

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Identifikace diferenciálně exprimovaných proteinů v savčích buňkách  
v průběhu infekce virem s využitím bioortogonální chemie  
(L-azidohomoalaninu).**

Bakalářská práce

**Pavλίna Kočová**

Školitel: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Školitel specialista: prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

České Budějovice 2014

**Kočová, P., 2014:** Identifikace diferenciálně exprimovaných proteinů v savčích buňkách v průběhu infekce virem s využitím bioortogonální chemie (L azidohomoalaninu). [Identification of newly synthesised proteins in mammalian cells during tick-borne encephalitis infection using bioorthogonal chemistry (L-azidohomoalanine). BSc. Thesis, in Czech] 37p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

This study was focused on changes in protein expression in glioblastoma cell line after infection with tick-borne encephalitis virus. Bioorthogonal chemistry (BONCAT method) was used to distinguish between previously synthesized proteins and newly synthesized proteins to observe changes in protein synthesis. Labelled proteins were purified and visualized using SDS-PAGE and western blotting. Purified proteins were also indentified using mass spectrometry. The number of the different labelled proteins decreases as the infection progress.

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

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

České Budějovice 18.4.2014

.....  
Pavλίna Kočová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Jankovi za odborné vedení práce a ochotu poradit, kdykoliv to bylo třeba. Dále profesoru Liboru Grubhofferovi, že mi umožnil pracovat v laboratoři, a vůbec všem z Laboratoře molekulární ekologie vektorů a patogenů za ochotu, trpělivost a příjemné a motivační pracovní prostředí. V neposlední řadě také velký dík patří celé rodině za to, že mě při psaní této práce podpořila.

# OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>                               | <b>1</b>  |
| <b>ÚVOD.....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>1 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>                                    | <b>3</b>  |
| 1.1 Obecná charakteristika virů .....                               | 3         |
| 1.1.1 Virová infekce .....  | 3         |
| 1.2 Klíšťová encefalitida .....                                     | 5         |
| 1.2.1 Taxonomie viru KE .....                                       | 5         |
| 1.2.2 Struktura a replikační cyklus viru KE .....                   | 5         |
| 1.2.3 Patogeneze onemocnění .....                                   | 6         |
| 1.3 Proteosyntéza.....  | 7         |
| 1.3.1 Proteosyntéza u neinfikovaných buněk .....                    | 7         |
| 1.3.2 Proteosyntéza u infikovaných buněk .....                      | 8         |
| 1.4 Bioortogonální chemie .....                                     | 10        |
| 1.4.1 Click chemie .....  | 10        |
| 1.4.2 Metoda BONCAT .....   | 11        |
| <b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>  | <b>13</b> |
| <b>3 MATERIÁL A METODY .....</b>                                    | <b>14</b> |
| 3.1 Použitá buněčná linie.....                                      | 14        |
| 3.1.1 Infekce buněk VKE .....                                       | 14        |
| 3.1.2 Inkubace buněk s AHA.....                                     | 14        |
| 3.1.3 Příprava lyzátu .....   | 15        |
| 3.2 Příprava proteinů .....   | 15        |
| 3.2.1 Click-iT reakce .....   | 15        |
| 3.2.2 Afinitní chromatografie s využitím magnetických kuliček ..... | 16        |
| 3.3 Detekce a vizualizace proteinů .....                            | 17        |
| 3.3.1 SDS-PAGE .....  | 17        |
| 3.3.2 Barvení gelů.....   | 19        |
| 3.3.3 Western blotting .....  | 19        |
| <b>4 VÝSLEDKY .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>5 DISKUZE .....</b>  | <b>29</b> |
| <b>6 ZÁVĚR .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>                            | <b>33</b> |

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|                   |   |
|-------------------|---|
| AHA               | L-azidohomoalanin   |
| APS               | amonium persulfát   |
| BCIP/NBT          | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate / nitro blue tetrazolium     |
| BOFES             | bovine fetal serum  |
| BONCAT            | z angl. „bioorthogonal non-canonical amino acid tagging“          |
| BSA               | z angl. „bovine serum albumin“                                    |
| CNS               | centrální nervová soustava  |
| dH <sub>2</sub> O | destilovaná voda  |
| DNA               | deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)                |
| dsRNA             | dvouvláknová RNA (double strand)                                  |
| DTT               | dithiotreitol   |
| eIF               | eukaryotní iniciační faktor                                       |
| GTP               | guanosintrifosfát   |
| ICAT              | z angl. „isotope-coded affinity tag“                              |
| IgG               | imunoglobulin G   |
| IL-6              | interleukin 6   |
| KE                | klíšťová encefalitida   |
| MOI               | z angl. „multiplicity of infection“                               |
| mRNA              | messenger RNA   |
| MS                | z angl. „mass spektrometry“, hmotnostní spektrometrie             |
| NGF               | z angl. nerve growth factor                                       |
| ORF               | z angl. „open reading frame“, otevřený čtecí rámec                |
| PAA gel           | polyakrylamidový gel  |
| PBS               | z angl. „phosphate buffered saline“, pufovaný fyziologický roztok |
| PFU               | z angl. „plaque forming unit“                                     |
| PVDF membrána.    | polyvinyliden difluoridová membrána                               |
| RNA               | ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)                          |
| RNáza L           | endoribonukleáza L  |
| SILAC             | z angl. „stable isotope labeling by amino acids in cell culture“  |
| TEMED             | N, N, N', N' – tetramethylendiamin                                |
| tRNA              | transferová RNA   |
| VKE               | virus klíšťové encefalidity                                       |

## ÚVOD

Virus klíšťové encefalidity (VKE) je medicínsky významným klíšťaty přenášeným flavivirem. Způsobuje závažné onemocnění nervové soustavy, klíšťovou encefalitidu. Ta může probíhat různě, od asymptomatické infekce až po těžkou meningoencefalitidu, která v některých případech končí smrtí (Gritsun a kol. 2003). VKE ročně způsobuje v České republice 500 – 1000 diagnostikovaných případů (EpiDat – databáze Státního zdravotnického ústavu v Praze), celosvětově se jedná o více než 10 000 onemocnění za rok (Kunz a Heinz 2003).

V průběhu infekce virem se mění metabolismus buňky a spektrum nově syntetizovaných proteinů se mění ve prospěch virových proteinů, syntéza buněčných proteinů je omezena (Alkhalil a kol. 2010). Tato práce se zabývá značením nově syntetizovaných proteinů v buněčné linii lidských glioblastomů pomocí bioortogonální chemie v různých intervalech od začátku infekce virem klíšťové encefalidity, purifikací značených proteinů a jejich identifikací.

# 1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1 Obecná charakteristika virů

Viry jsou malé nebuněčné organismy, na pomezí mezi živými a neživými formami života. Skládají se z genetické informace (ve formě DNA nebo RNA) a proteinového obalu (kapsidy). Obalené viry mají ještě membránu, zpravidla tvořenou dvojvrstvou fosfolipidů a ukotvenými specifickými povrchovými proteiny. Membrána bývá odvozena od membrány hostitelské buňky, ovšem proteiny v ní jsou kódovány virem. I když viry obsahují vlastní genetickou informaci a jsou schopné replikace, nečiní tak samostatně (nemají vlastní replikační aparát). K rozmnožování tedy vždy využívají hostitelskou buňku, kde modifikují metabolické procesy ve svůj prospěch, jsou intracelulárními parazity.

V současné době je dle ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) známo téměř tři tisíce kmenů virů. Viry jsou velice různorodé a dělíme je na základě různých hledisek do několika skupin, například podle tvaru kapsidy, jejich velikosti či způsobu přenosu. Často používaným systémem je dělení do skupin podle Baltimora (1971), který rozděluje viry podle typu genetického materiálu, který obsahují. Rozlišujeme tak viry s dvouvláknovou DNA, s jednovláknovou DNA, dvouvláknovou RNA, jednovláknovou RNA pozitivní či negativní polarity a viry s jednovláknovou RNA a reverzní transkriptázou. K těmto šesti skupinám můžeme přidat ještě skupinu hepadnavirů (např. virus hepatitidy B), které mají sice dvouvláknovou DNA, ale replikují se přes RNA intermediát a reverzní transkriptázou je tato RNA přepsána zpět do DNA.

Cest, kterými se virus může dostat do hostitelského organismu, je několik – přes trávicí trakt, respirační trakt (kapénkovou infekcí) nebo porušením kůže (zraněním, injekční stříkačkou, kousnutím hmyzem). Právě mezi viry přenášené krevsajcími členovci (nejčastěji se jedná o komáry nebo klíšťata) řadíme virus KE.

### 1.1.1 Virová infekce

Virová infekce způsobuje v hostitelském organismu mnoho změn, jak na úrovni systémové, tak na úrovni buněčné. Co se týče systémových změn, tak virová infekce indukuje imunitní odpověď. Imunitní odpověď zahrnuje jak specifickou, tak nespecifickou

část. K nespecifické imunitě patří likvidace virů fagocytujícími buňkami, produkce interferonu, vznik zánětu, a komplement. Specifickou imunitní odpověď zajišťují T a B lymfocyty, protilátky a některé z cytokinů.

Na buněčné úrovni rozlišujeme dva typy infekce. Při cytotocidní infekci dochází ke změně spektra syntetizovaných proteinů ve prospěch viru a k omezení syntézy buněčných makromolekul, což vede k poruše metabolismu buňky a změnám v cytoplazmatické membráně. Díky přítomnosti virových proteinů v cytoplazmatické membráně se buňka stává cílem imunitní odpovědi a následné destrukce. Oproti tomu u necytocidní infekce probíhá syntéza virových proteinů buď dostatečně pomalu a v souladu s metabolismem buňky (např. viry způsobující opar), nebo dochází k integraci virové nukleové kyseliny do buněčné a následně se množí společně. V některých případech virové infekce může dojít i k maligní transformaci buněk, jako například u lidského papilomaviru (Grussendorf-Conen 1990).

Změny v produkci proteinů následkem infekce lze sledovat kvantitativní analýzou proteinů, a to například pomocí 2D gelové elektroforézy (Lilley a Friedman 2004), izotopem kódovaných afinitních značek (ICAT) (Gygi a kol. 1999) nebo značení stabilními izotopy pomocí aminokyselin (SILAC) (Ong a kol. 2002). Následně může být ještě provedena purifikace značených proteinů a jejich identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Tyto metody ale nedokáží rozlišit nově syntetizované proteiny, jinými slovy proteiny syntetizované až v průběhu infekce. K tomuto účelu se využívá bioortogonální chemie a metoda zvaná BONCAT (Dieterich a kol. 2006). Metoda je blíže popsána v kapitole 1.4.2.

Co se týče morfologických změn, tak můžeme pozorovat (obzvláště u tkáňových kultur) cytopatický efekt viru. Buňky ztrácejí výběžky, zakulacují se a odlupují se od stěn kultivační nádoby. Dochází i ke změnám uvnitř buňky, konkrétně u flavivirů jsou to změny ve stavbě drsného endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu či mitochondrií (Růžek a kol. 2009).



## 1.2 Klíšťová encefalitida

### 1.2.1 Taxonomie viru KE

Virus klíšťové encefalidity (VKE) patří do čeledi Flaviviridae, rod *Flavivirus*. Většina zástupců tohoto rodu patří mezi arboviry, viry přenášené členovci (arthropod-borne viruses) a podle vektora přenosu se dělí do tří skupin, viry přenosné klíšťaty, komáry a viry bez známého vektora (Grard a kol. 2007). Mezi viry přenosné klíšťaty (tick-borne) patří virus klíšťové encefalidity, virus horečky Kyasanurského lesa či virus Omské hemoragické horečky. Viry přenosné komáry (mosquito-borne) jsou např. virus horečky Dengue, virus žluté zimnice, virus Japonské encefalidity a virus západního Nilu. K virům bez známého vektora se řadí virus Modoc a virus Rio Bravo (Gaunt a kol. 2001; Grard a kol. 2007).

U VKE rozlišujeme tři subtypy (Ecker a kol. 1999):

- Evropský subtyp, který se vyskytuje v Rakousku, Švýcarsku, Francii, Německu, Maďarsku, České republice, Slovensku, Chorvatsku, Finsku, Bělorusku a v evropské části Ruska, prototypovým kmenem je Neudoerfl
- Dálně-východní subtyp, který se vyskytuje ve východní části Ruska, v Číně, Japonsku, ale také v Litvě, na Ukrajině a v evropské části Ruska. Tento subtyp zahrnuje prototypový kmen Sofjin
- Sibiřský subtyp, který se vyskytuje v asijské části Ruska, s prototypovými kmeny Aina a Vasilchenko

Všechny subtypy jsou si geneticky i antigeně velice podobné, avšak sibiřský subtyp je více podobný dálně-východnímu subtypu než subtypu evropskému (Ecker a kol. 1999)

Evropský subtyp VKE je přenášen klíštětem *Ixodes ricinus*, dálně-východní a sibiřský subtyp klíštětem *I. persulcatus* (Gritsun a kol. 2003). Hlavními hostiteli a rezervoárem viru jsou drobní hlodavci, člověk je pouze náhodným hostitelem a nehraje významnější roli v životním cyklu viru v přírodě (Dumpis a kol. 1999; Mandl 2005).

### 1.2.2 Struktura a replikační cyklus viru KE

VKE je obalený virus o velikosti cca 50 nm, tvořený kapsidou a obalem. Kapsida je tvořena proteinem C (capsid) a obsahuje jednořetězcovou RNA pozitivní polarity o délce

přibližně 11 kbp kódující 3 strukturální a 7 nestrukturálních proteinů. V membráně obalující kapsidu se nachází protein E (envelope) a protein M (membrane). Povrchový glykoprotein E je hlavní antigenní determinantou a ovlivňuje míru virulence viru (Dumpis a kol. 1999). Protein M se vyskytuje pouze na zralých extracelulárních virionech, vzniká štěpením prekurzorového proteinu prM.

Replikační cyklus viru začíná přichycením virionu na buňku, které je zprostředkováno glykoproteinem E, následuje receptory zprostředkovaná endocytóza virionu do buňky. Po uvolnění nukleokapsidy do cytoplazmy hostitelské buňky je virová RNA použita pro syntézu negativní RNA, která je použita jako templát pro syntézu nových virových (+)RNA, sloužící jako mRNA (s jediným ORF) pro translaci. Vznikne polyprotein kódující všechny virové proteiny, který je štěpen buněčnou a virovou proteázou na konečné produkty. Tvoření nových virionů probíhá pučením přes membránu endoplazmatického retikula, ze které se uvolňují nezralé viriony, které nejsou infekční (Elshuber a kol. 2003). Při transportu těchto částic přes Golgiho aparát je protein prM štěpen na protein M, poté jsou zralé viriony uvolněny z buňky (Heinz a Stiasny 2012).

### **1.2.3 Patogeneze onemocnění**

Člověk se nejčastěji nakazí virem KE během sání infikovaného klíštěte, jsou ale známy i případy alimentární nákazy z nepasterizovaného mléka (Grešíková a kol. 1975). Krávy, ovce nebo kozy mohou být potenciálně nakažené VKE a během viremické fáze sekretovat virus v mléce (Grešíková 1958).

Po nákaze virem KE se virus začne replikovat v místě vstupu (nejčastěji kůže), a poté je pomocí Langerhansových buněk transportován do spádových lymfatických uzlin, kde probíhá další replikace viru. Lymfatickým systémem se virus dostává dále do krve, kterou se šíří do vnitřních orgánů, zejména jater, sleziny a kostní dřeně, kde způsobuje virémii. Ta je doprovázena příznaky podobnými chřipce, jako je zvýšení teploty, bolesti hlavy, svalů a nevolnost (Mandl 2005). Během této fáze se neobjevují příznaky poškození CNS. Po 2-10 dnech bez příznaků následuje druhá fáze, která se rozvine jen asi u jedné třetiny pacientů. Tato fáze je charakterizována šířením viru do CNS, kde je replikace viru spojená se zánětem a následnou dysfunkcí buněk (Dumpis a kol. 1999). Dvoufázový průběh je charakteristický pro evropský subtyp. Subtyp dálně-východní je jednofázový, způsobuje těžké poruchy CNS, u nejtěžších případů dochází k poškození neuronů v částech mozku

a míchy (Gritsun a kol. 2003; Halstead 2012). Sibiřský subtyp je charakterizován mírnějším průběhem akutní fáze, často bez vážnějšího poškození CNS, ovšem je zde větší riziko, že se rozvine chronická forma. Obecně má toto onemocnění mírnější průběh u dětí než u dospělých a těžší formy často způsobují dlouhotrvající či trvalé neuropsychiatrické následky (Mandl 2005).

## 1.3 Proteosyntéza

### 1.3.1 Proteosyntéza u neinfikovaných buněk

Proteosyntéza se skládá ze dvou hlavních kroků – transkripce genetické informace z DNA do mRNA a poté translace této informace z mRNA do aminokyselinové sekvence proteinu.

Transkripce probíhá u eukaryotických buněk v jádře (nukleoplazmě), kdy se pomocí RNA polymerázy syntetizuje komplementární řetězec k templátové DNA. Na promotor nasedne RNA polymeráza, která rozvolní dvoušroubovici DNA. Nukleosidtrifosfáty se samovolně párují s odhalenými bázemi DNA a RNA polymeráza je spojí do řetězce fosfodiesterovými vazbami. V eukaryotických buňkách vzniká nejdříve primární transkript, pre-mRNA, který podléhá několika posttranskripčním úpravám.

Na 5'-konec pre-mRNA je navázán 7' methyl guanosin (tzv. čepička). Na 3'-konci dochází k polyadenylaci, kdy je část primárního transkriptu naštěpena nukleázou a polymeráza poté přidá několik stovek nukleotidů dlouhou sekvenci složenou pouze z adeninů. Tyto dvě úpravy (čepička a poly(A) úsek) stabilizují molekulu RNA, pomáhají při jejím transportu do cytoplazmy a jsou také využity jako signál, že mRNA je kompletní. Kromě toho dochází ještě u většiny eukaryotních RNA k odstranění intronů (nekódujících úseků RNA) takzvaným splicingem (sestříhem) a následně k opětovnému spojení exonů. Sestříhaná mRNA je poté transportována do cytoplazmy.

Translaci můžeme rozdělit na tři fáze: iniciaci, elongaci a terminaci. Probíhá na ribozomech drsného ER či na volných ribozomech v cytoplazmě. Pro zahájení translace je potřeba vytvoření iniciačního komplexu, tzn. malé (40S) a velké (60S) podjednotky ribozomu a iniciační tRNA, kterého se účastní několik iniciačních faktorů (eIF).

V disociovaném stavu je na malé podjednotce navázán eIF3 a na velké podjednotce eIF6, které brání spojení. Na malou podjednotku se za pomoci eIF4a váže iniciační tRNA

v komplexu s GTP a eIF2a. Poté se malá podjednotka naváže na 5'-konec mRNA s navázaným eIF4 a po rozpoznání start kodonu AUG iniciační tRNA dojde k hydrolyze GTP, uvolnění několika iniciačních faktorů a za pomoci eIF5 se připojí velká podjednotka. Vznikne iniciační komplex pro zahájení translace, při které se podle genetického kódu překládá pořadí bází na sekvenci aminokyselin v proteinu. Iniciační tRNA se váže na P-místo (peptidylové) ribozomu, na A-místo (aminoacylové) se poté naváže další aminoacyl-tRNA. Mezi aminokyselinami vznikne za účasti peptidyltransferázy peptidická vazba a ribozom se posune o 3 báze (kodon). Tím se uvolní P-místo, na které se naváže další aminoacyl-tRNA. Tento proces prodlužování aminokyselinového řetězce se nazývá elongace.

K ukončení translace, terminaci, dochází, když se do vazebného A-místa dostane jeden ze stop kodonů (UAA, UAG nebo UGA), které nekódují žádnou aminokyselinu a místo tRNA vážou terminační faktory. Díky nim peptidyltransferáza použije jako substrát místo aminokyseliny molekulu vody, a tím v P-místě uvolní polypeptidový řetězec z tRNA do cytoplazmy. Ribozom je odpojený od mRNA a podjednotky jsou disociovány.

Nově syntetizované proteiny často podléhají posttranslačním úpravám. K nim patří odštěpení prvního methioninu na N-konci, odštěpení signálního peptidu, rozštěpení peptidu, navázání funkčních skupin (glykosylace, fosforylace, ubikvitinace) či vznik disulfidických můstků. Tyto modifikace ovlivňují strukturu a funkci proteinů a jejich stabilitu.

### **1.3.2 Proteosyntéza u infikovaných buněk**

Protože viry nemají vlastní replikační a translační aparát, jsou v tomto ohledu zcela závislé na hostitelské buňce. Aby mohly využít k syntéze proteinů potřebných pro replikaci buněčných ribozomů, musí zablokovat vlastní proteosyntézu buňky. Ovšem infikovaná buňka má své obranné mechanismy, kterými může virové translaci zabránit, a toto musí virus také obejít.

#### **1.3.2.1 Blokace proteosyntézy hostitelské buňky**

Existuje několik mechanismů, jak může virus omezit proteosyntézu v hostitelské buňce a optimalizovat produkci virových proteinů. Jedna z možností je omezení syntézy buněčných proteinů – degradace hostitelské mRNA, inaktivace translačních faktorů buňky

a produkce faktorů, které specificky inhibují buněčnou translaci. Další možností je zvýhodnění syntézy virových proteinů – pomocí syntézy faktorů, které usnadňují virovou proteosyntézu, produkcí virové mRNA, která má vyšší afinitu k iniciačním faktorům a tak vytlačuje buněčnou mRNA, nebo změnou iontového prostředí v buňce, které bude zvýhodňovat translaci virové mRNA (Schneider a Shenk 1987).

V případě Herpes simplex viru 1 dochází ke změně exprese regulačních proteinů, které se v buňce účastní RNA splicingu (snížení exprese), translace a následné degradace mRNA (zvýšení exprese) (Hong a kol. 2008). Virus vezikulární stomatitidy produkuje velké množství virové mRNA, která je v infikované buňce translatována s vyšší efektivitou, a současně částečně inaktivuje některé z iniciačních faktorů translace – například fosforyluje  $\alpha$  podjednotku eIF2 (Black a kol. 1994; Schneider a Shenk 1987).

#### 1.3.2.2 Reakce viru na obranné mechanismy buňky

Nejčastějším obranným mechanismem buňky je indukce nespecifické imunitní odpovědi, která zahrnuje produkci interferonů (Lobigs a kol. 2003). Jedná se o glykoproteiny, které vazbou na specifické povrchové receptory okolních buněk zvyšují rezistenci těchto buněk k virové infekci. Interferony indukují expresi enzymů, v tomto případě zejména proteinkinázy R a (2'-5') oligoadenylátsyntetázy (katalyzátorem exprese těchto enzymů je dsRNA), a molekul ovlivňujících buněčný cyklus a apoptózu (Goodbourn a kol. 2000). Proteinkináza R fosforyluje  $\alpha$ -podjednotku eIF2 a tím dochází k inhibici iniciace proteosyntézy na ribosomech. Oligoadenylátsyntetáza katalyzuje tvorbu oligoadenylátu, kde jsou jednotlivé nukleotidy spojeny vazbami 2'-5', nikoliv 3'-5'. Tyto následně aktivují endoribonukléazu L (RNáza L), která rozkládá mRNA a rRNA (Schneider a Shenk 1987).

Virová obrana proti produkci interferonu je značně různorodá. V případě infekce některými viry dochází k produkci menšího množství dsRNA, a tím nedochází k vyšší expresi těchto enzymů. Jiné zase produkují proteiny, které se váží na dsRNA a tím ji inaktivují. Tuto aktivitu mají například proteiny přítomné v kapsidě reovirů či NS1 protein viru chřipky (Lloyd a Shatkin 1992; Lu a kol. 1995). Další možností pro viry jak obejít buněčnou odpověď je inhibice proteinkinázy R, jako u infekce poliovirem, nebo syntéza inhibitorů RNázy L při infekci virem HIV (Black a kol. 1989; Martinand a kol. 1999).

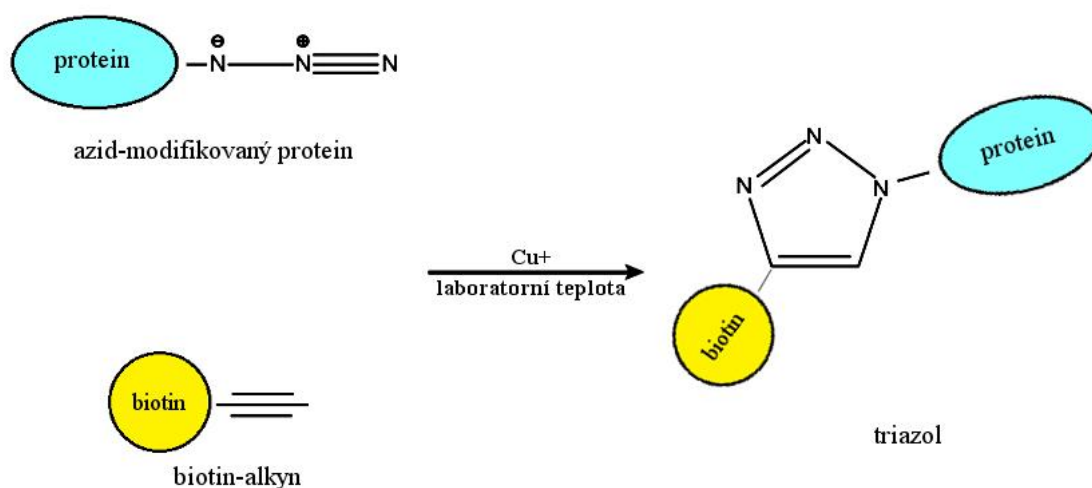
## 1.4 Bioortogonální chemie

Bioortogonální chemie je soubor všech reakcí, které mohou probíhat v živých systémech a přitom neovlivňují přirozené biochemické procesy (Sletten a Bertozzi 2009). Využívá modifikovaných molekul, které nesou malou nereaktivní skupinu. Tyto molekuly, strukturně velice podobné nativním molekulám, jsou zpracovány vlastními enzymy buňky. Například modifikované aminokyseliny nesoucí nereaktivní skupinu jsou akceptovány translačním mechanismem buňky a inkorporovány do proteinů. Tato nereaktivní skupina přitom zůstává inertní k okolnímu prostředí (Prescher a Bertozzi 2005). Inertní skupina poté může reagovat s přidanou sondou (specifická reakce inertní skupiny se sondou, tzv. Click reakce, Obr. 1), která nese funkční skupinu (např. fluorofor či biotin), a to za podmínek podobných těm, které se vyskytují v živých organismech – probíhají při teplotě 37 °C a v rozmezí pH 6-8.

### 1.4.1 Click chemie

Click chemie je definována jako souhrn reakcí, které probíhají s vysokou rychlostí, jsou vysoce selektivní a mají vysoké výtěžky (Baskin a Bertozzi 2007). Kromě tohoto musí splňovat i další kritéria – být modulární, produkovat pouze neškodné meziproducty a produkty, reakce by měla být stereospecifická, probíhat v jednoduchých reakčních podmínkách (ideálně by neměla být ovlivněna přítomností vody a kyslíku) a produkty by měly být snadno izolovatelné (Kolb a kol. 2001).

Jednou z Click reakcí je 1,3-dipolární cykloadice mezi azidem a terminálním alkynem, malými inertními skupinami, kdy jedna z nich (azid nebo alkyne) je navázána na sledovanou molekulu a druhá je konjugována s malou reaktivní značkou (funkční skupinou), použitelnou pro pozdější detekci. Touto značkou může být fluorofor anebo například biotin (schéma reakce viz Obr. 1). Jak alkyne, tak azidy jsou sloučeniny, které se v živých organismech běžně nevyskytují, což činí reakci velice specifickou (Beatty a kol. 2006).



**Obrázek 1:** Schéma Click reakce mezi azidem a alkynem.

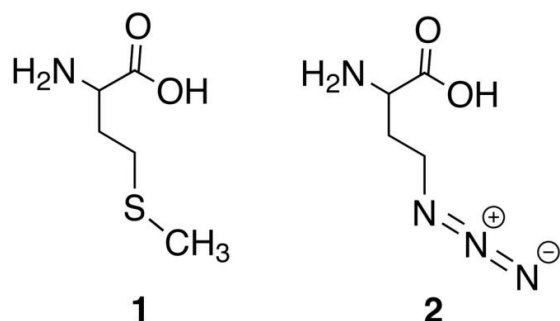
Značení a detekce proteinů s využitím Click reakce probíhá ve dvou krocích. Prvním krokem je metabolické značení proteinů, buňky jsou inkubovány s modifikovanou aminokyselinou nesoucí inertní skupinu (L-azidohomoalanin, AHA), následuje vlastní Click reakce (1,4-dipolární cykloadice) mezi azidem a alkynem s navázanou funkční skupinou katalyzovaná ionty  $\text{Cu}^+$ , při které vzniká stabilní triazol (schéma viz Obr. 1). Výhodou této reakce je její rychlost, reakce je až  $10^7$  krát rychlejší při použití iontů  $\text{Cu}^+$  než u nekatalyzované reakce (Lahann 2009). Protože koncentrace iontů mědi potřebná pro katalýzu reakce je pro organismus toxická, při pokusech jsem Click reakci prováděla až po lýze buněk.

#### 1.4.2 Metoda BONCAT

BONCAT (bio-orthogonal non-canonical amino acid tagging) je jedna z metod, jak zviditelnit a identifikovat nově syntetizované proteiny. Principem postupu, který jsem používala, je inkorporace azidové skupiny do proteinu (metabolické značení s využitím AHA), následné chemoselektivní značení alkynovým tagem (Click reakce), purifikace (afinitní chromatografie) a identifikace (hmotnostní spektrometrie, MS) naznačených proteinů.

AHA je syntetickým analogem methioninu (Obr. 2), není toxický pro buňky a nezasahuje do metabolismu proteinů v buňce, čímž splňuje podmínky bioortogonality (Dieterich a kol. 2006). Zároveň náhrada methioninu jeho analogem umožňuje např.

značení fluorescenční sondou (Kiick a kol. 2002). Dlouho se předpokládalo, že azidy jsou nestabilní či toxické. Ačkoliv azidový anion má toxicitu srovnatelnou s kyanidem, organické azidy toxické nejsou, při 37 °C jsou stabilní, nereagují s vodou a jsou rezistentní k oxidaci (Debets a kol. 2010; Prescher a Bertozzi 2005).



**Obrázek 2:** Methionin (1) a L-azidohomoalanin (2).

Tato metoda je omezena na proteiny, které obsahují alespoň jeden methionin. Pro příklad, část lidského proteomu methionin neobsahuje vůbec (1,02 %) a dalších 5,08 % všech lidských proteinů obsahuje methionin jen v N-terminální oblasti, která může být předmětem posttranslačních úprav. Z toho plyne, že teoreticky může být 94 % lidských proteinů naznačeno metodou BONCAT (Dieterich a kol. 2007).



## **2 CÍLE PRÁCE**

- Kultivace savčích buněk (glioblastů) v přítomnosti AHA
- Provedení Click reakce
- Detekce značených proteinů pomocí SDS-PAGE a western blotu
- Identifikace značených proteinů pomocí MS

## **3 MATERIÁL A METODY**

### **3.1 Použitá buněčná linie**

Neurálních buněčných linií existuje více, ale po zhodnocení použitelnosti jednotlivých linií bylo rozhodnuto, že pro sledování změn proteosyntézy bude používána buněčná linie glioblastomů, odvozená od podpůrných buněk neurálního původu (Prof. T. Eckschlager, 2. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova). Buňky byly kultivovány při 37 °C v médiu RPMI (Sigma-Aldrich) s přísadkou 10% BOFES (bovine fetal serum, PAA Laboratories), antibiotik/antimykotik (PAA Laboratories), merkaptoethanolu (Merck) a glutaminu (PAA Laboratories). Veškerá práce s buňkami probíhala v boxu s laminárním prouděním, tzn. ve sterilním prostředí.

#### **3.1.1 Infekce buněk VKE**

Pro infekci byl používán virus KE, kmen Neudoerfl, namnožený v glioblastomech, v suspenzi média RPMI. Titr viru, vyjádřený v plakotvorných jednotkách (PFU, plaque forming units) byl  $10^8$  PFU/ml.

Infekce buněk virem KE probíhala v kultivačních lahvích o objemu 25cm<sup>3</sup>. Na jednu láhev bylo nasazeno 2 x 10<sup>6</sup> buněk a necháno 12 hodin v boxu při 37 °C, aby se buňky přichytily na dno kultivační nádoby.

Médium v kultivační lahvi bylo odebráno a nahrazeno 2 ml čerstvého média s virem. Adsorpce probíhala v koncentraci 10 MOI (multiplicity of infection), k 1,8 ml média bylo přidáno 200 µl virové suspenze. Buňky byly inkubovány 2 hodiny při teplotě 37 °C. Poté bylo médium s virem odebráno a buňky byly promyty sterilním PBS (0,137 M NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3). Bylo přidáno 10 ml čerstvého RPMI média a buňky byly inkubovány po dobu 12, 24, 36, 48, 72, 96 a 120 hodin (počítáno od začátku infekce).

#### **3.1.2 Inkubace buněk s AHA**

Metabolické značení proteinů pomocí AHA bylo započato 2 hodiny před koncem daného intervalu (např. u intervalu 12 hodin začalo značení 10 hodin po infekci). Z kultivační lahve bylo odebráno médium, buňky byly promyty sterilním PBS (pH 7,3)

a byly k nim přidány 2 ml RPMI média bez methioninu (RPMI-1640 modified Sigma-Aldrich), s přidavkem 10% BOFES, antibiotik/antimykotik, merkaptoethanolu, glutaminu a cysteinu (L-cystine Research Grade, Serva). Po 2 hodinách inkubace při 37 °C byl k médiu přidán zásobní roztok AHA (Click-iT® AHA L-Azidohomoalanine, LifeTechnologies) tak, aby výsledná koncentrace byla 50 µM. Buňky byly s AHA inkubovány dalších 60 minut. Poté byl připraven lyzát.

### 3.1.3 Příprava lyzátu

Buňky v kultivační lahvi byly pomocí škrabky na buňky seškrábnuty do suspenze s médiem. Ta byla přenesena do mikrozkušavky a centrifugována při 4 °C 10 minut a 400 x G. Supernatant (médiem) byl opatrně odebrán a pelet byl rozsuspendován v 1 ml sterilního PBS (pH 7,3) a opět centrifugován při 4 °C 10 minut, 400 x G. Tento promývací krok byl ještě jednou zopakován. Poté bylo k peletu přidáno 500 µl lyzačního pufru (10% SDS v 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) s inhibitory proteáz (HALT™ Protease Inhibitor Cocktail (100x), Thermo Scientific) a fosfatáz (HALT™ Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x), Thermo Scientific) v ředění 10 µl na 1 ml lyzačního pufru. Vzniklý lyzát byl 10 minut sonikován, 10 minut vortexován při laboratorní teplotě a následně 5 minut centrifugován na maximální otáčky (10 000 x G). Lyzát byl skladován při -75 °C do dalšího zpracování.

## 3.2 Příprava proteinů

### 3.2.1 Click-iT reakce

U Click reakce je požadována maximální množství proteinů 200 µg v maximálním objemu 50 µl, proto byla u lyzátu spektrofotometricky změřena koncentrace proteinů (Nanophotometer Implen). Pro provedení Click reakce byl používán Click-iT Protein Reaction Buffer Kit (Life Technologies).

Ke 100 µl Click-iT reakčního pufru byl přidán biotin-alkyn (Life Technologies) nebo Alexa Fluor® 488 alkyn (Life Technologies) tak, aby výsledná koncentrace byla 40 µM. Ke směsi bylo přidáno odpovídající množství vzorku dle naměřené koncentrace a přidána dH<sub>2</sub>O na celkový objem 160 µl. Směs byla 5 vteřin vortexována. Poté bylo přidáno 10 µl roztoku CuSO<sub>4</sub> o koncentraci 40 mM a opět 5 vteřin vortexováno. Následně bylo přidáno 10 µl Click-iT reaction buffer additive 1, 5 vteřin vortexováno a ponecháno 2-3 minuty

stát. Pak bylo přidáno 20  $\mu$ l Click-iT reaction buffer additive 2, směs byla 5 vteřin vortexována. Click reakce probíhala dalších 20 minut za pomalého otáčení na rotátoru.

Po 20 minutách bylo provedeno srážení proteinů. Ke směsi bylo přidáno 600  $\mu$ l methanolu (Lachner), 400  $\mu$ l chloroformu (Lachner) a 150  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Vše bylo krátce zvortexováno a centrifugováno 5 minut při 13 000 x G. Vizuálně se daly odlišit dvě fáze, oranžová a bezbarvá. Oranžová fáze byla opatrně odebrána tak, aby nebyla porušena vrstva vysrážených proteinů na rozhraní fází. K druhé fázi bylo přidáno 450  $\mu$ l methanolu, směs byla krátce vortexována a centrifugována 10 minut na maximální otáčky. Supernatant byl odebrán a pelet byl ještě jednou promyt methanolem. Po odstranění supernatantu byl pelet vysušen ve vakuu a následně rozpuštěn v 50  $\mu$ l lyzačního pufru (10% SDS v 50 mM Tris-HCl, pH 8,0). Takto připravené proteiny byly použity pro další zpracování.

Všechny kroky, ve kterých vzorek obsahoval azidovou skupinu anebo fluorescenční značku Alexa Fluor® 488 probíhaly ve tmě.

### **3.2.2 Afinitní chromatografie s využitím magnetických kuliček**

Pro purifikaci proteinů po proběhlé Click reakci bylo využito afinitní chromatografie na magnetických kuličkách. V závislosti na tom, jaký konjugát byl použit při Click reakci, byla afinitní chromatografie prováděna buď na magnetických kuličkách se streptavidinem (pokud byl použit biotin-alkyn) nebo na magnetických kuličkách s proteinem G (pokud byla použita Alexa Fluor 488® alkyn).

#### a) Streptavidin

Do mikrozkušavky bylo odebráno 30  $\mu$ l magnetických kuliček se streptavidinem (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1, Life Technologies) a mikrozkušavka byla umístěna do magnetického stojánu. Po minutě byl odebrán skladovací roztok a magnetické kuličky byly 2x promyty 0,5 ml PBS (0,137 M NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). Poté byly kuličky rozpuštěny v 380  $\mu$ l PBS (pH 7,4), k nim bylo přidáno 20  $\mu$ l vzorku a 4  $\mu$ l inhibitorů proteáz (HALT™ Phosphatase Inhibitor cocktail (100x), Thermo Scientific). Směs byla umístěna na 30 minut do rotátoru, chráněna před světlem.

Po 30 minutách byla mikrozkumavka umístěna do magnetického stojánku a po dvou minutách byl roztok odebrán do nové mikrozkumavky, označené jako FT („flow-through“). Magnetické kuličky byly poté 3x promyty 0,5 ml PBS (pH 7,4), odebrané roztoky byly přeneseny do mikrozkumavek s označením W<sub>1-3</sub> („wash“). Po promytí byly magnetické kuličky rozsuspendovány v 20 µl dH<sub>2</sub>O. Z toho byly 4 µl použity pro detekci pomocí SDS-PAGE, zbylých 16 µl bylo odesláno na analýzu hmotnostní spektrometrií.

#### b) Alexa Fluor 488®

Do mikrozkumavky bylo odebráno 30 µl magnetických kuliček s navázaným proteinem G (Life Technologies) a mikrozkumavka byla umístěna do magnetického stojánku. Po minutě byl odebrán skladovací roztok a magnetické kuličky byly 2x promyty v 0,5 ml PBS, pH 7,4. Poté byly rozsuspendovány v 50 µl PBS pH 7,4, k nim byla přidán 1 µl anti-Alexa Fluor® 488 rabbit IgG (Life Technologies) a směs byla 30 minut vortexována při nízké rychlosti. Poté byla mikrozkumavka umístěna do magnetického stojánku, roztok byl odebrán a magnetické kuličky byly 2x promyty 0,5 ml PBS (pH 7,4). Následně k nim bylo přidáno 180 µl PBS pH 7,4, 20 µl vzorku a 2 µl inhibitorů proteáz (HALT™ Phosphatase Inhibitor cocktail (100x), Thermo Scientific). Směs byla 30 minut vortexována při nízké rychlosti, chráněna před světlem.

Další postup byl stejný jako výše.

V obou případech byly proteiny navázané na magnetických kuličkách odeslány pro identifikaci Mgr. Peteru Koníkovi (Ústav chemie a biochemie, PŘF JU). Vzorky byly štěpeny trypsinem, tryptické štěpy byly separovány NanoAcquity UHPLC (Waters) na C18 koloně a analyzovány hmotnostním spektrometrem ESI-QTOF PREMIER (Waters). Identifikace proteinů probíhala softwarem ProteinLynxGlobalServer software (Waters) s využitím databáze Swiss-Prot.

### **3.3 Detekce a vizualizace proteinů**

#### **3.3.1 SDS-PAGE**

Pro separaci proteinů podle velikosti byla použita polyakrylamidová gelová elektroforéza (Laemmli 1970). Probíhala na 12% polyakrylamidových (PAA) gelech s 5%

zaostřovacím gelem. Složkami připravených gelů je 30% Acrylamide Mix, směs akrylamidu a bis-akrylamidu 37,5:1 (Merck), 10% APS (Amresco), TEMED (Sigma Aldrich), zaostřovací pufr (1M Tris-base, 0,4% SDS, pH 6,8), separační pufr (1,5M Tris-base, 0,4% SDS, pH 8,8) a dH<sub>2</sub>O. Množství potřebná pro namíchání jednoho gelu jsou uvedena v Tabulce I.

**Tabulka I:** Objemy roztoků potřebné pro přípravu zaostřovacího a separačního gelu.

|                   | Zaostřovací gel (ml) | Separací gel (ml) |
|-------------------|----------------------|-------------------|
| 30% akrylamid     | 2                    | 0,17              |
| Zaostřovací pufr  | 1,25                 | -                 |
| Separací pufr     | -                    | 0,25              |
| dH <sub>2</sub> O | 1,7                  | 0,57              |
| 10% APS           | 0,05                 | 0,01              |
| TEMED             | 0,002                | 0,001             |

Vzorky pro elektroforetickou separaci byly smíchány s 4x redukujícím vzorkovým pufrům (Fermentas, Thermo Scientific) s přidavkem dithiothreitolu (DTT) a zahřívány 10 minut na 70 °C. Do sestavené aparatury (Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad) byl nalit elektroforézový pufr (25 mM Tris-base, 0,192 M glycin, 3,6 mM SDS) a do jamek byly naneseny vzorky. Do jedné jamky byl nanesen proteinový marker, do ostatních připravené vzorky. Pro některé vzorky byly vytvořeny dva totožné gely; jako proteinový marker byl u jednoho gelu určeného pouze pro barvení proteinů použit Protein Ladder (10-250 kDa) (New England BioLabs) a u druhého gelu určeného pro blotování Prestained Protein Marker VI (10 – 245 kDa) (Applichem).

Elektroforetická separace proteinů na 12% PAA gelu probíhala cca 1,5 hodiny při napětí 120 V. Po separaci byly gely opláchnuty dH<sub>2</sub>O, aby se odmyl zbytek elektroforézového pufru. Jeden gel byl použit pro western blotting, druhý pro barvení proteinů pomocí PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas, Thermo Scientific). Kvůli nízké intenzitě barvení byly některé gely nabarveny pomocí Silver Stain Kitu (Pierce, Thermo Scientific). V případě, že byl připraven pouze jeden gel se vzorky, byl použit pro western blotting a následně (pro kontrolu přeblotování všech proteinů) byl obarven PageBlue™.

### 3.3.2 Barvení gelů

#### a) PageBlue™ Protein Staining Solution

Polyakrylamidový gel byl 3x promyt v dH<sub>2</sub>O po dobu 10 minut a poté byl umístěn do barvicího roztoku (PageBlue™ Protein Staining Solution) na 1 hodinu (nebo přes noc). Následně byl gel 2x opláchnutý v dH<sub>2</sub>O a odbarvován v dH<sub>2</sub>O. Gely byly focené gel-dokumentačním zařízením MiniLumi (DNR Bio-Imaging Systems).

#### b) Silver Stain Kit

Gel byl promýván 2 x 5 minut v dH<sub>2</sub>O a poté fixován 2 x 15 minut ve fixovacím roztoku (30% ethanol, 10% kyselina octová). Poté byl gel promyt 2 x 5 minut v 10% ethanolu a 2 x 5 minut v dH<sub>2</sub>O. Následně byl gel inkubován 1 minutu v roztoku Silver Stain Sensitizer (ředění 1:500 v dH<sub>2</sub>O), promyt v dH<sub>2</sub>O 2 x 1 minutu a inkubován v roztoku Stain Working Solution (Silver Stain Enhancer, ředění 1:50 v roztoku Silver Stain) po dobu 30 minut. Gel byl rychle 2x opláchnut v dH<sub>2</sub>O po dobu 20 vteřin, poté byl inkubován v roztoku Developer Working Solution (Silver Stain Enhancer, ředění 1:50 v Silver Stain) 2-3 minuty, dokud se na gelu neobjevily proužky. Po dosažení požadované intenzity bylo vyvíjení zastaveno 5% roztokem kyseliny octové. Gel byl v tomto roztoku rychle opláchnut a poté v čistém 10 minut inkubován. Gely byly focené gel-dokumentačním zařízením MiniLumi (DNR Bio-Imaging Systems).

### 3.3.3 Western blotting

Elektroforeticky separované proteiny byly přeneseny na polyvinyliden difluoridovou (PVDF) membránu (Pall) metodou podle Towbina (1979).

PVDF membrána byla inkubována 5 minut v methanolu a následně stejně jako SDS-PAGE gel a blotovací papíry v blotovacím pufru (25 mM Tris-base, 0,192 M glycin, 20% methanol). V blotovací aparatuře (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) byl sestaven blotovací sendvič. Případné bublinky byly při sestavování odstraněny skleněnou tyčinkou. Blotování probíhalo 1 hodinu při 20 V.

Po hodině a po rozebrání blotovací aparatury byly na membráně označeny jamky a membrána byla krátce promyta v dH<sub>2</sub>O. Poté byla hodinu blokována v 5% mléce (5% sušené odtučněné mléko v PBS, pH 7,4) při laboratorní teplotě, nebo přes noc při 4 °C.

Další postup se mírně lišil podle použitého konjugátu (biotin-alkyn / Alexa Fluor® 488 alkyn).

a) Streptavidin

Membrána byla inkubována 1 hodinu v 5% mléce s přidaným streptavidinem s navázanou alkalickou fosfatázou (Streptavidin Alkaline Phosphatase, Vector Laboratories) v ředění 1:1000.

b) Alexa Fluor® 488

Membrána byla inkubována 1 hodinu v 5% mléce s přidanou primární protilátkou (anti-Alexa Fluor® 488 Rabbit, Life Technologies) v ředění 1:1000. Poté byla 3x promyta v PBS-Tween (0,05% Tween 20 v PBS, pH 7,4) po dobu 10 minut a následně 1 hodinu inkubována se sekundární protilátkou (Alkaline Phosphatase Goat Anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories), také v ředění 1:1000.

Následně byly membrány 2x promyty v PBS-Tween, 1x v PBS a umístěny do vyvolávacího roztoku pro alkalickou fosfatázu (20 µl 1x BCIP/NBT na 1 ml 0,1 M Tris-Base, 0,05 M MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M NaCl, pH 9,5) a ponechány vyvolávat za tmy, dokud se na membráně neobjevily proužky. Poté byly membrány promyty dH<sub>2</sub>O, vysušeny a vyfoceny gel-dokumentačním zařízením MiniLumi (DNR Bio-Imaging Systems).



## 4 VÝSLEDKY

Při pokusu značení nově syntetizovaných proteinů v glioblastomech pomocí AHA byly naznačeny proteiny syntetizované v daných intervalech (viz kapitola 3.1.1) a detekovány pomocí systému biotin/streptavidin na PVDF membráně. Po neuspokojivých výsledcích byl celý postup zopakován, s využitím Alexa Fluor® 488/ anti-Alexa Fluor® 488 opět na PVDF membráně.

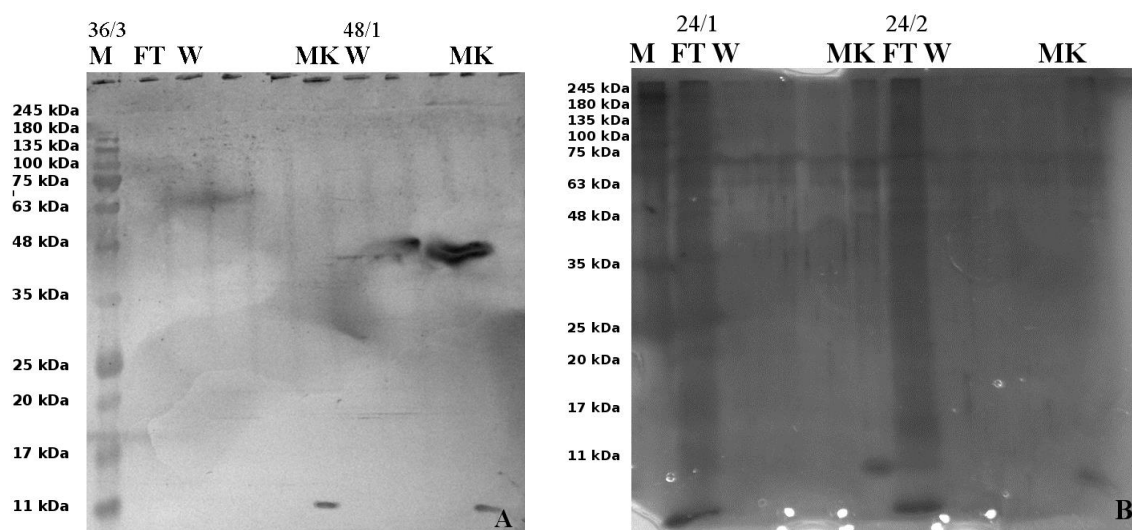
K ověření, zda Click reakce s přidáním biotin-alkynu proběhla, byla následně změřena koncentrace proteinů a vypočítán výtěžek reakce v procentech (Tab. II). Pro každou jednotlivou reakci bylo použito doporučené množství proteinů, 200 µg/reakci. Označení vzorků udává časový interval a pořadové číslo v tomto intervalu (12/1 označuje interval po infekci 12 hodin, vzorek č. 1; vzorky s označením 0 nebyly infikovány). V každém intervalu byly zpracovány tři vzorky (triplikáty).

**Tabulka II:** Výtěžek proteinů z Click reakce při použití biotin-alkynu.

| vzorek | Výtěžek proteinů |       | vzorek | Výtěžek proteinů |       |
|--------|------------------|-------|--------|------------------|-------|
|        | [µg]             | [%]   |        | [µg]             | [%]   |
| 0/1    | 159,5            | 79,75 | 48/1   | 181,2            | 90,58 |
| 0/2    | 150,0            | 75,00 | 48/2   | 142,5            | 71,25 |
| 0/3    | 139,5            | 69,75 | 48/3   | 174,0            | 87,00 |
| 12/1   | 79,5             | 39,75 | 72/1   | 173,8            | 86,92 |
| 12/2   | 128,0            | 64,00 | 72/2   | 159,3            | 79,67 |
| 12/3   | 137,5            | 68,75 | 72/3   | 198,0            | 99,00 |
| 24/1   | 178,8            | 89,42 | 96/1   | 142,5            | 71,25 |
| 24/2   | 82,0             | 41,00 | 96/2   | 198,0            | 99,00 |
| 24/3   | 130,5            | 65,25 | 96/3   | 164,2            | 82,08 |
| 36/1   | 125,5            | 62,75 | 120//1 | 190,8            | 95,42 |
| 36/2   | 94,2             | 47,08 | 120/2  | 198,2            | 99,08 |
| 36/3   | 125,5            | 62,75 | 120/3  | 193,3            | 96,65 |

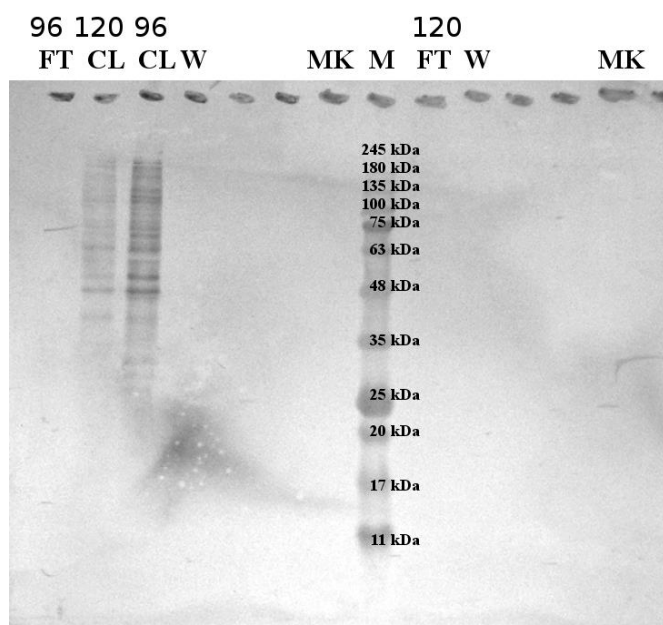
Po následně purifikaci naznačených proteinů afinitní chromatografií na magnetických kuličkách se streptavidinem byly všechny frakce naneseny na gel, elektroforeticky separovány a rozdělené proteiny obarveny, ovšem s mizivým výsledkem (výsledek není v práci zahrnut). Protože i při blotování nebyl na membráně detekovatelný signál, pouze mírná nespecifita (Obr. 3A), byly proteiny v gelu dále nabarveny stříbrem

(Obr. 3B), kde se potvrdilo, že jsou proteiny ve vzorku obsaženy, ale v množství, které je pravděpodobně pod limitem detekce western blotem.



**Obrázek 3:** Detekce proteinů western blotem s využitím streptavidinu konjugovaného s alkalickou fosfatázou (A), SDS-PAGE separace značených proteinů purifikovaných afinitní chromatografií s využitím magnetických kuliček se streptavidinem, barveno stříbrem (B). M – marker, FT – flow through, W – wash, MK – magnetické kuličky.

Pro kontrolu proběhnuté Click reakce a k vyloučení nespecifity western blotu byly poté ještě dva vzorky (96 h a 120 h po infekci) nanášeny na gel spolu s ostatními vzorky (frakcemi afinitní chromatografie) a přebíly. Potvrdilo se, že Click reakce proběhla, ale nezdařila se následná purifikace afinitní chromatografií (viz Obr. 4, vzorek 120/CL, 96/CL)



**Obrázek 4:** Detekce značených purifikovaných proteinů western blotem s využitím streptavidinu konjugovaného s alkalickou fosfatázou, vzorky včetně lyzátu po Click reakci. M – marker, CL – vzorek po Click reakci, FT – flow through, W – wash, MK – magnetické kuličky.

Kvůli problémům s detekcí značených proteinů pomocí systému biotin/streptavidin bylo následně rozhodnuto, že Click reakce, purifikace a následná vizualizace značených proteinů bude provedena pomocí systému Alexa Fluor® 488/ anti-Alexa Fluor® 488.

K ověření, zda Click reakce proběhla s pomocí nového systému s přidáním Alexa Fluor® 488-alkynu, byla změřena koncentrace proteinů a vypočítán výtěžek reakce v procentech (Tab. III). Pro každou jednotlivou reakci bylo použito doporučené množství proteinů, 200 µg/reakci. Jak je z tabulky patrné, výtěžek reakcí se výrazně nelišil od předchozí metody.

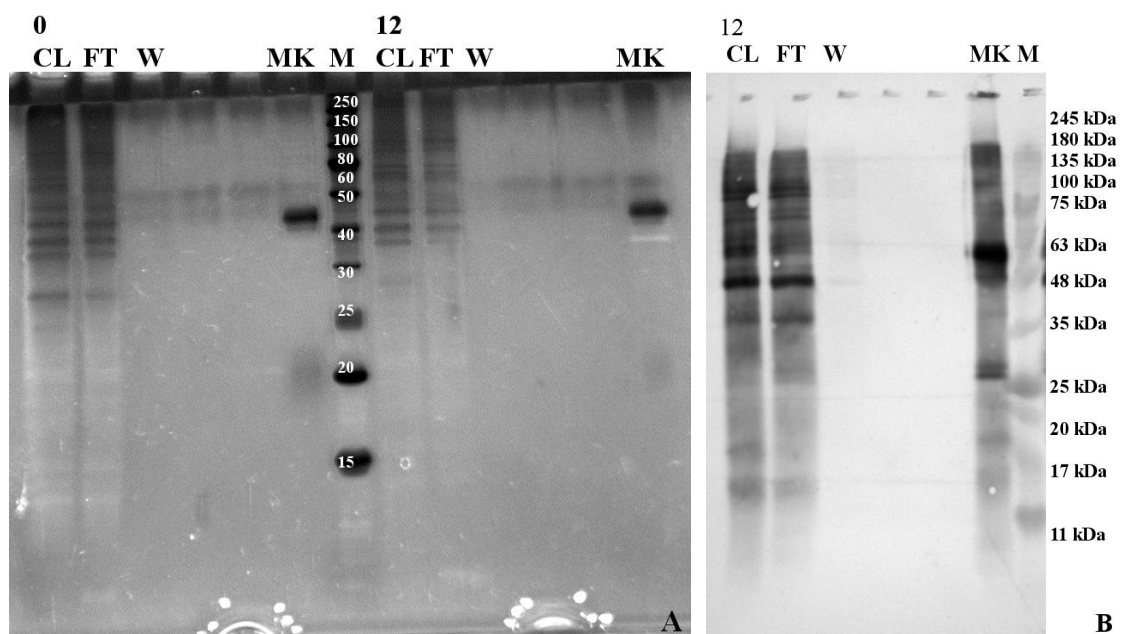
**Tabulka III:** Výtěžek proteinů z Click reakce při použití Alexa Fluor® 488-alkynu.

| vzorek | Výtěžek proteinů |       | vzorek | Výtěžek proteinů |       |
|--------|------------------|-------|--------|------------------|-------|
|        | [μg]             | [%]   |        | [μg]             | [%]   |
| 0/2    | 180,8            | 90,42 | 48/1   | 77,2             | 38,58 |
| 0/3    | 164,3            | 82,17 | 48/2   | 111,0            | 55,50 |
| 0/4    | 166,5            | 83,25 | 48/3   | 159,5            | 79,75 |
| 12/1   | 174,0            | 87,00 | 72/1   | 161,8            | 80,92 |
| 12/2   | 172,5            | 86,25 | 72/2   | 196,5            | 98,25 |
| 12/3   | 127,8            | 63,92 | 72/3   | 135,2            | 67,58 |
| 24/1   | 77,2             | 38,58 | 96/1   | 103,8            | 51,92 |
| 24/2   | 72,3             | 36,17 | 96/2   | 144,8            | 72,42 |
| 24/3   | 84,5             | 42,25 | 96/3   | 140,0            | 70,00 |
| 36/1   | 82,0             | 41,00 | 120//1 | 154,5            | 77,25 |
| 36/2   | 79,5             | 39,75 | 120/2  | 188,3            | 94,17 |
| 36/3   | 123,2            | 61,58 | 120/3  | 198,0            | 99,00 |

Následně byly purifikovány značené proteiny pomocí afinitní chromatografie. Byla použita anti-Alexa Fluor® 488, která se specificky váže jak na použité magnetické kuličky s navázaným proteinem G, tak na značené proteiny.

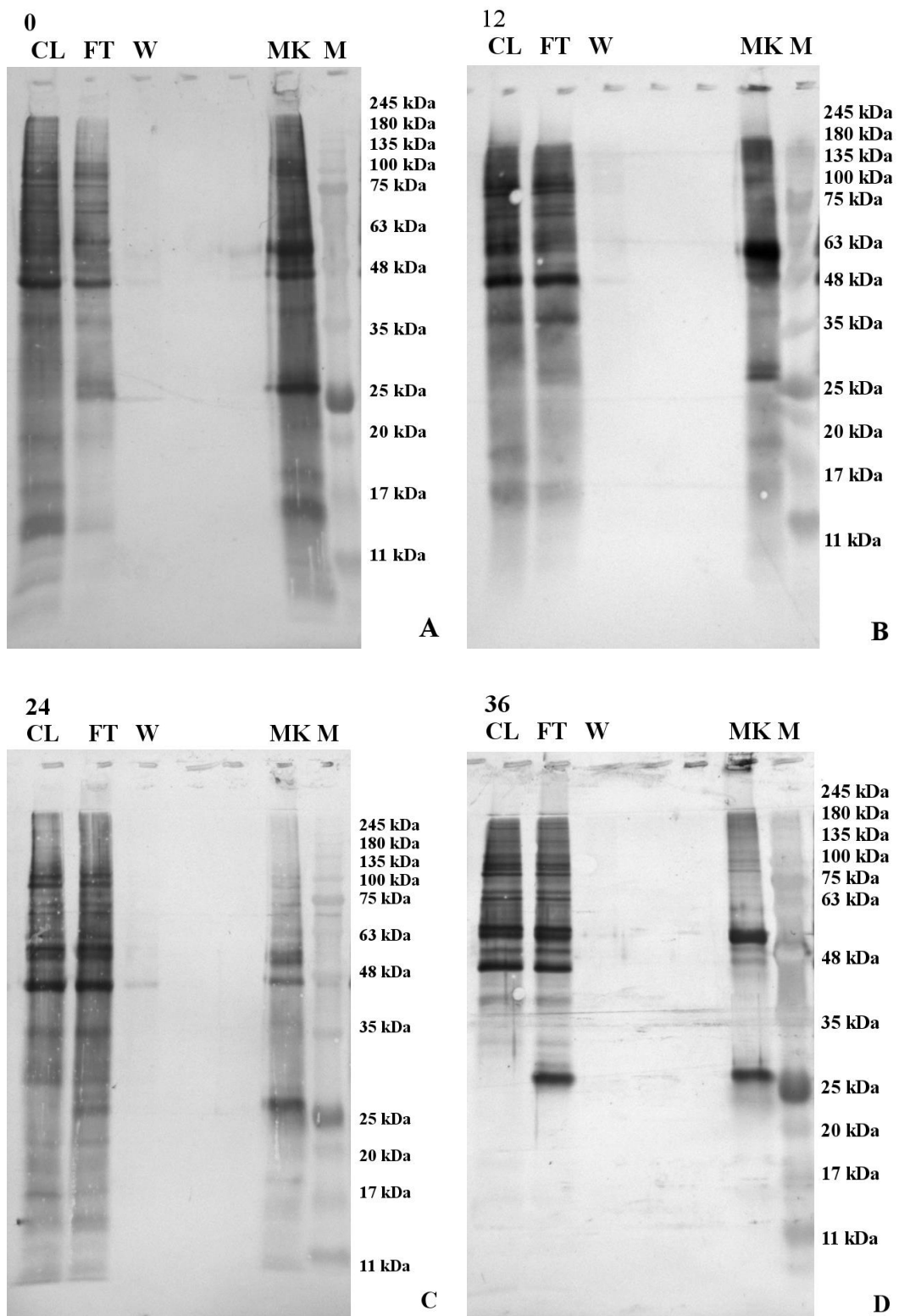
Všechny frakce z afinitní chromatografie (včetně lyzátu po Click reakci) byly naneseny na gel a následně byly elektroforeticky rozdělené proteiny detekovány western blotem. První dva gely byly jen barveny PageBlue™ a následně kvůli nízké intenzitě barvení byly gely nabarveny ještě stříbrem (Obr. 5A).

Na Obrázku 5A je již vidět, že proteiny zřetelně tvoří proužky a detekce značených proteinů pomocí Alexy Fluor® 488 a následným western blotem (Obr. 5B) je více specifická než předchozí metoda s využitím biotin-streptavidinu a následným western blotem. Další SDS-PAGE gely již byly barveny PageBlue™ jen pro potvrzení, že všechny proteiny byly přeneseny na PVDF membránu, a nejsou zde ukázány.

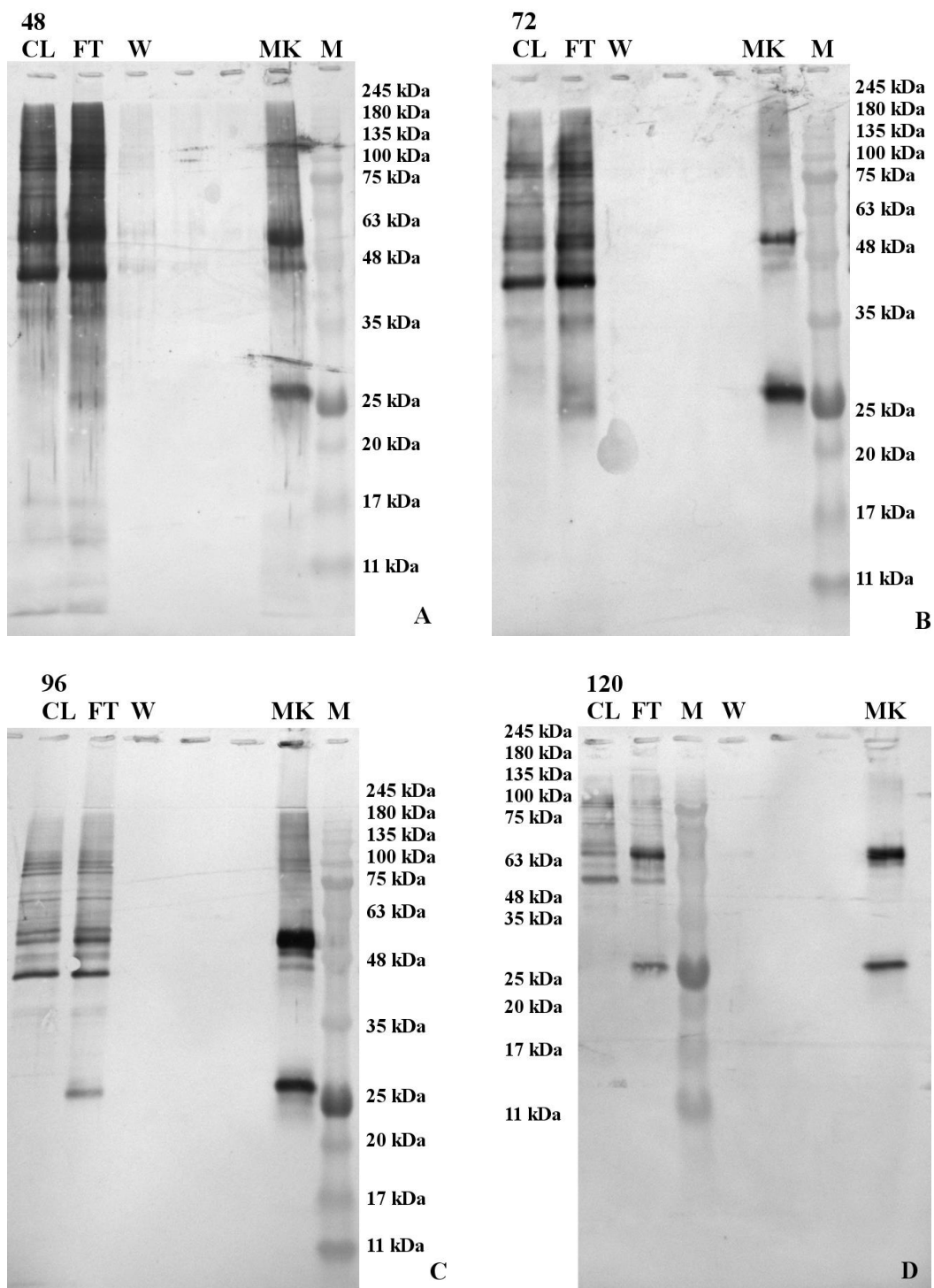


**Obrázek 5:** SDS-PAGE separované proteiny barvené stříbrem (A), detekce značených proteinů western blotem pomocí anti-Alexa Fluor® 488 Rabbit a anti-rabbit goat AP (B). M – marker, CL – vzorek po Click reakci, FT – flow through, W – wash, MK – magnetické kuličky.

Následující Obrázky 6 a 7 ukazují výsledky western blotu (s využitím Alexa Fluor® 488 systému) v různých intervalech po infekci virem KE. Z obrázků je patrné, že značení a purifikace proteinů proběhla v detekovatelných koncentracích. Frakce magnetických kuliček byla dále odeslána k identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Pro ověření funkčnosti/nefunkčnosti systému byly odeslány i magnetické kuličky z prvního pokusu se systémem biotin/streptavidin.



**Obrázek 6:** Detekce značených proteinů western blotem u neinfikovaných buněk (A), 12 hodin po infekci (B), 24 hodin po infekci (C) a 36 hodin po infekci (D). M – marker, CL – vzorek po Click reakci, FT – flow through, W – wash, MK – magnetické kuličky.



**Obrázek 7:** Detekce značených proteinů western blotem u 48 hodin p.i. (A), 72 hodin po infekci (B), 96 hodin po infekci (C) a 120 hodin po infekci (D). M – marker, CL – vzorek po Click reakci, FT – flow through, W – wash, MK – magnetické kuličky.

Z výsledků je patrné, že v delších intervalech po infekci je tvořeno méně různých proteinů a u značených proteinů nedochází k degradaci. Dle výsledků z hmotnostní spektrometrie se ve vzorcích kromě keratinu a dalších obvyklých kontaminací vyskytovaly různé formy aktinu, BSA, a z magnetických kuliček Immunoglobulin G binding protein nebo streptavidin (IgG nebyl přítomný ve všech vzorcích, pravděpodobně kvůli chybám v průběhu zpracování). V současné době probíhá optimalizace tohoto postupu.



## 5 DISKUZE

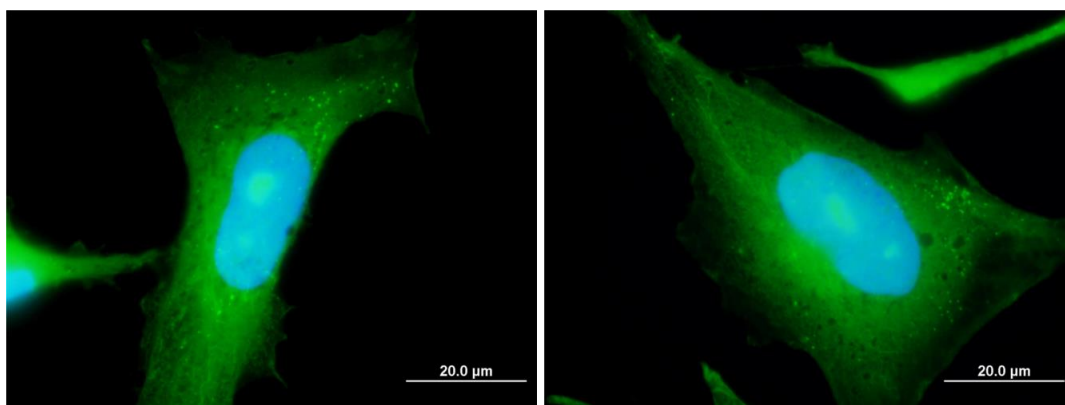
V mé práci jsem sledovala změny v proteosyntéze u buněk infikovaných virem KE, a to u buněčné linie glioblastomů, odvozené od podpůrných neurálních buněk, glioblastů. Tento typ buněk byl zvolen vzhledem k neurotropnímu charakteru viru KE a vzhledem k tomu, že z dostupných linií se glioblastomová buněčná linie jeví jako nejvhodnější pro podobné pokusy. Tyto buňky byly též použity jako model při studiu změn v genové expresi při nákaze virem Západního Nilu (Koh a Ng 2005). Pro sledování změn při mých pokusech byla použita metoda BONCAT, využívající bioortogonální chemii, pomocí které lze odlišit nově syntetizované proteiny od starších proteinů. Proteiny byly naznačeny modifikovanou aminokyselinou (AHA), která je svou strukturou podobná methioninu a není toxická pro buňky (Dieterich a kol. 2006). Poté byla provedena Click reakce, při které azidová skupina reagovala s alkynem za vzniku stabilního triazolu. Katalyzátorem této reakce byly  $\text{Cu}^+$  ionty. Na alkynu byla navázána funkční skupina, která byla později použita pro detekci těchto proteinů. Pro ověření, zda Click reakce proběhla, byla před i po reakci změřena koncentrace proteinů ve vzorcích a následně vypočítán výtěžek reakce. Ten se pohyboval u obou použitých postupů ve většině případů nad 50 %.

Pro detekci proteinů byl použit systém biotin/streptavidin. Jedná se o poměrně univerzální systém, který má široké spektrum použití – afinitní purifikace a značení, fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie (Diamandis a Christopoulos 1991). Systém biotin/streptavidin byl použit při identifikaci nově syntetizovaných proteinů v práci Dieterich a kol. (2006), kdy se podařilo identifikovat 195 nově syntetizovaných proteinů v časovém intervalu dvou hodin, v některých případech ovšem vykazoval variabilitu ve značení (Charron a kol. 2009). Obdobný postup byl použit při sledování proteosyntézy v larvách *Dania pruhovaného* (*Danio rerio*), kdy pro purifikaci značených proteinů byl použit systém biotin/avidin, a pro vizualizaci pomocí fluorescence Alexa Fluor® 488 alkyn (Hinz a kol. 2012). Značení pomocí Alexa Fluor® 488 bylo také použito při sledování regulace proteosyntézy indukované IL-6 a NGF (nerve growth factor) v nervových buňkách (Melemedjian a kol. 2010).

V našem případě byl alkyn konjugován s biotinem a streptavidin byl ve formě magnetických kuliček použitý při purifikaci proteinů a následně také pro jejich vizualizaci. Proteiny purifikované afinitní chromatografií na magnetických kuličkách se streptavidinem

byly elektroforeticky rozděleny na PAA gelu, přebílotovány a vizualizovány na PVDF membráně pomocí streptavidinu konjugovaného s alkalickou fosfatázou. Protože se u purifikovaných vzorků nepodařilo dosáhnout uspokojivého výsledku, pravděpodobně kvůli nízké koncentraci proteinů, byly naneseny na PAA gel i vzorky po Click reakci. Ty se již vizualizovat zdařilo, purifikace tedy neproběhla optimálně.

Kvůli problémům s detekcí proteinů byl celý postup zopakován, a to se systémem Alexa Fluor® 488/ anti-Alexa Fluor® 488, kdy Alexa Fluor® 488 byla konjugována s alkynelem použitým při Click reakci. Zde se již purifikace (afinitní chromatografií s na magnetických kuličkách s navázaným proteinem G) i následná vizualizace proteinů na PVDF membráně (pomocí anti-Alexa Fluor® 488 Rabbit protilátek a následně anti-rabbit goat protilátek konjugovaných s alkalickou fosfatázou) zdařila. Na Obrázku 8 je ukázána funkčnost systému, vizualizace Alexa Fluor® 488 alkyne (zelená) pomocí fluorescenčního mikroskopu (provedla Bc. Hana Zavadilová).



**Obrázek 8:** Glioblastomy, proteiny značené pomocí AHA po dobu 30 minut. Click reakce AHA s Alexou Fluor® 488. Zelená – Alexa Fluor® 488, modrá – DAPI (značení DNA).

Infekce virem ovlivňuje buněčnou proteosyntézu ve svůj prospěch, což má za následek syntézu menšího spektra proteinů (Alkhalil a kol. 2010; Martínez-Betancur a Martínez-Gutierrez 2013; Tchankouo-Nguetcheu a kol. 2012). Pokud porovnáme mezi sebou profil značených proteinů v jednotlivých intervalech infekce, můžeme si všimnout, že u prvních intervalů je spektrum proteinů široké, kdežto u intervalu 120 hodin po infekci již detekovatelných proužků odpovídajících jednotlivým proteinům mnoho není. Proužky odpovídající cca 50 kDa a 24 kDa, u kterých jsme ve všech intervalech zaznamenali

výrazný signál (u vzorků s označením MK), jsou podjednotky protilátky použité k purifikaci (anti-Alexa Fluor® 488 alkyn).

Magnetické kuličky s purifikovanými proteiny byly zaslány na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie (Mgr. Peter Koník, Ústav chemie a biochemie, PŘF JU). Mezi identifikovanými proteiny se nacházely různé typy keratinu (většina z nich jako kontaminace), různé formy aktinu, BSA (pravděpodobně z média), a z magnetických kuliček pocházející IgG binding protein či streptavidin. Ovšem IgG nebyl přítomný ve všech vzorcích, pravděpodobně kvůli problémům v průběhu zpracování vzorků. Přítomnost aktinu ve vzorcích je běžná, je to jeden z tzv. house-keeping genů (Eisenberg a Levanon 2003) a změny v jeho expresi byly pozorovány i v případě infekce buněk jinými viry (Alkhalil a kol. 2010).

## 6 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala značením nově syntetizovaných proteinů metodou BONCAT, purifikací značených proteinů a jejich identifikací v různých intervalech od začátku infekce virem KE.

Vizualizací proteinů pomocí SDS-PAGE a následného western blotu se podařilo ukázat, že spektrum nově syntetizovaných proteinů se v důsledku infekce virem KE mění. V delších intervalech po infekci se množství různých proteinů se snižuje. Byly také optimalizovány postupy pro použití metody BONCAT.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alkhalil, A., Hammamieh, R., Hardick, J., Ichou, M. A., Jett, M., Ibrahim, S. (2010):** Gene expression profiling of monkeypox virus-infected cells reveals novel interfaces for host-virus interactions. *Virology Journal* 7, 173-.
- Baltimore, D. (1971):** Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews* 35, 235-&.
- Baskin, J. M., Bertozzi, C. R. (2007):** Bioorthogonal click chemistry: Covalent labeling in living systems. *Qsar & Combinatorial Science* 26, 1211-1219.
- Beatty, K. E., Liu, J. C., Xie, F., Dieterich, D. C., Schuman, E. M., Wang, Q., Tirrell, D. A. (2006):** Fluorescence visualization of newly synthesized proteins in mammalian cells. *Angewandte Chemie-International Edition* 45, 7364-7367.
- Black, B. L., Brewer, G., Lyles, D. S. (1994):** Effect of vesicular stomatitis-virus matrix protein on host-directed translation *in vivo*. *Journal of Virology* 68, 555-560.
- Black, T. L., Safer, B., Hovanessian, A., Katze, M. G. (1989):** The cellular 60,000-Mr protein-kinase is highly autophosphorylated and activated yet significantly degraded during poliovirus infection – implications for translational regulation. *Journal of Virology* 63, 2244-2251.
- Charron, G., Zhang, M. Z. M., Yount, J. S., Wilson, J., Raghavan, A. S., Shamir, E., Hang, H. C. (2009):** Robust fluorescent detection of protein fatty-acylation with chemical reporters. *Journal of the American Chemical Society* 131, 4967-4975.
- Debets, M. F., van der Doelen, C. W. J., Rutjes, F., van Delft, F. L. (2010):** Azide: A unique dipole for metal-free bioorthogonal ligations. *Chembiochem* 11, 1168-1184.
- Diamandis, E. P., Christopoulos, T. K. (1991):** The biotin (strept)avidin systém – principles and applications in biotechnology. *Clinical Chemistry* 37, 625-636.
- Dieterich, D. C., Lee, J. J., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A., Schuman, E. M. (2007):** Labeling, detection and identification of newly synthesized proteomes with bioorthogonal non-canonical amino-acid tagging. *Nature Protocols* 2, 532-540.
- Dieterich, D. C., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A., Schuman, E. M. (2006):** Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9482-9487.
- Dumpis, U., Crook, D., Oksi, J. (1999):** Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases* 28, 882-890.

- Ecker, M., Allison, S. L., Meixner, T., Heinz, F. X. (1999):** Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology* 80, 179-185.
- Eisenberg, E., Levanon, E. Y. (2003):** Human housekeeping genes are compact. *Trends in Genetics* 19, 362-365.
- Elshuber, S., Allison, S. L., Heinz, F. X., Mandl, C. W. (2003):** Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *Journal of General Virology* 84, 183-191.
- Gaunt, M. W., Sall, A. A., de Lamballerie, X., Falconar, A. K. I., Dzhivanian, T. I., Gould, E. A. (2001):** Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General Virology* 82, 1867-1876.
- Goodbourn, S., Didcock, L., Randall, R. E. (2000):** Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* 81, 2341-2364.
- Grard, G., Moureau, G., Charrel, R. N., Lemasson, J. J., Gonzalez, J. P., Gallian, P., Gritsun, T. S., Holmes, E. C., Gould, E. A., de Lamballerie, X. (2007):** Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology* 361, 80-92.
- Grešíková, M., Sekeyová, M., Stupalová, S., Nečas, S. (1975):** Sheep milk-borne epidemic of tick-borne encephalitis in Slovakia. *Intervirology* 5, 57-61.
- Grešíková, M. (1958):** Excretion of the tickborne encephalitis virus in the milk of subcutaneously infected cows. *Acta Virologica* 2, 188-192.
- Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A., Gould, E. A. (2003):** Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research* 57, 129-146.
- Grussendorf-Conen, E. I. (1990):** Human papillomaviruses and their connection with oncogenesis. *Hautarzt* 41, 658-661.
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R. (1999):** Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* 17, 994-999.
- Halstead, S. B. (2012):** Flavivirus Vaccines. In S. Pei-Yong (Ed.): *Molecular Virology and Control of Flaviviruses*. Caister Academic Press, 185-230. ISBN: 978-1-904455-92-9
- Heinz, F. X., Stiasny, K. (2012):** Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of Clinical Virology* 55, 289-295.

- Hinz, F. I., Dieterich, D. C., Tirrell, D. A., Schuman, E. M. (2012):** Noncanonical amino acid labeling *in vivo* to visualize and affinity purify newly synthesized proteins in larval zebrafish. *ACS Chemical Neuroscience* 3, 40-49.
- Hong, M., Che, Y-c., Tang, G-z., Cun, W., Zhang, X-m., Liu, L-d., Li, Q-h. (2008):** Herpes simplex virus 1 infection alters the mRNA translation processing in L-02 cells. - 23.
- Kiick, K. L., Saxon, E., Tirrell, D. A., Bertozzi, C. R. (2002):** Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 19-24.
- Koh, W. L., Ng, M. L. (2005):** Molecular mechanisms of West Nile virus pathogenesis in brain cells. *Emerging Infectious Diseases* 11, 629-632.
- Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. (2001):** Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie-International Edition* 40, 2004-+.
- Kunz, C., Heinz, F. X. (2003):** Tick-borne encephalitis. *Vaccine* 21, S1-S2.
- Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680-&.
- Lahann, J. (2009):** Click chemistry for biotechnology and materials science. Wiley, Chichester, West Sussex, pp. xvii, 411 p. ISBN: 978-0-470-69970-6
- Lilley, K. S., Friedman, D. B. (2004):** All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Review of Proteomics* 1, 401-409.
- Lloyd, R. M., Shatkin, A. J. (1992):** Translational stimulation by reovirus polypeptide sigma-3: substitution for VAI-RNA and inhibition of phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic initiation factor 2. *Journal of Virology* 66, 6878-6884.
- Lobigs, M., Mullbacher, A., Wang, Y., Pavy, M., Lee, E. (2003):** Role of type I and type II interferon responses in recovery from infection with an encephalitic flavivirus. *Journal of General Virology* 84, 567-572.
- Lu, Y., Wambach, M., Katze, M. G., Krug, R. M. (1995):** Binding of the influenza-virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* 214, 222-228.
- Mandl, C. W. (2005):** Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research* 111, 161-174.

- Martinand, C., Montavon, C., Salehzada, T., Silhol, M., Lebleu, B., Bisbal, C. (1999):** RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and down regulates the 2-5A/RNase L pathway in human T cells. *Journal of Virology* 73, 290-296.
- Martínez-Betancur, V., Marín-Villa, M. and Martínez-Gutierrez, M. (2013):** Infection of epithelial cells with dengue virus promotes the expression of proteins favoring the replication of certain viral strains: *Journal of Medical Virology*. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.23857>
- Melemedjian, O. K., Asiedu, M. N., Tillu, D. V., Peebles, K. A., Yan, J., Ertz, N., Dussor, G. O., Price, T. J. (2010):** IL-6-and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent Signaling to the eIF4F complex. *Journal of Neuroscience* 30, 15113-15123.
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. (2002):** Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 1, 376-386.
- Prescher, J. A., Bertozzi, C. R. (2005):** Chemistry in living systems. *Nature Chemical Biology* 1, 13-21.
- Růžek, D., Vancová, M., Tesařová, M., Ahantarig, A., Kopecký, J., Grubhoffer, L. (2009):** Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *Journal of General Virology* 90, 1649-1658.
- Schneider, R. J., Shenk, T. (1987):** Impact of virus-infection on host-cell protein synthesis. *Annual Review of Biochemistry* 56, 317-332.
- Sletten, E. M., Bertozzi, C. R. (2009):** Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angewandte Chemie-International Edition* 48, 6974-6998.
- Tchankouo-Nguetcheu, S., Bourguet, E., Lenormand, P., Rousselle, J. C., Namane, A., Choumet, V. (2012):** Infection by Chikungunya virus modulates the expression of several proteins in *Aedes aegypti* salivary glands. *Parasites & Vectors* 5, 11.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979):** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets – procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.



## **Elektronické informační zdroje:**

EpiDat – databáze Státního zdravotnického ústavu v Praze

<http://www.szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr>