Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Sledování exprese proteinů v savčích buňkách infikovaných virem klíšťové encefalitidy

Diplomová práce

Bc. Pavlína Kočová

Školitel: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

České Budějovice 2017

Kočová, P., 2017: Sledování exprese proteinů v savčích buňkách infikovaných virem klíšťové encefalitidy. [Monitoring of protein expression in mammalian cells during tick-borne encephalitis infection. MSc. Thesis, in Czech] 44 p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This study is focused on changes in protein expression in a glioblastoma cell line during infection with tick-borne encephalitis virus. Newly synthesized proteins were distinguished from previously synthesized proteins using bioorthogonal chemistry (BONCAT method) to observe changes in protein synthesis. Labelled proteins were visualized using two-dimensional PAGE and western blotting followed by Click reaction on membrane. Differences in protein pattern between control and infected cells were observed.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 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, 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 19.4.2017 ……...

Bc. Pavlína Kočová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mě podporovali během vzniku této práce. Hlavní poděkování patří bezesporu mému školiteli Jankovi za odborné vedení práce, ochotu odpovídat na veškeré dotazy a pomoc kdykoliv to bylo třeba. Dále všem členům laboratoře, kteří byli ochotní poradit jak dobrou radou, tak kolikrát i skutkem. V neposlední řadě patří velký dík mé rodině, která mě celé studium podporovala. Děkuju.

OBSAH

ÚVOD **1**

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED **2**

1.1 VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY 2
1.1.1 Taxonomie 2
1.1.2 Struktura 3
1.1.3 Replikační cyklus VKE 4
1.1.4 Patogeneze onemocnění 6
1.2 PROTEOSYNTÉZA 7
1.3 ODPOVĚD BUŇKY NA VIROVOU INFEKCI 8
1.3.1 Reakce buňky na virovou infekci 8
1.3.2 Obranné mechanismy virů a jejich dopady na infikované buňky 10
1.4 BIOORTOGONÁLNÍ CHEMIE 11
1.4.1 Click chemie 11
1.4.2 Metoda BONCAT 12

2 CÍLE PRÁCE **14**

3 MATERIÁL A METODY **15**

3.1 PŘÍPRAVA BUNĚČNÝCH LYZÁTŮ 15
3.1.1 Infekce virem VKE 15
3.1.2 Metabolické značení 15
3.1.3 Příprava lyzátu 16
3.2 PŘÍPRAVA PROTEINOVÝCH VZORKŮ 16
3.2.1 Click reakce 16
3.2.2 Purifikace značených proteinů – afinitní chromatografie 17
3.3 DETEKCE A VIZUALIZACE ZNAČENÝCH PROTEINŮ 19
3.3.1 SDS-PAGE 19
3.3.2 Dvoudimenzionální PAGE 20
3.3.3 Western blotting 21
3.3.4 Barvení gelů 21
3.3.5 Click reakce na membráně 22

4 VÝSLEDKY **23**

5 DISKUZE **34**

6 ZÁVĚR **37**

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **38**

ÚVOD

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) patří mezi významné klíšťaty přenášené flaviviry. Je původcem závažného onemocnění nervové soustavy, klíšťové encefalitidy. Závažnost tohoto onemocnění je různá, od asymptomatické infekce až po závažnou meningoencefalitidu, která může končit i smrtí či dlouhodobými následky (Dumpis *et al.*, 1999). V České republice je ročně hlášeno 400-1000 diagnostikovaných případů (EPIDAT), celosvětově se počet případů pohybuje mezi 10 000 až 15 000 za rok. Toto číslo je ovšem pravděpodobně podhodnocené, jelikož nezahrnuje asymptomatické infekce a zároveň ne ve všech státech kde se VKE vyskytuje je ohlašovací povinnost (Bogovic a Strle, 2015). Proti VKE existují účinné vakcíny, ovšem proočkovanost v ČR byla v roce 2009 pouze 16 % (pro srovnání v Rakousku je proočkovanost až 88 %) (Amicizia *et al.*, 2013). Vzhledem k vysokému počtu případů infekcí a nízké proočkovanosti v ČR, ale také v jiných státech, je důležité pochopit mechanismy, které souvisí s šířením VKE.

V průběhu virové infekce se mění buněčný metabolismus. Proteosyntéza se posouvá ve prospěch virových proteinů a syntéza buněčných proteinů je omezena (Alkhalil *et al.*, 2010). Tato práce se zabývá sledováním změn v proteosyntéze buněčné kultury glioblastomů infikované VKE v různých intervalech od začátku infekce. Nově syntetizované proteiny v těchto intervalech byly značeny s využitím bioortogonální chemie a analyzovány elektroforetickými metodami. Ověřeno bylo také použití metod pro detekci značených proteinů, purifikaci biotinylovaných proteinů a následnou kvalitativní i kvantitativní analýzu.

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 Virus klíšťové encefalitidy

1.1.1 Taxonomie

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) řadíme do čeledi *Flaviviridae*, rod *Flavivirus*. Do této skupiny patří více než 70 virů, z nichž velká část patří mezi arboviry, tzn. viry přenášené členovci (Lindenbach *et al.*, 2007). Viry patřící k flavivirům můžeme dále rozdělit do několika skupin podle přenašeče. První skupinou jsou viry přenášené klíšťaty, kam řadíme mezi dalšími VKE, virus vrtivky, virus Omské hemoragické horečky, virus horečky Kyasanurského lesa či virus Powassan. Další skupinu tvoří viry přenášené komáry, kam patří např. virus Japonské encefalitidy, virus dengue, virus Západního Nilu nebo virus Zika. Další skupinou jsou viry bez známého vektora, jako je virus Rio Bravo nebo Modoc. Poslední skupinou, zavedenou v nedávných letech, jsou tzv. insect-specific viry, tzn. viry, které infikují pouze hmyz, kam řadíme například cell fusing agent virus, Culex flavivirus a další (Calzolari *et al.*, 2016).

Podle sekvenční analýzy strukturního proteinu E můžeme VKE rozdělit do tří subtypů, a to na dálněvýchodní, západní (evropský) a sibiřský. Evropský subtyp zahrnuje prototypový kmen Neudoerfl a další kmeny izolované v oblastech střední Evropy, Francie, Chorvatska, Běloruska, Finska a evropské části Ruska. Do dálněvýchodního subtypu patří prototypový kmen Sofjin a další kmeny, které byly izolovány ve východním Rusku, Číně, Japonsku, Litvě, Ukrajině a evropské části Ruska. Sibiřský subtyp, který je více podobný subtypu dálněvýchodnímu než evropskému, zahrnuje kmeny Aina a Vasilchenko, izolované v oblasti Sibiře (Ecker *et al.*, 1999). Výskyt jednotlivých subtypů koreluje s výskytem jejich vektora. Evropský subtyp je přenášen klíštětem *Ixodes ricinus*, které se vyskytuje v Evropě a evropské části Ruska, zatímco dálněvýchodní a sibiřský subtyp je přenášen klíštětem *I. persulcatus*, vyskytujícím se v asijské části Ruska (Gritsun *et al.*, 2003).

1.1.2 Struktura

Virion VKE je sférická částice o průměru cca 50 nm skládající se z kapsidy a obalu. Kapsida je tvořena virovým proteinem C (capsid), uvnitř se nachází jednovláknová RNA pozitivní polarity. V lipidové dvojvrstvě původem z hostitelské buňky, obalující kapsidu, se nachází další dva strukturní proteiny, E (envelope) a M (membrane). Protein M je syntetizován jako glykosylovaný prekurzor prM, který v nezralých intracelulárních virionech tvoří heterodimery s proteinem E. Tato interakce chrání protein E před předčasnou maturací - ireverzibilními konformačními změnami, které nastávají v kyselém prostředí během průchodu virionu trans-golgiho sítí (Heinz *et al.*, 1994). Krátce před uvolněním virionu z buňky je prM štěpen na pr část a maturovaný protein M pomocí furinu (serinová proteáza) (Stadler *et al.*, 1997).

Obalový glykoprotein E má základní funkci při průniku viru do buňky, váže se na buněčné receptory a iniciuje membránovou fúzi. Jedná se o hlavní antigenní determinantu VKE, která indukuje imunitní odpověď organismu, tvorbu virus neutralizujících protilátek (Heinz, 1986; Lindenbach *et al.*, 2007). U zralých virionů je ve formě metastabilních dimerů, které po průniku virionu do buňky a poklesu pH v prostředí endozomu (pH < 6,5) disociují a vytváří stabilnější trimery, které následně zprostředkují fúzi virové a endozomální membrány (Allison *et al.*, 1995; Stiasny *et al.*, 2001).

Kapsidový protein C je syntetizován jako asociovaný s membránou, přičemž kotva, kterou je ukotven v membráně ER, je později odštěpena působením virové proteázy NS2B/NS3 a zároveň slouží jako signální sekvence která translokuje prM do lumen ER (Lindenbach *et al.*, 2007). Mutace v tomto místě inhibuje produkci prM a tím i vznik nových virových částic (Amberg a Rice, 1999). Vysoký obsah bazických aminokyselin (23 z 96) je v souladu s tvrzením, že protein C se podílí na interakci s RNA (Kiermayr *et al.*, 2004). Zároveň bylo experimentálně potvrzeno, že jedna z hydrofobních domén (helix I, část centrální hydrofobní domény) je zodpovědná za interakci kapsidy a obalových proteinů. Při deleci 16 aminokyselinových zbytků právě z této oblasti tito mutanti syntetizovali podstatně větší množství subvirových částic. Tyto částice vykazovaly dle gradientové ultracentrifugace podobnost s rekombinantními subvirovými částicemi (RSP, recombinant subviral particles) získanými expresí pouze proteinu E a prM. Subvirové částice také nejsou infekční, ovšem v porovnání se samotným proteinem E fungovaly u myší jako výborné imunogeny (Ferlenghi *et al.*, 2001; Kofler *et al.*, 2002).

Virová RNA o délce přibližně 11 kb kóduje jeden otevřený čtecí rámec (ORF), který je ohraničený na obou koncích nekódujícími oblastmi. Na 5´ konci má čepičku, ovšem 3´ poly(A) konec chybí (Wengler *et al.*, 1978). Virová RNA neslouží jen jako mRNA pro translaci virových proteinů, je také templátem při RNA replikaci a dále slouží jako genetický materiál, který je balen do nově vznikajících virových částic.

Translatovaný polyprotein o velikosti přibližně 3400 aminokyselin je následně pomocí hostitelských a virových (NS2B/NS3) proteáz štěpen na výše uvedené strukturní proteiny (C, E a prM) a 7 nestrukturních proteinů - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5 (Gritsun *et al.*, 2003). Nestrukturní proteiny mají roli zejména při virové replikaci, jejich lokalizace je převážně v místě replikace virové RNA. Intracelulární forma NS1 je lokalizována společně s NS3 a dsRNA v místech virové replikace, extracelulární forma NS1 je výrazně antigenní a indukuje humorální odpověď organismu (Westaway *et al.*, 1997; Kuzmenko *et al.*, 2016). NS2B tvoří stabilní komplexy s NS3, pro kterou slouží jako kofaktor a jako membránová kotva. (Falgout *et al.*, 1991). NS3 má proteázovou, NTPázovou a 5-terminální RNA trifosfatázovou aktivitu (Li *et al.*, 1999; Bartelma a Padmanabhan, 2002). NS5 má RNA-dependentní RNA polymerázovou (RdRp) a methyltransferázovou aktivitu (Gritsun *et al.*, 2003).

1.1.3 Replikační cyklus VKE

Virus KE je přenášen klíšťaty z rodu *Ixodidae*. Hlavním vektorem pro evropský subtyp je *I. ricinus*, zatímco dálně-východní a sibiřský subtyp je přenášen zejména klíštětem *I. persulcatus* (Gritsun *et al.*, 2003). Vývojový cyklus klíštěte zahrnuje tři stadia, larvu, nymfu a imágo, přičemž každé stadium potřebuje sát na hostiteli pro vývoj do dalšího stadia a dospělá samice pro nakladení vajec. Larvy a nymfy většinou sají na drobných hlodavcích, zatímco dospělé samice na větších savcích (typicky vysoká zvěř či hospodářská zvířata) (Gray, 1991). Člověk je pouze náhodným hostitelem pro dospělé samice či nymfy (Süss, 2003).

Klíště se nakazí VKE při sání na nakaženém hostiteli, rezervoárem viru jsou zejména drobní hlodavci, u nichž lze prokázat latentní perzistentní infekci. Dalším způsobem, jak se klíště nakazí VKE, je od jiného klíštěte při „sousání“ (co-feeding), tzv. neviremický přenos

(Labuda *et al.*, 1993). Pokud se klíště nakazí VKE v jakémkoliv vývojovém stadiu, zůstává infekční i v dalších stadiích; přenos VKE je popsán transstadiálně i transovariálně (Benda, 1958; Dumpis *et al.*, 1999).

Vstup VKE do buňky je zprostředkován vazbou proteinu E na receptory (receptorem zprostředkovaná endocytóza). Kyselé pH v endozomu spouští konformační změny proteinu E (viz kapitola 1.1.2), kdy při pH < 6,5 dochází k fúzi virové a endozomální membrány (Heinz a Allison, 2000). Z kapsidy se do cytoplazmy uvolní virová RNA, která slouží přímo jako mRNA pro syntézu virového polyproteinu. Ten je na membráně drsného endoplazmatického retikula translatován jako jeden velký transmembránový polyprotein o velikosti přibližně 3400 aminokyselin. Tento polyprotein je následně štěpen hostitelskými enzymy (signaláza a furin) a virovou proteázou NS2B/NS3 na virové proteiny. Nestrukturní proteiny se shlukují na cytoplazmatické straně endoplazmatické membrány, kde vytvářejí tzv. replikační komplexy. Zde probíhá replikace virové RNA přes (-)RNA intermediát (zejména za účasti NS5 jako RNA-dependentní-RNA-polymerázy). Obalové proteiny (homodimery proteinu E a prM) agregují v lumen ER, zatímco kapsidový protein se shlukuje na cytoplazmatické straně membrány ER (Heinz a Allison, 2003). Virová RNA se naváže na kapsidový protein a je sbalena do nezralé virové částice která se vchlípí do lumen ER. Protein E je v komplexu s proteinem prM, který brání předčasné maturaci virionu, fúzi membrán a uvolnění virové RNA zpět do cytoplazmy. Protein prM je v průběhu dozrávání virionu štěpen furinem v trans-Golgiho aparátu krátce před uvolněním zralého virionu z buňky pomocí exocytózy (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

Kromě nezralých virionů se v buňce nachází i menší, subvirové částice. Ty mají v průměru jen přibližně 30 nm a skládají se pouze z proteinu E, M a lipidové membrány, kapsida zde chybí (Schalich *et al.*, 1996; Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Tyto částice jsou skládány také v ER a prochází všemi posttranslačními modifikacemi před opuštěním buňky jako kompletní virové částice. Také vykazují fúzní aktivitu srovnatelnou s maturovanými viriony a jsou vysoce imunogenní (Corver *et al.*, 2000; Kofler *et al.*, 2002).

1.1.4 Patogeneze onemocnění

Ve většině případů se člověk nakazí VKE po kousnutí infikovaného klíštěte. Ve střední Evropě je prevalence viru u klíšťat variabilní od <0,1% do 5% v závislosti na geografické poloze a ročním období, zatímco v Asii je prevalence viru od 4 do 39% (Suss, 2011). Nakažení kousnutím infikovaného klíštěte ovšem není jediná cesta, jak se lze virem KE nakazit. U malé části případů klíšťové encefalitidy došlo k nakažení alimentární cestou po požití tepelně neupraveného mléka a výrobků z něj. U nakažených zvířat (ovce, koza, méně často kráva) nelze pozorovat klinické příznaky a během virémie dochází k sekreci VKE do mléka (Grešíková, 1958). Ačkoliv v kyselém pH žaludku (pH 1,5-3,5) dochází ke konformačním změnám proteinu E, které snižují infektivitu viru, viriony nejsou zcela inaktivovány. Při pH 1,42 zbytková infektivita viru přetrvávala i po 4 hodinách, při pH 3,08 i po 24 hodinách (Pogodina, 1958). Při nákaze alimentární cestou se rozvíjí specifická dvoufázová forma, tzv. biphasic milk fever. Lokální epidemie byly zaznamenány v ČR, Rusku, Polsku, Maďarsku, Rakousku, Litvě, Lotyšsku, Albánii a na Slovensku (shrnuto v Suss, 2011). Dalším popsaným způsobem nákazy je vdechnutí aerosolu při práci v laboratoři (Avšič-Županc *et al.*, 1995)

VKE se přenáší kousnutím infikovaného klíštěte, kdy se do hostitele vylučuje slinami. Farmakolologicky účinné látky v klíštěcích slinách mají také vliv na přenos infekce (SAT, saliva-assisted transmission) (Nuttall a Labuda, 2008). Incidence je také ovlivněna dalšími faktory, jak dlouho bylo infikované klíště přisáté, kolik klíšťat bylo přisáto, jaká byla jejich infektivita a jaká byla koncentrace viru (Gritsun *et al.*, 2003).

Primární replikace viru probíhá v podkoží v místě přisátí klíštěte, konkrétně v epidermálních Langerhansových buňkách (dendritické buňky) a následně ve spádových mízních uzlinách (Labuda *et al.*, 1996). Replikace viru v mízních uzlinách je následována primární viremickou fází, kdy se virus šíří eferentními lymfatickými drahami do dalších extraneurálních orgánů, zejména do retikuloendoteliálního systému (slezina, játra, kostní dřeň) (Haglund a Günther, 2003). Během této druhé fáze se zvyšuje titr viru v krvi natolik, že prostoupí hematoencefalickou bariérou a infikuje centrální nervovou soustavu (CNS). Hlavním cílem viru jsou neurony, ačkoliv ostatní nervové buňky mohou být také infikovány (Mandl, 2005). Histopatologický nález na mozku je nespecifický a zahrnuje hyperemii, petechiální krvácení, zánětlivou infiltraci, nekrózu mikrogliálních buněk a hypertrofii a hyperplazii gliálních uzlů (Dumpis *et al.*, 1999).

Průběh infekce je pro evropský subtyp typicky dvoufázový; po krátké inkubační době (obvykle 7-14 dní, může být 2 až 28 dní) nastává primární virémie s nespecifickými příznaky podobnými chřipce – závratě, malátnost, bolest hlavy a svalů, horečka a nevolnost (Dumpis *et al.*, 1999). U 20-30 % pacientů se po cca týdnu (rozmezí 1-33 dní) bez příznaků rozvíjí druhá fáze onemocnění, která vykazuje různě závažné neurologické symptomy. Nejčastěji jde o meningeální formu, méně častá, avšak závažnější, je forma meningoencefalitická (Gritsun *et al.*, 2003).

Na buněčné úrovni se odehrává několik změn, zejména ve stavbě ER. Pozorovatelné jsou změny v organizaci drsného ER, kde probíhá replikace viru. Probíhá také reorganizace cytoskeletu. V oblastech, kde je soustředěn virový protein E, je hustá síť mikrotubulinu, který pravděpodobně hraje roli v maturaci viru (Růžek *et al.*, 2009).

1.2 Proteosyntéza

Proteosyntézu lze rozdělit do dvou hlavních kroků. Prvním krokem je transkripce, přepsání DNA do RNA, která je u eukaryotických buněk lokalizována v jádře. Tato RNA je následně translatována do aminokyselinové sekvence proteinu.

Transkripce DNA do RNA probíhá v jádře buňky, kdy se k vláknu DNA syntetizuje komplementární vlákno RNA. Tohoto děje se účastní RNA polymeráza, která nasedá na promotor v DNA a rozplétá dvoušroubovici. Volné NTP se samovolně párují s odhalenými bazemi a RNA polymeráza je spojuje fosfodiesterovými vazbami. Tímto způsobem vzniká primární transkript, který podléhá dalším posttranskripčním úpravám. Na 5´konec je připojena 7-methylguanosinová čepička, na 3´konec jsou poly(A) polymerázou připojovány adenosinové nukleotidy (polyadenylace). Tyto modifikace mají více funkci. Poly(A) konec stabilizuje molekulu RNA a chrání ji před enzymatickou degradací v cytoplazmě. 5´čepička chrání molekulu před degradací exonukleázami, má roli v transportu RNA z jádra do cytoplazmy a slouží jako iniciátor translace. Nezralá pre-mRNA ještě v jádře podléhá splicingu, kdy jsou specificky vyštěpeny introny a zralá mRNA, skládající se z 5´čepičky, exonů a polyA konce je transportována do cytoplazmy. Transport je zprostředkován tzv. cap binding komplexem (CBC), který se specificky váže na 5´čepičku. CBC je rozpoznáván nukleárním pórem, kterým je mRNA transportována ven z jádra. CBC je v cytoplazmě nahrazen translačními faktory, které rozpoznává ribozom.

Translace mRNA je lokalizována jak na volných ribozomech v cytoplazmě, tak na ribozomech v drsném ER. Ribozomy se v buňce nachází v disociované formě, kdy na malou podjednotku (40S) je navázán eIF3, který brání v navázání velké podjednotky (60S). Pomocí eIF4a se na malou podjednotku váže iniciační tRNA v komplexu s eIF2 a GTP, tento komplex se váže na 5´čepičku a vzniká preiniciační komplex. Ten hledá na mRNA iniciační kodon (AUG). Poté, co iniciační tRNA rozpozná AUG kodon, dojde k hydrolýze GTP, uvolní se několik iniciačních faktorů a pomocí eIF5 je připojena velká podjednotka. Vzniklý iniciační komplex „překládá“ mRNA do aminokyselinové sekvence. Peptidyltransferáza spojuje jednotlivé aminokyseliny peptidickou vazbou. Terminace nastává, když se do A místa ribozomu dostane stop kodon (UAA, UAG, UGA), který váže terminační faktory. Polypeptidový řetězec je uvolněn do cytoplazmy, ribozom je odpojen od mRNA a jeho podjednotky opět disociují.

Nascentní proteiny ve většině případů podléhají posttranslačním úpravám, které ovlivňují strukturu, funkci a stabilitu proteinů. Signální peptid je odštěpen, stejně jako první methionin na N-konci. Vznikají pro sekundární strukturu proteinů významné disulfidické můstky. Na protein se také navazuje řada funkčních skupin (glykosylace, fosforylace, ubikvitinace), častým případem je syntéza jednoho stejného proteinu, který vlivem posttranslačních modifikací má řadu rozdílných funkcí. Často pozorovaným jevem je také vliv fosforylace a defosforylace na aktivitu enzymů.

1.3 Odpověď buňky na virovou infekci

Následkem virové infekce se v hostitelském organismu odehrává mnoho změn na úrovni jak systémové, tak buněčné. Virová infekce indukuje systémovou imunitní odpověď, která zahrnuje specifickou a nespecifickou imunitu. Nespecifická imunita zahrnuje likvidaci viru fagocytujícími buňkami, produkci interferonu, komplement a vznik zánětu. U specifické imunitní odpovědi se pak setkáváme s T a B lymfocyty, protilátkami a některými z cytokinů.

1.3.1 Reakce buňky na virovou infekci

Infekce na buněčné úrovni může být rozdělena na dva typy. U cytocidní infekce dochází ke změnám v hostitelském metabolismu ve prospěch viru a ke změnám v cytoplazmatické membráně, které vedou k rozpoznání imunitním systémem a buňka je

destruována. U necytocidní infekce buď probíhá virová proteosyntéza pozvolněji a nenarušuje tak intracelulární proteinovou homeostázu (např. viry způsobující opar), nebo se virová genetická informace integruje do buněčné DNA a následně probíhá transkripce společně. Některé virové infekce mohou vést až k maligní transformaci viru, jako např. u infekce lidským papilomavirem (Grussendorf-Conen, 1990).

Nespecifická imunitní odpověď je založená na rozpoznávání specifických PAMP epitopů (pathogen-associated molecular patterns), které spouští aktivaci PRR (pattern recognition receptors). Ty aktivují antivirové transkripční faktory, které v jádře spouští transkripci antivirových genů pro cytokiny, interferon a interferonem stimulované geny (ISG). Virová RNA je uvnitř buňky rozpoznávána jak uvnitř endozomu (Toll-like receptory), tak volně v cytoplazmě (RIG-I-like receptory). Dvouvláknovou RNA v cytosolu také rozpoznává i protein kináza R (PKR). Rozpoznání virové RNA spouští signální kaskádu, která indukuje syntézu interferonu I. typu (IFN), který parakrinně ovlivňuje okolní buňky. Zčásti působí také autokrinně. Po navázání IFN na receptor se v buňce spouští Jak-STAT kaskáda, která indukuje transkripci ISG (interferonem stimulované geny) s antivirovou aktivitou.

Jeden z ISG, gen pro 2´-5´oligoadenylát syntetázu (OAS), který je up-regulován IFN, je považován za původce genetické rezistence vůči flavivirům u myší. OAS společně s RNaseL rozkládá RNA (Perelygin *et al.*, 2002). Další z ISG, TRIM79α, způsobuje v případě VKE lysozomální degradaci NS5 proteinu, který je zásadní pro virovou replikaci (Taylor *et al.*, 2011). Další produkt ISG, viperin (virus-inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, interferon-inducible), přímo inhibuje syntézu RNA (Upadhyay *et al.*, 2014).

Přítomnost velkého množství nesprávně sbalených proteinů narušuje buněčnou homeostázu a spouští stresovou reakci. Buňka se snaží snížit množství těchto proteinů dvěmi způsoby, omezením celkové proteosyntézy a/nebo zvýšením kapacity ER ke sbalování proteinů. V krajním případě může tato reakce sloužit také jako signál pro apoptózu (Harding *et al.*, 2003). Proteosyntéza je omezena fosforylací eIF2α, která zabraňuje navázání tRNA na malou ribozomální podjednotku a společně s mRNA a dalšími molekulami tvoří tzv. stresová granula (SG).

1.3.2 Obranné mechanismy virů a jejich dopady na infikované buňky

Virus pro svou replikaci využívá hostitelskou proteosyntézu. Proto, aby se mohlo nasyntetizovat velké množství virových proteinů, si virus klasický proteosyntetický aparát musí uzpůsobit pro svůj vlastně prospěch, a k tomu využívá řady mechanismů. Pro příklad můžeme uvést degradaci hostitelské mRNA (herpes-simplex virus), změnu iontových poměrů, syntézu faktorů usnadňujících virovou proteosyntézu či inaktivaci translačních faktorů. Například virus vezikulární stomatitidy inaktivuje α podjednotku eIF2 (Schneider a Shenk, 1987).

Zároveň viry obchází obranné mechanismy buňky. U flavivirů bylo prokázáno, že dochází k blokaci fosforylace Jak1 a tím inhibici této signální dráhy, za antagonistu je považován NS5 protein (Best *et al.*, 2005). Při replikaci VKE na drsném ER se nově vznikající virové částice vchlipují do lumen ER. Tím virus částečně brání rozpoznání dsRNA intermediátů v cytoplazmě a spuštění časné antivirové odpovědi – syntézy IFN (Overby *et al.*, 2010). Vznikající NS5 proteiny se kromě účasti v replikaci viru váží na prolidázu, a tím blokují expresi receptoru pro IFN (IFNAR1) na povrchu cytoplazmatické membrány (Lubick *et al.*, 2015).

U flavivirů je v 3´netranslatované oblasti (3´UTR) vysoce strukturovaná oblast, která nepodléhá degradaci hostitelskou exoribonukleázou XRN1. Tím vzniká tzv. sfRNA (subgenomic flavivirus RNA) (Pijlman *et al.*, 2008). Nahromadění sfRNA v buňce má několik důsledků – negativně ovlivňuje nespecifickou imunitní odpověď (Chang *et al.*, 2013) a inhibuje XNR1, čímž ovlivňuje homeostázu mRNA v hostitelské buňce (Moon *et al.*, 2012). sfRNA se také váže na proteiny v replikačím kompexu a na 5´konec RNA

Změny v expresi proteinů jako následek virové infekce lze sledovat kvantitativní analýzou proteinů. Mezi tyto metody patří např. značení pomocí izotopem kódovaných afinitních značek (ICAT) (Gygi *et al.*, 1999), značení stabilními izotopy pomocí aminokyselin (SILAC) (Ong *et al.*, 2002) nebo dvoudimenzionální diferenciální gelová elektroforéza (2D DIGE) (Lilley a Friedman, 2004). 2D DIGE v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (MALDI) byla použita např. při sledování změn proteosyntézy u buněčné kultury T-lymfocytů 7-10 dní po infekci HIV, kdy byly zjištěny změny v expresi 288 proteinů, z nichž 92 proteinů bylo identifikováno (u ostatních nebylo dostatečné množství pro identifikaci) (Ringrose *et al.*, 2008). Tyto metody pracují s celým proteomem a nerozliší nově syntetizované proteiny, exprimované v určitých časových úsecích

po infekci, zároveň v případě 2D DIGE je omezené i množství proteinů, které lze použít pro izoelektrofoksaci. V případě ICAT a SILAC je sice možné časové rozlišení syntetizovaných proteinů, takto modifikované proteiny jsou ale jen obtížně studovatelné jiným způsobem než hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením. Alternativou k těmto metodám je bioortogonální chemie a metoda zvaná BONCAT, která umožňuje značení nově syntetizovaných proteinů a jejich purifikaci (viz dále).

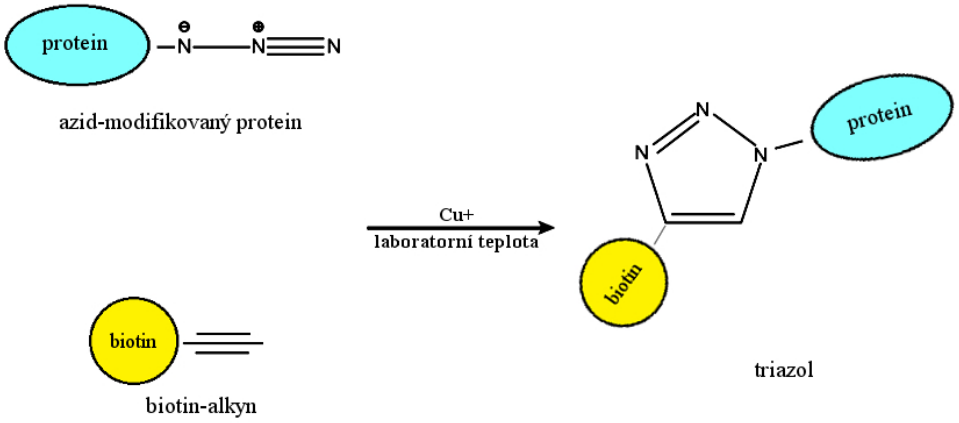
1.4 Bioortogonální chemie

Bioortogonální chemie je souhrnné označení všech reakci, které probíhají v živých systémech, ale přitom neovlivňují a nejsou ovlivněny přirozenými biochemickými procesy (Sletten a Bertozzi, 2011). V reakcích se využívají modifikované molekuly nesoucí malou nereaktivní skupinu, které jsou díky podobnosti s nativními molekulami enzymaticky zpracovávány stejně jako nativní molekuly.

1.4.1 Click chemie

Click chemie je označení pro reakce, které probíhají selektivně, rychle a mají vysoké výtěžky (Baskin a Bertozzi, 2007). Zároveň tyto reakce splňují další kritéria, musí být modulární, jejich produkty a meziprodukty musí být netoxické, reakce by měla být stereospecifická, produkty snadno izolovatelné a reakce by měla probíhat v relativně jednoduchých reakčních podmínkách, neměla by být ovlivněna přítomností kyslíku a vody (Kolb *et al.*, 2001).

Jedním z typů Click reakce je 1,3-dipolární cykloadice mezi terminálním alkynem a azidem. Jak azid tak alkyn jsou malé inertní molekuly, které se běžně v živých organismech nevyskytují a činí tak reakci velice specifickou (Beatty *et al.*, 2006). Jedna z inertních molekul (azid nebo alkyn) je navázána na sledované biomolekule a druhá je konjugována s funkční skupinou (malá reaktivní značka), která je využita v pozdější detekci. Touto funkční skupinou může být fluorophor (např. Alexa, CyDye), biotin popř. jiná skupina. Schéma reakce viz Obr. 1.



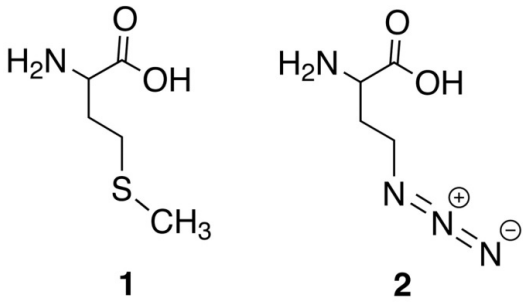
Obrázek 1: Schema Click reakce mezi biotin-alkynem a proteinem s azidovou skupinou.

Prvním krokem značení a detekce proteinů je metabolické značení, kdy jsou buňky inkubovány s modifikovanou aminokyselinou nesoucí inertní skupinu (např. L-azidohomoalanin, AHA) a následuje vlastní Click reakce mezi alkynem a azidem, katalyzována ionty Cu^{+}, kdy vzniká stabilní triazol. Výhodou Click reakce je rychlost, je 10^{7} krát rychlejší v porovnání s nekatalyzovanou reakcí (Lahann, 2009). Zatímco AHA je pro buňky netoxický, koncentrace iontů Cu^{+} potřebná při reakci je pro buňky toxická, proto v této i jiných pracích bývá Click reakce prováděna až po lýze buněk.

1.4.2 Metoda BONCAT

BONCAT (bio-orthogonal non-canonical amino acid tagging) je jednou z metod, kterou lze zviditelnit a identifikovat nově syntetizované proteiny. Nejprve se do proteinu inkorporuje azidová skupina (metabolické značení s využitím AHA), následuje chemoselektivní značení alkynovým tagem (Click reakce), purifikace značených proteinů (afinitní chromatorgafie) a identifikace (MS, hmotnostní spektrometrie).

AHA je jedním ze syntetických analogů methioninu (Obr. 2), který není pro buňky toxický a nezasahuje do buněčného metabolismu, čímž splňuje podmínky bioortogonality a zároveň umožňuje např. značení fluorescenční sondou (Kiick *et al.*, 2002; Dieterich *et al.*, 2006). Ačkoliv azidový anion je toxicitou srovnatelný s kyanidem, organické azidy toxické nejsou, jsou stabilní při 37 °C, jsou rezistentní k oxidaci a inertní vůči vodě (Prescher a Bertozzi, 2005; Debets *et al.*, 2010)



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

Metoda BONCAT je ovšem omezena na proteiny, které obsahují alespoň jeden methionin. Pokud vezmeme data z lidského proteomu, 5,08% proteinů obsahuje methionin jen v N-terminální oblasti, která může být předmětem posttranslačních úprav, z čehož plyne, že teoreticky můžeme metodou BONCAT naznačit 95% lidských proteinů (Dieterich *et al.*, 2006).

2 CÍLE PRÁCE

- kultivace glioblastomové buněčné linie v přítomnosti L-azidohomoalaninu
- provedení Click reakce
- detekce značených proteinů pomocí SDS-PAGE a western blottingu
- detekce značených proteinů pomocí dvoudimenzionální elektroforézy

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Příprava buněčných lyzátů

S ohledem na neurotropismus VKE byla používána buněčná linie glioblastomů odvozená od podpůrných buněk neurálního původu (Prof. T. Eckschlager, 2. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova). Buňky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Biowest) s 10 % BOFES (bovine fetal serum, Sigma-Aldrich), 1 % antibiotik (Amphotericin B 0,25 µg/ml, Penicilin G 100 units/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Biowest) a 1 % L-alanyl-L-glutaminem (Biochrom) při 37 °C. Práce s buňkami byla vždy prováděna v boxu s laminárním prouděním.

3.1.1 Infekce virem VKE

Pro infekci byl používán VKE kmene Neudörfl, který byl namnožený v glioblastomech v suspenzi média RPMI o titru viru 10^8 PFU/ml (plakotvorné jednotky, plaque forming unit). Buňky byly kultivovány v lahvích o objemu 75 cm^2, na které bylo nasazeno 1,5 x 10^6 buněk a ty byly kultivovány 24 hodin, aby adherovaly na dno kultivační lahve. Po 24 hodinách bylo medium nahrazeno 6 ml čerstvého média s virovou suspenzí. Adsorpce viru na buňky probíhala při koncentraci viru 10 MOI (multiplicity of infection), kdy k 5,85 ml média bylo přidáno 150 µl virové suspenze a buňky byly inkubovány 2 hodiny při teplotě 37 °C. Poté bylo médium s virem odebráno, buňky byly promyty sterilním PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Biosera) a bylo přidáno 30 ml čerstvého média. Buňky byly poté inkubovány po dobu 24, 48, 72, 96 a 120 hodin (od začátku infekce) při 37 °C. Současně byla pro každý interval připravena kontrola, ale bez přidání virové suspenze a inkubována ve stejných intervalech jako infikované buňky.

3.1.2 Metabolické značení

Značení nově syntetizovaných proteinů pomocí AHA bylo započato 2 hodiny před koncem intervalu, který jsme chtěli sledovat, tzn. např. u intervalu 24 hodin začalo značení 22 hodin po infekci (22 hpi). Po odebrání média z kultivační láhve byly buňky 2x promyty sterilním PBS a bylo k nim přidáno 6 ml modifikovaného RPMI média bez methioninu (RPMI-1640 Medium Modified, Sigma-Aldrich), s přídavkem 10 % BOFES,

1 % antibiotik, 1 % L-alanyl-L-glutaminu a 0,21 mM cysteinu (L-cystine Research Grade, Serva). Po 2 hodinách inkubace byl k buňkám přidán AHA ve finální koncentraci 50 µM. Inkubace buněk s AHA probíhala další 1 hodinu.

3.1.3 Příprava lyzátu

Po 60 minutách bylo z kultivační láhve odebráno médium a buňky byly dvakrát promyty sterilním PBS. K buňkám byly přidány 2 ml PBS-sacharózy (1,7 mM KH_2PO_4, 10 mM Na_2HPO7_4, 0,25 M sacharóza) a buňky byly pomocí škrabky seškrábnuty do roztoku, suspenze byla přenesena do mikrozkumavky a centrifugována při 4 °C a 400 x g. Supernatant byl odebrán a k buňkám byl přidán lyzační pufr (1% SDS v sodno-fosfátovém pufru, pH 8,0) s inhibitory proteáz (HALT™ Protease Inhibitor Cocktail) a fosfatáz (HALT™ Phosphatase Inhibitor Cocktail, obojí Thermo Scientific). Lyzát byl 10 minut sonikován, vortexován a následně centrifugován. Takto připravené lyzáty byly skladovány při -75 °C do dalšího zpracování.

3.2 Příprava proteinových vzorků

U všech buněčných lyzátů byla změřena koncentrace proteinů s využitím Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) pomocí přístroje Synergy H1 microplate reader (Biotek).

3.2.1 Click reakce

Pro Click reakci byl použit protokol dle Presolski a kol. (2011). Jelikož nebyl používán komerční kit, byla provedena optimalizace reakčních podmínek (projekt SGA 2016). Výsledný protokol je uveden níže.

Pro každou reakci bylo použito 150 µg proteinů. K odpovídajícímu objemu lyzátu byl přidán reakční pufr (0,1M draselno-fosfátový pufr, pH 7,0) do objemu 432,5 µl. Do reakční směsi bylo přidáno 10 µl 5 mM biotin-alkynu (Biotin-PEG4-alkyne, Click Chemistry Tools), 25 µl dH_2O a 7,5 µl předpřipravené směsi [20 mM $CuSO_4$ (2,5 µl) s 50 mM THPTA (Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine, Click Chemistry Tools) (5 µl)]. Nakonec bylo přidáno 20 µl 5 mM askorbátu sodného (Sigma-Aldrich). Reakce probíhala na rotátoru 1 hodinu při 37 °C. Poté byly proteiny sráženy methanol-chloroformem. K reakční směsi byly přidány 2 ml methanolu (Lach-ner),

500 µl chloroformu (Lach-ner) a 1,5 ml dH_2O. Vzniklá směs byla krátce zvortexována a centrifugována při 10 000 x g po dobu 1 minuty. Vrchní fáze byla odebrána a bylo přidáno 400 µl methanolu. Směs byla opět krátce zvortexována a centrifugována při 10 000 x g dalších 5 minut. Supernatant byl odebrán, pelet byl vysušen. Pokud byly proteiny použity pro SDS-PAGE, byl pelet rozsuspendován v lyzačním pufru, pokud byly proteiny použity pro izoelektrofokusaci (IEF), byl pelet rozsuspendován v rehydratačním pufru pro IEF (viz kapitola 3.3.2).

Dle stejného protokolu byla Click reakce provedena i s desthiobiotin alkynem (Desthiobiotin-PEG4-alkyne, Click Chemistry Tools).

3.2.2 Purifikace značených proteinů – afinitní chromatografie

Biotinylované proteiny byly dále purifikovány s využitím Streptavidin agarose resin (Click Chemistry Tools). Jelikož výsledky nebyly uspokojivé, byla vyzkoušena i purifikace s využitím Monomeric avidin agarose (Thermo Scientific).

3.2.2.1 Streptavidin agarose resin

Na prázdnou kolonku (Micro Bio-Spin™ Chromatography Columns, Bio-Rad) bylo odebráno 80 µl agarózových kuliček a 3x promyto 1 ml PBS (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,76 mM KH_2PO_4, pH 7,4). Poté byl ke kuličkám přidán proteinový vzorek, kolonka byla uzavřena a vzorek byl inkubován na rotátoru 1 hodinu při 37 °C. Poté byla kolonka 4x promyta PBS a zespodu uzavřena. Kuličky byly rozsuspendovány v 500 µl PBS, přeneseny do nové mikrozumavky a krátce zcentrifugovány při 600 x g. Supernatant byl odebrán, část kuliček byla použita pro SDS-PAGE a část byla použita pro eluci.

Eluce proteinů z agarózových kuliček probíhala několika způsoby:

a) k 12 µl suspenze kuliček bylo přidáno 50 µl 4x vzorkového pufru s DTT (0,2% bromfenolová modř, 40% glycerol, 8% SDS, 0,2M Tris, 100 mM dithiothreitol, pH 6,8), 100 µl dH_2O a vzorek byl inkubován po dobu 10 minut při 95 °C.

b) k 12 µl suspenze kuliček bylo přidáno 50 µl 5x vzorkového pufru (0,25% bromfenolová modř, 50% glycerol, 10% SDS, 0,25M Tris, pH 6,8), 100 µl dH_2O a vzorek byl inkubován po dobu 10 minut při 95 °C

c) k 12 µl suspenze kuliček bylo přidáno 100 µl 6 M guanidin hydrochloridu, krátce zvortexováno; eluát byl pře elektroforetickou separací precipitován metodou methanol-chloroform a pelet rozsuspendován v 20 µl lyzačního pufru (1% SDS, 0,1 M sodno-fosfátový pufr, pH 8,0)

d) k 12 µl suspenze kuliček bylo přidáno 100 µl 8 M guanidin hydrochloridu, krátce zvortexováno; eluát byl pře elektroforetickou separací precipitován metodou methanol-chloroform a pelet rozdudpendován v 20 µl lyzačního pufru

e) k 12 µl suspenze kuliček bylo přidáno 100 µl 6M močoviny a krátce zvortexováno

f) k 12 µl suspenze kuliček bylo přidáno 100 µl roztoku [50% acetonitril, 0,1% kyselina trifluoroctová] a krátce zvortexováno; kuličky byly 3x promyty PBS, odebraný eluát byl vysušen ve speed-vacu (Labconco) a následně rozsuspendován v 20 µl lyzačního pufru

g) k 12 µl suspenze kuliček bylo přidáno 100 µl roztoku [30% acetonitril, 0,5% kyselina mravenčí] a krátce zvortexováno; kuličky byly 3x promyty PBS, odebraný eluát byl vysušen ve speed-vacu (Labconco) a následně rozsuspendován v 20 µl lyzačního pufru

h) k 12 µl suspenze kuliček bylo přidáno 100 µl dH_2O a vzorek byl 30 vteřin inkubován při 70 °C

i) k 12 µl suspenze kuliček bylo přidáno 100 µl dH_2O a vzorek byl 30 vteřin inkubován při 80 °C

j) v případě Click reakce s využitím desthiobiotinu: k 12 µl suspenze kuliček bylo přidáno 100 µl 4 mM d-biotinu v TBS (tris-buffered saline; 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6), inkubováno 15 minut a kuličky byly 3x promyty PBS

Pro následnou elektroforetickou separaci byl vždy použit eluát a agarózové kuličky. V případě vzorků, u kterých byl při reakci použit desthiobiotin, byly použity i promývací kroky, které byly vysráženy a peletky byly rozsuspendovány v 20 µl lyzačního pufru.

3.2.2.2 Monomeric avidin agarose

Na prázdnou kolonku bylo odebráno 100 µl agarózových kuliček a ty byly promyty PBS (2x 2 ml). Následně pro zablokování irreverzibilních vazebných míst (polymerní avidin) byly promyty 1 ml blokovacího pufru (2 mM d-biotin v PBS) a z reverzibilních vazebných míst byl biotin následně vymyt 2x 1 ml elučního pufru (0,1 M glycin, pH 8.0) a 2x 1 ml PBS. Ke kuličkám byl přidán vzorek a kolonka byla inkubována 1h při mírném třepání. Eluát byl odebrán do nové mikrozkumavky a označen FT (flow-through). Následně byly kuličky promyty 6x 200 µl PBS, 6x 200 µl blokovacím pufrem a 6x 200 µl elučním pufrem. U jednotlivých frakcí byla změřena orientační koncentrace proteinů spektrofotometrem (Implen). Ze všech frakcí byly metodou methanol-chloroform precipitovány proteiny, které byly společně s částí agarózových kuliček použity pro SDS-PAGE.

3.3 Detekce a vizualizace značených proteinů

3.3.1 SDS-PAGE

Proteiny byly separovány podle velikosti s využitím polyakrylamidové gelové elektroforézy (Laemmli, 1970). Separační gel obsahoval 12% akrylamid (Rotiphorese® Gel 30 směs akrylamidu a bis-akrylamidu 37,5:1, Roth), 0,1% APS (amonium persulfát), 0,375 M Tris-base, pH 8,8, 0,1% SDS, a 0,04% TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin). Zaostřovací gel obsahoval 5% akrylamid, 0,25 M Tris-base, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS a 0,01% TEMED.

Vzorky pro elektroforetickou separaci byly smíchány s 4x redukujícím vzorkovým pufrem s DTT (0,2% bromfenolová modř, 40% glycerol, 8% SDS, 0,2M Tris, 100 mM dithiothreitol, pH 6,8) a 10 minut zahřívány na 70 °C. Do sestavené aparatury (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad) byl nalit elektrodový pufr (25 mM Tris-base, 0,192 M glycin, 0,1% SDS), na gel byly naneseny vzorky a proteinový marker (Prestained Protein Marker VI 10 – 245 kDa, Applichem). Elektroforetická separace proteinů probíhala přibližně 1,5 hodiny při 120 V. Po separaci byly gely buď použity pro western blotting, nebo byly gely barveny koloidní Coomassie (viz kapitola 3.3.4).

3.3.2 Dvoudimenzionální PAGE

Při dvoudimenzionální PAGE byla v prvním směru použita izoelektrická fokusace a následně v druhém směru separace podle velikosti (SDS-PAGE).

100 µg proteinů vysrážených metodou methanol-chloroform byla rozsuspendována v 125 µl rehydratačního pufru pro IEF (7 M močovina, 2 M thiomočovina, 2% CHAPS, 40 mM DTT, 1% bromfenolová modř, 0,2% Pharmalyte 3-10, GE Healthcare). IPG stripy pro IEF (ReadyStrip IPG strips, Bio-Rad) byly rehydratovány přes noc (11-16 hodin) pod vrstvou minerálního oleje (Sigma-Aldrich). Izoelektrofokusace v aparatuře Hoefer IEF100 probíhala dle protokolu uvedeného v Tabulce I.

Tabulka I: Parametry izoelektrofokusace.

	napětí	čas [h]
konstantní	250 V	0:30
gradient	1000 V	1:00
gradient	4000 V	2:00
gradient	4000 V	2:00
konstantní	500 V	∞
celkem	cca 11500 Vh	

IPG stripy byly poté osušeny od oleje a pro druhý směr, SDS-PAGE, byly ekvilibrovány nejprve 2x 10 minut v ekvilibračním pufru (6 M močovina, 0,375 M Tris, pH 8,8; 2% SDS, 20% glycerol) s 2% DTT, následně 2x 10 minut v ekvilibračním pufru s 2,5% iodoacetamidem. Proužky byly poté opláchnuty v 1x elektrodovém pufru pro SDS-PAGE, přeneseny na připravený polyakryalmidový gel (TGX™ Precast Gels, Bio-Rad) a převrstveny rozehřátou agarózou (ReadyPrep™ Overlay Agarose, Bio-Rad). Proteinový prestained marker (3 µl) byl napuštěn na přibližně 4x4 mm čtverec filtračního papíru a umístěn k IPG stripu k jedné straně. Další postup byl stejný jako v kapitole 3.3.1.

3.3.3 Western blotting

Proteiny po elektroforetické separaci byly přeneseny na PVDF membránu (Amersham) metodou dle Towbina (1979).

Membrána byla aktivována methanolem a následně byla inkubována (stejně jako SDS-PAGE gely a blotovací papíry) v blotovacím pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol). V blotovací aparatuře (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad) byl sestaven blotovací sendvič, bublinky byly při sestavování odstraňovány skleněnou tyčinkou. Blotování probíhalo 30 minut při 25 V.

Po přenesení proteinů byla membrána krátce promyta v PBS. V tomto kroku byla buď provedena Click reakce na membráně (viz kapitola 3.3.5) a až poté byla membrána zablokována, nebo byla membrána rovnou zablokována v 5% sušeném odtučněném mléce v PBS-T (PBS, 0,05% Tween20). Po zablokování membrány byl pro detekci biotinem označných protenů používán streptavidin konjugovaný s alkalickou fosfatázou (Streptavidin Alkaline Phosphatase, Vector Laboratories, streptavidin AP) v 5% mléce, ředění 1:2000. Kvůli velice slabému signálu byla následně použita ještě biotinylovaná anti-streptavidin protilátka (Vector Laboratories) v ředění 1:2000 v 5% mléce a opět streptavidin AP (1:2000) v 5% mléce – triple značení. Ředění streptavidinu a protilátky bylo vybráno vzhledem ke kvalitnější detekci, menšímu pozadí a slabším nespecifickým interakcím. Mezi inkubacemi byla membrána promývána 3x 10 minut v PBS-T. Poslední promývání proběhlo 2x 10 minut v PBS-T, 1x 10 minut v PBS a membrány byly umístěny do vyvolávacího pufru pro alkalickou fosfatázu (0,1 M Tris, 0,05 M $MgCl_2$, 0,1 M NaCl, pH 9,5) se substrátem BCIP/NBT (1x BCIP/NBT, 20 µl/10 ml vyvolávacího pufru). Po dosažení viditelného signálu byly membrány promyty dH_2O, vysušeny a oskenovány.

3.3.4 Barvení gelů

Polyakrylamidové gely byly barveny koloidním CBB (Coomassie Brilliant Blue) tzv. Blue Silver postupem (Candiano *et al.*, 2004). Gely byly fixovány v roztoku 50% ethanolu a 2% kyseliny fosforečné po dobu 20 minut, následně byly 2x promyty v dH_2O a barveny přes noc koloidním roztokem CBB (10% kyselina fosforečná, 10% síran amonný, 0,12% CBB G-250, 20% methanol). Následně byly gely promyty v dH_2O a vyfoceny pomocí gel-dokumentačního zařízení (G:Box Chemi XX6, Syngene).

3.3.5 Click reakce na membráně

PVDF membrána po přenesení proteinů byla promyta v PBS a byla k ní přidána reakční směs stejná jako pro Click reakci v roztoku, ovšem ve větším objemu (8 ml/membrána - 7,38 ml reakčního pufru, 100 µl biotin-alkynu, předpřipravená směs 40 µl $CuSO_4$ a 80 µl THPTA, 400 µl askorbátu sodného). Reakce probíhala 1 hodinu, poté byla membrána promyta PBS a blokována v 5% mléce v PBS-T. Po zablokování membrány byly proteiny s navázaným biotinem detekovány triple značením streptavidinem AP. Postup při vyvolávání byl stejný jako v kapitole 3.3.3.

4 VÝSLEDKY

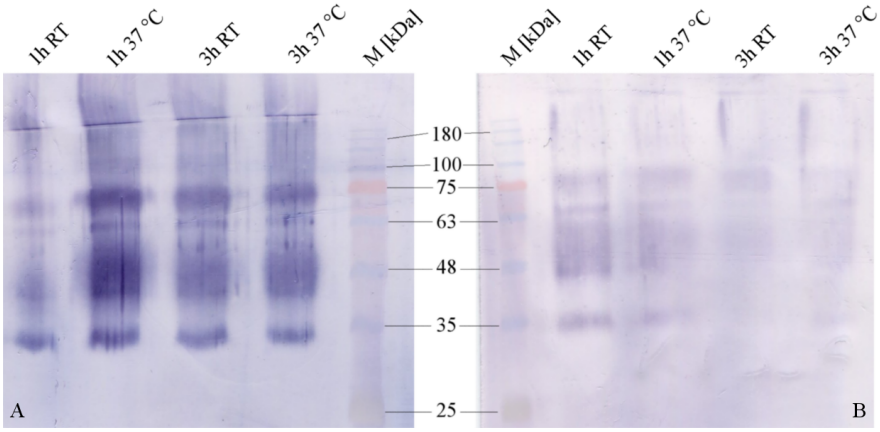
Shrnutí výsledků

Pro sledování změn proteosyntézy v buněčné kultuře glioblastomů infikované VKE byla použita metoda BONCAT (kapitola 1.4.2) a následně Click reakce. Click reakce probíhala bez využití komerčních kitů, proto bylo nutné nejprve optimalizovat reakční podmínky. Pro purifikaci značených proteinů byl použit streptavidin imobilizovaný na agarózových kuličkách, ovšem následná eluce byla i s využitím několika přístupů neúplná. Purifikace byla provedena i s využitím agarózových kuliček s navázaným monomerním avidinem (Monomeric avidin agarose), který by měl umožňovat účinnou eluci, ovšem zde se eluce také nezdařila.

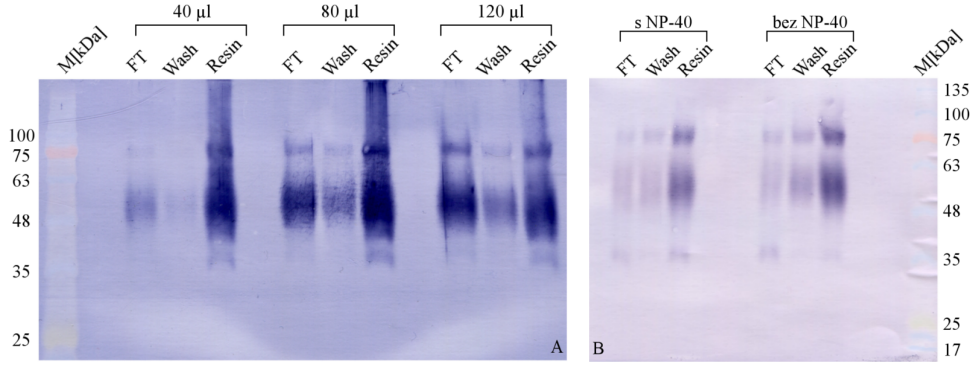
Pro 2D PAGE byly nejprve použity precipitované proteiny již po Click reakce, ovšem výsledky nesplňovaly očekávání. Vzhledem k výraznému „streakování" byl použit postup, kdy pro 2D PAGE byly použity vysrážené proteiny z buněčného lyzátu bez provedené Click reakce, které neměly navázaný biotin. Proteiny byly elektroforeticky separovány, přeneseny na PVDF membránu a Click reakce proběhla až na membráně. Vizualizace proteinů probíhala pomocí triple-značení.

Nejprve byla provedena optimalizace reakčních podmínek pro provedení Click reakce, porovnánány byly časy 1 hodina a 3 hodiny, laboratorní teplota (RT, room temperature) a 37 °C. Při porovnání těchto modifikací bylo prokázáno, že nejlepších výsledků bylo dosaženo, když reakce probíhala 1 hodinu při 37 °C. Zároveň je na Obr. 3 patrné, že při použití triple-značení při blottingu (streptavidin AP – biotinylovaná anti-streptavidin protilátka – streptavidin AP, Obr. 3A) je možné detekovat i velmi nízké množství proteinů (na gel bylo v tomto případě nanášeno 75 ng proteinů u každého vzorku).

Pro purifikaci biotinylovaných proteinů byl využit streptavidin imobilizovaný na agarózových kuličkách. Nejdříve byla provedena optimalizace, kde jsme pro purifikaci použili různé množství agarózových kuliček, a sledovali jsme vliv přidání detergentu NP-40 (Nonidet P-40, pro snížení efektu SDS). Nejlepších výsledků (ve frakcích FT a W minimální signál) bylo dosaženo, když pro purifikaci bylo použito 40 µl agarózových kuliček pro 50 µg proteinů, přidání detergentu NP-40 nemělo na proteinový profil viditelný vliv (Obr. 4).

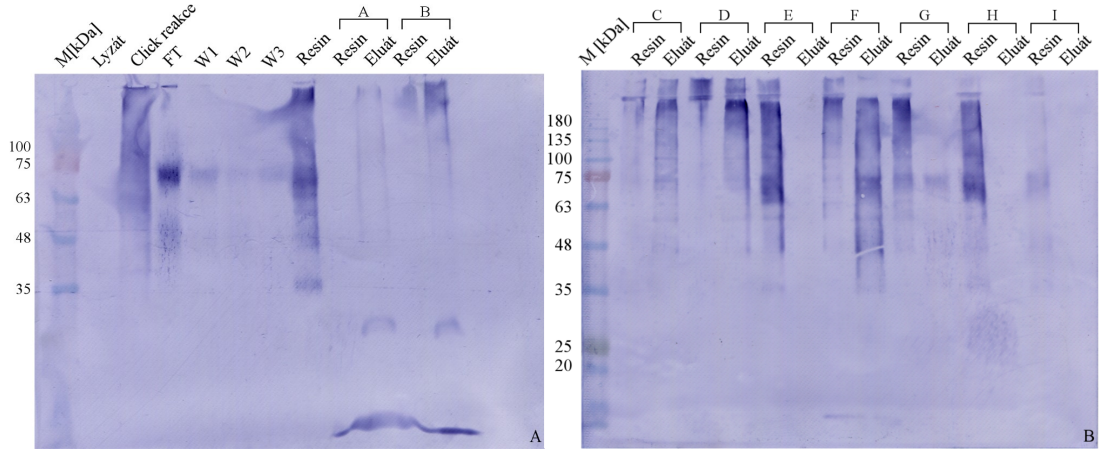


Obrázek 3: Optimalizace reakčních podmínek Click reakce a vizualizace značených proteinů, na gel nanášeno 75 ng proteinů. (A) značení streptavidin AP – biotinylovaná anti-streptavidin protilátka – streptavidin AP; (B) značení pouze streptavidinem AP. Vyvolávání signálu pomocí BCIP/NBT.

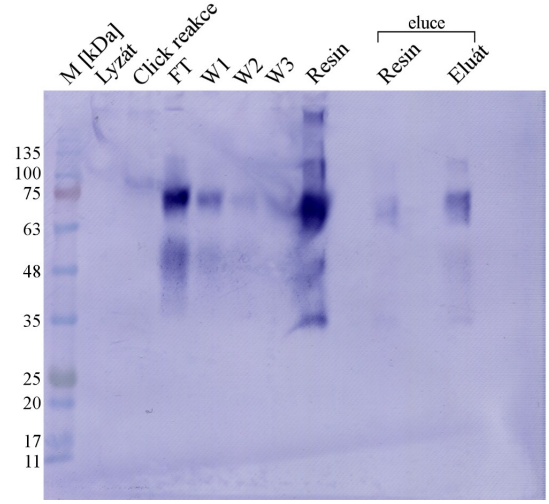


Obrázek 4: Purifikace biotinylovaných proteinů pomocí streptavidinu imobilizovaného na agarózových kuličkách (resin), FT – flow-through. (A) – porovnání různých objemů agarózových kuliček použitých pro purifikaci ze stejného množství reakční směsi, (B) – vliv detergentu NP-40 na purifikaci. Triple značení, vyvolávání signálu pomocí BCIP/NBT.

Eluce proteinů ze streptavidin-agarózy probíhala několika způsoby (viz kapitola 3.2.2.1). Na gel byly nanášeny vždy agarózové kuličky a eluát. U eluce pomocí vzorkového pufru (dvojice A a B, Obr. 5) byly výsledky očekávané, ovšem tento postup není kompatibilní s přímou následnou analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie. U eluce pomocí guanidin hydrochloridu (dvojice C a D, Obr. 5) již na agarózových kuličkách nebyl tak výrazný signál, proto byl tento postup ještě zopakován (viz dále – Obr. 7). U ostatních způsobů eluce, vybraných podle různých publikovaných postupů, byl u agarózových kuliček stále ještě výrazný signál (v porovnání s eluátem).



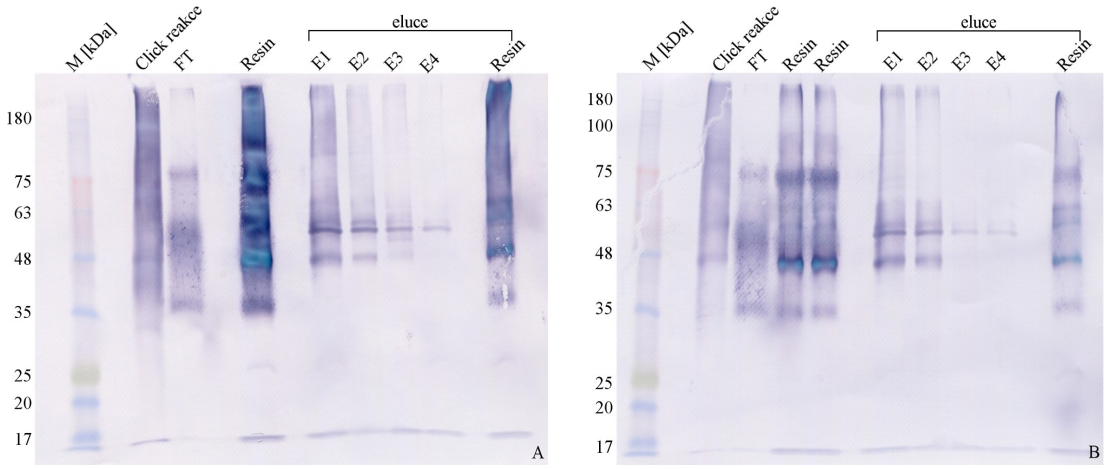
Obrázek 5: Eluce biotinylovaných proteinů z agarózových kuliček. Lyzát – lyzované buňky bez provedené Click reakce, Click reakce – srážené proteiny po provedené Click reakci, FT – flow-through, W1, W2, W3 – promytí pomocí PBS, Resin – kuličky po promytí, které byly použity pro další eluci. U každého způsobu eluce byla na gel nanesena suspenze kuliček po eluci (resin) a eluované proteiny. Pro eluci navázaných proteinů byl použit: (A) 4x redukující vzorkový pufr s DTT, (B) 5x neredukující vzorkový pufr, (C) 8M guanidin hydrochlorid, (D) 6M guanidin hydrochlorid, (E) 6M urea, (F) 50% acetonitril s 0,1% kyselinou trifluoroctovou, (G) 30% acetonitril s 0,5% kyselinou mravenčí, (H) inkubace s dH_2O po dobu 30 sekund při 70 °C, (I) inkubace s dH_2O po dobu 30 sekund při 80 °C. Triple značení, vyvolávání signálu pomocí BCIP/NBT.



Obrázek 6: Eluce biotinylovaných proteinů z agarózových kuliček, proteiny s navázaným desthiobiotinem. Lyzát – lyzované buňky bez provedené Click reakce, Click reakce – srážené proteiny po provedené Click reakci, FT – flow-through, W1, W2, W3 – promytí pomocí PBS, resin – agarózové kuličky. U vzorků označených eluce byla na gel nanesena suspenze kuliček po eluci (eluce resin) a eluované proteny. Pro eluci navázaných proteinů byl použit 20 mM d-biotin v PBS. Triple značení, vyvolávání signálu pomocí BCIP/NBT.

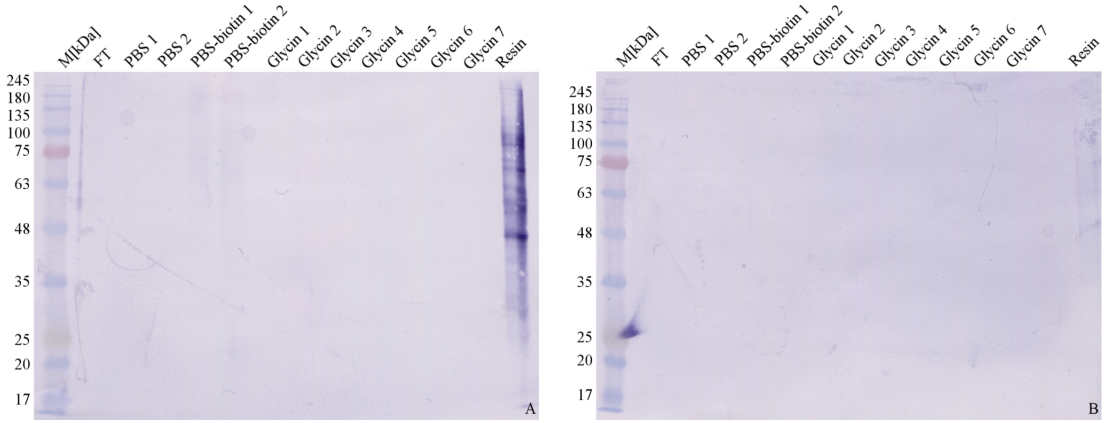
Pro eluci byly také použity proteiny, na které byl Click reakcí navázán desthiobiotin. Desthiobiotin má menší afinitu k streptavidinu a měl by být eluovatelný kompetitivně pomocí volného d-biotinu (Obr. 6). Ani tímto způsobem se nepodařilo kompletně eluovat všechny navázané proteiny.

Alespoň částečné eluce se podařilo dosáhnout při použití guanidin hydrochloridu (dvojice C a D, Obr. 5), tento postup byl zopakován s tím, že eluce probíhala postupně ve 4 krocích, kdy vždy bylo přidáno 150 µl nového 8M guanidin hydrochloridu. Z Obrázku 7 je patrné, že i když v každém dalším eluátu máme slabší signál, u agarózových kuliček je signál stále výrazný.



Obrázek 7: Postupná eluce biotinylovaných proteinů z agarózových kuliček (resin) pomocí 8M guanidin hydrochloridu. Click reakce – precipitované proteiny po provedené Click reakci, FT – flow-through, resin – suspenze kuliček před elucí; eluce: E1, E2, E3, E4 – jednotlivé kroky eluce, resin – suspenze kuliček po eluci. (A) kontrolní vzorek, (B) vzorek 120 hpi. Triple značení, vyvolávání signálu pomocí BCIP/NBT.

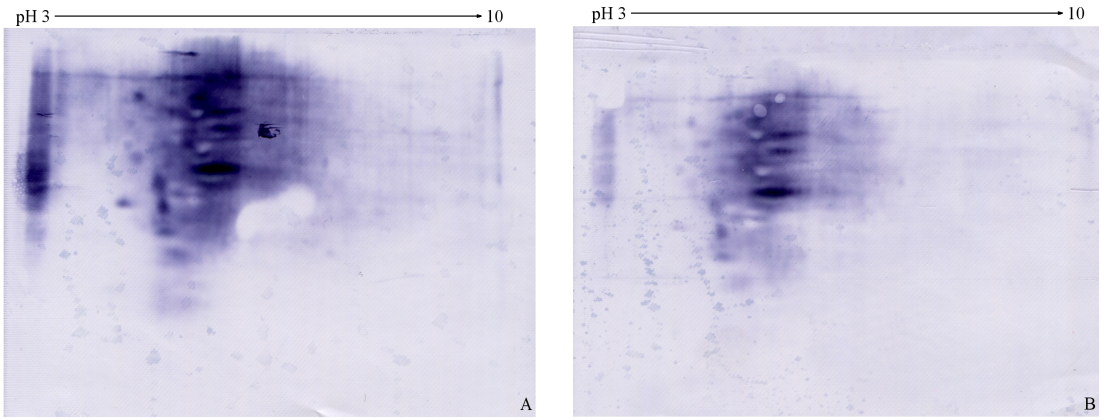
Vzhledem k stále výraznému signálu u agarózových kuliček byla provedena purifikace s využitím jiných agarózových kuliček (Monomeric Avidin Agarose). Eluce biotinylovaných proteinů probíhala dle protokolu výrobce, který tvrdí, že eluce je kvantitativní a agarózové kuličky mohou být použité opakovaně. Ovšem jak je vidět na Obr. 8, biotinylované proteiny byly detekovány pouze u suspenze agarózových kuliček, u ostatních vzorků signál není detekovatelný až na výjimku velice slabého signálu v případě eluce pomocí PBS s biotinem.



Obrázek 8: Purifikace biotinylovaných proteinů s využitím Monomeric avidin agarose. FT – flow-through, PBS – promytí PBS k odstranění nespecificky navázaných proteinů, PBS-biotin – eluce pomocí 2 mM d-biotinu v PBS, Glycin – eluce pomocí 0,1 M glycinu, pH 2,8; resin – suspenze agarózových kuliček po eluci. (A) kontrolní vzorek, (B) vzorek 120 hpi. Triple značení, vyvolávání signálu pomocí BCIP/NBT.

Purifikace biotinylovaných proteinů s využitím streptavidinu imobilizovaného na agarózových kuličkách i s využitím Monomeric avidin agarose bohužel nesplnila očekávání. Ani v jednom případě se nepodařilo kvantitativně eluovat všechny navázané proteiny – následná kvalitativní anebo kvantitativní analýza hmotnostní spektrometrií by tedy nemohla poskytnout skutečně věrohodné výsledky.

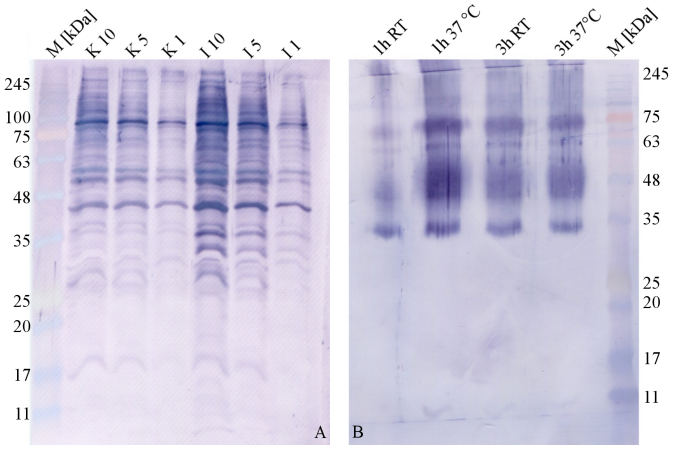
Biotinylované proteiny po provedené Click reakci byly použity také pro 2D PAGE. I po optimalizaci protokolu a použití triple-značení na PVDF membráně jsme stále nedosahovali kýžených výsledků, na gelech i na membránách bylo stále přítomné výrazné „streakování“ (Obr. 9).



Obrázek 9: 2D PAGE biotinylovaných proteinů po Click reakci. (A) neinfikované buňky, (B) buňky 120 hpi. Triple značení, vyvolávání signálu pomocí BCIP/NBT.

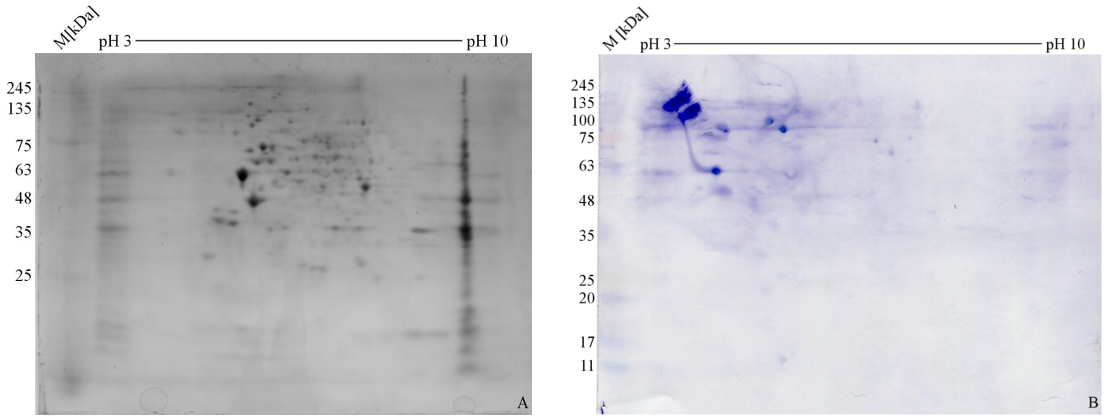
Některé proteiny (Obr. 9) sice vypadají nedofokusované, ovšem zvýšení voltáže ze 4000V (celkem cca 11500 Vh) na 6000V a prodloužení fokusace při 6000V na 3 hodiny (celkem cca 23500 Vh) nevedlo k lepším výsledkům.

Vzhledem k výše uvedeným potížím jsme pro SDS-PAGE použili přímo buněčné lyzáty a Click reakci jsme provedli až u proteinů přenesených na PVDF membráně („Click na membráně“).



Obrázek 10: Porovnání Click reakce na membráně (A) a Click reakce v roztoku (B). K – kontrola, I – 120 hpi; K 10 – 10 µg nanesených proteinů, K 5 – 5 µg nanesených proteinů, K 1 – 1 µg nanesených proteinů; I 10, I 5 a I 1 analogicky. Vpravo bylo na membránu naneseno 75 ng proteinů. Triple značení, vyvolávání signálu pomocí BCIP/NBT (A) 1 h, (B) 72 h.

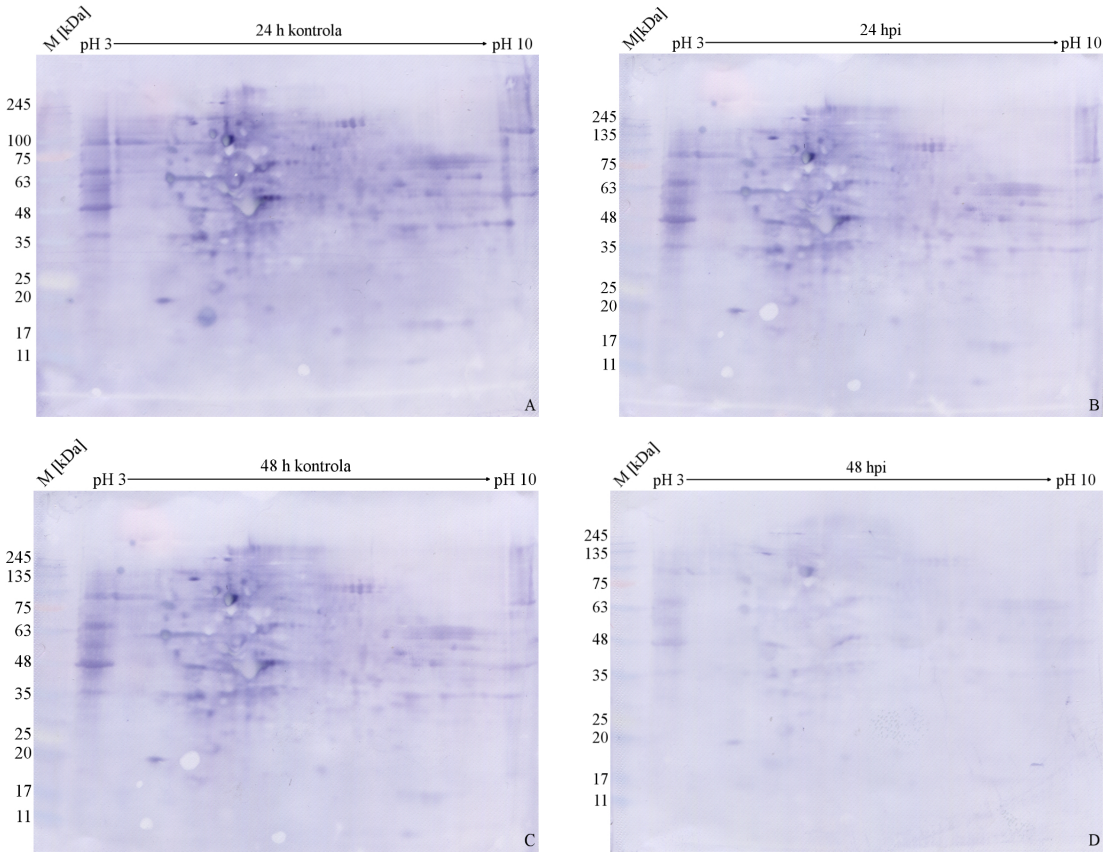
Při porovnání Click reakce na membráně a Click reakce v roztoku (Obr. 10) je zřejmé, že při provedení Click reakce až na membráně je signál mnohem lépe ohraničen a je detekovatelné větší spektrum proteinů. V případě Click reakce v roztoku bylo detekováno menší množství proteinů (75 ng), ovšem vyvolávání signálu probíhalo mnohem déle než v případě Click reakce na membráně, kdy již po hodině byl signál zřetelný. Tento postup jsme proto dále používali i při vizualizaci proteinů separovaných pomocí 2D SDS-PAGE.



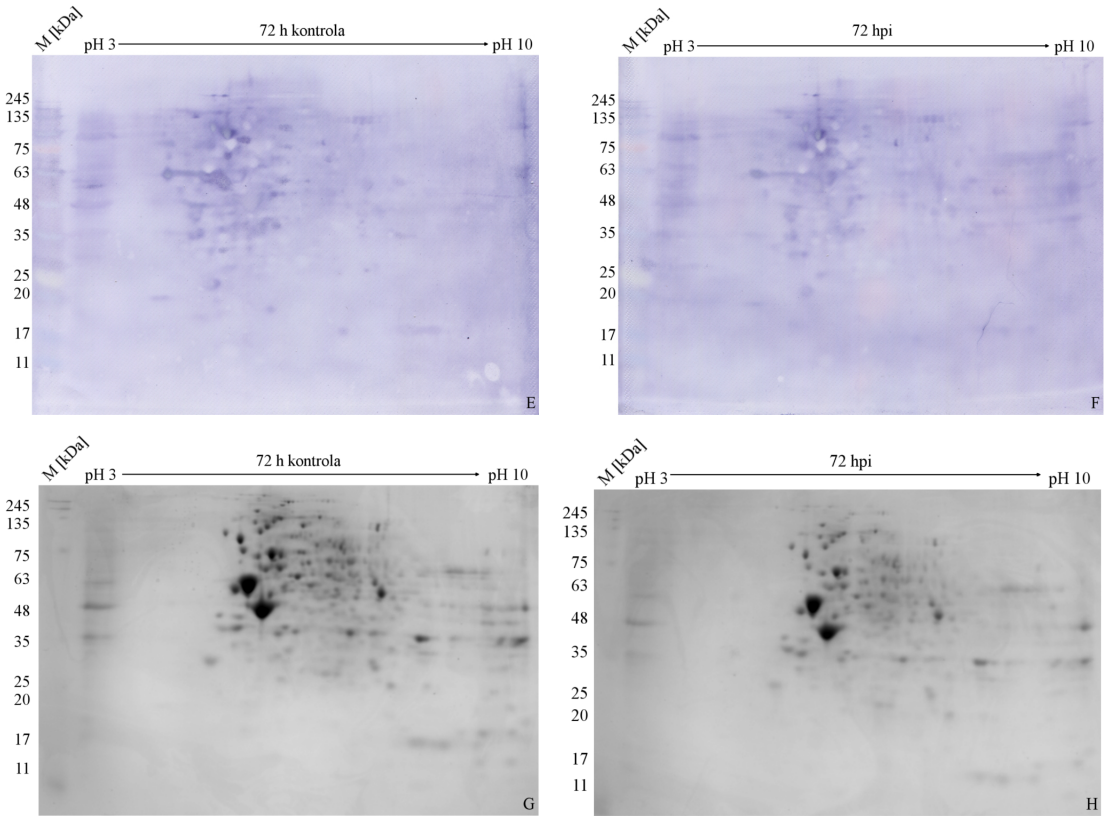
Obrázek 11: 2D PAGE buněčného lyzátu bez provedené Click reakce. (A) PAA gel barvený CBB, (B) Click reakce na membráně s využitím biotin-alkynu, triple-značení streptavidin AP – biotinylovaná anti-streptavidin protilátka – streptavidin AP. Vyvolávání signálu pomocí BCIP/NBT.

Izoelektrofokusace vzorku probíhala při 4000 V, což je původní protokol uvedený v kapitole 3.3.2. Na gelu (Obr. 11A) je již vidět, že ačkoliv se jedná o stejný protokol a stejný vzorek jako v předchozím případě (Obr. 9), proteiny jsou fokusované a ani na membráně není pozorovatelné výraznější „streakování“.

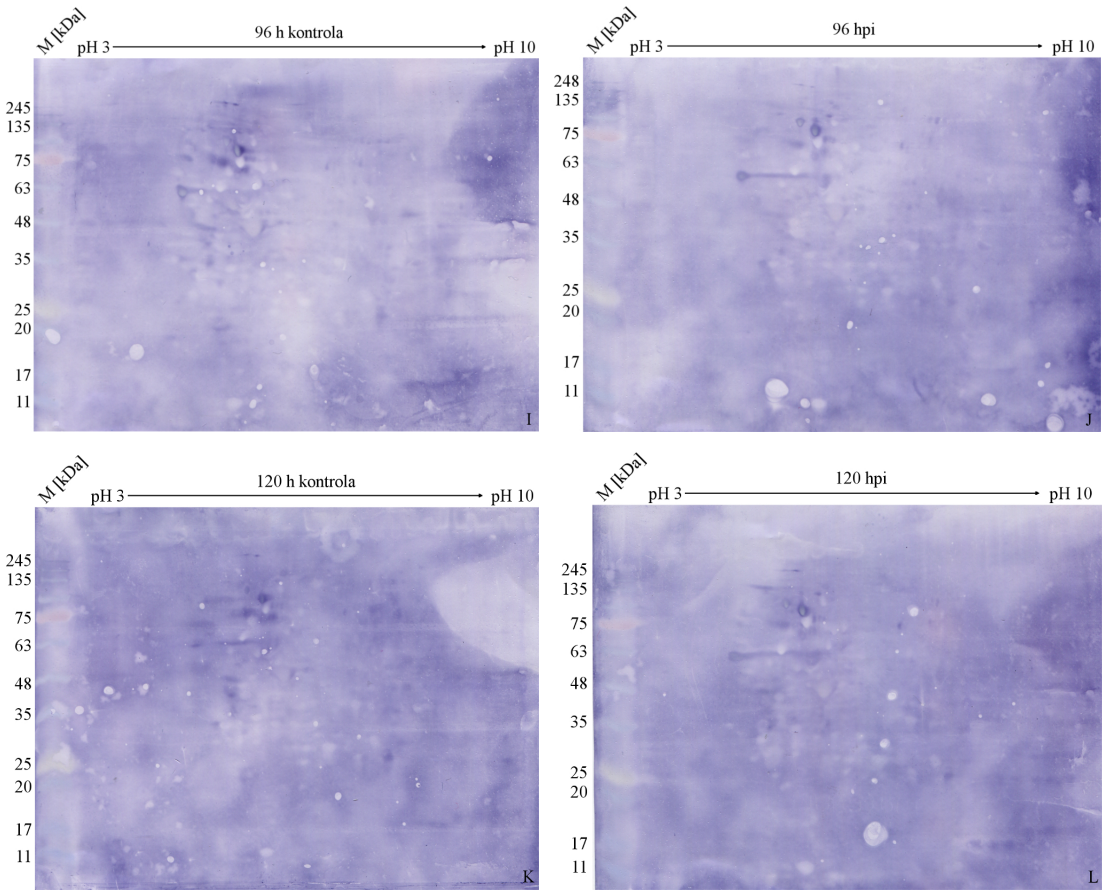
Tento postup byl použit pro analýzu všech buněčných lyzátů v jednotlivých intervalech po infekci (24, 48, 72, 96 a 120 hpi) a to jak pro infikované buňky, tak pro kontrolní vzorky, které byly připraveny stejným způsobem (Obr. 12 a 13).



Obrázek 12: 2D PAGE buněčných lyzátů a Click reakce na membráně, jednotlivé intervaly po infekci a kontrolní vzorky. (A) 24 h kontrola, (B) 24 hpi, (C) 48 h kontrola, (D) 48 hpi. Triple značení, vyvolávání signálu pomocí BCIP/NBT.

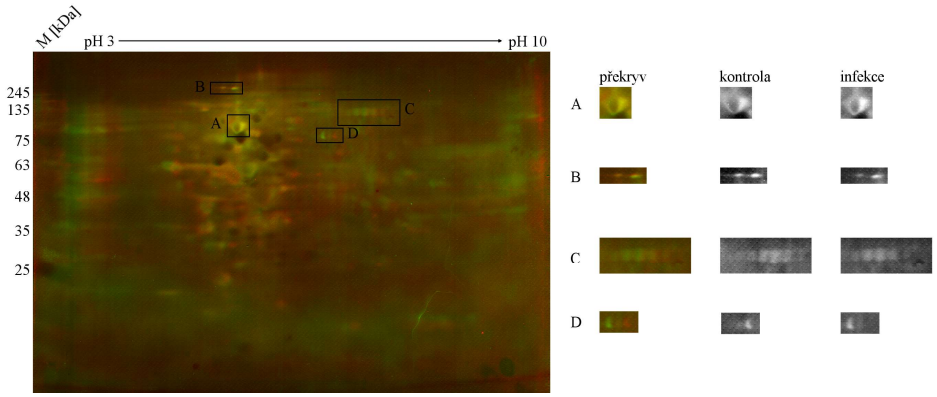


Obrázek 13: 2D PAGE buněčných lyzátů a Click reakce na membráně, jednotlivé intervaly po infekci a kontrolní vzorky. (E) 72 h kontrola, (F) 72 hpi, (G) PAA gel 72 h kontrola, (H) PAA gel 72 hpi. Gely barveny CBB, u membrán použito triple značení a vyvolávání signálu na membráně pomocí BCIP/NBT.



Obrázek 13: 2D PAGE buněčných lyzátů a Click reakce na membráně, jednotlivé intervaly po infekci a kontrolní vzorky. (I) 96 h kontrola, (J) 96 hpi, (K) 120 h kontrola, (L) 120 hpi. Triple značení, vyvolávání signálu pomocí BCIP/NBT.

Tyto gely a membrány tedy již bylo možné použít pro porovnání produkce proteinů v různých časových intervalech u kontrolních a infikovaných buněk. Pokud porovnáme např. např. membrány E a F, tzn. vzorek 72 hpi a k tomu kontrolní, můžeme zde pozorovat několik jevů (viz Obr. 14).



Obrázek 14: Porovnání signálu detekovaných proteinů u VKE infikovaných a neinfikovaných buněk, 72 hpi. Vlevo překryv signálů proteinů s přiřazenou červenou barvou pro kontrolu a zelenou barvou pro infekci. V případě překrytí signálu toho samého proteinu o přibližně stejné intenzitě se takový protein jeví jako žlutý. Vpravo (A, B, C, D) výřez ukázkových oblastí membrány pro porovnání výskytu proteinů: barevné výseky – překryv signálu, uprostřed – kontrola, vpravo – infekce.

U Obr. 14 oblasti označené (A) je intenzita na obou membránách přibližně stejná, což znamená, že tento protein je exprimován jak u kontrolních, tak i u infikovaných buněk ve velmi podobném množství. Na překrytém obrázku se tedy tento protein jeví jako žlutý. V oblasti (B) je patrná změna intenzity, kdy u kontrolního vzorku je intenzita signálu vyšší, což naznačuje změny v expresi tohoto/těchto proteinu/ů. V oblasti (C) je posun signálu, který je patrně způsoben rozdílnou fosforylací (změna izoelektrického bodu proteinu). Fosforylace je pozorovatelná i v oblasti (D).

5 DISKUZE

V této práci byly sledovány změny v proteosyntéze u buněk infikovaných VKE. Vzhledem k neurotropnímu charakteru VKE byla zvolena glioblastomová buněčná linie, která se v porovnání s jinými dostupnými buněčnými liniemi jeví jako vhodná pro podobné pokusy, protože u těchto buděk dochází k replikaci viru, ale nedochází k smri buněk. Jsou proto vhodným modelem pro perzistentní infekci (Palus *et al.*, 2014). Tento typ buněk byl též použít při studiu změn v genové expresi při nákaze virem Západního Nilu (Koh a Ng, 2005).

Pro detekci změn v proteosyntéze byla použita metoda BONCAT, která na rozdíl od běžně používaných metod pro značení proteinů (např. značení stabliními izotopy pomocí aminokyselin nebo pomocí izotopem kódovaných afinitních značek) umožňuje odlišit nově syntetizované proteiny od starších proteinů. Proteiny byly naznačeny modifikovanou aminokyselinou (AHA), která je svou strukturou podobná methioninu a je inkorporována do nově syntetizovaných proteinů (Dieterich *et al.*, 2006). U proteinů obsahujících AHA byla následně provedena Click reakce (1,3-dipolární cykloadice), kdy byla na proteiny navázána molekula umožňující detekci.

Pro detekci nově syntetizovaných proteinů byl zvolen systém biotin/streptavidin. Tento systém má poměrně široké spektrum použití, např.imunometody, DNA hybridizace, imunohistochemie, průtoková cytometrie (Diamandis a Christopoulos, 1991). Tento systém byl také použit např. při identifikaci 195 nově syntetizovaných proteinů v buňkách HEK 329 nebo při sledování proteosyntézy v larvách *Danio rerio* (Dieterich *et al.*, 2006; Hinz *et al.*, 2012).

Systém biotin/streptavidin byl v této práci použit také pro purifikaci nově syntetizovaných proteinů s využitím streptavidinu imobilizovaného na agarózových kuličkách, ovšem následná purifikace biotinylovaných proteinů nebyla úspěšná. Testováno bylo i použití desthiobiotinu v Click reakci, který má menší afinitu ke streptavidinu s předpokladem jednodušší eluce z agarózových kuliček. Použití desthiobiotinu nemělo vliv na intenzitu signálu, bohužel ani na eluci (Obr. 6) – velké množství proteinů zůstalo navázaných na kuličky a ani tato metoda neumožňuje kompletní eluci všech purifikovaných proteinů (Rybak *et al.*, 2005). Takto purifikované proteiny (navázané na

agarózových kuličkách) sice lze použít pro MS analýzu, ovšem při dodržení standardního protokolu (přidání proteázy/trypsinu) bude ve vzorku množství peptidů původem ze streptavidinu/avidinu imobilizovaného na agarózových kuličkách.

Ověřena byla také eluce biotinylovaných proteinů z agarózových kuliček několika způsoby, včetně publikovaných (např. Holmberg *et al.*, 2005; Schiapparelli *et al.*, 2014). Bohužel, eluce ani v jednom případě nebyla kvantitativní (ani kvalitativní) a zároveň kompatibilní s následnou přímou analýzou hmotnostní spektrometrí bez další úpravy vzorku.

Obdobné výsledky byly získány i v jiných pracích, např. v případě eluce pomocí vody při teplotě 70 °C, která je dle některých zdrojů vysoce účinná, ve skutečnosti nedochází k eluci všech proteinů (Elia, 2008). Jiným příkladem je práce Fukuyami a kol. (2012), kdy bylo ukázáno, že nejvíce proteinů bylo identifikováno tryptickým štěpením purifikovaných proteinů přímo na kuličkách a ne elucí – takový vzorek ale není možné dále analyzovat pomocí 1D a 2D elektroforézy. Alternativou pro purifikaci značených proteinů by bylo použití biotinu konjugovaného s alkynem štěpitelnou vazbou (např. diazobiotin-alkyn štěpitelný dithioničitanem sodným, disulfid štěpitelný redukčním činidlem apod.) (Szychowski *et al.*, 2010). Vzhledem k vyšší ceně takových konjugátů, k obecně vysokému nespecifickému záchytu proteinů (strept)avidinem (Schiapparelli *et al.*, 2014), ale také vzhledem k dalším výhodám 2D PAGE bylo přistoupeno k ověření využití 2D separace proteinů a porovnání 2D elektroforetických profilů značených proteinů. 2D separace umožňuje účinnější separaci jednotlivých isoforem proteinů i odlišení různých proteinů s podobnou molekulovou hmotností.

2D PAGE byla nejprve provedena s proteiny s navázaným biotinem (pomocí Click reakce), ovšem i přes veškeré snahy o optimalizaci protokolu bylo jak na gelech, tak na membránách přítomno výrazné „streakování“. Změněný elektroforetický profil vzorků po Click reakci je pozorovatelný i na 1D SDS-PAGE a tato změna je nezávislá na tom, jestli jsou vzorky po Click reakci sráženy, ultrafiltrovány, popř. dialyzovány (Ondruš, 2016). Důvodem pro problémy se separací proteinů ve 2D je tedy pravděpodobně také samotná Click reakce. Proto byly v dalších pokusech pro 2D PAGE použity přímo buněčné lyzáty bez Click reakce a ta byla prováděna až po blottingu na proteinech imobilizovaných na

membráně. Obdobný postup byl použit při přímé detekci AHA modifikovaných proteinů pomocí Click reaktivních pro-fluorophorů poté, co „klasická“ metoda identifikace proteinu z gelu nebyla možná, zejména pro proteiny < 10 kDa (Ohata *et al.*, 2015).

Použitím tohoto pozměněného porotokolu bylo dosaženo lepší detekce jednotlivých nově syntetizovaných proteinů. Na rozdíl od 2D PAGE separace neznačených proteinů a tedy následné detekce celého spektra proteinů, u Click reakce jsou na membráně označeny pouze ty proteiny, které jsou syntetizovány v daném 2h intervalu. Pozorované tak byly změny v expresi proteinů i v posttranslační modifikaci proteinů (Obr. 14). Tuto metodu je tedy možné využít pro studium časové změny exprese proteinů u infikovaných buněk.

Různě exprimované proteiny mezi kontrolními vzorky a vzorky po infekci byly předány do laboratoře proteomiky k identifikaci, bohužel identifikace nebyla úspěšná. Pro zvýšení pravděpodobnosti identifikace bude v budoucnosti provedena 2D ELFO ve velkém formátu (20 cm).

6 ZÁVĚR

V této práci byla sledována proteosyntéza u buněk infikovaných VKE vrůzných intervalech po infekci. Bylo vyzkoušeno více přístupů, bohužel u proteinů značených biotinem pomocí Click reakce purifikace i 2D PAGE nebyla optimální. Změnou protokolu a provedením Click reakce až po blottingu (Click on membrane) bylo dosaženo lepších výsledků a lze vysledovat rozdíly v expresi proteinů v jednotlivých intervalech po infekci.

Optimalizace tohoto pustupu je možnou cestou pro určení proteinů, které jsou exprimovány u infikovaných buněk v konkrétním časovém intervalu po infekci VKE, ale také u jiných případů, kdy je sledována změna exprese proteinů z časového hlediska.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alkhalil, A., Hammamieh, R., Hardick, J., Ichou, M. A., Jett, M. a Ibrahim, S. (2010). Gene expression profiling of monkeypox virus-infected cells reveals novel interfaces for host-virus interactions. *Virology Journal* **7**, 19.

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

Amberg, S. M. a Rice, C. M. (1999). Mutagenesis of the NS2B-NS3-mediated cleavage site in the flavivirus capsid protein demonstrates a requirement for coordinated processing. *Journal of virology* **73**, 8083–94.

Amicizia, D., Domnich, A., Panatto, D., Lai, P. L., Cristina, M. L., Avio, U. a Gasparini, R. (2013). Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* **9**, 1163–1171.

Avšič-Županc, T., Poljak, M., Matičič, M., Radšel-Medveščck, A., LeDuc, J. W., Stiasny, K., Kunz, C. a Heinz, F. X. (1995). Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. *Clinical and Diagnostic Virology* **4**, 51–59.

Bartelma, G. a Padmanabhan, R. (2002). Expression, purification, and characterization of the RNA 5′-triphosphatase activity of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3. *Virology* **299**, 122–132.

Baskin, J. M. a 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. a Tirrell, D. A. (2006). Fluorescence visualization of newly synthesized proteins in mammalian cells. *Angewandte Chemie-International Edition* **45**, 7364–7367.

Benda, R. (1958). The common tick *I. ricinus L.* as a reservoir and vector of tick-borne encephalitis. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology and immunology* **2**, 314–330.

Best, S. M., Morris, K. L., Shannon, J. G., Robertson, S. J., Mitzel, D. N., Park, G. S., Boer, E., Wolfinbarger, J. B. a Bloom, M. E. (2005). Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. **79**, 12828–12839.

Bogovic, P. a Strle, F. (2015). Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World journal of clinical cases* **3**, 430–41.

Calzolari, M., Zé-Zé, L., Vázquez, A., Sánchez Seco, M. P., Amaro, F. a Dottori, M. (2016). Insect-specific flaviviruses, a worldwide widespread group of viruses only detected in insects. *Infection, Genetics and Evolution* **40**, 381–388.

Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. a Righetti, P. G. (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327–1333.

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

Debets, M. F., van der Doelen, C. W. J., Rutjes, F. a van Delft, F. L. (2010). Azide: A unique dipole for metal-free bioorthogonal ligations. *Chembiochem* **11**, 1168–1184.

Diamandis, E. P. a Christopoulos, T. K. (1991). The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical Chemistry* **37**, 625–636.

Dieterich, D. C., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A. 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. a Oksi, J. (1999). Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases* **28**, 882–890.

Ecker, M., Allison, S. L., Meixner, T. a 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.

Elia, G. (2008). Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins. *Proteomics* **8**, 4012–4024.

Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y. M. a Lai, C. J. (1991). Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of virology* **65**, 2467–75.

Ferlenghi, I., Clarke, M., Ruttan, T., Allison, S. L., Schalich, J., Heinz, F. X., Harrison, S. C., Rey, F. A. a Fuller, S. D. (2001). Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus. *Molecular Cell* **7**, 593–602.

Fukuyama, H., Ndiaye, S., Hoffmann, J., Rossier, J., Liuu, S., Vinh, J. a Verdier, Y. (2012). On-bead tryptic proteolysis: An attractive procedure for LC-MS/MS analysis of the Drosophila caspase 8 protein complex during immune response against bacteria. *Journal of Proteomics* **75**, 4610–4619.

Gray, J. S. (1991). The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Review of Medical and Veterinary Entomology* **79**, 323–333.

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. 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. a Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* **17**, 994–999.

Haglund, M. a Günther, G. (2003). Tick-borne encephalitis - pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* **21**, S11–S18.

Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M. a Ron, D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell* **11**, 619–633.

Heinz, F. X. (1986). Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Advances in virus research* **31**, 103–168.

Heinz, F. X. a Allison, S. L. (2000). Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Advances in virus research* **55**, 231–69.

Heinz, F. X. a Allison, S. L. (2003). Flavivirus structure and membrane fusion. *Advances in Virus Research* **59**, 63–97. doi:10.1016/S0065-3527(03)59003-0.

Heinz, F. X., Stiasny, K., Püschner-Auer, G., Holzmann, H., Allison, S. L., Mandl, C. W. a Kunz, C. (1994). Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* **198**, 109–17.

Hinz, F. I., Dieterich, D. C., Tirrell, D. A. a Schuman, E. M. (2012). Noncanonical amino acid labeling in vivo to visualize andaffinity purify newly synthesized proteins in larval zebrafish. *Acs Chemical Neuroscience* **3**, 40–49.

Holmberg, A., Blomstergren, A., Nord, O., Lukacs, M., Lundeberg, J. a Uhlén, M. (2005). The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* **26**, 501–510.

Chang, R.-Y., Hsu, T.-W., Chen, Y.-L., Liu, S.-F., Tsai, Y.-J., Lin, Y.-T., Chen, Y.-S. a Fan, Y.-H. (2013). Japanese encephalitis virus non-coding RNA inhibits activation of interferon by blocking nuclear translocation of interferon regulatory factor 3. *Veterinary microbiology* **166**, 11–21.

Kiermayr, S., Kofler, R. M., Mandl, C. W., Messner, P. a Heinz, F. X. (2004). Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and *in vitro* assembly of capsid-like particles. *Journal of virology* **78**, 8078–84.

Kiick, K. L., Saxon, E., Tirrell, D. A. 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.

Kofler, R. M., Heinz, F. X. a Mandl, C. W. (2002). Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. *Journal of Virology* **76**, 3534–3543.

Koh, W. L. a 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. a Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie-International Edition* **40**, 2004–+.

Kuzmenko, Y. V., Starodubova, E. S., Karganova, G. G., Timofeev, A. V. a Karpov, V. L. (2016). Nonstructural protein 1 of tick-borne encephalitis virus activates the expression of immunoproteasome subunits. *Molecular Biology* **50**,

Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T., Danielova, V. a Nuttall, P. a (1993). Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *Journal of medical entomology* **30**, 295–299.

Labuda, M., Austyn, J. M., Zuffova, E., Kozuch, O., Fuchsberger, N., Lysy, J. a Nuttall, P. A. (1996). Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* **219**, 357–66.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacterophage-T4. *Nature* **227**, 680-.

Lahann, J. (2009). Click Chemistry: A Universal Ligation Strategy for Biotechnology and Materials Science. In *Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science*, pp. 1–7. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

Li, H., Clum, S., You, S., Ebner, K. E. a Padmanabhan, R. (1999). The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *Journal of virology* **73**, 3108–16.

Lilley, K. S. a Friedman, D. B. (2004). All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Review of Proteomics* **1**, 401–409.

Lindenbach, B. D., Thiel, H.-J. a Rice, C. (2007). Flaviviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology* 1101–1151.

Lubick, K. J., Robertson, S. J., McNally, K. L., Freedman, B. A., Rasmussen, A. L., Taylor, R. T., Tsuruda, S., Sakai, M., Ishizuka, M., Boer, E. F., Foster, E. C., Chiramel, A. I., Addison, C. B., Green, R., Kastner, D. L., Katze, M. G., Holland, S. M., Forlino, A., Freeman, A. F., Boehm, M., Yoshii, K., Best, S. M. and Walts, A. D. (2015). Flavivirus antagonism of type i interferon signaling reveals prolidase as a regulator of IFNAR1 surface expression. *Cell Host and Microbe* **18**, 61–74.

Mandl, C. W. (2005). Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research* **111**, 161–174.

Moon, S. L., Anderson, J. R., Kumagai, Y., Wilusz, C. J., Akira, S., Khromykh, A. A. a Wilusz, J. (2012). A noncoding RNA produced by arthropod-borne flaviviruses inhibits the cellular exoribonuclease XRN1 and alters host mRNA stability. *RNA* **18**, 2029–2040.

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J. a Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 13–22.

Nuttall, P. A. a Labuda, M. (2008). Saliva-assisted transmission of tick-borne pathogens. In *Ticks* (ed. Bowman, A. S.) a Nuttall, P. A.), pp. 205–219. Cambridge University Press, Cambridge.

Ohata, J., Vohidov, F. a Ball, Z. T. (2015). Convenient analysis of protein modification by chemical blotting with fluorogenic „click“ reagents. *Mol. BioSyst.* **11**, 2846–2849.

Ondruš, J. (2016). Význam sialovaných glykoproteinů pro klíště Ixodes ricinus. Diplomová práce (Mgr.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.

Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A. 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.

Overby, A. K., Popov, V. L., Niedrig, M. a Weber, F. (2010). Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and hides its double-stranded RNA in intracellular membrane vesicles. *Journal of Virology* **84**, 8470–8483.

Palus, M., Bílý, T., Elsterová, J., Langhansová, H., Salát, J., Vancová, M. a Růžek, D. (2014). Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus. *Journal of General Virology* **95**, 2411–2426.

Perelygin, A. A., Scherbik, S. V, Zhulin, I. B., Stockman, B. M., Li, Y. a Brinton, M. A. (2002). Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 9322–7.

Pijlman, G. P., Funk, A., Kondratieva, N., Leung, J., Torres, S., van der Aa, L., Liu, W. J., Palmenberg, A. C., Shi, P. Y., Hall, R. A. a Khromykh, A. A. (2008). A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host and Microbe* **4**, 579–591.

Pogodina, V. V. (1958). [Resistance of tick-borne encephalitis virus to gastric juice]. *Voprosy virusologii* **3**, 271–5.

Prescher, J. A. a Bertozzi, C. R. (2005). Chemistry in living systems. *Nature Chemical Biology* **1**, 13–21.

Presolski, S. L., Hong, V. P. a Finn, M. G. (2011). Copper-catalyzed azide-alkyne Click chemistr. *Current Protocols in Chemical Biology* **3**, 153–162.

Ringrose, J. H., Jeeninga, R. E., Berkhout, B. a Speijer, D. (2008). Proteomic studies reveal coordinated changes in T-cell expression patterns upon infection with human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **82**, 4320–4330.

Růžek, D., Vancová, M., Tesařová, M., Ahantarig, A., Kopecký, J. a Grubhoffer, L. (2009). Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *The Journal of general virology* **90**, 1649–1658.

Rybak, J.-N., Ettorre, A., Kaissling, B., Giavazzi, R., Neri, D. a Elia, G. (2005). In vivo protein biotinylation for identification of organ-specific antigens accessible from the vasculature. *Nature Methods* 291–298.

Schalich, J., Allison, S. L., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C. a Heinz, F. X. (1996). Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *Journal of virology* **70**, 4549–57.

Schiapparelli, L. M., McClatchy, D. B., Liu, H. H., Sharma, P., Yates, J. R. a Cline, H. T. (2014). Direct detection of biotinylated proteins by mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **13**, 3966–3978.

Schneider, R. J. a Shenk, T. (1987). Impact of virus infection on host-cell protein synthesis. *Annual Review of Biochemistry* **56**, 317–332.

Sletten, E. M. a Bertozzi, C. R. (2011). Bioorthogonal reactions. *Acc. Chem. Res.* **44**, 666–676. doi:10.1021/ar200148z.

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

Stiasny, K., Allison, S. L., Mandl, C. W. a Heinz, F. X. (2001). Role of metastability and acidic pH in membrane fusion by tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology* **75**, 7392–7398. doi:10.1128/JVI.75.16.7392-7398.2001.

Suss, J. (2011). Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-An overview. *Ticks and Tick-borne Diseases* **2**, 2–15.

Süss, J. (2003). Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* **21**, S19–S35.

Szychowski, J., Mahdavi, A., Hodas, J. J. L., Bagert, J. D., Ngo, J. T., Landgraf, P., Dieterich, D. C., Schuman, E. M. a Tirrell, D. A. (2010). Cleavable biotin probes for labeling of biomolecules via azide-alkyne cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 18351–18360.

Taylor, R. T., Lubick, K. J., Robertson, S. J., Broughton, J. P., Bloom, M. E., Bresnahan, W. A. a Best, S. M. (2011). TRIM79α, an interferon-stimulated gene product, restricts tick-borne encephalitis virus replication by degrading the viral RNA polymerase. *Cell Host and Microbe* **10**, 185–196.

Towbin, H., Staehelin, T. a 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.

Upadhyay, A. S., Vonderstein, K., Pichlmair, A., Stehling, O., Bennett, K. L., Dobler, G., Guo, J. T., Superti-Furga, G., Lill, R., Överby, A. K. a Weber, F. (2014). Viperin is an iron-sulfur protein that inhibits genome synthesis of tick-borne encephalitis virus via radical SAM domain activity. *Cellular Microbiology* **16**, 834–848.

Wengler, G., Wengler, G. a Gross, H. J. (1978). Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology* **89**, 423–437.

Westaway, E. G., Mackenzie, J. M., Kenney, M. T., Jones, M. K. a Khromykh, A. A. (1997). Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *Journal of virology* **71**, 6650–61.

Elektronické informační zdroje:

EPIDAT – databáze Státního zdravotnického ústavu v Praze

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