R. B.** (2007). Glycosylation of dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth in vitro but not for growth in intrathoracically inoculated *Aedes aegypti* mosquitoes. *Virology* 366: 415-423.

**Brinton M. A., Disputo J. H.**, (1988). Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology* 162: 290-299.

**Calisher C. H., Gould E. A.** (2003). Taxonomy of the virus family *Flaviviridae*. *Adv Vir Res* 59: 1-19.

**Calisher C. H., Karabatsos N., Dalrymple J. M., Shope R. E., Porterfield J. S., Westaway E. G., Brandt W. E.** (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyvalent antisera. *J Gen Virol* 70: 37-43.

**Cecilia D., Gould E. A.** (1991). Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants. *Virology* 181: 70-77

**Clum S., Ebner K. E., Padmanabhan R.** (1997). Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3(Pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B. *J Biol Chem* 272(49): 30715-30723.

**Corver J., Ortiz A., Allison S. L., Schalich J., Heinz F. X., Wilschut J.** (2000). Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system. *Virology* 269: 37–46.

**Combet C., Jambor M., Deléage G., Geourjon C.** (2002), Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein, *Bioinformatics*. 18: 213-214.

**Dzhivanian T. I., Korolev M. B., Karganova G. G., Lisak V. M., Kashtanova G. M., Chuprinskaya M. V.** (1988). Changes in the host-dependent characteristics of the tick-borne encephalitis virus during its adaptation to ticks and its readaptation to white mice. *Vopr Virusol* 33: 589–595.

**Elshuber S., Allison S. L., Heinz F. X., Mandl C. W.** (2003). Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J Gen Viro* 84: 183-191.

**Falgout B., Markoff L.** (1995). Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 69: 7232-7243.

**Falgout B., Miller R. H., Lai C.-J.** (1993). Deletion analysis of Dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: Identification of a domain required for NS2B-NS3 proteinase activity. *J Virol* 67: 2034-2042.

- Ferlenghi I., Clarke M., Ruttan T., Allison S. L., Schlich J., Heinz F. X.** (2001). Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus. *Mol Cell* 7: 593–602.
- Gorbalenya A. E., Donchenko A. P., Koonin E. V., Blinov V. M.**, (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* 17: 4713-4729.
- Gordon S.** (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23–35.
- Goto A., Yoshii K., Mayumi O., Ueki T., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I.** (2005). Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus like particle secretion. *Vaccine* 23: 3043-3052.
- Gritsun T. S., Lashkevich V. A., Gould E. A.** (2003). Tick-Borne encephalitis. *Antiviral Res* 57: 129-146.
- Grubhoffer L., Guirakhoo F., Heinz F. X., Kunz C.** (1990). Interaction of tick-borne encephalitis virus protein E with labelled lectins. *Lectino-Biol Biochem Clin Biochem* 7: 313-319.
- Guex N., Peitsch M. C.** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723 ([www.expasy.org/spdbv](http://www.expasy.org/spdbv)).
- Haglund M., Vene S., Forsgren M., Günther G., Johansson B., Niedrig M., Plyusnin A., Lindquist L., Lundkvist A.** (2003). Characterisation of human tick-borne encephalitis virus from Sweden. *J Med Virol* 71: 610-621.
- Hall T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hayasaka D., Ivanov L., Leonova N. G., Goto A., Yoshii K., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I.** (2001). Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. *J Gen Virol* 82: 1319–1328.
- Heinz F. X.** (2003). Molecular aspects of TBE virus research. *Vaccine* 21: S3-S10
- Heinz F. X., Allison S. L.** (2003). Flavivirus structure and membrane fusion. *Adv Virus Res* 59: 63-97.
- Heinz F. X., Allison S. L., Stiasny K., Schlich J., Holzmann H., Mandl C. W.** (1995). Recombinant and virion-derived soluble and particulate immunogens for vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine* 13: 1636–1642.
- Heinz F. X., Kunz C.** (1980). Chemical crosslinking of tick-borne encephalitis virus and its subunits. *J Gen Virol* 46: 301-309.
- Helenius A., Aebi M.** (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364-2369.
- Hennig L.** (1999). WinGene/WinPep: User-friendly software for the analysis of amino acid sequences. *Biotechniques* 26: 1170-1172.
- Holzmann H., Heinz F. X., Mandl C. W., Guirakhoo F., Kunz C.** (1990). A single amino acid substitution in the envelope protein E of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model. *J Virol* 70: 219-222
- Hounsell E. F.** (1998). Characterization of protein glycosylation. In Elizabeth F. H. (ed.) *Glycoanalysis protocols. Methods in molecular biology* Vol. 76. Humana press Inc., Totowa, NJ, U.S.A. pp 1-3.
- Hurtley S. M., Helenius A.** (1989). Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* 5: 277-307.

- Chambers T. J., Hahn C. S., Galler R., Rice C. M.** (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44: 649-688.
- Chambers T. J., Nestorowicz A., Amberg S. M., Rice C. M.** (1993). Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: Effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J Virol* 67: 6797-6807.
- Chaturvedi U. C., Agarwal R., Elbishbishi E. A., Mustafa A. S.** (2000). Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 28: 183–188.
- Chu J. J., Ng M. L.** (2004). Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol* 78: 10543-10555.
- Chung K. M., Liszewski M. K., Nybakken G., Davis A. E., Townsend R. R., Fremont D. H., Atkinson J. P., Diamond M. S.** (2006). West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18879-18880.
- Chunikhin S. P., Dzhivanian T. I.** (1977). “Ecological markers” of arboviruses. DS-marker of the tick-borne encephalitis virus. *Vestn Akad Med Nauk SSSR* 5: 17–21.
- Jiang W. R., Lowe A., Higgs S., Reid, H., Gould E. A.** (1993). Single amino acid codon changes detected in louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence. *J Gen Virol* 74: 931-935
- Khromykh A. A., Westaway E. G.** (1996). RNA binding properties of core protein of the flavivirus Kunjin. *Arch Virol* 14 : 685-699.
- Kofler R M., Heinz F. X., Mandl C. W.** (2002). Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. *J Virol* 76: 3534-3543.
- Konishi E., and Mason P. W.** (1993). Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol* 67: 1672-1675.
- Koonin E. V.** (1993). Computer-assisted identification of putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of retrovirus. *J Gen Virol* 74: 733-740.
- Kopecký J., Grubhoffer L., Kovář V., Jindrák L., Vokurková D.** (1999). A putative host cell receptor for Tick-borne encephalitis virus identified by anti-idiotypic antibodies and virus affinity blotting. *intervirology* 42: 9–16.
- Kroschewski H., Allison S. L., Heinz F. X., Mandl C. W.** (2003). Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 308: 92-100.
- Labuda M., Jiang W. R., Kaluzová M., Kožuch O., Nuttall P. A., Weismann P., Elečková E., Žuffová E., Gould E. A.** (1994). Change in phenotype of tick-borne encephalitis virus following passage in *Ixodes ricinus* ticks and associated amino acid substitution in the envelope protein. *Virus Res* 31: 305–315.
- Lee J. M., Crooks A. J., Stephenson J. R.** (1989). The synthesis and maturation of a non-structural extracellular antigen from tick-borne encephalitis virus and its relationship to the intracellular NS1 protein. *J Gen Virol* 70: 335-343.
- Leung L. Y., Pijlman G. P., Kondratieva N., Hyde J., Mackenzie J. M., Khromykh A. A.** (2008). The role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol* (v tisku).
- Lindenbach B. D., Thiel H. J., Rice C. M.** (2007). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D. M. a Howley P. M. (ed.) *Fields Virology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 5th Edition. pp 1101-1112.

- Lindenbach B. D., Rice M. Ch.** (2001). *Flaviviridae: the viruses and their replication*. Virology 991–1041.
- Lobigs M., Usha R., Nestorowicz A., Marshall I. D., Weir R. C., Dalgarno L.** (1990). Host cell selection of Murray valley encephalitis virus variants altered at an RGD sequence in the envelope protein and mouse virulence. Virology 176: 587-595.
- Lorenz I. C., Allison S. L., Heinz F. X., Helenius A.** (2002). Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. J Virol 76: 5480-5491.
- Mackenzie J. M., Khromykh A. A., Jones M. K., Westaway E. G.** (1998). Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. Virology 245: 203-215.
- Mackenzie J. M., Jones M. K., Young P. R.** (1996). Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. Virology 220: 232-240.
- Mandl C. W.** (2005). Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. Virus Res 111: 161-174.
- Markoff L., Falgout B., Chang A.** (1997). A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. Virology 233: 105-117.
- Martoglio B., Dobberstein B.** (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. Trends Cell Biol 8: 410-415.
- Mason P. W.** (1989). Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. Virology 169: 354-364.
- McMinn P. C.** (1997). The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. Virology 78: 2711-2722.
- Miguez-Burbano M. J., Jaramillo C. A., Palmer C. J., Shor-Posner G., Velasquez L. S.** (1999). Total immunoglobulin E levels and dengue infection on San Andres Island, Colombia. Clin Diagn Lab Immunol 6: 624–626.
- Miller J. L., deWet B. J. M., Martinez-Pomarez L., Radcliffe C.M., Dwek R. A., Rudd P. M., Gordon S.** (2008). The Mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. PloS Pathog 4: e17.
- Moens S., Vanderleyden J.** (1997). Glycoproteins in procaryotes. Arch Microbiol 168: 169-175.
- Montaner L. J., da Silva R. P., Sun J., Sutterwala S., Hollinshead M.** (1999). Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10. J Immunol 162: 4606–4613.
- Morrison T. G., McQuain C. O., Simpson D.** (1978). Assembly of viral membranes: maturation of the vesicular stomatitis virus glycoprotein in the presence of tunicamycin. J Virol 28: 368-374.
- Mukherjee M., Dutta K., White A. M., Cowburn D., Fox O. R.** (2006). NMR solution structure and backbone dynamics of domain III of the E protein of tick-borne Langat flavivirus suggests a potential site for molecular recognition. Protein Sci 15: 1342-1355.
- Murray J. M., Aaskov J. G., Wright P. J.** (1993). Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. J Gen Virol 74: 175-182.
- Muylaert I. R., Chambers T. J., Galler R., Rice C. M.** (1996). Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the Yellow fever virus NS1 protein: Effects on virus replication and mouse neurovirulence. Virology 222: 159-168.

**Nestorowiez A., Chambers T. J., Rice C. M.**, (1994). Mutagenesis of the yellow fever virus NS2A/2B cleavage site: Effects on proteolytic processing, viral replication and evidence for alternative processing of the NS2A protein. *Virology* 199: 114-123.

**Nowak T., Farber P. M., Wengler G.** (1989). Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* 169: 365-376.

**Nowak T., Wengler G.** (1987). Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. *Virology* 156: 127-137.

**Olden K., Robert P. M., Jaworski C., Kenneth Y. M.** (1979). Evidence for role of glycoprotein carbohydrates in membrane transport: Specific inhibition by tunicamycin. *Cell Biol* 2: 791-795.

**Post P.J., Carvalho R., Galler R.** (1991). Glycosylation and secretion of yellow fever virus nonstructural protein NS1. *Virus Res* 18: 291-302.

**Preugschat F., Strauss J. H.** (1991). Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. *Virology* 185: 689-697.

**Rey F. A., Heinz F. X., Mandl C., Kunz C., Harrison S. C.** (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375: 291-298.

**Rice C. M.** (1996). *Flaviviridae: the viruses and their replication*. *Virology* 3: 931-959.

**Rice C. M., Lenches E. M., Eddy S. R., Shin S. J., Sheets R. L., Strauss J. H.** (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229: 726-733.

**Romanova I. L., Gmy P. A., Dzhivanian I.T., Bakhmutov V. D., Lukashev N.A., Gmyl V. L., Rumyantsev A. A., Burenkova A.L., Lashkevich A.V., Karganova G. G.** (2007). Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology* 362: 75–84.

**Růžek D., Gritsun T. S., Forrester N. L., Gould E. A., Kopecký J., Golovchenko M., Rudenko N., Grubhoffer L.** (2008). Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus. *Virology* (v tisku).

**Schalich J., Allison S. L., Stiasny K., Mandl C. W., Kunz C., Heinz F.X.** (1996). Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *J Virol* 70: 4549–4557.

**Stadler K., Allison S. L., Schalich J., Heinz, F. X.** (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* 71: 8475-8481.

**Stocks C. E., Lobigs M.** (1995). Posttranslational signal peptidase cleavage at the flavivirus C-prM junction in vitro. *J Virol* 69: 8123-8126.

**Šenigl F., Grubhoffer L., Kopecký J.** (2006). Differences in maturation of Tick-borne encephalitis virus in mammalian and tick cell line. *Intervirology* 49: 239–248.

**Takegami T., Sakamuro D., Furukawa T.** (1995). Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS3 has RNA binding and ATPase activities. *Virus Genes* 9: 105-112.

**Taylor P. R., Gordon S., Martinez-Pomares L.** (2005). The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol* 26: 104–110.

- Trent D. W.** (1977). Antigenic characterization of flavivirus structural proteins separated by isoelectric focusing. *J Virol* 22: 608-618.
- Trombetta E. S., Helenius A.** (1998). Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol* 8: 587-592.
- Vigerust D. J., Shepherd V. L.** (2007). Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol* 15: 211-218.
- Wallner G., Mandl C. W., Ecker M., Holzmann H., Stiastry K., Kunz C., Heinz F. X.** (1996). Characterization and complete genome sequences of high- and low- virulence of tick-borne encephalitis. *J Gen Virol* 77: 1035-1042.
- Wallner G., Mandl C., Kunz C., Heinz F. X.** (1995). The flavivirus 3'-non-coding region : extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 213: 169-178.
- Wang E., Weaver S. C., Shope R. E., Tesh R. B., Watts D. M., Barrett A. D. T.** (1996). Genetic variation in yellow fever virus: duplication in the 3' non-coding region of strains from Africa. *Virology* 225: 274-281.
- Wengler G., Wengler G.** (1993). The NS3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology* 197: 265-273.
- Westaway E. G., Khromykh A. A., Kenney M. T., Mackenzie J. M., Jones M. K.** (1997). Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus. *Virology* 234: 31-41.
- Winkler G., Maxwell S. E., Riemmler C., Stollar V.** (1989). Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology* 171: 302-305.
- Wu K.-P., Wu C.-W., Tsao Y.-P., Kuo T.-W., Lou Y.-Ch., Lin C.-W., Wu S.-Ch., Cheng J.-W.** (2003). Structural basis of a Flavivirus recognized by its neutralizing antibody. solution structure of the domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *J Biol Chem* 278: 46007-46013
- Yoshii K., Hayasaka D., Goto A., Kawakami K., Kariwa H., Takashima I.** (2005). Packaging the replicon RNA of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus into single-round infectious particles: development of a heterologous gene delivery system. *Vaccine* 23: 3946-3956.



## 9. SEZNAM ZKRATEK

- C – kapsidový (capsid)
- CDR – cukerná doména (carbohydrate recognition domain)
- DEN – dengue
- E – obalový (envelope)
- EDTA – disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
- ER – endoplasmatické retikulum
- IL – interleukin
- KE – klíšťová encefalitida
- M – membránový (membráně)
- MR – manosový receptor
- NS – nestructurální (nonstructural)
- ORF – otevřený čtecí rámeček (open reading frame)
- PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
- PEK – prasečí embryonální ledviny (porcine embryo kidney)
- PS – prasečí ledviny (porcine kidney stable)
- PTS – prekolostrální telecí sérum
- RSP – rekombinantní subvirové částice
- TBEV – virus klíšťové encefalitidy (tick-borne encephalitis virus)
- TGF – faktor transformující růst (transforming growth factor)
- UTR – netranslatovaná oblast (untranslated region)
- VLP – viru podobné částice (virus-like particles)

## 10. PŘÍLOHA

Príloha 1: Nukleotidová sekvence Hypr3TM; změny oproti Hypr50/CB jsou označeny větší

velikostí písma a podtržením.

prM

**at** gacgattgct  
481 gcaaccgtga ggaaagaaaag ggacggctca actgtgatca gagctgaagg aaaggacgca  
541 gcaactcagg tgcgtgtgga gaatggcacc tgtgtgatcc tggctactga catgggggtca  
601 tgggtgtgatg attcactgtc ctatgagtgt gtgaccatag atcaaggaga agagcctggt  
661 gacgtggatt gtttttgccg gaatgttgat ggagtctatc tggagtatgg acgctgtggg  
721 aaacaagaag gctcacggac aaggcgc

M

**tca** gtgctgatcc catcccatgc ccagggagag  
781 ctgacgggga ggggacacaa atggctagaa ggagactcgc tgcaacaca tctcaccaga  
841 gttgagggat gggtttgaa gaacaggcta cttgccctgg cgatggtcac cgttgtgtgg  
901 ttgaccctgg agagtgtggt gaccagggtc gccgttctgg ttgtgctcct gtgtttggcg  
961 ccggtctacg ct

E

**tcg**cgttg cacacatttg gaaaacaggg actttgtgac tggactcag  
1021 gggactacga gggtcacctt ggtgctgga ctgggtggat gtgttaccat aacagctgag  
1081 gggaaagcctt caatggatgt gtggcttgac gccatttacc aggagaacc tgctaagaca  
1141 cgtgagtact gtttacacgc caagttgtcg ggactaagg ttgcagccag atgccaaca  
1201 atgggaccag ccactttggc tgaagaacac caggggtggca cagtgtgcaa gagagatcag  
1261 agtgatcgag gctggggcaa cactgtgga ctttttgaa agggtagcat tgtggcctgt  
1321 gtcaaggcgg cttgtgaggc aaaaaagaaa gccacaggac atgtgtacga cgccaacaaa  
1381 atagtgtaca cggtcaaagt cgaaccacac acgggagact atgttgccgc aaacgagaca  
1441 catagtggga ggaagacggc atccttcaca gtttcttcag agaaaacat tctgactatg  
1501 ggtgagtatg gagatgtgtc tctgttgtgt agggctcgta gtggcgttga cttggcccag  
1561 accgtcatcc ttgagcttga caagacagt gaacacctc caacggcttg gcaggtccac  
1621 agggactggt ttaatgatct ggctctgcca tggaaacatg agggagcgca aaactggaat  
1681 aacgcagaaa gattggttga atttggggct cctcatgctg tcaagatgga tgtgtacaac  
1741 ctcggagacc agactggagt gtactgaag gctctcgctg gggttcctgt ggcacacatt  
1801 gagggaaacca agtaccacct gaagagtggc catgtgacct gcgaagtggg actggaaaaa  
1861 ctgaagatga aaggctctac gtacacaatg tgtgacaaaa caaagttcac atggaagaga  
1921 actccaacag acagtgggca tgatacagtg gtcattggaag tcacattctc tggaaacaaag  
1981 ccctgtagga tcccagtcag gycagtggca catggatctc cagatgtgaa cgtggccatg  
2041 ctgataacgc caaacccaac aattgaaaac aatggagggtg gcttcataga gatgcagctg  
2101 cccccagggg acaacatcat ctatgttggg gaactgagtc atcaatggtt ccaaaaaggg  
2161 agtagcatcg gaagagtttt ccaaaaagacc aagaaaggca tagaaagact gacagtgata  
2221 ggggagcacg cctgggactt cggttctgct ggaggctttc tgagttcaat tgggaaggcg  
2281 gtgcacacgg tccttggtgg tgctttcaac agcatcttcg ggggagtggg gtttctacca  
2341 aagcttctat taggagtggc attggcttgg ttgggctgga acatgagaaa ccctacaatg  
2401 tccatgagct ttctcttggc tggaggtctg gttttggcca tgacccttgg agtggggggc

NSI

2461 **gat**gttggct gcgctgtgga cacggaacga atggagctcc gctgtggcga aggcctggtc  
2521 gtgtggagag aggtctcaga atggtatgac aactatgcct actaccgga gacaccggg  
2581 gcccttgcac cagccataaa ggagacattt gaggaggaa gctgtggcgt agtcccccaa  
2641 aacaggctcg agatggccat gtggagaagc tcggtcacag agctgaatct ggctctggcg  
2701 gaagggtgagg caaatcttac agtgatggtg gacaagtttg acccactgta ctaccgaggt  
2761 ggtgtccctg gtttactgaa aaaaggaaa gacataaaaag tctcctggaa aagctggggc  
2821 cattcaatga tctggagcat tcctgaggcc ccccgctcgt tcatgggtggg cacggaagga  
2881 caaagtgagt gtcccctgga gagacggaag acaggtgttt tcacgggtggc agaattcggg  
2941 attggcctga gaacaaaggt cttcttggat ttcagacagg aaccaacaca tgagtgtgac  
3001 acaggagtga tgggagctgc cgtcaagaac ggcatggcaa tccacacaga tcaaagtctc  
3061 tggatgagat caatgaaaaa tgacacaggc acttacatag ttgaactttt ggtcactgac  
3121 ctgaggaact gctcatggcc tgctagccac actatcgata atgctgacgt ggtggactcg  
3181 gagttattcc ttccggcgag cttggcagga cctagatcct ggtacaacag gataccgggt  
3241 tattcagaac aggtgaaggg gccatggaag cacacgccta tccgagtcac cagagaggag  
3301 tgtcccggca cgaccgttac catcaacgcc aagtgtgaca aaagaggagc atctgtgagg

3361 agtaccacag agagtggcaa ggttatccca gaatggtgct gccgagcgtg cacaatgcc  
 3421 ccagtgacgt tccggactgg aactgattgc tggatgccca tggaaatacg gccagtcct  
 3481 gaccaggggg ggcttgctcg ctcaatggtg gttgcggac

**NS2A**

**a acggtgaatt actcagtgag**

3541 ggaggggtcc ccggaatagt ggcaattgtt gtggtccttg aatacatcat ccgcaggaga  
 3601 ccctccacgg gatcaacggt tgtgtggggg ggcatcgtcg ttctcgctt gcttgtcacc  
 3661 gggatggtca ggatggagag cctggtgctg tatgtggtgg cagtggggat cacattccac  
 3721 cttgagctag ggccagagat cgtggccttg atgctactcc aggctgtgtt tgagctgagg  
 3781 gtgggtttgc tcagcgcatt tgcgctgctg agaagcctca ccgtccgaga gatggtgacc  
 3841 acctactttc tattgctggt cctggaattg gggctgccga gtgcgaacct tgaggatttc  
 3901 tggaaatggg gtgatgcact ggcctagggg gcgctgatat tcagggcttg cacggcagaa  
 3961 ggaaagactg gagcggggct cctgctcatg gctctcatga cacagcagga tgtggtgact  
 4021 gtgcatcatg gactggtgtg cttcctgagt gcagcttcgg cttgctcggt ctggaggctg  
 4081 ctcaggggac acagagagca gaagggattg acctggattg tccccctggc tagattgctt  
 4141 gggggagagg gctctggaat cagactgctg gcgttttggg agctgtcagc tcacagagga  
 4201 agacga

**NS2B**

**tctt tcagtgaacc actaactgtg gtaggggtca tgctgacatt ggctagcggc**

4261 atgatgcgac acacctcca ggaggctctc tgtgcactcg cagtggcctc gtttctcttg  
 4321 ttgatgctgg tgctggggac aagaaaagatg cagctggttg ccgaatggag tggctgtgtg  
 4381 gaatggcatc cggaactagt gaatgagggt ggagaggta gcctgcgggt ccgtcaggac  
 4441 gcgatgggaa actttcactt gactgagctc gagaaagaag agagaatgat ggctttttgg  
 4501 ttgattgccg gcttggcagc ttcggccatt cattggtcag gcattcttgg tgtgatggga  
 4561 ctgtggacgc tcacggaaaat gctgaggtca tcccgaagg

**NS3**

**t ctgacctggt tttctctgga**

4621 caggggggtg gagagcgtg tgacagacct ttcgaggta aggacggtg ctacaggatt  
 4681 ttcagccccg gcttgttctg ggtcagaac cagggtgggag ttggctacgg ttccaaagg  
 4741 gtcttgcaaca cgatgtggca tgtgacgaga ggagcggcgc tgtctattga tgatgctgtg  
 4801 gccggctcct actgggctga tgtgaggggag gatgttgtgt gctacggagg agcctggagt  
 4861 ctggaggaaa aatggaaagg tgaacagta caggttcatg cttcccacc agggaaggcc  
 4921 catgagggtg atcagtgcc gcctggggag ttgatccttg acaccggaag gaagcttggg  
 4981 gcaataccaa ttgatttggg aaaaggaaca tcaggcagcc ccattcttaa cggccaggga  
 5041 gtggtcgtgg ggctatacgg aaatggccta aagaccaatg agacctacgt cagcagcatt  
 5101 gctcaagggg aagcggagaa gagtcgacc aacctccac aggctgttgt gggtagcggc  
 5161 tggacatcaa agggtcagat cacagtgtg gacatgcacc caggctcagg gaagaccac  
 5221 agagtccctc cggagctcat tcgccaatgc attgacaggc gcctgagaac gttggtgtt  
 5281 gctccaactc gtgtggtact caaagaaatg gagcgcgcct tgaatgggaa acgggtcagg  
 5341 ttccactcac cagcagtcag tgaccaacag gctggagggg caattgtcga tgtgatgtgt  
 5401 cacgcaacct atgtcaacag acggctacta ccacagggga gacaaaattg ggagggtggca  
 5461 atcatggatg aggccactg gactgacct cacagcatag ctgccagagg tcatttgtac  
 5521 actctggcaa aagaaaacaa gtgtgactg gtcttgatga cagcgacacc tctggttaag  
 5581 agtgaacctt ttccggagtc taacggagcc atcactagtg aggaaagaca gattcctgat  
 5641 ggagagtggc gtgacgggtt tgactggatc actgagtatg aaggacgcac agcctggttt  
 5701 gtcccttcga ttgcaaaagg tgggtctata gctcgcacct tgagacagaa agggaaaagt  
 5761 gtgatctggt tgaacagcaa aacctttgaa aaggactact caagagttag ggtgagaag  
 5821 cctgactttg tggtgacgac tgatatctcg gagatggggag ccaaccttga cgtgagccgc  
 5881 gtcatagatg ggaggacaaa catcaagcct gaggaggttg atgggaaggc cgagctcacc  
 5941 gggaccaggc gagtgaccac ggcttccgct gcccaacggc gcggaagagt tggctggcaa  
 6001 gacggacgaa cagatgaata catatactct ggacagtgtg atgatgatga cagtggatta  
 6061 gtgcaatgga aggaggcgca aatacttctt gacaacataa caaccttgcg gggcccctg  
 6121 gccacctttt atggaccaga acaggacaag atgccggagg tggccggtca ctttcgactc  
 6181 actgaagaga aaagaaagca cttccgacat cttctcactc attgtgactt tacaccgtgg  
 6241 ctggcgtggc acgtcgcagc gaatgtgtcc agcgtcacgg atcgaagctg gacatgggaa  
 6301 gggccggagg caaatgccgt ggatgaggcc agtgggtgact tggtcacctt caggagccc  
 6361 aatggggcgg agagaactct caggccggtg tggaaaggac cacgcatggt caaagaggg  
 6421 cgtgacatca aagagtctgt ggcgtacgca tctgggcgct gc

**NS4A**

**agtttcgg agatgttctg**

6481 acaggaatgt cgggagttcc ggagcttttg cggcacagat gcgtcagtc cctggacgctc

6541 ttctacacac tcatgcatga gaaacctgac agcagggcaa tgagaatggc ggagagagac  
6601 gccccagagg cctttctgac catggttgag atgatgggtg tgggtttggc aaccctgggt  
6661 gtcatctggg gcttcgctgt ccggacttca atcagccgta tgatgctggg cacgctggtc  
6721 ctgctggcct ctttgctact cttgtgggca ggtggcgtcg gctatgggaa tatggccgga  
6781 gtggccctca tcttctacac gttgctgacg gtgctgcagc ccgagggggg aaaacagaga  
6841 agcagtgatg acaacaaaact ggcatatttc ttgctgacgc tctgcagcct tgctggactg  
6901 gttgcagcc

NS5

ggtggt ttctgagggga

7681 gacacgcttg gagatctctg gaaacggagg ctgaacaact gcaccagggg ggaattcttt  
7741 gtgtacaggg gcactggcat cctggagacg gaacgtgaca aggctagaga gttgctcaga  
7801 agaggagaga ccaatatggg attggctgtc tctcggggca cggcaaagct tgccctggctc  
7861 gaggaacgcg gatatgccac cctcaagggg gaggtggtag atcttggatg tggaaagggc  
7921 ggctggctct attatgcggc atcccgaccg gcagtcatga gtgtcagggc atacaccatt  
7981 ggtggaagag ggcattgagg tccaaagatg gtaacaagcc tgggttggaa cttgatcaaa  
8041 tttagatcag gaatggacgt gttcagcatg cagccacacc gggctgacac tgtcatgtgt  
8101 gacatcggag agagcagccc agatgccgct gtggaggggt agaggacaag gaaagtgata  
8161 ttgctcatgg agcaatggaa aaacaggaac cccacggctg cctgtgtgtt caaggtgctg  
8221 gccccatacc gcccagaagt gatagaagca ctgcacagat tccaactgca atgggggggg  
8281 ggtctgggta ggacccttt ttcaaggaac tccacccatg agatgtatta ctcaacagct  
8341 gtcactggga acatagtgaa ctccgtcaat gtacagtcca ggaaactttt ggctcggttt  
8401 ggagaccaga gagggccaac cagggtgcct gaacttgacc tgggagttgg aacgaggtgt  
8461 gtggtcttag ctgaggacaa ggtgaaagaa caagatgtac aagagaggat caaagcgttg  
8521 cgggagcaat acagcgaaac ctggcacatg gacgaggaac atccgtaccg gacatggcag  
8581 tattggggca gctaccgcac ggaccaacc ggctcggcgg cgtcactgat caatgggggt  
8641 gtgaaacttc tcagctggcc atggaacgca cgggaagatg tgggtgcgat ggccatgact  
8701 gacacaacgg ctttcggaca gcagagatg ttcaaagata aagttgacac aaagccacag  
8761 gaacctcagc ccggcacaag agtcatcatg agagcagtaa atgattggat tttggaacga  
8821 ctggcgcaga aaagcaaac gcgcatgtgc agcagagagg aattcatagc aaaagtgaaa  
8881 tcaaacgcag ccttgggagc ttggtcagat gagcaaaaaca gatgggcgag tgcaagagag  
8941 gctgtagagg atcctgcatt ctggcacctc gtggatgaag agagagaaaag gcacctcatg  
9001 gggagatgcg cgcactgctg gtacaacatg atgggcaaga gagagaagaa actgggagag  
9061 ttcggagtgg cgaagggaa tcgggccatt tggtagatgt ggctggggag tcgctttctg  
9121 gagttcgagg ctcttggatt cttgaatgaa gaccattggg cctctagaga gtccagtgga  
9181 gctggagttg agggaaataag cttgaactac ctgggctggc acctcaagaa gttgtcaacc  
9241 ctgaatggag gactcttcta tgcagatgac acagctggct gggacacgaa agttaccaat  
9301 gcagacttag aggatgaaga acagatccta cggtagatgg agggtaggca caaacaactg  
9361 gcaaccacaa taatgcaaaa agcatatcat gccaaagtgc tgaaggtcgc gaggccctcc  
9421 cgtgatggag gctgcatcat ggatgtcatc acaagaagag atcaaagagg ttcgggcccag  
9481 gttgtgacct atgcccttaa caccctcacc aacataaagg tgcaactaat ccgaatgatg  
9541 gaaggggaaag gggcataga ggcagcggat gcacacaacc cgagactgct tcgagtggag  
9601 cgctggctga aagaacatgg agaagagcgt cttggaagaa tgctcgtcag tggtagcatg  
9661 tgtgtgggta ggcccttggg tgacagattt ggcaaagcac tttactttct gaatgacatg  
9721 gccaagacca ggaaggacat tggggaatgg gagcactcgg ccggcttatc aagctgggag  
9781 gaggtcccct tttgttcaca ccacttcac gagctagtga tgaaggacgg acgcaccttg  
9841 gtggtgccgt gcagagacca agatgaactc gttgggaggg cgcgcatctc accgggatgc  
9901 ggctggagtg tccgcgagac ggctgcctt tcaaaagcct acgggcagat gtggctgctg  
9961 agctacttcc atcggcgaga cctgaggacg ctcgggcttg ccatcaactc agcagtgcct  
10021 gtcgattggg ttccctaccg cgcacgaca tggagcatcc atgccagtgg ggccctggatg  
10081 accacagaag acatgctgga cgtctggaac cgggtgtgga ttttgacaa ccctttcatg  
10141 cagaacaagg gaaaggatcat ggagtggagg gatgttccgt acctccctaa agctcaggac  
10201 atgttatgtt cctccctcgt tgggagggaa gaaagagcag aatgggcca gaacatctgg  
10261 ggagcagtgg aaaaggatgag gaagatgata gggcctgaaa agttcaagga ctatctctct  
10321 tgtatggacc gccatgacct gcactgggag ctgagactgg agagctcaat aatc