

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA MEDICÍNSKÉ BIOLOGIE



Genetická variabilita přírodních izolátů viru Ťahyňa

Diplomová práce

Bc. Patrik Kilian

Školitel: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Daniel Růžek, PhD.

České Budějovice, 2010

Kilian P., 2010: Genetická variabilita přírodních izolátů viru Ťahyňa. [Genetic variability in field strains of Ťahyňa virus, Mgr. Thesis, in Czech].

Annotation:

Sequence analysis of 18 low-passage field strains and two reference strains of Ťahyňa virus was performed with the purpose to reveal molecular determinants of virulence and elucidation of genetic variability of Ťahyňa virus in field.

Práce byla finančně podpořena granty:

Z60220518, MSM 6007665801 a Výzkumným centrem LC 06009 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně jen s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách

V Českých Budějovicích dne 30. dubna 2010

.....
Patrik Kilian

PODĚKOVÁNÍ:

S radostí na tomto místě děkuji zejména svému školiteli specialistovi Danu Růžkovi za přivedení mě k mojí „virologické lásce“, bunyavirům, za odborné vedení a vřelý a kamarádský vztah. Nemalý dík patří také mému školiteli, Liboru Grubhofferovi za možnost pracovat na tomto, pro naši laboratoř netradičním viru. Děkuji také Vaclavu Hypšovi za pomoc s fylogenetickou analýzou.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Hlavní cíle práce.....	2
3. Literární přehled	3
3.1. Čeleď Bunyviridae.....	3
3.2. Virus Ťahyňa	4
3.2.1. Historie, distribuce a cirkulace v přírodním ohnisku.....	4
3.2.2. Struktura viru Ťahyňa	6
3.2.3. Velký segment	7
3.2.4. Střední segment	8
3.2.5. Malý segment	10
3.2.6. Replikace ve vnímavé buňce	12
3.2.7. Replikace viru Ťahyňa v komárech a savčích hostitelích.....	14
3.2.8. Klinický obraz onemocnění.....	16
4. Materiál a metody	17
5. Výsledky.....	21
5.1. Střední genomický segment	21
5.2. Malý genomický segment.....	26
6. Diskuze.....	27
7. Závěr	33
8. Seznam použité literatury.....	34
9. Příloha.....	43

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3' NCR – 3' nekódující oblast

5' NCR – 5' nekódující oblast

cDNA – 'complementary deoxyribonucleic acid', DNA vzniklá reverzním přepisem z RNA

cRNA – RNA vzniklá přepisem z virové RNA

vRNA – virová RNA

ORF – otevřený čtecí rámec

PCR – polymerázová řetězová reakce

RT – reverzní transkripce

RdRp – RNA dependentní RNA polymeráza

TAHV – Ťahyňa virus

BUNV – virus Bunyamwera

LACV – La Crosse virus

1. Úvod

Viry jsou obligatorní intracelulární parazité provázející lidstvo snad od samého počátku bytí. Ačkoliv jsou daleko menší než všechny ostatní formy života, mají velice jednoduchou stavbu a obsahují jen jeden druh nukleové kyseliny, nic to neubírá na jejich tajemnosti a zákeřnosti. Čeleď *Bunyaviridae* je obrovská skupina zahrnující jak živočišné, tak rostlinné viry. Mnohé z nich také tvoří velmi významné lidské patogeny. Některé z nich jsou právem považovány za reálnou hrozbu při využití coby biologické zbraně. Jejich nebezpečnost a obrovská síla netkví pouze v již existujících zástupcích, ale též možnosti rychlého přizpůsobení se rozličným podmínkám a vznikem nových variant kmenů. Bunyaviry jsou RNA viry a jako takové jsou předurčeni k rychlému a efektivnímu vývoji. Tyto viry však zašly ještě dále. Podobně jako viry chřipky mají genom tvořený několika segmenty. To jim umožňuje ještě další evoluční výhodu v možnosti volného genomického přeuspořádání segmentů mezi zástupci stejné skupiny. Síla tohoto mechanismu se neukazuje pouze u chřipkových virů. I bunyaviry ze skupiny Bunyamwera v minulosti dokázaly svou moc. Ngari virus, vzniklý přeuspořádáním segmentů dvou různých virů, stál za vypuknutím epidemie hemoragické horečky v Keni a Somálsku. Ačkoliv onemocnění virem Ťahyňa nebylo dosud fatální a spíše uniká pozornosti lékařů, obdobné onemocnění způsobené příbuzným a biologicky podobným virem La Crosse je ve Spojených státech amerických reálnou hrozbou, ohrožující děti smrtelnou encefalitidou. Již několik let se proti němu američtí vědci snaží vyvinout účinnou vakcínu. Přenos téměř všudypřítomnými komáry pak dává skrytému nebezpečí nový rozměr. Dnešní moderní doba umožňující procestovat svět během velmi krátkého času přispívá k dalšímu šíření a vzniku virů se zcela novou kombinací biologických vlastností. Pro účinnější boj s biologickými agens musíme pochopit jejich samotnou podstatu jak cirkulace v přírodě, tak jejich molekulární charakteristiku. Jako všechno na světě prochází i viry určitým stupněm vývoje. Naučili jsme se již mnohému, nicméně nesrovnatelně více se ještě naučit musíme. Stejně jako musíme ověřovat a upravovat pravdy již dávno objevené. Ve virologii podobně jako v celé biologii nic neplatí dokonale.

2. Hlavní cíle práce

1. Sekvenční analýza malého a středního genomického segmentu souboru kmenů viru Ťahyňa lišících se biologickými vlastnostmi.
2. Pokus o identifikaci molekulárních determinant virulence viru Ťahyňa.
3. Srovnání a interpretace získaných dat vzhledem k dalším zástupcům čeledi *Bunyaviridae*.

3. Literární přehled

3.1. Čeleď Bunyviridae

Čeleď *Bunyviridae*, čítající více jak 350 virů, je jednou z největších čeledí zahrnující živočišné viry vůbec. V současné době rozeznáváme v rámci této čeledi pět rodů, z nichž ovšem jen čtyři jsou viry živočišné – Orthobunyavirus (dříve Bunyavirus), Hantavirus, Nairovirus a Phlebovirus. Poslední rod, Tospovirus, tvoří viry rostlinné. Celou čeleď dále ještě doplňují viry nezařazené ani do jednoho z rodů. Dříve rozeznávaný rod Uukuvirus je nyní řazen jako séro skupina do rodu Phlebovirus (Nichol *et al.*, 2005). Většina zástupců čeledě *Bunyviridae* představuje členovci přenášené viry, tzv. arboviry (z angl. arthropod borne virus). Výjimkou je rod Hantavirus. Viry tohoto rodu, pojmenovaném po řece Han v Jižní Koreji, jsou přenášeny výhradně vzdušnou cestou z výměšků infikovaných hlodavců (Hart *et* Bennet, 1999). Viry ostatních rodů jsou přenášeny jednak dvoukřídlym hmyzem (Diptera), například zástupci čeledě *Culicidae* (Orthobunyavirus) a *Psychodidae* (Phlebovirus), jednak klíšťaty (zástupci rodů Nairovirus, Phlebovirus, Orthobunyavirus) (Soldan *et* Gonzalez-Scarano, 2005). Bližší přehled udává tabulka č. 1. Rostlinné Tospoviry jsou přenášeny několika druhy třásněnek (*Thripidae*) (Wijkamp *et al.*, 1993).

Tabulka č. 1 – Přehled několika zástupců čeledi *Bunyviridae*.

Rod	Virus	Hostitel/onemocnění	Geografické rozšíření	Vektor
Orthobunyavirus	Ťahyňa	Člověk / Horečnaté	Evropa	Komár (Aedes, Culex)
	La Crosse	Člověk / Encefalidity	Severní Amerika	Komár (Aedes triseriatus)
	Bunyamwera	Člověk / Horečnaté, encefalidity	Afrika	Komár (Aedes)
Hantavirus	Hantaan	Člověk / HFRS ¹	Asie, Evropa	-
	Puumala	Člověk / HFRS ¹ (mírné)	Asie, Evropa	-
	Sin Nombre	Člověk / HPS ²	Severní Amerika	-
Nairovirus	Krymsko-konžská hemoragická horečka	Člověk / hemoragická horečka	Asie, Afrika, Evropa	Klíště (Hyalomma)
	Nairobi sheep disease	Ovce, kozy (Člověk) / hemoragické gastroenteritidy	Afrika, Asie	Klíště (Rhipicephalus appendiculatus)
Phlebovirus	Horečky údolí Rift	Člověk, dobytek / Hepatitidy, hemoragie	Afrika	Komár (Aedes, Culex)
	Uukuniemi	Mořští ptáci	Evropa	Klíště
	Toscana	Člověk / Horečka, aseptická meningitida	Evropa	Flebotomus

¹ Hemoragická horečka s renálním syndromem. ² Hantavirový pulmonální syndrom.

3.2. Virus Ťahyňa

Virus Ťahyňa (TAHV) taxonomicky řadíme do rodu *Orthobunyavirus*. Rod je pojmenován po jeho prototypovém viru Bunyamwera (BUNV), poprvé izolovaném v Ugandě. Přesná taxonomie více než 150 zástupců tohoto rodu není zcela jasná, kvůli nedostatku biochemických charakteristik většiny izolátů,. Dříve bylo zejména na základě sérologických vlastností rozeznáváno 18 séroskupin (Calisher, 1996). Podle současné nomenklatury (Nichol *et al.*, 2005) je však rod dělen spíše do 48 tzv. druhů (angl. species) či skupin (např. Acara virus, Anopheles A virus, Bunyamwera virus, virus Kalifornské encefalidity a mnohé další). Do skupin jsou pak přiřazeny jednotlivé izoláty či subtypy. TAHV je řazen do skupiny (séroskupiny) Kalifornských encefalid, společně s viry Kalifornské encefalidity, La Crosse (LACV), Jamestown Canyon (JCV), San Angelo (SAV), Snowshoe hare (SSHV) a dalšími.

3.2.1. Historie, distribuce a cirkulace v přírodním ohnisku

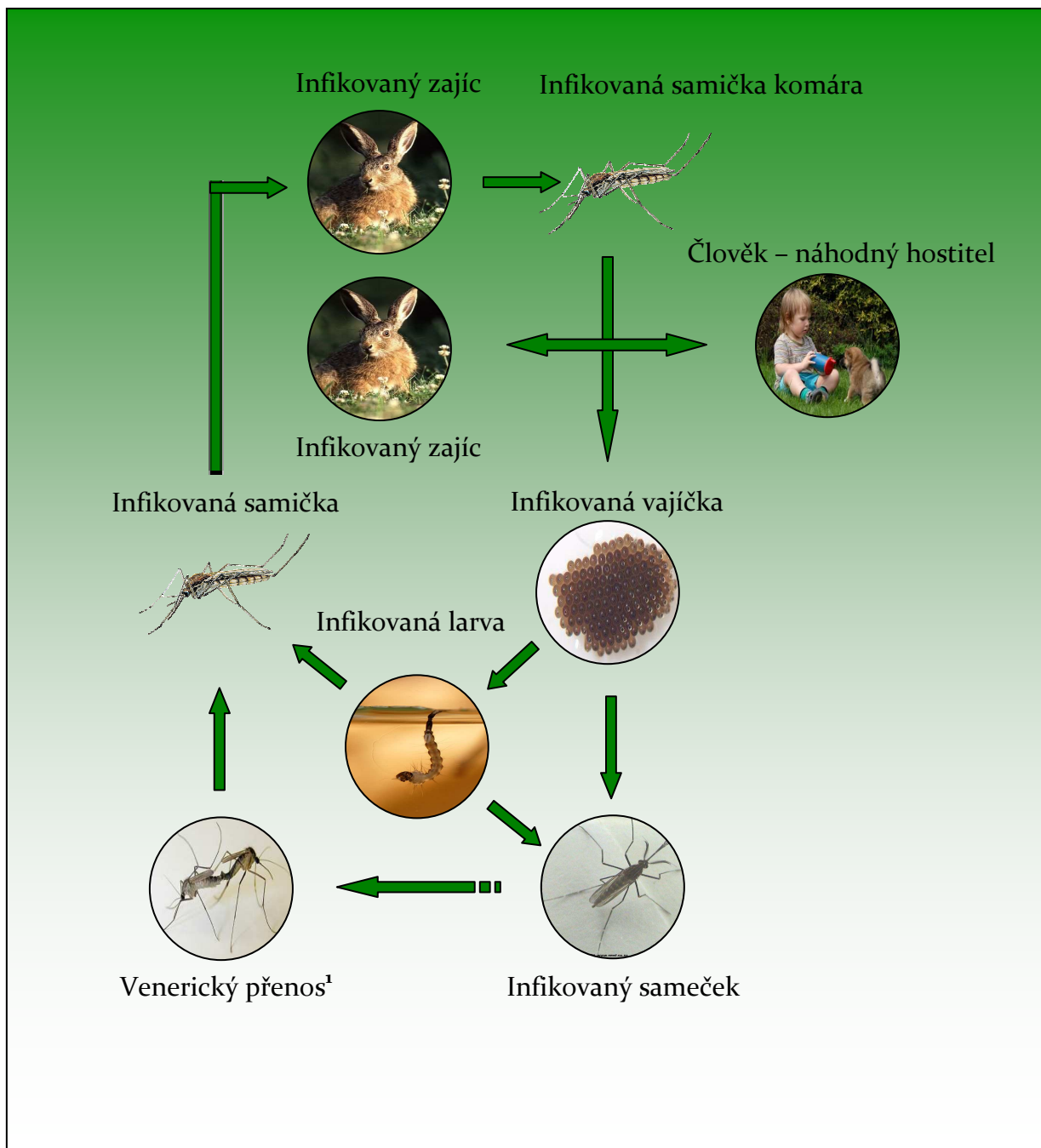
Bunyaviry, či lépe řečeno rod *Orthobunyavirus*, jsou především přenášeny komáry, i když lze najít několik výjimek (Tete virus přenášený klíšťaty) (Swanepoel *et Burt*, 2009). V roce 1943 a 1944 byl v Kalifornii izolován z komárů neurotrovní virus, který nebylo možné zařadit k žádnému tehdy známému agens. Byl pojmenován jako virus Kalifornské encefalidity a od tohoto okamžiku se také datuje historie skupiny virů nazývané po svém prvním izolovaném zástupci – tzv. viry Kalifornské encefalidity (Hammon *et Reeves*, 1952).

Samotný TAHV byl poprvé izolován V. Bárdošem a V. Danielovou v roce 1958 z komárů¹ *Aedes caspius* a *Ae. vexans* odchycených poblíž vesnice Ťahyňa a Križany na východním Slovensku. Jednalo se tehdy o vůbec první arbovirus přenášený komáry ve střední Evropě (Bárdoš *et Danielová*, 1959). Záhy na to byla cirkulace TAHV potvrzena v dalších evropských a asijských státech (Francie, Polsko, Itálie, Čína) (Bárdoš, 1974; Lu *et al.*, 2009). Antigenně k viru Ťahyňa velmi příbuzný virus Lumbo byl izolován v Africe roku 1960 (Kokernot *et al*, 1962). V současnosti je však pokládán spíše za variantu viru TAHV, nežli za samostatný druh (Hubálek, 2008).

Coby arbovirus sdílí TAHV s ostatními arboviry i jejich typickou vlastností - přírodní ohniskovost. Podmínky pro vznik a udržování přírodního ohniska, jež byly formulovány na začátku roku 1939 akademikem Pavlovským, zahrnují určité biotické, abiotické a geografické vlivy. V těchto velice specifických oblastech je potom virus přenášen mezi vektory a rezervoárovými zvířaty, přičemž člověk se může nakazit náhodně při vstupu do ohniska (Pavlovskij, 1939). Vektorem TAHV bývá hlavně komár druhu *Ae. vexans*, nicméně virus byl úspěšně izolován i z komárů *Ae. caspius*, *Ae. cinereus*, *Ae. sticticus*, *Ae. dorsalis*, *Culiseta (C.) annulata* a *Culex (Cul.) modestus* (Danielová, 1962a; Danielová et Holubová, 1977; Hubálek, 2008). Recentně byl TAHV izolován z komára *Ae. detritus* (Li et al., 2010). Jako rezervoárová zvířata jsou považováni zejména zajáci (*Lepus europaeus*), v menší míře také srnci (*Capreolus capreolus*) a divoká prasata (*Sus scrofa*) (Hubálek et al., 1993). Přírodní ohniska se vykytují nejčastěji v periodicky zaplavovaných lužních lesech sloužících coby líníště komárů a umožňující jejich masové rozšíření (Danielová, 1978).

Důležitým aspektem přežívání arbovirů (zvláště komáry přenášených) v přírodním ohnisku je mechanismus přezimování. Průkaz transovariálního přenosu TAHV komárem *Ae. vexans* (Danielová et Ryba, 1979), ale i amerického viru La Crosse (Watts et al., 1973) nabídl relativně elegantní řešení tohoto problému, neboť komáři rodu *Aedes* zimu nepřežívají, jejich vajíčka ano. Nicméně izolace TAHV z komára *Cul. modestus*, ale především *C. annulata* nabízí ještě možnost další, a to přezimování TAHV v hibernujících dospělých. Skutečně, TAHV byl detekován v *C. annulata* i 181 dní po infekci, přičemž 122 dní z toho komár hibernoval (Danielová et Minář, 1969). Následně byl izolován i z hibernujících dospělců odchycených ve volné přírodě. Protože u komárů jsou pouze samičky krevsající, transovariální přenos infekce na samce by byl slepým článkem cyklu. V případě LACV však byl prokázán i venerický přenos při kopulaci infikovaného samce s neinfikovanou samicí (Thompson et Beaty, 1977). Schéma cirkulace viru v přírodě ukazuje obrázek 1.

¹ Ačkoli je v současné době uvažováno o zařazení některých komárů rodu *Aedes* do samostatného rodu *Ochlerotatus* (Reinert, 2000), v této práci ponechávám pro lepší přehlednost původní řazení a *Ochlerotatus* považuji za podrod rodu *Aedes* (Savage et Strickman, 2004).

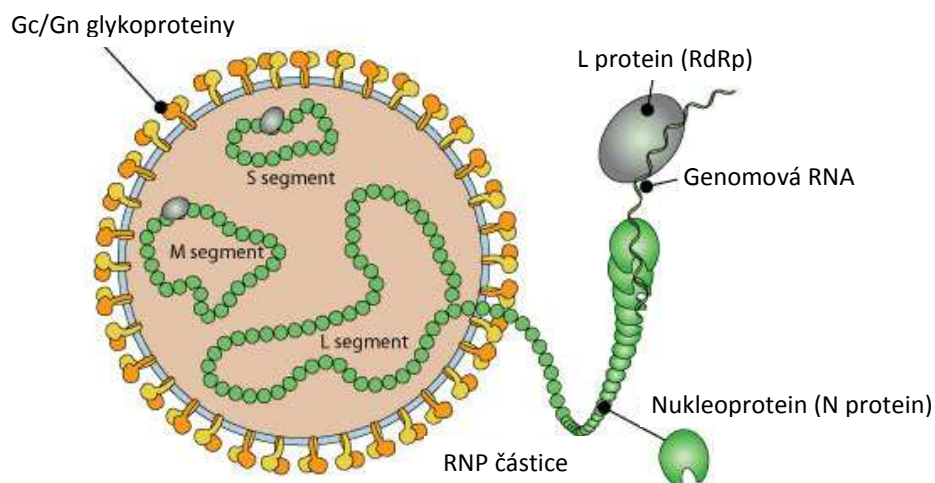


Obr. 1 Cyklus viru TAHV v přírodním ohnisku. ¹Prokázán u LACV.

3.2.2. Struktura viru Ťahyňa

Velikost obalených sférických virionů TAHV je, stejně jako ostatních virů skupiny kalifornských encefalitid, asi 100 nm v průměru (Obijeski et Murphy, 1977). Genom viru je tvořen třemi segmenty jednovláknové RNA negativní polarity. Jednotlivé segmenty jsou označeny podle své velikosti jako velký L (~ 6980 nt), střední M (~ 4490 nt) a malý S (~

984 nt). Každý ze segmentů je ohraničen různě dlouhými nekódujícími sekvencemi (NCR). Konce 5' a 3' NCR obsahují vysoce konzervovanou sekvenci. To umožňuje každému vlákně vytvářet cirkulární nebo tzv. 'panhandle' struktury, pozorovatelné v elektronovém mikroskopu (Obijeski *et al.*, 1976a). Zároveň je každý genomový segment blízce asociován s mnoha molekulami strukturního proteinu N a společně ještě s RNA-dependentní RNA polymerázou (RdRp) tvoří tzv. ribonukleoproteinové (RNP) částice (Elliott, 1990). Kromě dvou strukturních proteinů, N a RdRp, obsahují viriony ještě dva další strukturní proteiny zvané G_N a G_C zanořené do lipidového obalu, vytvářející tak na povrchu částice 10 nm dlouhé výběžky (Obijeski *et al.*, 1976b). Schématickou strukturu virionu ukazuje obrázek 2.



Obr. 2 Bunyavirová částice (převzato a upraveno z <http://www.expasy.ch/viralzone/>)

3.2.3. Velký segment

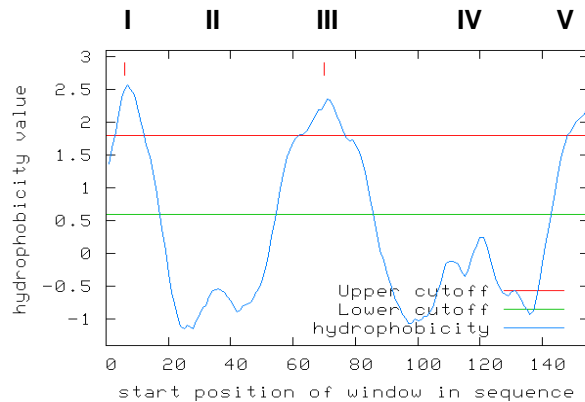
Největší genomický segment viru, L segment, je dlouhý u LACV 6980 nt. Kompletní nukleotidová sekvence tohoto segmentu však u TAHV nebyla dosud určena. Jediný otevřený čtecí rámec (ORF), ohraničený na koncích 61 nt (5') a 127 nt (3') NCR, kóduje asi 180 kDa velký protein – RdRp (L protein) (Endres *et al.*, 1989; Elliott, 1990). Zároveň byla také prokázána endonukleázová aktivita tohoto proteinu, díky níž L protein odštěpuje z hostitelských mRNA čepičku spolu ještě s několika nukleotidy a umožňuje tak syntézu virové mRNA z (-)vRNA (tzv. cap snatch) (Pettersson *et al.*, 1984). Podobný mechanismus,

avšak probíhající v jádře a odštěpující čepičku z hostitelské pre-mRNA, byl prokázán i u čeledi *Orthomyxoviridae* (Palese *et Shaw*, 2007).

3.2.4. Střední segment

Střední segment TAHV je dlouhý asi 4490. Kóduje jeden ORF, který je na 5' a 3' koncích ohraničen 61, respektive 106 nt dlouhými nekódujícími sekvencemi. ORF je translatován do jediného 4323 aminokyselin (aa) dlouhého polyproteinu, který je kontrastně štěpen hostitelskou proteázou na 968 aa dlouhý Gc protein, 286 aa dlouhý Gn protein a nejmenší 174 aa dlouhý nestrukturní protein NSm, který byl ale prokázán pouze u rodu *Orthobunyavirus* a *Tospovirus* (zde ale kódovaný jako ambisense) (Elliott, 1990; Kormelink *et al.*, 1992). Situace je ještě komplikována rodem *Phlebovirus*, jež, jak bylo prokázáno, kóduje nejméně jeden nestrukturní protein (Di Bonito *et al.*, 1997). Ten ale nebyl nalezen u jiného zástupce tohoto rodu – viru *Uukuniemi* (Rönholm *et Pettersson*, 1987).

Asi 11 kDa velký NSm transmembránový protein je lokalizovaný společně s Gc a Gn proteinem do Golgiho aparátu (Fuller *et Bishop*, 1982; Nakitare *et Elliott*, 1993). Pomocí predikce hydrofóbního profilu bylo u tohoto proteinu zjištěno pět domén, z nichž tři jsou hydrofóbní a dvě hydrofilní (Obr. 3). Zatímco interní část proteinu, zejména doména III (ale i části domén II a IV), je spíše postradatelná a dokonce schopná nést cizí peptid, doména I, účastní se zrání virionu, je naproti tomu zcela nepostradatelná. Doména V slouží zřejmě coby signální sekvence pro Gc protein, ale je schopná interagovat i s ostatními virovými proteiny (Shi *et al.*, 2006). NSm zřejmě také vytváří společně s buněčným aktinem jakási vlákna mající funkci „lešení“ při transportu RNP z místa jejich vzniku (tzv. „virových továren, viral factories“) k akumulovaným Gc a Gn proteinům v membráně Golgiho aparátu a umožňuje následné pučení. Při tomto se zřejmě inkorporují i malé části jak endogenního aktinu, tak i nestrukturního proteinu NSm (Fontana *et al.*, 2008). Zajímavostí je, že tento protein u rostlinných tospovirů vytváří podobné struktury (ovšem bez přítomnosti aktinu) napříč plasmodesmaty a tím umožňuje přímý transport RNP z buňky do buňky (Storms *et al.*, 1995).



Obr. 3. Hydrofóbní profil NSm proteinu viru Bunyamwera (prototypového viru rodu Orthobunyavirus) provedený pomocí programu TopPred (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>)

Povrchové glykoproteiny Gc a Gn (původně nazývané podle rychlosti migrace v polyakrylamidovém gelu G1 a G2) jsou velké asi 125, respektive 39 kDa (Obijeski *et al.*, 1977). Oba jsou kódovány středním segmentem, ale na polyproteinu jsou od sebe odděleny nestrukturním proteinem NSm. Po expresi podstupují oba proteiny řadu posttranslačních modifikací, akumulují se v membráně Golgiho aparátu a podílí se na zrání virové částice. Gn stejně jako Gc protein je považován za integrální membránový protein typu I s N koncem směřovaným do exoplazmatického prostoru a C koncem směřovaným do cytoplazmy (u zralé částice je poté N konec orientován vně virionu). V případě Gn proteinu je cytoplasmatický konec (CT – z angl. ‘cytoplasmatic tail’) dlouhý 78 aminokyselin. U proteinu Gc je tento konec výrazně kratší, mající 26 aminokyselin. Kvůli absenci matrixového proteinu v bunyavirové částici se zdá být CT konec Gn proteinu kriticky důležitý pro sbalování virové částice díky interakci s ribonukleoproteiny jak bylo prokázáno u fleboviru Uukuniemi. Konce CT obou proteinů pravděpodobně hrají důležitou úlohu také v membránové fúzi (Shi *et al.*, 2007; Överby *et al.* 2007). Oproti CT doménám je transmembránová doména proteinu Gn podstatně kratší (19 aminokyselin). Obsahuje však vysoce důležitou signální sekvenci pro směrování a zadržování heterodimeru Gc-Gn v membráně Golgiho aparátu (Shi *et al.*, 2007).

Na základě bioinformaticko-proteomických analýz (Garry *et al.*, 2004) byla zjištěna podobnost určitých sekvencních motivů bunyavirového Gc proteinu s obalovým proteinem I viru Sindbis (*Togaviridae*, Alphavirus) – fúzním proteinem třídy II, a tak postulována jeho fúzní aktivita, která byla i následně experimentálně potvrzena pro 22 aa dlouhý hydrofóbní peptid proteinu Gc (Plassmeyer *et al.*, 2007). Ačkoliv některé práce

prokazují důležitou roli pro membránovou fúzi jak Gc, tak i Gn proteinu (Jacoby *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 2007).

Někteří autoři také považují protein Gc za hlavní ligand pro receptory na obratlovčích buňkách a protein Gn naopak za ligand pro vazbu na receptory buněk komářího střeva. V takovém případě je potom Gn na povrchu částice částečně překryt Gc a po jeho odštěpení proteázami komářího střeva může plně odhalený Gn sloužit coby ligand (Ludwig *et al.*, 1991). Tento model je ale stále nebyl spolehlivě potvrzen (Hacker *et al.*, 1995). Přesné strukturní modely bohužel scházejí.

Jak již bylo uvedeno, oba proteiny podstupují řadu posttranslačních modifikací, zejména N-glykosylací. Protein Gn TAHV obsahuje 2 potenciální N-glykosylační místa, protein Gc potom místa 4. Nicméně v predikci glykosylačních míst proteinu Gc byla zjištěna jistá variabilita v případě jednoho přírodního izolátu TAHV (Kilian *et al.*, 2010). Přítomnost glykanů u membránových proteinů ve všech očekávaných místech byla prokázána a jejich funkce ověřena u viru Bunyamwera. Zatímco mutace zasahující glykosylační místo proteinu Gn zcela omezila správné skládání proteinu, transport do Golgiho aparátu a tím i produkci dalších infekčních částic, zrušení glykosylačních míst proteinu Gc sice mělo vliv na množení viru v tkáňové kultuře, ale nebylo v žádném případě letální (Shi *et al.*, 2005). Glykany na proteinu Gn se proto jeví jako klíčové pro životní cyklus viru, zatímco glykosylace proteinu Gc pouze přispívají k jeho množení. Bohužel žádná studie zaměřující se na roli glykosylací TAHV nebyla dosud provedena, ačkoliv obsahuje několik potenciálních míst navíc (Campbell *et al.*, 1999; Kilian *et al.*, 2010).

3.2.5. Malý segment

Ačkoliv je tento segment nejmenší ze všech, nic to neubírá na jeho důležitosti, neboť protein N (z angl. nucleocapsid), kódovaný tímto segmentem, je v infikovaných buňkách nejhojnější a zároveň kriticky důležitý pro úspěšný replikační cyklus viru (Griot *et al.*, 1993). U rodů Orthobunyavirus, Phlebovirus a Tospovirus je kódován ještě další produkt, a to nestrukturní protein NSs. Avšak jen u rodu Orthobunyavirus je kódovaný v překrývajícím se čtecím rámci, zatímco u zbylých dvou jako 'ambisense' (Bishop *et al.*,

1982; Fuller *et al.*, 1983). Rod Hantavirus a Nairovirus kódují pouze protein N, ačkoliv u některých zástupců prvně zmiňovaného rodu (přenášených hlodavci podčeledí *Sigmodontinae* a *Arvicolinae*) lze nalézt další čtecí rámec překrývající první podobně jako je tomu u orthobunyvirů a teoreticky kódující rovněž nestrukturní NSs. Produkt tohoto dalšího ORF se však podařilo detekovat v infikovaných buňkách až v roce 2007. Tím byla definitivně potvrzena funkčnost ORF pro NSs u hantavirů (Jääskeläinen *et al.*, 2007). Zajímavostí je absence NSs ORF u virů skupiny Anopheles A, Anopheles B a Tete, zástupců rodu Orthobunyavirus (Mohamed *et al.*, 2009).

Protein N je složen asi z 235 aa a jeho velikost činí přibližně 25 kDa. Primární, nikoli však jediná funkce tohoto proteinu je enkapsidovat jak virovou RNA, tak virovou komplementární RNA (cRNA), tím stabilizovat jejich sekundární strukturu a zároveň umožňovat transkripci pomocí L proteinu. Vše se děje jednak díky schopnosti proteinu N oligomerizovat, a jednak vázat se na RNA. Vazba probíhá sekvenčně specificky na jejím 5' konci, ale také nespecificky na ostatních částech RNA. Schopnost oligomerizace se zdá být jedinečnou vlastností proteinu N a probíhá zřejmě systémem N-konec k N-konci a C-konec k C-konci (Leonard *et al.*, 2005; Osbourne *et Elliott*, 2000). Vazbou na RNA také protein N umožňuje správné utváření 'panhandle' struktury a je tudíž považován za RNA chaperon (Mir *et Panganiban*, 2006). Další důležitou funkcí proteinu N je vazba jednak na protein L a vznik RNP a také na povrchové glykoproteiny Gc a Gn umožňující tak skládání virové partikule.

Funkce cytoplazmatického (může být ale detekován i v jádře (Weber *et al.*, 2001)) proteinu NSs, velkého asi 12 kDa není přesně známá. Ačkoliv není tento protein kódován všemi zástupci čeledi *Bunyaviridae* a není ani nezbytný pro úspěšnou replikaci viru, může přispívat nebo dokonce zhoršovat průběh onemocnění (Janssen *et al.*, 1986; Bridgen *et al.*, 2001). Colón-Ramos *et al.* (2003) prokázal sekvenční podobnost tohoto proteinu s proteinem Reaper – proapoptického proteinu z mouchy *Drosophila melanogaster*. Ačkoliv C-konce obou proteinů jsou spíše odlišné, N-konce vykazují vysokou míru konzervace, což s sebou přináší i řadu podobných funkcí. Pokusy *in vitro* na savčích buňkách prokázaly, že NSs, stejně jako Reaper, indukuje uvolňování cytochromu c z mitochondrií a tím následnou aktivaci kaspáz (cysteinové proteázy účastníci se mimo jiné apoptózy) vedoucí až k programované buněčné smrti. Tato role je však nejasná, protože u BUNV byl prokázán účinek NSs naopak protiapoptický (Kohl *et al.*, 2003). Další

funkcí, společnou pro oba proteiny (Reaper a NSs), je schopnost přímo inhibovat translaci buněčných proteinů. *In vivo* pokusy pak poukázaly na schopnost proteinu NSs, exprimovaného intracerebrálně inokulovaným rekombinantním virem Sindbis (*Togaviridae*, Alphavirus), způsobovat těžké encefalitidy a následnou smrt pokusných zvířat právě díky indukci apoptózy v neurální tkáni (Colón-Ramos *et al.*, 2003). Nicméně v hmyzích buňkách nebyl dosud pro- ani proti-apoptický účinek tohoto proteinu prokázán a jeho funkce v hmyzím systému je stále nejasná (Blakqori *et al.*, 2007). Méně kontroverzní a podle některých autorů dokonce důležitější rolí proteinu NSs je v inhibici interferonové α i β odpovědi (interferonová odpověď I typu) v infikovaných buňkách a tím úspěšné překonávání první obranné linie hostitelského organismu (Bridgen *et al.*, 2001; Blakqori *et al.*, 2007).

3.2.6. Replikace ve vnímavé buňce

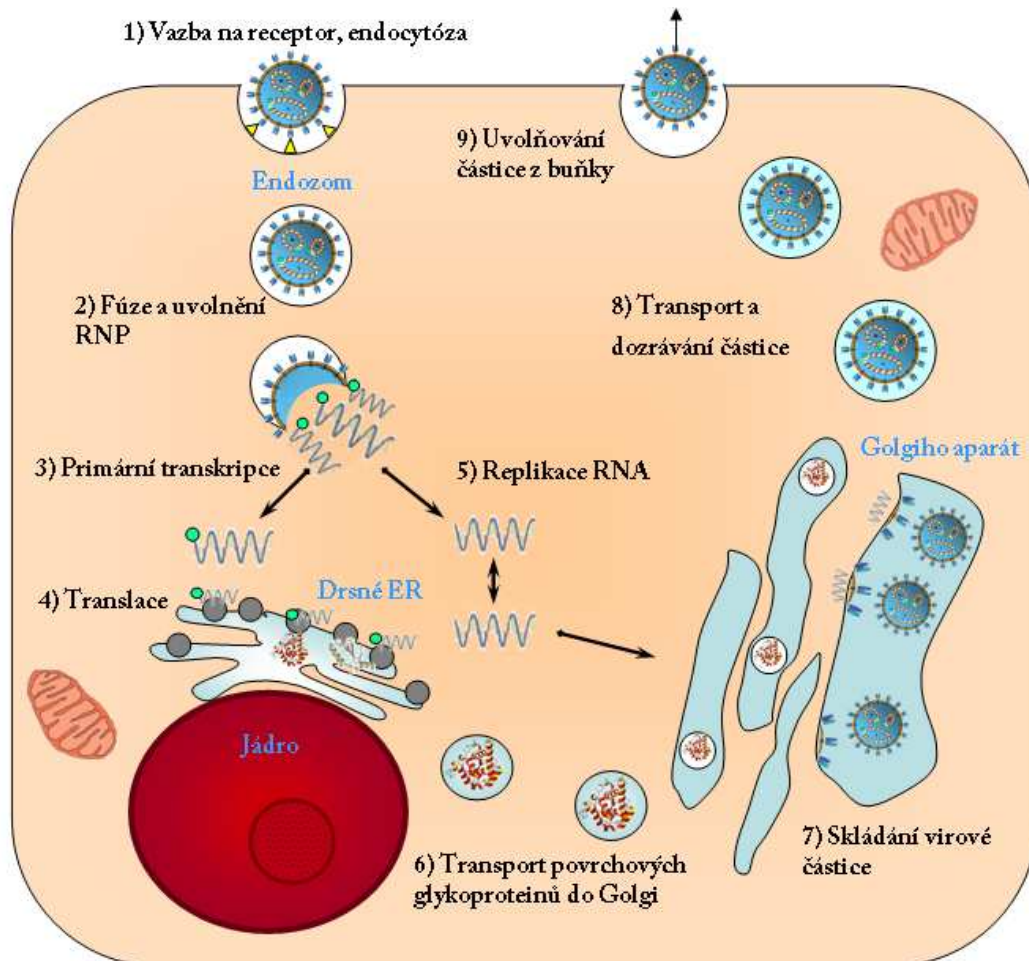
Viry jsou obligátní intracelulární paraziti využívající ke svému životu vnímavou buňku. Replikace TAHV, stejně jako ostatních zástupců RNA-virů (s výjimkou čeledě *Orthomyxoviridae* a *Bornaviridae*), probíhá v cytoplazmě hostitelské buňky, avšak rozličnými mechanizmy (Ball, 2007).

Způsob, jakým TAHV proniká do hostitelské buňky, není zcela znám. Nicméně obecný postup je shodný pro většinu obalených virů. Průběh replikace ve vnímavé buňce znázorňuje obrázek 4. Prvotním krokem je interakce obalového proteinu s vhodným buněčným receptorem. Ligandem pro receptor komářích i savčích buněk je u skupiny virů Kalifornské encefalitidy (California group) zřejmě protein Gc (Hacker *et al.*, 1995). Ačkoliv některé práce považují Gc protein za ligand savčích a komářích buněk, vyjma buněk komářího střeva, jejichž ligandem by měl být protein Gn (Ludwig *et al.*, 1991). Přesná role obou povrchových glykoproteinů ve vazbě na buňku však zůstává nadále tajemstvím, stejně jako identifikace jejich receptoru v hmyzím a obratlovčím systému. Krátce po přichycení částice na buňku dochází k endocytóze pomocí klatrinem obalených váčků. Zde díky mírně kyselému pH podstupují proteiny Gn a Gc změnu konformace umožňující fúzi obalu částice s membránou endosomu (Gonzales-Scarano *et al.*, 1984; Pobjecky *et al.*, 1986). Tím dochází k uvolnění RNP do cytoplazmy napadené buňky (Hacker *et Hardy.*,

1997). Ačkoliv je Gc (či přesněji jeho část) považován za hlavní protein umožňující fúzi (Plassmeyer *et al*, 2007) zdá se, že je schopný způsobovat fúzi jen v asociaci s proteinem Gn (Jacoby *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 2007).

Po uvolnění RNP dochází v buněčné cytoplazmě k rozvolnění struktury 'panhandle', uvolnění N proteinu z 3' konce RNA a primární transkripci do mRNA pomocí L proteinu 'cap snatch' mechanismem, popsaným výše. Důležité je, že coby templát pro syntézu mRNA může sloužit pouze RNA asociovaná s nukleoproteinem, nikoliv volná virová RNA (Dunn *et al.*, 1995). Syntetizovaná mRNA není polyadenylována (Elliott, 1990). Po primární transkripci a syntéze proteinů začíná vlastní replikace virové (v)RNA. Nejprve je syntetizována komplementární cRNA, která je stejně jako mRNA pozitivní polarity. Narozdíl od ní ale nemá čepičku. Z cRNA je následně syntetizována vRNA. Tento poměrně složitý mechanismus, kdy protein L začne používat na primeru nezávislou syntézu RNA namísto použití čepičky s oligonukleotidy není příliš známý. Pravděpodobně však souvisí s vazbou proteinu N na cRNA a vRNA, tato vazba na mRNA zřejmě díky čepičce není možná (Schmaljohn *et Nichol*, 2007). Replikace vRNA je velice komplexní proces probíhající v tzv. „virových továrnách“. Toto jsou útvary složené převážně z Golgiho aparátu, mitochondrií, endoplazmatického retikula a zvláštních tubulárních struktur, které slouží pravděpodobně jako spojky mezi jednotlivými organelami. Virový protein L je koncentrován v globulární doméně, kde je i zároveň vysoká koncentrace proteinu N, který chrání nově syntetizovaná vlákna RNA za vzniku RNP. Tyto nově vzniklé částice jsou transportovány pomocí aktin-myosinových motorů a vláknitých struktur tvořených proteinem NSm a aktinem směrem k místu, kde jsou velmi hustě koncentrovány povrchové glykoproteiny Gc a Gn (Fontana *et al.*, 2008). Tyto dříve nasyntetizované proteiny byly kontrastně vyštěpeny z polyproteinu. V lumen endoplazmatického retikula byly glykosylovány, díky vzniku heterodimeru Gn-Gc schopny opustit lumen a následně se akumulovat v Golgiho aparátu. Samotný proces pučení do Golgiho aparátu bohužel také není do detailu známý. Po sbalení je částice transportována k buněčnému povrchu a uvolňována. Zajímavým faktem, majícím široký evoluční dopad, je schopnost tvořit reasortované částice. Při infekci jedné buňky dvěma různými viry stejné skupiny, může dojít k rekombinaci genomických segmentů obou virů a tím ke vzniku dosud neexistujícího zástupce (Bishop *et al*, 1980; Chandler *et al*, 1990; Chandler *et al.*, 1991;

Borucki *et al.*, 1999). Dobrým příkladem může být virus Ngari (Orthobunyavirus; skupina Bunyamwera), mající zřejmě L a S segment viru Bunyamwera, zatímco M segment viru Batai. Tento mechanismus má široké uplatnění u mnoha zástupců virů majících segmentovaný genom (Yanase *et al.*, 2006; Briese *et al.*, 2006).



Obr. 4. Schématické znázornění replikace TAHV ve vnímavé buňce. **Modře** jsou popsány základní buněčné organely, černě jednotlivé replikační kroky.

3.2.7. Replikace TAHV v komárech a savčích hostitelích

Jednou z charakteristik všech arbovirů je jejich schopnost indukovat virémii v nejméně jednom druhu obratlovce a tím umožnit infekci jejich vektora.

TAHV, jak již bylo psáno dříve, je přenášen hlavně komáry rodu *Aedes*. Virus v komárech však neperzistuje pouze pasivně, nýbrž je schopný se i úspěšně pomnožovat aniž by buňku více ohrozil (Elliott *et al.*, 1986; Scallan *et al.*, 1992). Dynamika množení v komářím těle je pro TAHV dobře známa zejména díky Dr. Danielové (Danielová, 1962b a 1968). Po nasátí infikované krve komárem se virus nejprve pomnožuje v epiteliálních buňkách komářého střeva a následně asi po 4 dnech diseminuje prostřednictvím hemolymfy do ostatních částí těla, přičemž největšího pomnožení v hlavě, hrudi a abdomenu bylo dosaženo 14. den po infekci. Virus úspěšně infikuje i vaječníky a tím umožňuje transovariální přenos, jak bylo popsáno výše. Po dostatečném pomnožení ve slinných žlázách je poté virus schopen infikovat obratlovčího hostitele. Zajímavostí je také výrazné ovlivnění chování komárů po infekci, kdy u transovariálně i orálně infikovaných samic dochází k mnohem dřívějšímu a častějšímu páření se samci než u neinfikovaných (Gabitsch *et al.*, 2006; Reese *et al.*, 2009).

TAHV je na obratlovce přenesen po sání infikovaného komára. Preferovaným modelem pro studium patogeneze je laboratorní myš, z důvodu značné podobnosti infekci lidské. Obecně platí, že mladší jedinci bývají vnímaví více než jedinci starší. Viry Kalifornské skupiny tedy způsobují spíše problém u mladých jedinců. Na středozápadě Spojených států je LACV dokonce považován za nejčastějšího původce encefalitid u dětí (Calisher, 1994). Výjimkou se zdá být jiný virus skupiny Kalifornských encefalitid – Jamestown Canyon, který častěji postihuje spíše starší jedince (Rust *et al.*, 1999).

Po subkutánním přenosu viru na sající myšku, který nejlépe imituje přirozenou infekci člověka, nejprve nastává tzv. extraneurální fáze. V tomto období se virus pomnožuje hlavně v příčně pruhované svalovině, ale v menší míře také v hladkém a srdečním svalstvu. Následně virus proniká zřejmě lymfatickou cestou do krve. Při vysokém titru v krvi může virus dosud neobjasněným způsobem proniknout přes hematoencefalickou bariéru a infikovat CNS. V mozku se virus dále množí především v neuronech a indukuje typický zánět (Griot *et al.*, 1993). LACV také může indukovat apoptózu neurálních buněk (Pekosz *et al.*, 1996). Smrt se dostavuje asi za 3-4 dny po infekci. Navzdory tomuto obecnému schématu, Bennett *et al.* (2008) neprokázal, že by příčně pruhované svalstvo u odstavené myšky představovalo preferenční místo replikace LACV. Navrhnul schéma jiné, v rámci kterého se virus nejprve množí poblíž místa inokulace, následně se šíří krevním řečištěm do čichového epitelu a přes čichový nerv

postupuje do CNS. Je možné, že virus využívá obě tyto cesty, jak čichovým nervem, tak transcelulární či paracelulární přechod přes epiteliální buňky tvořící hematoencefalickou bariéru k průniku do mozku. Možnost šíření nasální cestou však vyvolává spekulace nad další možnou cestou přenosu viru v přírodě. Virus přítomný ve vodě obsahující larvy infikovaných komárů by mohl být přenesen na přirozeného hostitele při pití této vody. Tato alternativa je však, také díky zatím neexistujícímu důkazu, značně kontroverzní.

3.2.8. Klinický obraz onemocnění

První případ onemocnění způsobeného TAHV byl u člověka diagnostikován v roce 1960 ve valtické nemocnici. Úspěšná izolace z krve člověka s chřipkovými příznaky byla provedena v roce 1972. Onemocnění má inkubační dobu dlouhou asi 3-4 dny. Velká část infekcí TAHV však probíhá inaparentně. Pokud ne, Valtická horečka, jak bylo onemocnění posléze nazváno, se může projevit několika různými formami. Nejčastější je tzv. forma chřipková, vyznačující se příznaky běžné virózy (bolesti hlavy, zvýšená teplota) s asi 2 dny trvající horečkou. Vykytuje se u 40% případů. Druhou, také poměrně častou, je forma plicní postihující kolem 30% postižených. Způsobuje pneumonie, bronchopneumonie či záněty pohrudnice (pleuritis). Revmatoidní forma, stejně jako forma břišní postihuje asi 10% nakažených. Vyznačují se bolestí břicha, respektive kloubů. Anginózní forma, objevující se v 7% případů, je charakterizována zánětem mandlí, může být také často doprovázena sekundární infekcí. Nejvážnější forma postihující CNS se vyskytuje u 3% případů a vyznačuje se zánětem mozkových blan-meningitidou (Sluka, 1969; Šimková *et al.*, 1973). Infekce TAHV není, na rozdíl od amerického LACV, infekcí fatální ani nezpůsobuje trvalé následky. V případě LACV byly pozorovány nervové poruchy po zotavení se z infekce (McJunkin, *et al.* 2001) a mortalita je udávána asi 0,5% (Rust *et al.*, 1999).

4. Materiál a metody

Virus

V této práci bylo použito celkem 17 nízkopasažovaných přírodních izolátů viru TAHV izolovaných z komára *Aedes vexans* a jeden nízkopasažovaný kmen izolovaný z komára *Aedes cantans*. Dále práce zahrnovala jeden referenční kmen (236) pasážovaný intramuskulárně a jeden vysoce periferně atenuovaný, termosenzitivní kmen 181/57, který byl odvozen z přírodního izolátu (181) 57-násobným intracerebrálním pasážováním v laboratorní myši. Všechny kmeny byly izolovány Dr. Danielovou a fenotypicky charakterizovány Dr. Málkovou a Dr. Marhoulem v Parazitologické ústavu Československé akademie věd v Praze (nyní Biologické centrum Akademie věd České republiky, v. v. i, Parazitologický ústav, České Budějovice) (Máková, 1971a,b; Máková et Marhoul, 1971). Kmeny navzájem vykazovaly velkou variabilitu v rozličných fenotypových znacích – charakter plaků v buněčné kultuře, termosenzitivitu a virulenci pro laboratorní myš po subkutánním nebo intracerebrálním podání. Bližší pohled dává tabulka č. 2.

Tab. 2 Charakteristika použitých kmenů.

Kmen	Velikost plaků			Termosenzitivita ¹	Virulence		Rok izolace	Místo izolace	Biologický zdroj
	Velké (>3 mm)	Střední (1-3 mm)	Malé (<1 mm)		i.c.	s.c.			
29	++	+		±	+++	+++	1963	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
76	++	+		-	+++	++	1963	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
83	++	+		-	++	++	1963	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
89	++	+		-	+	+	1963	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
90	++	+		-	+++	++	1963	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
94	+	+		-	+++	+++	1963	les Drnholec	<i>Ae. cantans</i>
105	++	+		-	+++	+++	1963	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
106	++	+		-	+++	++	1963	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
181	++	+		±	+++	++	1962	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
181/57		+	++	+	+++	-			
236	++	+		-	+	+	1958	Ťahyňa (SK)	<i>Ae. vexans</i>
1014		++	+	±	++	++	1964	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
4019	++	+		±	++	++	1966	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
4020	+	++		±	+++	++	1966	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
4030	+	++		-	+++	+++	1966	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
4033	+	+		±	++	++	1966	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
4034	+	++		+	++	+	1966	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
4057	+	+		±	+++	+++	1966	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
4060	++	+		±	++	++	1966	les Drnholec	<i>Ae. vexans</i>
5060	+	+		±	++	++	1968	les Lanžhot	<i>Ae. vexans</i>

¹Termosenzitivita byla určena na základě poklesu titru po 15 minutovém vystavení teplotě 50°C.

Termosenzitivní kmeny (+) se vyznačovaly poklesem titru o více než 2 log LD50 nebo TCID50, naopak teplotně rezistentní (-) jsou charakterizovány poklesem menším než 1 log LD50 nebo TCID50. Kmeny označeny jako ± se vyznačovaly poklesem titru větším než 1 log, ale menším než 2 log LD50 nebo TCID50. i.c. – intracerebrální inokulace. s.c. – subkutánní inokulace.

Izolace virové RNA, reverzní transkripce a PCR

RNA byla izolována z myší mozkové suspenze za použití kitu Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Německo) přesně podle instrukcí výrobce. cDNA byla syntetizována pomocí kitu RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Kanada) s 1 μ l (0,01 mM zásobní roztok) specifického sense primeru. Pro segment S byl využit primer TS 1F, pro segment M primer TM 1F (Tab.3).

Pro polymerázovou řetězovou reakci byl využit Plain PPP Master Mix ((150mM Tris-HCl, pH 8.8, 40mM (NH₄)SO₄, 0.02% Tween 20, 5mM MgCl₂, 400_μM dNTPs, 100 U/ml Taq DNA polymeráza; TopBio, Česká republika) s 2 μ l dříve připravené cDNA coby templátem a 1 μ l vhodným 'sense' a 'antisense' primerem (Generi Biotech, Česká republika) (Tab. 3).

Reakční směs (25 μ l):

- 12,5 μ l PPP Master Mix (TopBio, ČR)
- 8,5 μ l vody pro PCR (TopBio, ČR)
- 1 μ l sense a antisense primeru (0,01 mM zásobní roztok)
- 2 μ l templátové cDNA

Primery byly navrženy a analyzovány programem Vector NTI (součást balíku programů Vector NTI suite v. 5.5) podle známé sekvence kmene TAHV 92 - Bárdoš (přístupové číslo databáze GenBank: AF123485 – M segment; Z68497 – S segment). Přehled použitých primerů udává tabulka 3.

PCR reakce byla provedena v cycleru Eppendorf mastercycler gradient a Bioer GenePro s následujícími reakčními podmínkami:

Podmínky PCR:

- 1) denaturace 95°C/5 minut
- 2) 30 cyklů:
 - 1) denaturace 95°C/30 vteřin
 - 2) nasedání primerů 45-55°C */30 vteřin
 - 3) elongace 72°C/1 minutu
- 3) finální elongace 72°C/3 minuty
- 4) udržovací teplota 14°C

* Teplota závislá na použité kombinaci primerů.

Tab. 3 Přehled použitých primerů

Označení	Polarita	Sekvence	Segment	Pozice nasedání
TS F1	Sense	5' - AGTAGTGTACTCCACTTGAATACT - 3'	S	1 - 593
TS R1	Antisense	5' - ACTATTCCTTGTTTACTCTGT - 3'		
TS F2	Sense	5' - ATATATTTGGCATTCTTCCCA - 3'	S	499 - 977
TS R2	Antisense	5' - AGTAGTGTGCTCCACTGAATAC - 3'		
TM F1	Sense	5' - AGTAGTGTACTACCAAGTATAGATAA - 3'	M	1 - 616
TM R1	Antisense	5' - ATGTAAGAATCTAACACAAGACATGT - 3'		
TM F2	Sense	5' - TATCACCTTGATCAAACCTTGCG - 3'	M	508 - 1395
TM R2	Antisense	5' - TGCACGAGGCAGTTGTATGTTTT - 3'		
TM F3	Sense	5' - AACAAATGTAGACAGTGCACATGCG - 3'	M	1310 - 2241
TM R3	Antisense	5' - ATTGATGGGCTCTTTGTAGGAGGAA - 3'		
TM F4	Sense	5' - CATGATGAGATGTGGGATGACTT - 3'	M	2183 - 3060
TM R4	Antisense	5' - GACTTGGATGTGATCTTGAAACC - 3'		
TM F6	Sense	5' - ACAATTGAAGGAACAGAGACTGC - 3'	M	2954 - 3695
TM R6	Antisense	5' - AGGCCTGGTAGTCATTATCAAAG - 3'		
TM F5	Sense	5' - CAAATAAATGACATAGGTGTTTAC - 3'	M	3533 - 4490
TM R5	Antisense	5' - AGTAGTGTGCTTCCAAGTATAA - 3'		

Separace produktů PCR na agarózovém gelu

Po proběhnutí PCR bylo k reakční směsi přidáno 5 µl nanášecího pufru (6X Orange DNA Loading Dye, Fermentas, Kanada) s 5x koncentrovaným barvivem SYBR Green (SYBR Green I, nucleic acid stain, Amresco, USA). Separace byla prováděna v 1% agarózovém gelu a vizualizovaná na transiluminátoru (Visi-blue™ Transilluminator).

Vzorky pro sekvenční analýzu byly extrahovány z gelu pomocí kitu illustra GFX PCR DNA and Gel band purification Kit (GE Healthcare, Velká Británie) přesně podle postupu doporučeného výrobcem. Poté byly jednotlivé fragmenty sekvenovány ve společné laboratoři genomiky Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity a Biologického centra AVČR sekvenátorem ABI Prism 3130 xL (Applied Biosystems).

Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza získaných nukleotidových sekvencí byla provedena dvěma metodami – 'Maximum parsimony' (v programu TNT; Goloboff *et al.*, 2004) a 'Bayesian inference of posterior probability' (v programu Mr. Bayes 3.0b4; Ronquist *et al.*, 2003) s následujícími parametry $nst = 6$, $rates = invgamma$, $ngen = 6.000.000$, $samplefreq = 100$. Analýza byla z důvodu velmi nízké variability segmentu S provedena pouze pro segment M a to jak pro kompletní sekvenci středního segmentu, tak

pro oblasti kódující jednotlivé proteiny. Protože nukleotidový alignment sekvencí byl jednoznačný nebylo potřeba dalších analýz pro nalezení optimálních srovnávacích parametrů. S ohledem na vysokou aminokyselinovou konzervovanost byly pro fylogenetickou analýzu použity sekvence nukleotidové. Homologní sekvence LACV (přístupové číslo databáze GenBank: U70207) byla použita coby 'outgroup'.

Bioinformatická analýza

Získané sekvence byly srovnány pomocí programu BioEdit Sequence Alignment Editor, v. 5.0.6. (Hall, 1999) a AlignX (součást balíku programů Vector NTI suite v. 5.5).

Základní informace o nukleotidové a aminokyselinové variabilitě byly získány programem MEGA4 (Zhang *et Gu*, 1998; Tamura *et al.*, 2007). Plot analýza nukleotidové podobnosti jednotlivých kmenů s referenčním kmenem 236 byla provedena programem Simplot v. 3.5.1 a jednobázovým rozlišením.

Hydrofóbní profil proteinu NSm byl vyhodnocen serverovým programem TopPred (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>) s 'cutoff' hodnotou pro hydrofóbnost 1,8 a KD-měřítkem (Kyte *et Doolittle*, 1982).

N-glykosylační místa byla identifikována serverovým programem NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>). Se standardně nastavenou hraniční hodnotou glykosylačního potenciálu 0,5.

Potenciální místa účastníci se tvorby disulfidických můstků byla vyhodnocena programem Dipro Scratch Protein Predictor (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>).

5. Výsledky

V této práci byl sekvenčně analyzován střední a malý genomický segment 20 biologicky rozdílných kmenů TAHV.

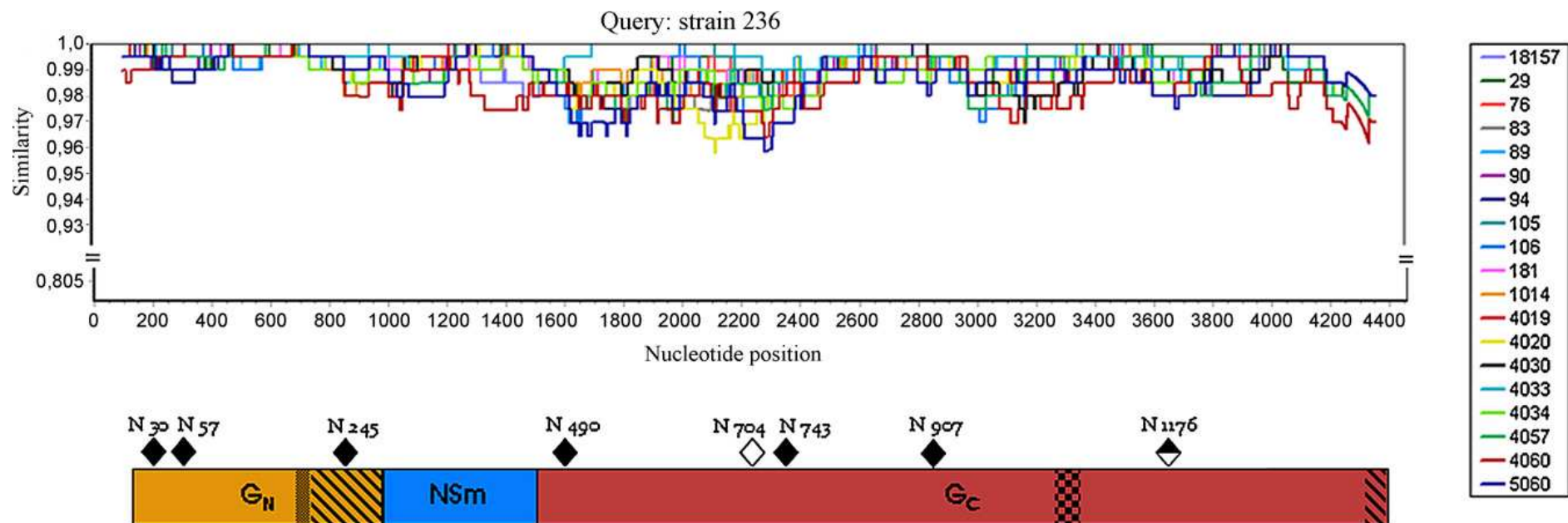
5.1. Střední genomický segment

Střední segment lze rozdělit na několik oblastí. Jednak na regiony kódující strukturální, resp. nestrukturní protein a dále pak na krajové nekódující oblasti.

Celkový přehled míry variability středního segmentu všech analyzovaných kmenů ve srovnání s referenčním kmenem 236 ukazuje obrázek 6.

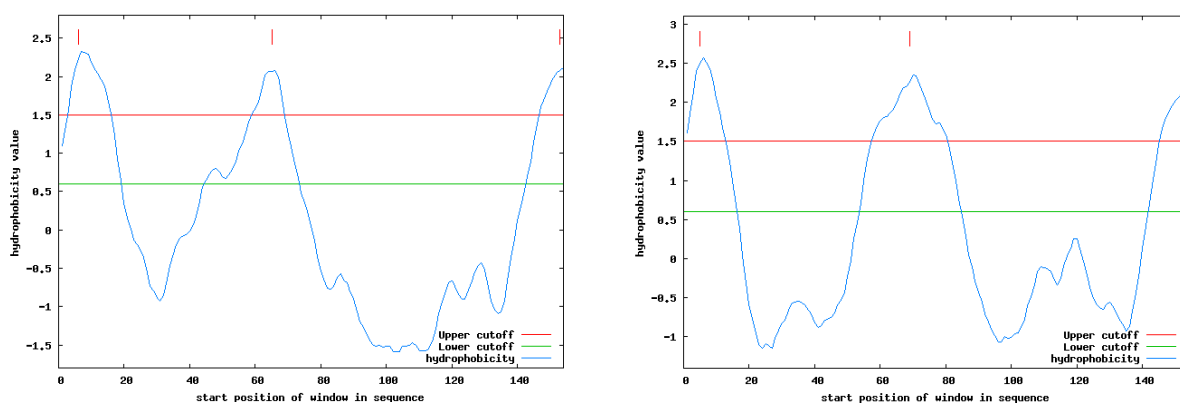
Z nukleotidového srovnání jednotlivých oblastí byla pozorována vysoká míra konzervace jak 3' tak 5' nekódujících oblastí mezi všemi analyzovanými kmeny. V 3' NCR však byla pozorována delece jednoho nukleotidu v pozici G⁴³³⁴ (vzhledem k sekvenci cDNA celého segmentu M) u sedmi kmenů – 29, 76, 83, 89, 181, 4019 a 4060.

Značně konzervovaná byla také oblast kódující povrchový protein G_N s průměrnými 3,9 nukleotidovými záměnami na sekvenci, z nichž 3,6 bylo synonymních a pouze 0,3 nesynonymních. Obě transmembránové domény byly také vysoce konzervované. Aminokyselinové srovnání odhalilo pouze jednu záměnu Ile²²⁸→Thr²²⁸ v cytoplazmatické doméně kmene 4034. Poměr tranzicí a transverzí (si/sv) činil 3,2. Podle odvozené aminokyselinové sekvence byly predikovány celkem 3 potenciální N-glykosylační místa v pozicích N30, N57 a v cytoplazmatické doméně N245. U žádného kmene však nebyla glykosylační místa postižena aminokyselinovou substitucí.



Obr. 6 Simplot analýza jednotlivých izolátů ve srovnání s referenčním kmenem 236 a vyznačenými oblastmi středního genomického segmentu: tečky – transmembránová doména; proužky – cytoplazmatická doména; kostičky – pravděpodobný fúzní peptid a predikovanými N-glykosylačními místy : Černý čtvereček – N-glykosylace predikovaná u všech kmenů; Černo-bílý čtvereček – N-glykosylace predikována u všech kmenů, ale s malou pravděpodobností. Bílý čtvereček – N-glykosylace predikovaná pouze u kmene 1014.

Oblast kódující nestrukturní protein NSm vykazovala celkově vysoký stupeň nukleotidové identity s 4,3 nukleotidovými záměnami v průměru na sekvenci. Z celkového počtu však 2,6 tvořily substituce synonymní a 1,7 nesynonymní. Poměr tranzicí a transverzí byl 2,3. Predikce hydrofóbního profilu proteinu NSm odhalila značnou podobnost s BUNV, včetně třech hydrofóbních a dvou nehydrofóbních domén (Obr. 7).



Obr. 7 Srovnání hydrofóbních profilů proteinu NSm referenčního kmene TAHV 236 a viru BUNV pomocí serverového programu Toppred.

N-koncové domény (I a II) se zdály být téměř úplně konzervované s jedinou aminokyselinovou záměnou v doméně I u kmene 4060 na pozici Val³¹⁷ → Ile³¹⁷ (v porovnání s referenčním kmenem 236). V doméně II potom záměna na pozici Met³⁶² → Ile³⁶² u kmenů 4057 a 5060. Naproti tomu C-koncové domény vykazovaly relativně hodně aminokyselinových záměn oproti kmenu 236. Shrnutí aminokyselinových záměn 3 C-koncových domén je zobrazeno v tabulce č.3.

Tab. 3 Aminokyselinové rozdíly v rámci třech domén proteinu NS_M ve srovnání s kmenem 236

Oblast	Pozice ¹	Kmen	Záměna
Doména III	362	4057, 5060	Met → Ile
	367	všechny	Ile → Val
Doména IV	388	4033	Arg → Gly
	398	4030	His → Asn
	426	1014	Gln → Lys
	428	76, 181, 181/57	Glu → Gly
	432	94	Glu → Ala
	434	4060	Leu → Gln
Doména V	457	89, 90, 181, 181/57	Val → Gly
	468	4034	Val → Ile
	470	181/57	Ile → Leu

¹ Pozice udána ve smyslu celého polyproteinu M.

Největší variabilita mezi jednotlivými izoláty byla odhalena v sekvenci kódující strukturní protein G_C. Průměrně na jednu sekvenci bylo pozorováno 26,6 nukleotidových záměn, z nichž 18,3 bylo synonymních a 8,3 nesynonymních. Poměr tranzicí a transverzí činil 17,7. Oblast považovaná za potencionální fúzní peptid byla zcela konzervovaná u všech izolátů. Pouze jedna aminokyselinová záměna byla pozorována u kmene 236 v cytoplazmatické doméně na pozici Thr⁹⁵² → Ala⁹⁵². Celkově 5 potencionálních N-glykosylačních míst bylo predikováno v sekvenci kódující protein G_C. Nicméně pouze 4 byly společné pro všechny analyzované kmeny, a to v pozicích N490, N743, N907 a N1176. N-glykosylace v pozici N1176 však byla predikována s malým potenciálem. Všechna tato potenciální místa vykazovala vysoký stupeň konzervace. N-glykosylace v pozici N704 byla predikována pouze u kmene 1014.

Predikovaných cysteinů, potenciálně tvořících disulfidické můstky, bylo nalezeno celkem 7 v proteinu G_N a 15 v proteinu G_C. Všechny byly zcela konzervované mezi všemi analyzovanými kmeny TAHV.

Tabulka 5, zobrazující nukleotidové záměny středního segmentu mezi jednotlivými izoláty, stejně jako kompletní aminokyselinový alignment (Obr. 9), je uvedena v příloze.

Fylogenetická analýza založená na oblastech pro G_N a NSm nepřinesla očekávané informace vzhledem k velmi malému množství nukleotidových záměn. Fylogenetický strom, založený na sekvenci celého M segmentu, plně korespondoval s dendrogramem oblasti kódující protein G_C (Obr. 8). Ačkoliv lze ve fylogenetické analýze vysledovat určité větve příbuzných kmenů, žádná korelace s jednotlivými biologickými vlastnostmi nebyla nalezena. Příkladem je největší příbuzností vysoce atenuovaného kmene 181/57 s biologicky velmi odlišným kmenem 181. Podobně nebyla odhalena ani příbuznost kmenů se stejným biologickým zdrojem - kmen 94 izolovaný z komára *Ae. cantans* je řazen do společné větve s izolátem 83 z *Ae. vexans*. Žádná korelace také nebyla nalezena mezi místem a rokem

Tab. 4 Aminokyselinové rozdíly mezi kmenem 181 a jeho atenuovaným derivátem 181/57.

Protein	Změna aminokyseliny ¹
NSm	Ile-470→Leu
G_C	Asn-497→Ser
	Asp-636→Asn
	Ile-833→Thr
	Phe-835→Leu
	Val-1184→Ala
	Ile-1272→Val
	Leu-1282→Ser
	Val-1295→Ile
Asp-1365→Val	

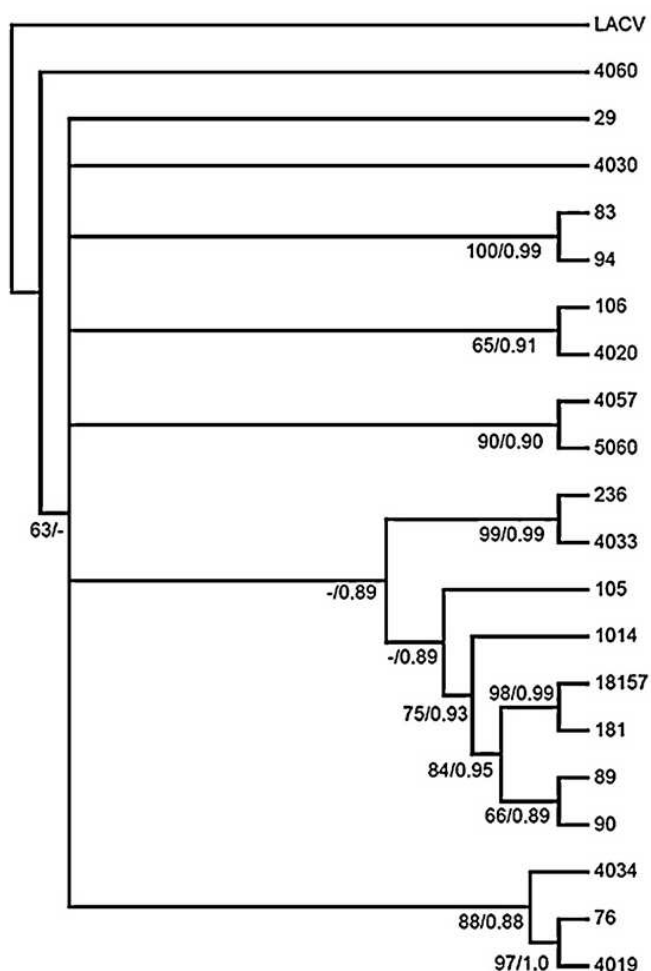
Nekonzervativní aminokyseliny jsou zvýrazněny **tučně**. Pozice jsou vyjádřeny ve smyslu celého polyproteinu.

¹Aminokyselinové změny považovány za konzervativní: Ala=Val, Ile=Leu=Phe=Val.

izolace.

Sekvenční srovnání přírodního izolátu s jeho atenuovaným derivátem 181/57 odhalilo celkem 12 nukleotidových záměn, z nichž 10 vedlo k aminokyselinové změně. Jedna aminokyselinová záměna byla pozorována v úseku kódující protein NS_M, devět potom v úseku pro G_C. Nicméně 8 z těchto změn bylo konzervativních (aminokyseliny s podobnou rozpustností, polaritou a hydrofobicitou). Pouze 2 záměny byly nekonzervativní a zároveň unikátních pro kmen 181/57 a to v pozici Asp⁶³⁶ → Asn⁶³⁶ a Asp¹³⁶⁵ → Val¹³⁶⁵. Přehled aminokyselinových záměn je uveden v tabulce 4.

V izolátu z komára *Ae. cantans* byly pozorovány dvě záměny v pozicích Gly⁴³² → Ala⁴³² (NS_M protein) a Ile⁶⁹⁴ → Val⁶⁹⁴ (G_C protein).



Obr.8 Fylogenetická analýza založená na kompletní sekvenci kódující střední segment. Přesný konsenzus 8 nejvíc parsimonních stroměčků. Hodnoty jednotlivých uzlů vyjadřují bootstrapovou hodnotu/posterior probability.

5.2. Malý genomický segment

Navzdory místy relativně variabilního středního segmentu, vykazoval segment S vysokou míru konzervace a to jak v nukleotidové tak aminokyselinové sekvenci. Obě terminální nekódující oblasti vykazovaly podobně jako u segmentu M absolutní konzervovanost.

V oblasti kódující protein N bylo zjištěno průměrně 1,26 nukleotidových záměn na sekvenci, z nichž všechny byly synonymní. Poměr tranzicí a transverzí činil 0,63.

Analýza téměř zcela konzervovaného genu pro protein NS_S ukázala pouze jedinou nesynonymní nukleotidovou záměnu a to u atenuovaného kmene 181/57 měnící Ser³⁵ (ve vztahu pouze k proteinu NS_S) na Tyr³⁵. Srovnání s proteinem Reaper z *Drosophila melanogaster* odhalilo určité sekvenční podobnosti, nicméně žádná z nich nebyla touto jedinou mutací ovlivněna.

Ani v jednom proteinu nebyla predikována žádná potenciální glykosylační místa.

Získané sekvence byly uloženy do databáze GenBank pod přístupovými čísly **GU390669–GU390688** pro segment S a **GQ386823–GQ386841** pro segment M.

6. Diskuze

Cílem této práce bylo provést sekvenční analýzu středního a malého genomického segmentu vybraných převážně nízko pasážovaných kmenů TAHV, které se podstatně lišily v již dříve vyšetřovaných biologických vlastnostech (charakterem plaků v buněčné kultuře, termosenzitivita a virulence pro laboratorní myš po intracerebrální nebo subkutánní inokulaci) a zároveň poukázat na míru variability TAHV v přírodě.

Střední a malý genomický segment nebyl vybrán náhodou. Již z dřívějších prací založených na 'rearrangementu' (přeuspořádání) genomických segmentů jsou mapovány determinanty virulence především do středního segmentu (Janssen *et al.*, 1986). Zdá se však, že tento segment nehraje důležitou roli jen při infekci obratlovčího hostitele, ale i při infekci svého vektora. Beaty *et al.* (1982) prokázal, že schopnost jednoho druhu komára přenést určitý bunyavirus je velmi omezená a vázaná především na účinnou diseminaci ze střeva do ostatních tělních orgánů. Prokázal také, že klíčovou úlohu v této diseminaci hraje právě střední segment. Ačkoliv v této práci byly porovnávány zejména kmeny izolované z *Ae. vexans*, studie zahrnovala i kmen izolovaný z *Ae. cantans*. Porovnáním nukleotidových a aminokyselinových sekvencí bylo možné vysledovat jednu záměnu typickou pouze pro izolát z *Ae. cantans* (Obr. 9). Tyto aminokyselinové změny mohou proto hrát důležitou roli v určování vektorové kompetence pro daný arbovirus. V sekvenci proteinu G_N , který je některými autory (Ludwig *et al.*, 1991) považován za ligand buněk komářího střeva, však nenesl záměny žádné. Pro objasnění důležitosti uvedených změn by však bylo potřeba analyzovat větší soubor izolátů z více rozdílných biologických zdrojů.

Již dříve bylo pokázáno, že mutace v glykoproteinu G_C může významně redukovat replikaci viru po primární inokulaci v periferních tkáních obratlovčího hostitele, především v příčně pruhované svalovině a tím může být následně výrazně ovlivněn titr viru v krvi. G_C mutanti tak vykazují menší virulenci a neuroin vazivitu po periferní inokulaci do pokusného zvířete (Gonzalez-Scarano *et al.*, 1985). Nicméně přesné determinanty virulence stále zůstávají spíše neznámé. Srovnáním získaných sekvencí našeho souboru izolátů TAHV byl zjištěn nejvyšší stupeň variability ze všech sledovaných proteinů právě v sekvenci kódující protein G_C . Tato studie biologicky odlišných přírodních kmenů tak podporuje klíčovost proteinu G_C v určování biologických vlastností virů ze skupiny Kalifornských encefalitid,

především neuroinvizivitu. Jak lze vysledovat z tabulky 2, atenuovaný kmen 181/57 zahrnutý v této studii, vykazoval zcela odlišné vlastnosti než kmene ostatní. Inkubační doba byla značně prodloužená, stejně redukována byla i letalita nakažených myšek (Málková, 1971b). Ze srovnání sekvencí atenuovaného kmene a ostatních přírodních izolátů byly objeveny dvě aminokyselinové záměny unikátní pro tento atenuovaný kmen, které byly zároveň nekonzervativní. To může naznačovat, že aminokyseliny v pozici 636 a 1365 mohou být potenciálními determinanty neuroinvizivitu TAHV. Další, ačkoliv jiná (Asp → Gly) záměna, potvrzující důležitost aminokyseliny v pozici 1365 byla pozorována u kmene 89. Tento přírodní izolát z komára *Ae. vexans* vykazoval ve srovnání s ostatními také velmi sníženou míru virulence. To může podporovat roli této aminokyseliny v určování periferní virulence. Nicméně další z přírodních izolátů, 4034, mající periferní virulenci také značně alterovanou, nevykazoval v těchto oblastech záměnu žádnou.

Pouze jediná změna typická pro atenuovaný kmen 181/57, nalezená v úseku kódující nestrukturní protein NSm, byla nalezena v pozici Ile⁴⁷⁰ → Leu⁴⁷⁰. Ačkoliv je tato změna konzervativní, zajímavé je její umístění postihující signální sekvenci LIVHA. V této sekvenci je za koncovým A odstěpen protein NSm a G_C z prekursorového polyproteinu. Malá změna této sekvence proto mohla ovlivnit zpracování kódovaného M polyproteinu a omezit tak replikační cyklus kmene 181/57. Nedaleko této sekvence byla nalezena změna v pozici Val⁴⁶⁸ → Ile⁴⁶⁸ typická pro periferně méně virulentní kmen 4034.

Ačkoliv protein G_N bývá někdy považován za ligand pro receptory buněk komářího střeva, zcela jistě má důležitou roli i v obratlovčích buňkách. Bennett et al., (2007) poukázal, že aminokyselinová změna G_N proteinu v pozici Thr¹⁴⁸ → Ala¹⁴⁸ může velmi ovlivnit neuroinvizivitu a laboratorní myši. Nicméně v souboru námi vyšetřovaných kmenů TAHV nebyla žádná podobná záměna v této či blízké aminokyselině nalezena. Valentini et al. (2008) poukázal na možnou úlohu disulfidických můstků v utváření správné konformace virových proteinů a tím ovlivňování virulence viru Toscana (*Bunyaviridae*, Phlebovirus). Mezi všemi námi analyzovanými kmeny TAHV však byly všechny cysteinové zbytky, schopné vytvářet difulfidické můstky absolutně konzervované. Jejich poziční stabilita značí spíše důležitost pro replikační cyklus viru, bez možnosti jakékoliv změny.

Atenuovaný kmen TAHV vykazoval unikátní vlastnosti také v nestrukturním proteinu NSs kódovaném malým segmentem. Ačkoliv Bridgen et al. (2001) považuje NSs spíše za přídatný protein, který není kriticky důležitý pro replikaci viru, může souviset se

závažností celkového průběhu onemocnění. Po periferní inokulaci vykazoval divoký typ (wild type, wt) od delečního mutanta BUNVdelNSs jen malou odlišnost v patogenezi. Po intracerebrálním podání však byl již rozdíl zřetelný. BUNVdelNSs se projevoval menší schopností množit se a šířit v mozkové tkáni. Z toho lze usuzovat na malý význam proteinu NSs v periferní atenuaci TAHV 181/57. Naproti tomu však BUNVdelNSs také nevytvářel téměř žádné nebo jen malé plaky v buněčné kultuře, podobně jako zmiňovaný TAHV 181/57. Zdá se tedy, že mutace v proteinu NSs v pozici 35 může alterovat jeho funkci, tím ovlivňovat šíření mezi buňkami a velikost plaků. Nicméně kmen 1014, tvořící v buněčné kultuře také část malých plaků, neobsahoval aminokyselinovou záměnu žádnou. Ačkoliv NCR oblasti nekódují žádný protein, hrají velkou roli při replikačním cyklu viru. Mutace především v 5' NCR může podle některých prací mít vliv na atenuaci BUNV (Lowen *et Elliott*, 2005). V případě našeho souboru kmenů TAHV však poskytovaly 5' i 3' NCR vysokou míru konzervace a pravděpodobně tak nehrají roli v determinaci biologických vlastností analyzovaných izolátů.

Ačkoliv jsou uvedené záměny vhodnými kandidáty pro determinanty určující fenotyp, potvrzení nebo vyvrácení jejich důležitosti by vyžadovalo hlubší studium metodou cílené mutagenese.

Již dřívější studie termosenzitivního mutanta (ts) viru Maguari (MAGV; Orhobunyavirus, *Bunyaviridae*) a jeho wt (Pollit *et al.*, 2006) odhalila potenciální determinanty termosenzitivity v místech 492 (494 u TAHV), 534 (536 u TAHV) a 681 (684 u TAHV) vzhledem k celému kódovanému M polyproteinu. Všechna tato potenciální místa leží v N-koncové oblasti glykoproteinu G_C. Ačkoliv stejná oblast proteinu G_C u námi analyzovaných kmenů TAHV byla rovněž nejvíce variabilní (Obr. 6), uvedené determinanty ts fenotypu byly plně konzervované. Podobně tomu bylo při porovnání 2 ts kmenů TAHV (181/57 a 4034; Tab. č. 2), které neodhalilo v celém M polyproteinu žádné aminokyselinové záměny typické pouze pro tyto 2 kmeny. Ts fenotyp tedy může být ovlivněn buď několika na sobě nepříliš závislých mutací, nebo jsou jeho determinanty lokalizovány na segmentu jiném. Protože však segment S byl mezi kmeny TAHV vysoce konzervovaný, nelze vyloučit možnou úlohu segmentu L v determinaci ts fenotypu.

N-glykosylace jsou obecně důležité pro skládání proteinu do správné terciární struktury, jeho správnou biologickou funkci či pro jeho intracelulární směřování. U všech námi analyzovaných kmenů TAHV bylo predikováno celkem 7 potencionálních N-

glykosylačních míst v oblastech kódující proteiny G_N a G_C . Téměř všechna místa se plně shodovala s predikcemi jiných autorů (Campbell *et al.*, 1999). Jak bylo zjištěno, N-glykosylační místa proteinu G_N jsou téměř úplně konzervovaná mezi zástupci virů Kalifornské encefalitidy. Další srovnání s ostatními zástupci rodu Orthobunyavirus odhalilo mezi jeho zástupci absolutně konzervovaná glykosylační místa v pozici N57 (G_N) a N1176 (protein G_C) ve smyslu k aminokyselinové sekvenci polyproteinu TAHV (Shi *et al.*, 2005). Tato přísná poziční stabilita naznačuje jejich klíčovou úlohu v životním cyklu orthobunyvirů. Důležitá úloha v replikačním cyklu zejména pro glykosylaci G_N byla prokázána u BUNV. Glykan N57 se u BUNV nachází nejbližší N-konci proteinu G_N a je kriticky důležitý pro správné sbalování stejně jako pro navigaci heterodimeru do Golgiho aparátu. U TAHV, podobně jako u ostatních zástupců virů Kalifornské encefalitidy je však jedno potenciální glykosylační místo umístěno ještě blíže k N-konci. Jeho využití stejně jako role je však stále neznámá. Přísná konzervovanost mezi našimi izoláty však značí jeho funkční důležitost. Glykosylace proteinu G_N je také klíčová u viru Krymsko-konžské hemoragické horečky (*Bunyaviridae*, Nairovirus) pro skládání do správné konformace stejně jako pro nitrobuněčný transport (Erickson *et al.*, 2007). V sekvenci proteinu G_C byla celkově zjištěna pouze mírná variabilita u analyzovaných kmenů TAHV. Pouze u kmene 1014 bylo objeveno jedno další glykosylační místo. Zajímavé je, že se tento kmen vyznačuje jednak tvorbou malých plaků v buněčné kultuře, ale také částečnou termosenzitivitou a sníženou virulencí oproti jiným přírodním izolátům. Jak bylo dříve prokázáno, glykosylace proteinu G_C sice není kriticky důležitá pro replikační cyklus viru, ale přispívá k účinnější infekci hostitelské buňky. Protože toto potenciální glykosylační místo nebylo nalezeno u žádného jiného kmene TAHV, jeho objevení se náhodnou mohlo negativně ovlivnit funkci proteinu G_C a tím spolu s dalšími faktory pozměnit fenotyp kmene 1014. Jak bylo již zmíněno, řada pokusů s BUNV prokázala jednak využívání potenciálních míst pro navázání glykanu a jednak značnou důležitost pro virový replikační cyklus (Shi *et al.*, 2005). Důležitost glykosylací virových proteinů však byla prokázána i u zástupců jiných čeledí, např. *Flaviviridae* (Muylaert *et al.*, 1996). Ačkoliv viry Kalifornské skupiny vykazují více predikovaných N-glykosylačních míst než zmiňovaný BUNV, hlubší studie zabývající se jejich skutečným využitím, stejně jako jejich úloha u této skupiny virů bohužel chybí.

Fylogenetická analýza segmentu S vybraných zástupců virů Kalifornské encefalitidy (Vapalahti *et al.*, 1996) odhalila jeho celkově vysokou konzervovanost. Fylogeneticky nejbližší si byly viry cirkulující na zcela odlišných kontinentech – Inkoo virus (cirkulující v severní Evropě) byl nejbliže severoamerickému viru JCV, TAHV byl nejbliže africkému viru Lumbo (dnes však již považovanému za kmen TAHV; Hubálek, 2008). Navzdory obrovským geografickým vzdálenostem si všichni zástupci zachovali nízkou variabilitu S segmentu. Autoři velkou podobnost připisovali velmi podobnému replikačnímu cyklu v přírodě, zahrnujícímu jak stejný druh vektora tak přirozeného hostitele. Nicméně, sekvenční analýza 27 kmenů viru Oropouche (*Bunyaviridae*, Orthobunyavirus, skupina Oropouche) odhalila relativně vysokou variabilitu genu kódující N protein (Saeed *et al.*, 2000). Naše výsledky však potvrzují velkou konzervovanost segmentu S skupiny Kalifornských virů, naznačující značnou důležitost proteinů N a NSs pro virový replikační cyklus a umožňující pouze minimální změny v aminokyselinové sekvenci S kódovaných proteinů. Nicméně fylogenetická analýza námi analyzovaných kmenů poukázala na podobnou situaci i u segmentu M. Ačkoliv byly některé kmene klastrovány do společných větví, téměř žádná fylogenetická shoda nebyla nalezena mezi izoláty z komárů odchycených ve stejném roce a na stejném místě. Konzervovanost tohoto segmentu však není tak striktní jak je tomu u S segmentu. Zdá se tedy, že TAHV cirkuluje v přírodě ve velice heterogenní populaci zahrnující kmene s velice odlišnými biologickými vlastnostmi. Mutace odhalené mezi analyzovanými přírodními izoláty mohly vzniknout náhodnými záměnami díky malé přesnosti a absenci 'proofreadingové' (korekturní) aktivity RdRp. Tento vznik mutací je u RNA virů velmi běžný a umožňuje jim velice rychlou a efektivní schopnost přizpůsobit se jakýmkoliv změnám (Domingo *et Holland*, 1997). V přírodě tedy RNA viry cirkulují spíše ve formě tzv. quasispecies (kvasi-druhů), tj. populace různě odlišných variant stejného viru. U arbovirů je tento způsob zvláště efektivní právě kvůli střídání vektora a hostitele. V daném organismu rychle převládne vždy varianta, které dané prostředí nejlépe vyhovuje. Srovnávací studie kmene LACV získaného v roce 1960 z mozku nakažených a zemřelých pacientů s jeho derivátem, získaným *in vitro* pasážováním, odhalila čtyři nukleotidové záměny, z nichž tři vedly ke změně aminokyseliny. Podobný výsledek byl pozorován při srovnání kmene izolovaném z mozkové tkáně dětských pacientů v roce 1978 s jeho pasážovaným derivátem. Nicméně srovnání obou wt z roku 1960 a 1978 odhalilo podstatně méně nesynonymních záměn.

Studie také poukázala, že krátkým laboratorním pasážováním lze docílit daleko větších genetických změn, než se tomu děje v přírodě. Důvodů může být podle autorů několik. Jednak dosažení maxima virového 'fitness' (soubor parametrů popisující schopnost organismu přizpůsobit se danému prostředí) v přirozeném savčím i hmyzím hostiteli, vyselektování jednotlivých mutant z 'quasispecies', schopných účinně se množit a způsobovat virémii u člověka, či cirkulace neurovirulentních kmenů v přírodě nezávisle na kmenech méně neurovirulentních. (Huang et al., 1997; Domingo et Holland, 1997; Borucki et al., 2002;). Velká stabilita LACV v přírodě byla prokázána i studií Bennetta et al. (2007). Naše výsledky mohou naznačovat, že ačkoliv TAHV v přírodě zřejmě cirkuluje v fenotypově velmi heterogenní populaci, genotypově je relativně velmi stabilní. Jak je vidět v tab. 5 v příloze, je mezi jednotlivými přírodními kmeny izolovanými v různých letech průměrně velice málo aminokyselinových záměn. Vůbec nejvíce záměn je pozorováno mezi kmeny 181/57 a 236, potažmo mezi kmenem 181/57 a ostatními přírodními izoláty. Výsledky také naznačují, že i velmi malé změny v primární struktuře proteinů tak mohou mít veliký význam pro fenotypový projev izolátu. Toto bylo prokázáno i u viru horečky údolí Rift (RVFV; *Bunyaviridae*, Phlebovirus), tvořícího v přírodě také velmi geneticky homogenní populaci (Bird et al., 2007). Podle autorů studie (Morrill et al., 2010) je však kmen ZH501, izolovaný z lidského pacienta, tvořen dvěma virovými subpopulacemi, které se liší v proteinu G_N jedinou aminokyselinovou záměnou alterující virulenci pro laboratorní myš. Jedna virová subpopulace je pro laboratorní myš zcela atenuovaná, zatímco druhá je vysoce virulentní. Po inokulaci kmene ZH501 do myši pak rychle převládne varianta virulentnější. Zodpovězení otázky, zda náš soubor TAHV představuje kmeny cirkulující v přírodě na sobě nezávisle, či se jedná pouze o různé varianty z 'quasispecies', by vyžadovalo další studii.

7. Závěr

Byla provedena sekvenční a bioinformatická analýza M a S segmentu přírodních izolátů TAHV, laboratorně udržovaného kmene 236 a intracerebrálně pasážovaného, atenuovaného kmene 181/57. Ze studie vyplívá celkově vysoká genetická stabilita TAHV v čase. Bylo identifikováno několik možných aminokyselinových záměn zodpovědných za atenuovaný či termosenzitivní fenotyp. Daný fenotyp je pravděpodobně ovlivněn pouze malými změnami genomu či jejich různou kombinací. Práce tak upozorňuje na určité oblasti genomu, vhodné pro další studii pomocí cílených mutagenéz. Získané sekvence byly uloženy do databáze GenBank. Část výsledků byla publikována v impaktovaném časopise *Virus Research* (IF 2008: 2,429): Kilian, P., Růžek, D., Danielová, V., Hypsa, V., Grubhoffer, L. 2010. Nucleotide variability of Tahyna virus (Bunyaviridae, Orthobunyavirus) small (S) and medium (M) genomic segments in field strains differing in biological properties. *Virus Res.* 149:119-23

8. Seznam použité literatury

- Ball, L.A. 2007.** Virus replication strategies. IN: Fields Virology, 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Knipe, D. M. a Howley P. M. (ed.). str. 121.
- Bárdoš, V., Danielová, V. 1959.** The Tahyna virus--a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 3:264-76.
- Bárdoš, V. 1974.** Recent state of knowledge of Tahyna virus infections. *Folia Parasitol.* 21:1-10.
- Bird, B.H., Khristova, M.L., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T. 2007.** Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. *J Virol.* 81:2805-16.
- Bishop, D.H., Beaty, B.J., Shope, R.E. 1980.** Recombination and gene coding assignments of bunyaviruses and arenaviruses. *Ann N Y Acad Sci.* 354:84-106.
- Bishop, D.H., Gould, K.G., Akashi, H., Clerx-van Haaster, C.M. 1982.** The complete sequence and coding content of snowshoe hare bunyavirus small (S) viral RNA species. *Nucleic Acids Res.* 10:3703-13.
- Beaty, B.J., Miller, B.R., Shope, R.E., Rozhon, E.J., Bishop, D.H. 1982.** Molecular basis of bunyavirus per os infection of mosquitoes: role of the middle-sized RNA segment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:1295-7.
- Bennett, R.S., Ton, D.R., Hanson, C.T., Murphy, B.R., Whitehead, S.S. 2007.** Genome sequence analysis of La Crosse virus and in vitro and in vivo phenotypes. *Virol J.* 8:4-41.
- Bennett, R.S., Cress, C.M., Ward, J.M., Firestone, C.Y., Murphy, B.R., Whitehead, S.S. 2008.** La Crosse virus infectivity, pathogenesis, and immunogenicity in mice and monkeys. *Virol J.* 11:5-25.
- Blakqori, G., Delhayé, S., Habjan, M., Blair, C.D., Sánchez-Vargas, I., Olson, K.E., Attarzadeh-Yazdi, G., Fragkoudis, R., Kohl, A., Kalinke, U., Weiss, S., Michiels, T., Staeheli, P., Weber, F. 2007.** La Crosse bunyavirus nonstructural protein NSs serves to suppress the type I interferon system of mammalian hosts. *J Virol.* 81:4991-9.
- Borucki, M.K., Chandler, L.J., Parker, B.M., Blair, C.D., Beaty, B.J. 1999.** Bunyavirus superinfection and segment reassortment in transovarially infected mosquitoes. *J Gen Virol.* 80:3173-9.
- Borucki, M.K., Kempf, B.J., Blitvich, B.J., Blair, C.D., Beaty, B.J. 2002.** La Crosse virus: replication in vertebrate and invertebrate hosts. *Microbes Infect.* 4:341-50.

- Bridgen, A., Weber, F., Fazakerley, J.K., Elliott, R.M. 2001.** Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:664-9.
- Briese, T., Bird, B., Kapoor, V., Nichol, S.T., Lipkin, W.I. 2006.** Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa. *J Virol.* 2006 Jun;80(11):5627-30.
- Campbell, W.P., Huang, C. 1999.** Sequence comparisons of medium RNA segment among 15 California serogroup viruses. *Virus Res.* 61:137-44.
- Calisher, C.H. 1994.** Medically important arboviruses of the United States and Canada. *Clin Microbiol Rev.* 7:89-116.
- Calisher, C.H. 1996.** History, classification, taxonomy of viruses in the family bunyaviridae. In: *The Bunyaviridae.* Elliott R.M. (ed). New York: Plenum Press, str. 1–17.
- Colón-Ramos, D.A., Irusta, P.M., Gan, E.C., Olson, M.R., Song, J., Morimoto, R.I., Elliott, R.M., Lombard, M., Hollingsworth, R., Hardwick, J.M., Smith, G.K., Kornbluth, S. 2003.** Inhibition of translation and induction of apoptosis by Bunyaviral nonstructural proteins bearing sequence similarity to reaper. *Mol Biol Cell.* 14:4162-72.
- Danielová, V. 1962a.** Experimental studies on the relation of Tahyna viruses to some types of mosquitoes. *Cs Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 11:171-4.
- Danielová, V. 1962b.** Multiplication dynamics of Ťahyňa virus in different body parts of *Aedes vexans* mosquito. *Acta Virol.* 6:227-230.
- Danielová, V. 1968.** Penetration of the Ťahyňa virus to various organs of the *Aedes vexans* mosquito. *Folia Parasitol* 15:87-91.
- Danielová, V. 1978.** Význam komárů jako vektorů arbovirů v Československu. *Čs. Epidem.* 27: 218-222.
- Danielová, V., Minář, J. 1969.** Experimental overwintering of the virus Ťahyňa in mosquitoes *Culiseta annulata* (Schrk.) (Diptera, Culicidae). *Folia Parasitol* 16:285-287.
- Danielová, V., Holubová, J. 1977.** Two more mosquito species proved as vectors of Tahyna virus in Czechoslovakia. *Folia Parasitol* 24:187-9.
- Danielová, V., Ryba, J. 1979.** Laboratory demonstration of transovarial transmission of Ťahyňa virus in *Aedes vexans* and role of this mechanism in overwintering of this arbovirus. *Folia Parasitol.* 26:361-366.
- Di Bonito, P., Mochi, S., Grò, M.C., Fortini, D., Giorgi, C. 1997.** Organization of the M genomic segment of Toscana phlebovirus. *J Gen Virol.* 78:77-81.

- Domingo, E., Holland, J.J. 1997.** RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol.* 51:151-78.
- Dunn, E.F., Pritlove, D.C., Jin, H., Elliott, R.M. 1995.** Transcription of a recombinant bunyavirus RNA template by transiently expressed bunyavirus proteins. *Virology.* 211:133-43.
- Elliott, R.M., Wilkie, M.L. 1986.** Persistent infection of *Aedes albopictus* C6/36 cells by Bunyamwera virus. *Virology.* 150:21-32.
- Elliott, R.M. 1990.** Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol.* 71:501-22.
- Endres, M.J., Jacoby, D.R., Janssen, R.S., Gonzalez-Scarano, F., Nathanson, N. 1989.** The large viral RNA segment of California serogroup bunyaviruses encodes the large viral protein. *J Gen Virol.* 70:223-8.
- Erickson, B.R., Deyde, V., Sanchez, A.J., Vincent, M.J., Nichol, S.T. 2007.** N-linked glycosylation of Gn (but not Gc) is important for Crimean Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein localization and transport. *Virology.* 361:348-55.
- Fontana, J., López-Montero, N., Elliott, R.M., Fernández, J.J., Risco, C. 2008.** The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol.* 10:2012-28.
- Fuller, F., Bishop, D.H. 1982.** Identification of virus-coded nonstructural polypeptides in bunyavirus-infected cells. *J Virol.* 41:643-8.
- Fuller, F., Bhowm, A.S., Bishop, D.H. 1983.** Bunyavirus nucleoprotein, N, and a non-structural protein, NSS, are coded by overlapping reading frames in the S RNA. *J Gen Virol.* 64:1705-14.
- Gabitzsch, E.S., Blair, C.D., Beaty, B.J. 2006.** Effect of La Crosse virus infection on insemination rates in female *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 43:850-2.
- Garry, C.E., Garry, R.F. 2004.** Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penetrenes). *Theor Biol Med Model.* 15:1-10.
- Goloboff, P.A., Farris, J.S., Nixon, K.C., 2004.** TNT. *Cladistics* 20: 84–184.
- Gonzalez-Scarano, F., Pobjecky, N., Nathanson, N. 1984.** La Crosse bunyavirus can mediate pH-dependent fusion from without. *Virology.* 132:222-5.

- Gonzalez-Scarano, F., Janssen, R.S., Najjar, J.A., Pobjecky, N., Nathanson, N. 1985.** An avirulent G1 glycoprotein variant of La Crosse bunyavirus with defective fusion function. *J Virol.* 54:757-63.
- Griot, C., Gonzalez-Scarano, F., Nathanson, N. 1993.** Molecular determinants of the virulence and infectivity of California serogroup bunyaviruses. *Annu Rev Microbiol.* 47:117-38.
- Hacker, J.K., Volkman, L.E., Hardy, J.L. 1995.** Requirement for the G1 protein of California encephalitis virus in infection in vitro and in vivo. *Virology.* 206:945-53.
- Hacker, J.K., Hardy, J.L. 1997.** Adsorptive endocytosis of California encephalitis virus into mosquito and mammalian cells: a role for G1. *Virology.* 235:40-7.
- 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.
- Hammon, W.M., Reeves, W.C. 1952.** California encephalitis virus, a newly described agent. *Calif Med.* 77:303-9.
- Hart, C.A., Bennett, M. 1999.** Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis. *Microbes Infect.* 1:1229-37.
- Huang, C., Thompson, W.H., Karabatsos, N., Grady, L., Campbell, W.P. 1997.** Evidence that fatal human infections with La Crosse virus may be associated with a narrow range of genotypes. *Virus Res.* 48:143-8.
- Hubálek, Z., Juřicová, Z., Svobodová, S., Halouzka, J. 1993.** A serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic. *J Wildl Dis.* 29:604-7.
- Hubálek, Z. 2008.** Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol Res. Suppl* 1:S29-43.
- Chandler, L.J., Beaty, B.J., Baldrige, G.D., Bishop, D.H., Hewlett, M.J. 1990.** Heterologous reassortment of bunyaviruses in *Aedes triseriatus* mosquitoes and transovarial and oral transmission of newly evolved genotypes. *J Gen Virol.* 71:1045-50.
- Chandler, L.J, Hogge, G., Endres, M., Jacoby, D.R, Nathanson, N., Beaty, B.J. 1991.** Reassortment of La Crosse and Tahyna bunyaviruses in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Virus Res.* 20:181-91.
- Jääskeläinen, K.M., Kaukinen, P., Minskaya, E.S., Plyusnina, A., Vapalahti, O., Elliott, R.M., Weber, F., Vaheri, A., Plyusnin, A. 2007.** Tula and Puumala hantavirus NSs ORFs are functional and the products inhibit activation of the interferon-beta promoter. *J Med Virol.* 79:1527-36.

- Jacoby, D.R., Cooke, C., Prabakaran, I., Boland, J., Nathanson, N., Gonzalez-Scarano, F. 1993.** Expression of the La Crosse M segment proteins in a recombinant vaccinia expression system mediates pH-dependent cellular fusion. *Virology*. 193:993-6.
- Janssen, R.S., Nathanson, N., Endres, M.J., Gonzalez-Scarano, F. 1986.** Virulence of La Crosse virus is under polygenic control. *J Virol*. 59:1-7.
- Kilian, P., Růžek, D., Danielová, V., Hypsa, V., Grubhoffer, L. 2010.** Nucleotide variability of Tahyna virus (Bunyaviridae, Orthobunyavirus) small (S) and medium (M) genomic segments in field strains differing in biological properties. *Virus Res*. 149:119-23.
- Kohl, A., Clayton, R.F., Weber, F., Bridgen, A., Randall, R.E., Elliott, R.M. 2003.** Bunyamwera virus nonstructural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death. *J Virol*. 77:7999-8008.
- Kokernot, R.H., McIntosh, B.M., Worth, C.B., De Moraist, Weinbren, M.P. 1962.** Isolation of viruses from mosquitoes collected at Lumbo, Mozambique. I. Lumbo virus, a new virus isolated from *Aedes* (Skusea) pembraensis Theobald. *Am J Trop Med Hyg*. 11:678-82.
- Kormelink, R., de Haan, P., Meurs, C., Peters, D., Goldbach, R. 1992.** The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *J Gen Virol*. 73:2795-804.
- Kyte, J., Doolittle, R.F. 1982.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 157:105-32.
- Leonard, V.H., Kohl, A., Osborne, J.C., McLees, A., Elliott, R.M. 2005.** Homotypic interaction of Bunyamwera virus nucleocapsid protein. *J Virol*. 79:13166-72.
- Li, W.J., Wang, J.L., Li, M.H., Fu, S.H., Wang, H.Y., Wang, Z.Y., Jiang, S.Y., Wang, X.W., Guo, P., Zhao, S.C., Shi, Y., Lu, N.N., Nasci, R.S., Tang, Q., Liang, G.D. 2010.** Mosquitoes and mosquito-borne arboviruses in the Qinghai-Tibet Plateau--focused on the Qinghai area, China. *Am J Trop Med Hyg*. 82:705-11.
- Lowen, A.C., Elliott, R.M. 2005.** Mutational analyses of the nonconserved sequences in the Bunyamwera Orthobunyavirus S segment untranslated regions. *J Virol*. 79:12861-70.
- Lu, Z., Lu, X.J., Fu, S.H., Zhang, S., Li, Z.X., Yao, X.H., Feng, Y.P., Lambert, A.J., Ni da, X., Wang, F.T., Tong, S.X., Nasci, R.S., Feng, Y., Dong, Q., Zhai, Y.G., Gao, X.Y., Wang, H.Y., Tang, Q., Liang, G.D. 2009.** Tahyna virus and human infection, China. *Emerg Infect Dis*. 15:306-9.
- Ludwig, G.V., Israel, B.A., Christensen, B.M., Yuill, T.M., Schultz, K.T. 1991.** Role of La Crosse virus glycoproteins in attachment of virus to host cells. *Virology*. 181:564-71.

- Málková, D., 1971a.** Thermosensitivity of Ťahyňa virus. *Acta Virol.* 15:309–315.
- Málková, D., 1971b.** Virulence of Ťahyňa virus in mice and its relation to thermosensitivity and character of plaque population markers. *Acta Virol.* 15:473–478.
- Málková, D., Marhoul, Z., 1971.** Plaquing of different strains of Ťahyňa virus in GMK cells. *Acta Virol.* 15: 227–232.
- McJunkin, J.E., de los Reyes, E.C., Irazuzta, J.E., Caceres, M.J., Khan, R.R., Minnich, L.L., Fu, K.D., Lovett, G.D., Tsai, T., Thompson, A. 2001.** La Crosse encephalitis in children. *N Engl J Med.* 344:801-7.
- Mir, M.A., Panganiban, A.T. 2006.** The bunyavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone: possible roles in viral RNA panhandle formation and genome replication. *RNA.* 12:272-82.
- Mohamed, M., McLees, A., Elliott, R.M. 2009.** Viruses in the Anopheles A, Anopheles B, and Tete serogroups in the Orthobunyavirus genus (family Bunyaviridae) do not encode an NSs protein. *J Virol.* 83:7612-8.
- Morrill, J.C., Ikegami, T., Yoshikawa-Iwata, N., Lokugamage, N., Won, S., Terasaki, K., Zamoto-Niikura, A., Peters, C.J., Makino, S. 2010.** Rapid accumulation of virulent rift valley Fever virus in mice from an attenuated virus carrying a single nucleotide substitution in the m RNA. *PLoS One.* 5:e9986.
- 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: 159–68.
- Nakitare, G.W., Elliott, R.M. 1993.** Expression of the Bunyamwera virus M genome segment and intracellular localization of NSm. *Virology.* 195:511-20.
- Nichol, S.T., Beaty, B.J., Elliott, R.M., Goldbach, R., Plyusnin, A., Schmaljohn, C.S., Tesh, R.B. 2005.** Bunyaviridae. IN: *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses.* Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (ed). Elsevier Academic Press. str. 695-716. ISBN 0-12-249951-4.
- Obijeski, J.F., Bishop, D.H., Palmer, E.L., Murphy, F.A. 1976a.** Segmented genome and nucleocapsid of La Crosse virus. *J Virol.* 20:664-75.
- Obijeski, J.F., Bishop, D.H., Murphy, F.A., Palmer, E.L. 1976b.** Structural proteins of La Crosse virus. *J Virol.* 19:985-97.
- Obijeski, J.F., Murphy, F.A. 1977.** Bunyaviridae: recent biochemical developments. *J Gen Virol.* 37:1-14.

- Osborne, J.C., Elliott, R.M. 2000.** RNA binding properties of bunyamwera virus nucleocapsid protein and selective binding to an element in the 5' terminus of the negative-sense S segment. *J Virol.* 74:9946-52.
- Överby, A.K., Pettersson, R.F., Neve, E.P. 2007.** The glycoprotein cytoplasmic tail of Uukuniemi virus (Bunyaviridae) interacts with ribonucleoproteins and is critical for genome packaging. *J Virol.* 81:3198-205.
- Palese, p., Shaw, M.L. 2007.** Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. IN: *Fields Virology*, 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Knipe, D. M. a Howley P. M. (ed.). str. 1647-1689.
- Patterson, J.L., Holloway, B., Kolakofsky, D. 1984.** La Crosse virions contain a primer-stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease. *J Virol.* 52:215-22.
- Pavlovskij, E.M. 1939.** [O přírodní ohniskovosti infekčních a parazitických onemocnění]. *Vestn Akad Nauk SSSR.* 10:98-108.
- Pekosz, A., Phillips, J., Pleasure, D., Merry, D., Gonzalez-Scarano, F. 1996.** Induction of apoptosis by La Crosse virus infection and role of neuronal differentiation and human bcl-2 expression in its prevention. *J Virol.* 70:5329-35.
- Plassmeyer, M.L., Soldan, S.S., Stachelek, K.M., Roth, S.M., Martín-García, J., González-Scarano, F. 2007.** Mutagenesis of the La Crosse Virus glycoprotein supports a role for Gc (1066-1087) as the fusion peptide. *Virology.* 358:273-82.
- Pobjecky, N., Smith, J., Gonzalez-Scarano, F. 1986.** Biological studies of the fusion function of California serogroup Bunyaviruses. *Microb Pathog.* 1:491-501.
- Pollitt, E., Zhao, J., Muscat, P., Elliott, R.M., 2006.** Characterization of Maguari orthobunyavirus mutants suggests the nonstructural protein NSm is not essential for growth in tissue culture. *Virology* 348:224–232.
- Reese, S.M., Beaty, M.K., Gabitzsch, E.S., Blair, C.D., Beaty, B.J. 2009.** *Aedes triseriatus* females transovarially infected with La Crosse virus mate more efficiently than uninfected mosquitoes. *J Med Entomol.* 46:1152-8.
- Reinert, J.F. 2000.** New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. *J Am Mosq Control Assoc.* 16:175-88.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 19: 1572–1574.

- Rönholm, R., Pettersson, R.F. 1987.** Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Uukuniemi virus encoding the membrane glycoproteins G1 and G2. *Virology*. 160:191-202.
- Rust, R.S., Thompson, W.H., Matthews, C.G., Beaty, B.J., Chun, R.W. 1999.** La Crosse and other forms of California encephalitis. *J Child Neurol*. 14:1-14.
- Saeed, M.F., Wang, H., Nunes, M., Vasconcelos, P.F., Weaver, S.C., Shope, R.E., Watts, D.M., Tesh, R.B., Barrett, A.D. 2000.** Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. *J Gen Virol*. 81:743-8.
- Savage, H.M., Strickman, D. 2004.** The genus and subgenus categories within Culicidae and placement of Ochlerotatus as a subgenus of Aedes. *J Am Mosq Control Assoc*. 20:208-14.
- Scallan, M.F., Elliott, R.M. 1992.** Defective RNAs in mosquito cells persistently infected with Bunyamwera virus. *J Gen Virol*. 73 :53-60.
- Shi, X., Brauburger, K., Elliott, R.M. 2005.** Role of N-linked glycans on bunyamwera virus glycoproteins in intracellular trafficking, protein folding, and virus infectivity. *J Virol*. 79:13725-34.
- Shi, X., Kohl, A., Léonard, V.H., Li, P., McLees, A., Elliott, R.M. 2006.** Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *J Virol*. 80:8089-99.
- Shi, X., Kohl, A., Li, P., Elliott, R.M. 2007.** Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis. *J Virol*. 81:10151-60.
- Schmaljohn, C.S., Nichol, S.T. 2007.** Bunyaviridae. IN: *Fields Virology*, 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Knipe, D. M. a Howley P. M. (ed.). str. 1741-1789.
- Sluka, F. 1969.** The clinical picture of the Ťahyňa virus infection. IN: *Arboviruses of the California complex and the Bunyamwera group*. Bárdoš, V. et al. (ed.). Publ. House Slov. Acad. Sci. str. 311-314.
- Soldan, S.S., González-Scarano, F. 2005.** Emerging infectious diseases: the Bunyaviridae. *J Neurovirol*. 11:412-23.
- Storms, M.M., Kormelink, R., Peters, D., Van Lent, J.W., Goldbach, R.W. 1995.** The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology*. 214:485-93.
- Swanepoel, R., Burt, F.J. 2009.** Bunyaviridae. IN: *Principles and Practice of Clinical Virology*, Sixth Edition. Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E., Schoub, B.D., Griffiths, P.D., Mortimer, P. (ed). Wiley-Blackwell str. 699-731. ISBN: 978-0-470-51799-4.

- Šimková, A., Sluka, F. 1973.** Isolation of Tahyna virus from the blood of a case of influenza-like disease. *Acta Virol.* 17:94.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007.** MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–1599.
- Thompson, W.H., Beaty, B.J. 1977.** Venereal transmission of La Crosse (California encephalitis) arbovirus in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Science.* 196:530-1.
- Valentini, M., Valassina, M., Savellini, G.G., Cusi, M.G. 2008.** Nucleotide variability of Toscana virus M segment in strains isolated from clinical cases. *Virus Res.* 135:187-90.
- Vapalahti, O., Plyusnin, A., Cheng, Y., Manni, T., Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A. 1996.** Inkoo and Tahyna, the European California serogroup bunyaviruses: sequence and phylogeny of the S RNA segment. *J Gen Virol.* 77:1769-74.
- Wijkamp, I., van Lent, J., Kormelink, R., Goldbach, R., Peters, D. 1993.** Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *J Gen Virol.* 74:341-9.
- Watts, D.M., Pantuwatana, S., DeFoliart, G.R., Yuill, T.M., Thompson, W.H. 1973.** Transovarial transmission of LaCrosse virus (California encephalitis group) in the mosquito, *Aedes triseriatus*. *Science.* 182:1140-1.
- Weber, F., Dunn, E.F., Bridgen, A., Elliott, R.M. 2001.** The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. *Virology.* 2001 281:67-74.
- Yanase, T., Kato, T., Yamakawa, M., Takayoshi, K., Nakamura, K., Kokuba, T., Tsuda, T. 2006.** Genetic characterization of Batai virus indicates a genomic reassortment between orthobunyaviruses in nature. *Arch Virol.* 151:2253-60.
- Zhang, J., Gu, X., 1998.** Correlation between the substitution rate and rate variation among sites in protein evolution. *Genetics.* 149:1615–1625.

9. Příloha

Tab. 5 Počty nukleotidových a aminokyselinových záměn mezi jednotlivými kmeny

	236	181/57	29	76	83	89	90	94	105	106	114	181	1014	4019	4020	4030	4033	4034	4057	4060	5060
236		40	34	40	36	34	35	39	22	36	35	28	34	37	38	39	18	41	44	64	52
181/57	21		36	40	36	25	27	35	22	36	17	12	30	37	38	39	32	41	42	64	50
29	10	19		32	28	30	31	31	18	30	31	24	30	29	30	31	28	35	36	56	44
76	10	17	8		32	36	37	35	24	35	37	28	36	7	34	35	34	23	40	60	48
83	9	16	7	7		30	31	7	16	30	31	24	30	29	28	31	30	35	38	54	46
89	14	16	12	12	9		19	35	16	30	21	14	24	33	32	35	28	35	40	60	42
90	14	17	12	12	9	8		36	17	31	22	15	25	34	33	36	29	36	39	61	45
94	12	15	10	10	7	14	14		19	35	36	29	35	32	33	32	33	38	37	57	49
105	6	15	4	4	3	8	8	6		20	17	10	16	21	22	23	16	25	28	48	34
106	9	16	7	7	4	9	9	9	3		31	24	30	32	18	35	30	39	40	60	48
114	16	13	14	14	11	12	12	16	10	11		9	25	32	33	36	29	36	41	59	45
181	11	10	9	7	6	7	7	11	5	6	7		18	25	26	29	22	29	34	54	38
1014	15	20	13	13	10	13	13	15	9	10	15	10		33	32	35	28	35	40	60	46
4019	11	18	9	3	8	13	13	11	5	8	13	8	14		31	32	31	22	37	57	45
4020	9	16	7	7	4	9	9	9	3	4	11	6	10	8		33	32	37	40	56	48
4030	11	18	9	9	8	13	13	9	5	8	15	10	14	10	8		33	38	39	59	49
4033	8	15	6	6	5	10	10	8	2	5	12	7	11	7	5	7		35	38	58	44
4034	14	21	12	10	11	14	14	14	8	11	16	11	15	11	11	13	10		41	63	49
4057	13	18	11	11	10	15	15	9	7	10	17	12	16	12	10	10	9	15		66	30
4060	10	17	8	8	7	12	12	10	4	7	12	9	13	9	7	9	6	12	11		74
5060	12	21	10	10	9	14	14	12	6	9	16	11	15	11	9	11	8	14	7	10	

Pravý horní roh – nukleotidové záměny. Levý dolní roh – aminokyselinové záměny.

		G _N protein					Section 1
		1	10	20	30	40	55
236	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
29	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
76	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
83	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
89	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
90	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
94	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
105	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
106	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
181	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
181/57	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
1014	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
4019	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
4020	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
4030	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
4033	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
4034	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
4057	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
4060	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
5060	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
Consensus	(1)	MMPVLFFIALSAA	SPVYQRCFQDGAIVKQNP	SKQAVTEVCLKDDVSMIK	TEARYF		
							Section 2
		56	70	80	90	100	110
236	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
29	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
76	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
83	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
89	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
90	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
94	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
105	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
106	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
181	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
181/57	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
1014	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
4019	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
4020	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
4030	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
4033	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
4034	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
4057	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
4060	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
5060	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		
Consensus	(56)	RNATGTYANNVAIRKWL	VSDWHDCRPKKV	SGGHIN	IVIEVGDDDLTLHTEAYVCNAD		

Obr. 9 Alignment aminokyselinových sekvencí M polyproteinu s vyznačenými známými oblastmi (str. 44-57).

Section 3

	(111)	111	120	130	140	150	165
236	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
29	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
76	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
83	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
89	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
90	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
94	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
105	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
106	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
181	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
181/57	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
1014	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
4019	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
4020	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
4030	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
4033	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
4034	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
4057	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
4060	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
5060	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP
Consensus	(111)	CTIGVDKETAQVRLQTD	DTTNHF	FEIAGTTVKSGWFKSTTYITLDQTC	EHLK	V	SCGP

Section 4

	(166)	166	180	190	200	210	220
236	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
29	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
76	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
83	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
89	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
90	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
94	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
105	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
106	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
181	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
181/57	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
1014	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
4019	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
4020	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
4030	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
4033	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
4034	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
4057	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
4060	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
5060	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		
Consensus	(166)	KSIQPHACFNQHM	SCVRFLHRTILPGSIASSICQNV	EIIILTVL	TLLIFILLSIL		

TMD G_N proteinu

		NS _M doména II			NS _M doména III						
								Section 7			
	(331) 331		340	350	360	370	385				
236	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
29	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
76	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
83	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
89	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
90	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
94	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
105	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
106	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
181	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
181/57	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
1014	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
4019	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
4020	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
4030	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
4033	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
4034	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
4057	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMC	IINYAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
4060	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
5060	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMC	IINYAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
Consensus	(331)	AGDTQETFKLE	EDLPDDMLSMAMKVNMY	YIMCMIN	YAVT	TWSFILCALLIALL	FPK	Y			
								Section 8			
	(386) 386		400	410	420	430	440				
236	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
29	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
76	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
83	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
89	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
90	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
94	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
105	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
106	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
181	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
181/57	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
1014	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
4019	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
4020	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
4030	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
4033	(386)	QHGFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
4034	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
4057	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
4060	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	G	LQTHR	KTY
5060	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
Consensus	(386)	QHRFLN	FYAMYCH	ECDMYH	DRSGLKYN	GDFTN	KCRQCTCGQY	EDAA	GLLTHR	KTY	
		NS _M doména IV									

		NS _M doména V				G _C protein		Section 9	
		441	450	460	470	480	495		
236	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
29	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
76	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
83	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
89	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIGYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
90	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIGYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
94	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
105	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
106	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
181	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIGYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
181/57	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIGYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
1014	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
4019	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
4020	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
4030	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
4033	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
4034	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
4057	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
4060	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
5060	(441)	NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
Consensus		(441) NCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDPEKCSGEADITWNCTGPF							
		Section 10							
		496	510	520	530	540	550		
236	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
29	(496)	LNLGNCEKKQKKESYDNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
76	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
83	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
89	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
90	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
94	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
105	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
106	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
181	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
181/57	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
1014	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
4019	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
4020	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
4030	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
4033	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
4034	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
4057	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
4060	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
5060	(496)	LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							
Consensus		(496) LNLGNCEKKQKKESYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEBQRS							

Section 11

	(551)	551	560	570	580	590	605
236	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
29	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
76	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
83	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	VCILYPNQHPCR			
89	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
90	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
94	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	VCILYPNQHPCR			
105	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
106	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
181	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNRHPCR			
181/57	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNRHPCR			
1014	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
4019	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNRHPCR			
4020	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
4030	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
4033	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
4034	(551)	YHVQLTAEYAMLTRCCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
4057	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
4060	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
5060	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			
Consensus	(551)	YHVQLTAEYAMLTRYCDYYTQFTD	NSGYSQTTWRVYLRSHDFE	ACILYPNQHPCR			

Section 12

	(606)	606	620	630	640	650	660
236	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
29	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
76	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
83	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
89	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
90	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
94	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
105	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
106	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
181	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
181/57	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	NKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
1014	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
4019	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
4020	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
4030	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
4033	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
4034	(606)	CVKHGNKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
4057	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
4060	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
5060	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			
Consensus	(606)	CVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKF	DKDLNLALMSLHHA	FRGTSSPYIAK			

(661) 661 670 680 690 700 715

236 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

29 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

76 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

83 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKGLTEMNPFKHDEWDDF

89 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKGLTEMNPFKHDEMWDDF

90 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKGLTEMNPFKHDEMWDDF

94 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

105 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

106 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKGLTEMNPFKHDEMWDDF

181 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKGLTEMNPFKHDEMWDDF

181/57 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKGLTEMNPFKHDEMWDDF

1014 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKGLTEMNPFKHDEMWDDF

4019 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

4020 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYSGNALLKAIIDYIKYMKGLTEMNPFKHDEMWDDF

4030 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

4033 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

4034 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

4057 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

4060 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

5060 (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

Consensus (661) LLKEKKNEDLVTYAEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPFKHDEMWDDF

(716) 716 730 740 750 760 770

236 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV ICLSPKSGVSYDSIIA

29 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

76 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

83 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

89 (716) IFGVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

90 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTDVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

94 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

105 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

106 (716) ISEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

181 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

181/57 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

1014 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

4019 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

4020 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

4030 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

4033 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

4034 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

4057 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

4060 (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

5060 (716) IFEVSPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

Consensus (716) IFEVPPTKSPSVRRLESSYDFKTNVNSNP SHICKNIKTV VCLSPKSGVSYDSIIA

(771) 771 780 790 800 810 825

236 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 29 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 76 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYEAVGBEIIDAIKKSCKW
 83 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 89 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 90 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 94 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 105 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 106 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 181 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 181/57 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 1014 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 4019 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYEAVGBEIIDAIKKSCKW
 4020 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 4030 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 4033 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 4034 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYEAVGBEIIDAIKKSCKW
 4057 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 4060 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 5060 (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW
 Consensus (771) CGEPSQPSIYRKPDSQVFQSNADQTHFCLSDTHCLENYETVGBEIIDAIKKSCKW

(826) 826 840 850 860 870 880

236 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 29 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 76 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 83 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 89 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 90 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNNKPFYSELQKDYDK
 94 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 105 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 106 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 181 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 181/57 (826) ETEFTEYTQLKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 1014 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 4019 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 4020 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 4030 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 4033 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 4034 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 4057 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNKWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 4060 (826) ETEFTEYTQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 5060 (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNKWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK
 Consensus (826) ETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMDSGECTVTTNRWPIILCDNDKPFYSELQKDYDK

	(881)	881	890	900	910	920	935
236	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
29	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
76	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
83	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
89	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
90	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
94	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
105	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
106	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
181	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
181/57	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
1014	(881)	GQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
4019	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
4020	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
4030	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
4033	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
4034	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
4057	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
4060	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
5060	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHSNIDKIEVHELEDLEQYKKA					
Consensus	(881)	DQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVSHNNIDKIEVHELEDLEQYKKA					

	(936)	936	950	960	970	980	990
236	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
29	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
76	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
83	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
89	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
90	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
94	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
105	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
106	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
181	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
181/57	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
1014	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
4019	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
4020	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
4030	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
4033	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
4034	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
4057	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
4060	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
5060	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					
Consensus	(936)	TQKLQTSLTLPKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPALAGT					

(991) 991 1000 1010 1020 1030 1045

236 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

29 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

76 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI SYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

83 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

89 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

90 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

94 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

105 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

106 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIDVNTKHDELCTGPCP

181 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

181/57 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

1014 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

4019 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI SYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

4020 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

4030 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

4033 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

4034 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

4057 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

4060 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

5060 (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

Consensus (991) SIGFKITSKSGKHLLDVI GYVKSASYS AVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCP

(1046) 1046 1060 1070 1080 1090 1100

236(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

29(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

76(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

83(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

89(1046) VNVPHSTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

90(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

94(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

105(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

106(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

181(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

181/57(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

1014(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

4019(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

4020(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

4030(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

4033(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

4034(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

4057(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

4060(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

5060(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

Consensus(1046) VNVPHGTGWL TPAKERTSSWGCEBFGCLAISDGCVFGSCQDI IKDEITVYRKETE

Fúzní peptid

(1101) 1101 1110 1120 1130 1140 1155
 236(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 29(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 76(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 83(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 89(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 90(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 94(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 105(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 106(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 181(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 181/57(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 1014(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 4019(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 4020(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 4030(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 4033(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 4034(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 4057(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 4060(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 5060(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM
 Consensus(1101) ETTDVELCLTFADKTYCTNLNAITPIITDQFEVQPKTVEAYSLPRIIAVRNHEIM

(1156) 1156 1170 1180 1190 1200 1210
 236(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 29(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 76(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 83(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 89(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 90(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 94(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 105(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 106(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 181(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 181/57(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 1014(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCIDNDYQ
 4019(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 4020(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 4030(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 4033(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 4034(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 4057(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 4060(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 5060(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ
 Consensus(1156) VGQINDIGVYSKCGNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRKEVIVRKCFDNDYQ

(1211) 1211 1220 1230 1240 1250 1265
 236(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 29(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 76(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 83(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 89(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNADLTVE
 90(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 94(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 105(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 106(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 181(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 181/57(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 1014(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 4019(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 4020(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 4030(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 4033(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 4034(1211) ACKFLQIPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 4057(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 4060(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 5060(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE
 Consensus(1211) ACKFLQTPASYRLEBEEGSSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVE

(1266) 1266 1280 1290 1300 1310 1320
 236(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 29(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 76(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 83(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 89(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 90(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTAFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 94(1266) GVCTGCI NCFENIHCESTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 105(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 106(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 181(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 181/57(1266) GVCTGCI NCFENIHCESTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 1014(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 4019(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 4020(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 4030(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC SVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 4033(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 4034(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 4057(1266) GVCTGCI NCFENIHCESTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 4060(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 5060(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC
 Consensus(1266) GVCTGCI NCFENIHCELTIHSTVEASC PVVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVIC

(1321) 1321 1330 1340 1350 1360 1375

236(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

29(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDVAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

76(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

83(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

89(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEK^GERCKTWMCRV

90(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

94(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

105(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

106(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

181(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

181/57(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEK^VERCKTWMCRV

1014(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

4019(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

4020(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

4030(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

4033(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

4034(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

4057(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

4060(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

5060(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

Consensus(1321) NEKPGPTLPPFKICSAKTDAAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKD^DERCKTWMCRV

(1376) 1376 1390 1400 1410 1420 1430

236(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRDALRQHE

29(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

76(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

83(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

89(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

90(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

94(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

105(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

106(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

181(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

181/57(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

1014(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

4019(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

4020(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

4030(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

4033(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

4034(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

4057(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

4060(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

5060(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

Consensus(1376) RDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMAIFIVIYI^IVLPICPKLRD^TLRQHE

CT doména
G_C proteinu

(1431) 1431 1440
236(1431) DAYKREMKIR
29(1431) DAYKREMKIR
76(1431) DAYKREMKIR
83(1431) DAYKREMKIR
89(1431) DAYKREMKIR
90(1431) DAYKREMKIR
94(1431) DAYKREMKIR
105(1431) DAYKREMKIR
106(1431) DAYKREMKIR
181(1431) DAYKREMKIR
181/57(1431) DAYKREMKIR
1014(1431) DAYKREMKIR
4019(1431) DAYKREMKIR
4020(1431) DAYKREMKIR
4030(1431) DAYKREMKIR
4033(1431) DAYKREMKIR
4034(1431) DAYKREMKIR
4057(1431) DAYKREMKIR
4060(1431) DAYKREMKIR
5060(1431) DAYKREMKIR
Consensus(1431) DAYKREMKIR