

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Kateřina Daňhelová

Příprava expresních vektorů pro expresi helikasy z virů Zika a Dengue
Preparation of expression vectors for the production of ZIKA and Dengue
NS3 helicase

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultant: RNDr. Taťána Majerová, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 21.6. 2021

.....

Kateřina Daňhelová

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za profesionální vedení, vlídný přístup a milá slova, za důvěru v mou osobu a za možnost být součástí jeho skupiny na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce RNDr. Taťáně Majerové, Ph.D. za cenné rady a za to, že mě provedla celou laboratorní praxí na ÚOCHB s neustálou trpělivostí a já díky tomu získala nové životní zkušenosti, a Mgr. Pavlu Novotnému, že mi byl vždy nápomocen a já se na něj v každé chvíli mohla obrátit o radu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a svým přátelům, že mi vždy věřili a podporovali mě ve studiu.

Abstrakt

Viry Zika a Dengue se vlivem globalizace rozšiřují do všech kontinentů, které leží aspoň částí v tropickém a subtropickém pásu. S jejich rozšířením souvisí i vzestup vážných onemocnění způsobených těmito viry. Řešením tohoto problému mohou být nová léčiva, jež by byla účinná proti těmto infekcím. Jejich cílem zásahu mohou být různé virové proteiny, mezi nimi i virová helikasa, kterou se zabývá tato bakalářská práce. Tématem této práce bylo připravit expresní konstrukty pro produkci rekombinantních helikas virů Zika a Dengue prostřednictvím vhodného bakteriálního kmene *Escherichia coli*. Byly připraveny varianty odvozené od plasmidu pET-16b s vloženou helikasou virů Zika a Dengue. Následnou purifikací byla získána helikasa viru Zika, která bude dále využita pro výzkumné účely.

Klíčová slova: *Flavivirus*, virus Zika, virus Dengue, helikasa, exprese, purifikace, enzymová aktivita

Abstract

Zika and Dengue viruses have spread, due to globalisation, to all continents which lie at least in part in the subtropic and tropic climatic zones. This spread of these viruses is a reason of an increasing number of severe diseases caused by them. New drugs, which would be effective against these infections, could be an answer to this challenge. Various viral proteins, among them also viral helicase, which is the topic of this bachelor thesis, can be a suitable drug target. The task was to prepare expression constructs for production of recombinant helicases of Zika and Dengue viruses *via* the suitable bacterial strain *Escherichia coli*. Several constructs derived from plasmid pET-16b were prepared with inserted helicase of Zika and Dengue viruses. One of them was used for the preparation of recombinant purified helicase of Zika virus, that will be used for further research.

[IN CZECH]

Keywords: *Flavivirus*, Zika virus, Dengue virus, helicase, expression, purification, enzyme activity

[IN CZECH]

Obsah

Seznam zkratek	8
1 Úvod.....	11
1.1 Čeleď <i>Flaviviridae</i>	11
1.2 Rod <i>Flavivirus</i>	12
1.3 Virus Zika.....	15
1.4 Virus Dengue	17
1.5 Helikasy.....	20
1.5.1 Helikasová doména nestrukturního proteinu NS3.....	21
2 Cíle práce.....	24
3 Materiál a metody.....	25
3.1 Použité chemikálie	25
3.2 Použité přístroje	27
3.3 Použité metody	28
3.3.1 Metoda polymerasové řetězové reakce	28
3.3.2 Restrikční štěpení	28
3.3.3 Agarosová elektroforéza.....	28
3.3.4 Purifikace DNA z gelu	29
3.3.5 Spojení fragmentů DNA metodou Gibson Assembly.....	29
3.3.6 Transformace kompetentních bakterií <i>E. coli</i>	29
3.3.7 Minipreparace plasmidové DNA	30
3.3.8 Příprava LB média a jeho zaočkování	30
3.3.9 Homogenizace	31
3.3.10 Purifikace na nosiči Ni-NTA.....	31
3.3.11 Měření koncentrace proteinu na přístroji NanoDrop.....	32
3.3.12 Vysokorychlostní kapalinová chromatografie	32
3.3.13 Polyakrylamidová gelová elektroforéza.....	33

3.3.14	Vizualizace gelu	33
3.3.14.1	Barvení stříbrem.....	33
3.3.14.2	Barvení Coomassie Brilliant Blue	34
3.3.15	Měření NTPasové aktivity.....	34
4	Výsledky	36
4.1	Příprava expresních plasmidů pro získání virových helikas.....	36
4.2	Exprese	38
4.3	Purifikace Zika helikasy.....	40
4.4	Enzymová aktivita	42
5	Diskuze	45
6	Závěr	48
Příloha 1	54
Příloha 2	55
Příloha 3	58

Seznam zkratek

AA	akrylamid
ADE	protilátkově závislé zesílení (z angl. Antibody Dependent Enhancement)
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
ATP	adenosin-5'-trifosfát (z angl. adenosine-5'-triphosphate)
ATPasa	adenosin-5'-trifosfatasa (z angl. adenosine-5'-triphosphatase)
BDV	virus nemoci Borna (z angl. Borna Disease Virus)
bp	párů bází (z angl. base pair)
BVDV	virus boviní virové diarey (z angl. Bovine Viral Diarrhea Virus)
C	kapsida (z angl. Capsid)
CBB	barvivo Coomassie Brilliant Blue
CNS	centrální nervová soustava
CSFV	virus klasického moru prasat (z angl. Classical Swine Fever Virus)
DENV	virus Dengue
DHF	hemorrhagická horečka dengue (z angl. Dengue Hemorrhagic Fever)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic acid)
dsRNA	dvouvláknová RNA (z angl. double-strand RNA)
DSS	šokový syndrom dengue (z angl. Dengue Shock Syndrome)
DTT	dithiotreitol
E	obalový protein (z angl. Envelope)
<i>E. coli</i>	bakterie <i>Escherichia coli</i>
ER	endoplazmatické retikulum

FPLC	vysokorychlostní kapalinová chromatografie (z angl. Fast Protein Liquid Chromatography)
GBS	Guillain-Barré syndrom
GBV	virus George Barkera
HCV	virus hepatitidy C
IPTG	isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
JEV	virus japonské encefalitidy
LB	Luria-Bertani
M	membránový protein
mRNA	mediátorová RNA
NIAID	Národní institut alergií a infekčních chorob (z angl. National Institute of Allergy and Infectious Diseases)
Ni-NTA	nitrilotrioctová kyselina chelatující nikelnatý kation (z angl. Nickel-Nitrilotriacetic acid)
NS	nestrukturní
NTP	nukleosid-5'-trifosfát (z angl. nucleoside-5'-triphosphate)
NTPasa	nukleosid-5'-trifosfatasa (z angl. nucleoside-5'-triphosphatase)
OD	optická denzita
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. Polymerase chain reaction)
pr	prekurzorový protein
prM	prekurzor membránového proteinu (z angl. pre-Membrane)
RdRp	RNA-dependentní RNA-polymerasa
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. Ribonucleic acid)
SDS	dodecylsírán sodný (z angl. Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsíranu sodného

SF	nadrodina (z angl. Superfamily)
TAE	Tris-acetát-EDTA
TBEV	virus klíšťové encefalitidy (z angl. Tick-borne Encephalitis Virus)
TEVpr	proteasa viru tabákové mozaiky (z angl. Tobacco Etch Virus protease)
TGN	trans-Golgi systém (z angl. trans-Golgi network)
TEMED	tetramethylethylendiamin
tRNA	transferová RNA
UV	ultrafialové (z angl. Ultraviolet)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organisation)
WNV	virus západonilské horečky (z angl. West-Nile Virus)
YFV	virus žluté zimnice (z angl. Yellow Fever Virus)
ZIKV	virus Zika

1 Úvod

Se zvyšující se globalizací přichází i rozšíření chorob do populací, jež proti nim postrádají přirozenou obranyschopnost [1]. Významnou skupinou těchto virů, sužujících lidskou populaci, jsou arboviry, mezi které patří i viry, jejichž proteiny jsou předmětem této práce, Zika a Dengue.[2].

1.1 Čeleď *Flaviviridae*

Virus Zika (ZIKV) a virus Dengue (DENV), patřící do čeledi *Flaviviridae*, jsou přenášeny především komáry rodu *Aedes* (Obr. č. 1) [3]. *Flaviviridae* je čeleď malých obalených RNA virů s 9 000 – 13 000 bázemi [4]. Do této čeledi, která obsahuje více než 100 druhů, patří rody *Pestivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* a *Flavivirus* [5,6]. V první řadě je nejlepší možností jak nejvíce snížit počty nakažených těmito viry prevence, proti těmto virovým infekcím totiž neexistují specifická antivirotika [3].



Obrázek č. 1: Zástupce druhu komárů rodu *Aedes* nasávající lidskou krev, přičemž probíhá přenos virů z komára do lidské krve, převzato z [7].

Pestiviry napadají přežvýkavce, z chovatelského i ekonomického hlediska svou infekcí způsobují vážné problémy v chovu hospodářských zvířat [8,9]. Patří mezi nejmenší obalené RNA viry zvířat s nešroubovicovou ikosahedrální nukleokapsidou [10]. Zástupci tohoto rodu jsou virus bovinní virové diarey (BVDV-1; BVDV-2, z angl. Bovine

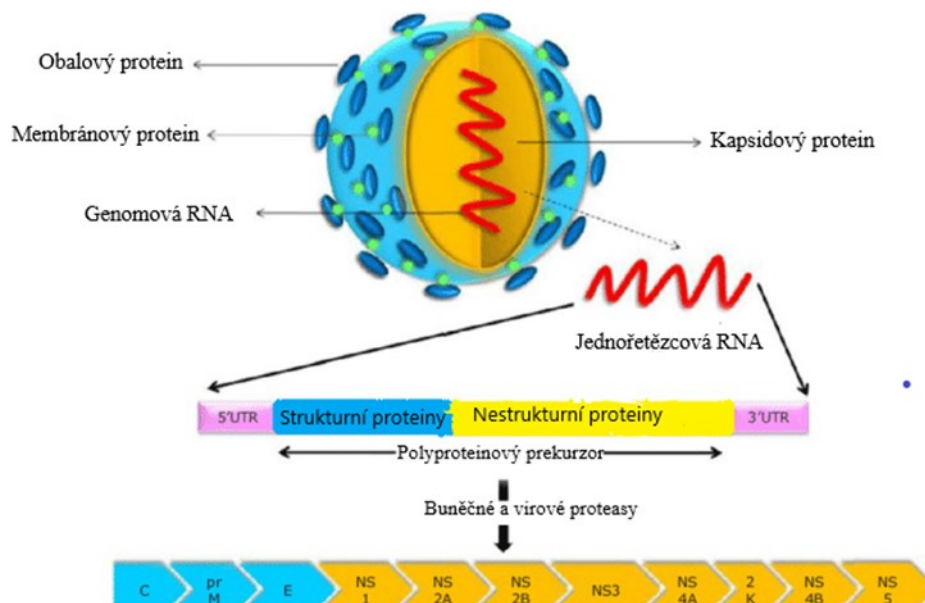
Viral Diarrhea Virus), virus klasického moru prasat (CSFV, z angl. Classical Swine Fever Virus) a virus nemoci Borna (BDV, z angl. Borna Disease Virus) [11].

Rod *Hepacivirus* obsahuje geneticky rozmanité viry, které napadají různé savčí druhy – netopýry, primáty, hlodavce, psy, krávy, koně a další [12]. I když jsou tyto viry velmi rozdílné, jsou všechny odvozeny od viru napadající člověka, viru hepatitidy C (HCV), a způsobují akutní a chronické onemocnění jater [13]. Přibližně 180 milionů lidí po celém světě je nakažených HCV, u 80 % infikovaných se projeví chronický zánět jater [14]. Vakcína proti HCV, která by ho vymýtila, stále neexistuje [15].

Do rodu *Pegivirus* patří druh *Pegivirus A* s viry George Barkera (GBV-A a GBV-C), který byl izolovaný z primátů, a druh *Pegivirus B*, který je zastoupen viry nalezenými v netopýrech [16]. GBV-C patří mezi lidské viry přenosné krví, avšak infekce tímto virem se nepovažuje za patogenní [17]. GBV-C může v těle hostitele roky přetrvávat, aniž by člověk měl klinické příznaky [18]. Tento virus je nejbližší geneticky příbuzný s HCV [19].

1.2 Rod *Flavivirus*

Rod *Flavivirus* obsahuje více než 70 virů přenášených členovci, zvláště klíšťaty nebo komáry, jako je tomu u ZIKV a DENV [20,21]. Flaviviry jsou obalené viry s jednořetězcovým pozitivně orientovaným RNA genomem a sdílí podobné genomové uspořádání s jedinečnou přeloženou polyproteinovou sekvencí rozštěpenou do deseti hlavních proteinů, tří strukturních – kapsida (C, z angl. Capsid), prekurzor membránového proteinu (prM, z angl. pre-Membrane) a obalový protein (E, z angl. Envelope) – a sedmi nestruturních (NS) – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Obr. č. 2, str. 13). Povrchové antigeny jsou v rámci stejných druhů flavivirů poměrně zachované s výjimkou DENV, u kterého jsou pozorovány 4 odlišné sérotypy [22]. Dalšími lidskými patogeny tohoto rodu virů jsou virus žluté zimnice (YFV, z angl. Yellow Fever Virus), virus západonilské horečky (WNV, z angl. West-Nile Virus), virus japonské encefalitidy (JEV) a virus klíšťové encefalitidy (TBEV, z angl. Tick-borne Encephalitis Virus) [23].



Obrázek č. 2: Schéma genomu jednořetězcové pozitivně orientované RNA rodu *Flavivirus*, převzato a upraveno z [24]

RNA genom těchto virů obsahuje 11 000 nukleotidů pro ukládání a kódování informací, které jsou vyžadovány pro úspěšné dokončení virového cyklu. Kromě protein kódující informace to dokáže díky nezbytným informacím v sekundárních strukturách genomové RNA. Tím RNA genom plní funkci jak mRNA, která ukládá protein kódující informace, tak funkci zajišťující správnou regulaci virového cyklu. Toto složité chování mají pod svou patronací RNA-RNA interakce s hostitelskými ribonukleovými kyselinami, které ovlivňují jejich funkci a následky mohou být životu nebezpečné [25].

Mechanismus vstupu a následně rozšíření v hostitelských buňkách mají všechny viry rodu *Flavivirus* stejný. Vstup viru se nejdříve uskuteční pomocí endocytosy spřažené s receptorem a následně přesunem do endosomů. Nízké pH v lumen endosomu způsobí změny v konformacích glykoproteinu E na povrchu viru, což má za následek fúzi tohoto virového proteinu s endosomálními membránami. Vstupní proces je ukončen rozpadem virové kapsidy a vylitím RNA genomu do cytoplasmy. Genom, vhodný jako templát pro replikaci a translaci, je na endoplazmatickém retikulu (ER) přeložen do prekurzorového proteinu (pr), jenž je následně rozštěpen virovou a hostitelskou proteasou, čímž se vytvoří již výše zmíněné strukturální a nestrukturní proteiny. Po translaci původního genomu zkopíruje RNA-dependentní RNA polymerasa (RdRp) proteinu NS5 komplementární negativně orientovaný řetězec RNA, aby následně vytvořila nově syntetizovaný pozitivně orientovaný řetězec RNA [26]. Aby nedozrálé viriony mohly dokončit svůj cyklus, musí

se prM navázat na E, aby se odkrylo štěpné místo pro furin, čímž se z neinfekční částice stane částice maturovaná. Nízké pH v prostředí trans-Golgi systému (TGN, z angl. trans-Golgi network) způsobí přeuspořádání z konformace hrotu do ploché konformace, která je charakteristická pro dozrálý virus. V TGN se nachází proteasa furin štěpící rozpoznávací místo mezi pr a membránovým proteinem (M). pr doména zůstává ve spojení s E, čímž inhibuje jeho fúzní funkci, než je virus dopraven do extracelulárního prostoru, jehož neutrální pH způsobí disociaci E a pr. Tím se virus stává infekčním [23].

Funkce proteinů E, prM a NS5 byla osvětlena, je však důležité zmínit, že ostatní proteiny jsou též nezbytnou součástí polyproteinového řetězce. Protein C se váže na virovou RNA a dotváří nukleokapsidu [27]. Nestrukturní proteiny se angažují v replikaci a působí proti vrozené imunitní odpovědi hostitele. Pro katalýzu replikace RNA jsou zapotřebí dva důležité nestrukturní proteiny, NS3 a NS5. V N-koncové doméně proteinu NS3 se nachází virová serinová proteasa. Pro svoji aktivitu potřebuje nestrukturní protein 2B (NS2B) jako kofaktor vazby polyproteinového substrátu v aktivním místě. C-koncová část NS3 se skládá z RNA trifosfatasy, RNA helikasy a adenosin-5'-trifosfatasy (ATPasa, z angl. adenosine-5'-triphosphatase), tyto enzymy hrají roli ve vytvoření čepičky a v syntéze virové RNA [28]. RdRp proteinu NS5 nacházející se na jeho C-konci byla zmíněna, ale nesmí se opomenout ani methyltransferasa na jeho N-konci, jejímž úkolem je katalyzovat tvorbu čepičky na nově vzniklém virovém řetězci RNA [27]. Dimerizovaný NS1 protein, interagující s NS4A v membráně, je exportován na buněčný povrch, kde disociuje z plasmatické membrány savčích buněk a jako hexamer se hromadí v extracelulárním prostoru [29]. NS2A se specificky váže na 3'-konec virové RNA a hraje důležitou roli ve změně antivirové interferonové odpovědi hostitele, vedle toho je důležitý při shromažďování a sekreci virových částic [30]. U proteinů NS4A a NS4B se prokázalo, že jsou nezbytné pro autofagii, která je důležitá pro degradaci virových částic v lysozomech [31].

Flaviviry mají různé oblasti působnosti z hlediska geografie, což se dá přičítat tomu, že jsou závislé na specifických vektorech a odlišných přirozených hostitelích. Např. YFV přenášen druhu *Aedes* a *Haemagogus* napadá své hostitele v tropických a subtropických pásech Afriky a Jižní Ameriky, DENV, také přenášen druhu *Aedes*, se překrývá s oblastmi YFV, ale rozšířil se i do oblastí Střední a jižních částí Severní Ameriky a na jihovýchod Asie [20,32]. ZIKV, též přenášen komáry rodu *Aedes*, se rozšířil z afrických lesů až na ostrovy v Tichém oceáně, do Asie a Ameriky [33].

1.3 Virus Zika

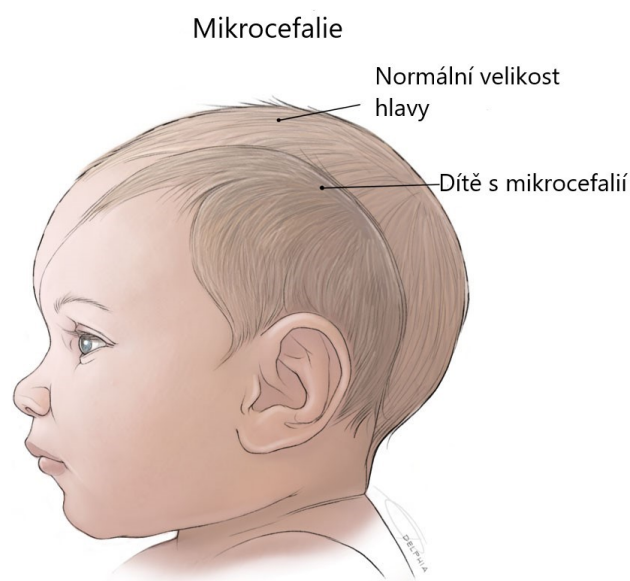
ZIKV byl poprvé izolován v Africe ze subhumánního primáta v roce 1947 a v roce 1948 z komára. Infekce člověka ZIKV bylo po půl století považováno za výjimečné. Některé studie prokázaly ojedinělé případy infekcí ZIKV v částech Afriky a Asie, což trvalo do doby, než se virus objevil v Tichomoří a v obou částech Ameriky. Největší nárůst nakažených byl v rozmezí let 2015 až 2016 v Brazílii. Ve stejném časovém rozmezí byla nejvíce postiženou evropskou zemí Francie, kde se jen za rok 2016 nakazilo 1 132 lidí [34–36].

Jak už bylo řečeno, ZIKV se primárně přenáší štípnutím od komára, ale může být přenesen i pohlavním stykem, nákaza během těhotenství vede k poškození plodu [37]. Zatímco komár nasává krev ze svého hostitele, ZIKV vstupuje do organismu přes epidermální, dermální a Langerhansovy buňky obsažené v kůži. Virus cílí hlavně proti lidským dermálním fibroblastům, epidermálním keratinocytům a nedozrálým dendritickým buňkám. Za normálních okolností je imunitní odpověď vůči virům důležitá při odstranění virových částic, která se je snaží zničit procesem autofagie. Avšak ZIKV díky svým vlastnostem dokáže tuto skutečnost obrátit ve svůj prospěch. Již výše zmíněné nestrukturní proteiny NS4A a NS4B zakřivují membránu endoplazmatického retikula a tím se vytvoří plocha, kde se hromadí virové částice připravené k replikaci [38,39]. Vedle této pro virus důležité schopnosti proteiny NS4A a NS4B omezují fosforylaci proteinu Akt a tím inhibují dráhu Akt-mTOR, jež reguluje buněčný cyklus. V závěru tohoto procesu dochází k sekreční autofagii zvyšující počet zralých virů v extracelulárním prostoru [40]. Poté virus napadá místní lymfatické uzliny, buňky v krevním řečišti, orgány a tkáně včetně centrálního nervového systému (CNS), kosterní a srdeční svalovinu, přes placentu napadá i plod, což může vést k vrozeným vadám [39,41]. Příznaky se objevují po inkubační době několika dnů po bodnutí nakaženého komára. Tyto příznaky obvykle přetrvávají 3 až 12 dní. U ZIKV se často objevuje bezpříznakový průběh nákazy [42].

Hlavními příznaky napadení virem Zika jsou vysoká tělesná teplota, vyrážka po celém těle, bolest kloubů a zarudlé oči. Mezi sekundární příznaky onemocnění patří Guillain-Barrého syndrom (GBS) a u novorozeňat může vzniknout mikrocefalie, která je důsledkem infekce v prenatálním období [43].

GBS je neurologická porucha, kdy imunitní systém člověka napadá části jeho vlastního periferního nervového systému. Příznaky této poruchy mohou vést od krátkodobé slabosti po zničující paralysu, kdy člověk není schopen samostatně dýchat [44].

Mikrocefalie (Obr. č. 3) je nedostatečný vývin mozku, který se velikostí velmi podobá mozkům hominidů [45]. Mikrocefalie se dělí na primární mikrocefalii, kdy selhává růst mozku do normální velikosti během těhotenství, a sekundární, kdy v době narození má mozek očekávanou velikost, ale následně se přestane vyvíjet [46].



Obrázek č. 3: Rozdíl mezi normální velikostí hlavy zdravého dítěte a velikostí hlavy dítěte postiženého mikrocefalií, převzato a upraveno z [47]

Protilátky proti ZIKV byly nalezeny v krvi velkých savců – jako jsou orangutani, zebry a sloni – ale i hlodavců. Ukázalo se však, že pouze člověk je hostitelem, který pomáhá k rozšíření viru v populaci. U člověka je viremická doba mezi 3 až 5 dny po propuknutí nemoci. Testování pomocí metody polymerasové řetězové reakce (PCR, z angl. Polymerase Chain Reaction) může být provedeno na vzorcích získaných z krve nebo moči méně než 14 dní od propuknutí nemoci, kdy se detekuje virová RNA [39,42].

Pro potlačení množení ZIKV v organismu dosud neexistuje žádná specifická léčba a ani není registrovaná žádná vakcína. Využívá se symptomatická léčba, kdy se

kombinuje acetaminofen a antihistaminické léky [42]. Co se týče vakcíny, v klinických testech se zkouší několik potenciálních látek. Zatím jsou tyto testy ve fázi I a II klinického testování. Jako nejnadějnější možnost se jeví DNA vakcína, jež kóduje proteiny prM a E, vyvíjena americkým Národním institutem alergií a infekčních chorob (NIAID, z angl. National Institute of Allergy and Infectious Diseases) ve fázi II. Plasmid této vakcíny exprimuje zmíněné proteiny, díky této expresi se vytvoří neinfekční a imunogenní částice podobné viru *in vivo* [35]. Prevence závisí na individuálním přístupu v ochraně proti bodnutí komára, kdy je dobré nosit dlouhé kalhoty a světlbarevné oblečení a používat moskytiéry a repelenty. Další možností je vymýcení populace komárů, pro tu by mohl být vhodný deltamethrin, který se aplikuje jako rozprašovač [42].

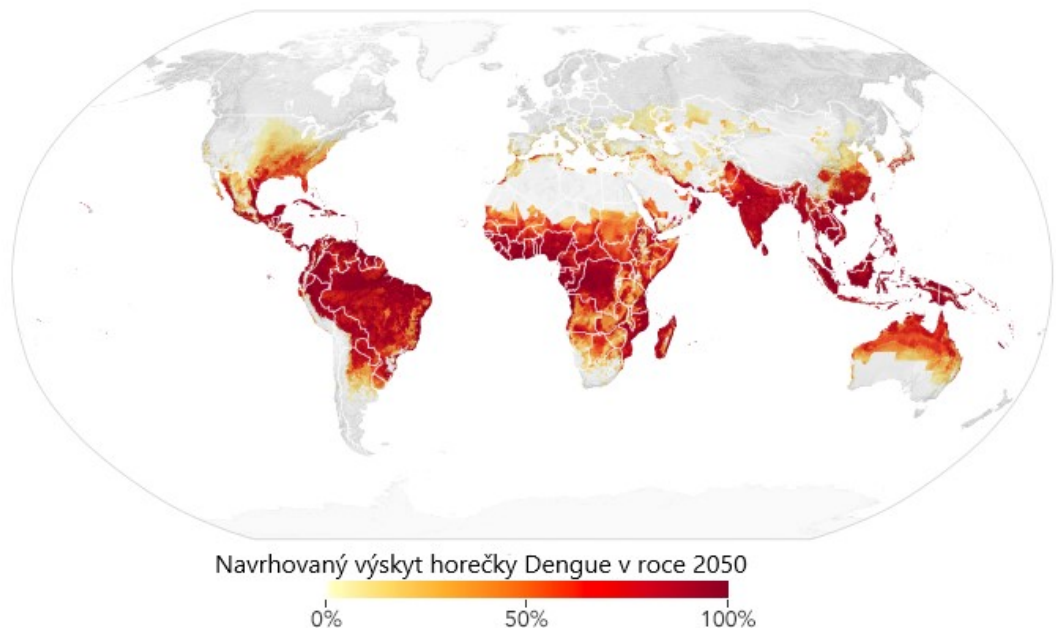
1.4 Virus Dengue

DENV se rozšířil do více jak 100 zemí v jihovýchodní Asii, na americkém kontinentu, v západním Tichomoří, v Africe a ve východních částech Středomoří. V posledních 50 letech se počet infikovaných zvýšil třicetkrát, DENV napadá obyvatele tropického a subtropického pásu, což koresponduje s výskytem vektoru tohoto viru [48,49]. Každý rok se celosvětově nakazí 400 milionů obyvatel a přes 3 miliardy obyvatel žije v oblastech rizika nákazy [50].

DENV je stejně jako ZIKV přenášen komáry rodu *Aedes*, primárně jej přenášejí samičky druhu *Aedes aegypti*, ale největšího rozmachu DENV dosáhl díky druhu *Aedes albopictus* [51]. Ve srovnání s ZIKV, u DENV není známo, kdy se poprvé objevil v lidské populaci, protože se často stává, že jeho příznaky nejsou prokázány jako nákaza DENV. První doložený případ nákazy tímto virem se datuje do období 50. let 20. století s výskytem nejprve v hlavním městě Filipín, v Manile, odkud se rozšířil do thajského Bangkoku [52].

U viru, jehož inkubační doba trvá 3 až 14 dní, lze rozlišit 4 odlišné sérotypy a každý z nich může způsobovat onemocnění, které se může projevovat v různých úrovních – od mírné po vážné příznaky, od horečky, po kožní vyrážku, ospalost, podrážděnost, zvětšení jater, až k hemorhagické horečce Dengue (DHF, z angl. Dengue Hemorrhagic Fever) nebo k následné smrti. Dalším projevem, kritickým především u dětí, je šokový syndrom Dengue (DSS, z angl. Dengue Shock Syndrome). Stále však neexistuje specifická léčba proti nákaze DENV, jediná varianta léčby jsou podpůrné léky [50,53].

Na klasickou horečku Dengue nejčastěji trpí starší děti a dospělí. Vyznačuje se náhlou horečkou a dalšími příznaky, které se nevyskytují u všech nakažených. K těmto příznakům patří i bolest za nadočnicovými oblouky, bolest za okem, bolesti těla, žaludeční nevolnosti a zvracení, bolesti kloubů, slabost a vyrážka. Pacienti mohou trpět anorexií, může se jim změnit pocit chuti, dále mohou mít mírnou bolest v krku [53]. Vlivem změn klimatických podmínek je tato nemoc čím dál rizikovější a podle Světové zdravotnické organizace (WHO, z angl. World Health Organisation) se stává velmi zranitelným i evropský kontinent [54]. Předpovědi výskytu horečky Dengue za 30 let znázorňuje Obr. č. 4.



Obrázek č. 4: Předpokládaný výskyt horečky Dengue v závislosti na životním prostředí v roce 2050. Data, která byla získána díky satelitu NASA jsou založená na vývoji budoucích teplot, množství dešťových srážek a populaci komárů, převzato a upraveno z [54]

Mezi příznaky DHF patří horečka trvající 2 až 7 dní, trombocytopenie a zahuštění krve [55]. DHF se nejčastěji vyskytuje u dětí mladší 15 let, ale někdy se může objevit i u dospělých [53].

DSS se projevuje vysokou tepovou frekvencí a nitkovitým pulsem, nebo hypotenzí a vlhkou a studenou pokožkou. Trpícímu bez včasné léčby hrozí smrt a může se dostat do stavu, kdy jeho tlak či tep je těžko postřehnutelný. Tento stav nemá obvykle dlouhého trvání, smrt nastává po 12 až 36 hodinách, lékaři se tuto skutečnost snaží zvrátit

podáváním chybějících tekutin a pokud pacient přežije, dostává se mu rychlého uzdravení [32,48].

DENV má 4 různé sérotypy s tím rozdílem, že každý má jinou sekvenci polyproteinového řetězce, tyto sekvence se v proteinu E liší ve 30 % a více. Hostitel se stává imunní proti danému sérotypu po celý život, ale když se setká s odlišným sérotypem, jeho imunitní ochrana je pouze přechodná a následná nákaza DENV s různými sérotypy má riziko vážného průběhu onemocnění kvůli jevu protilátkově závislého zesílení (ADE, z angl. Antibody Dependent Enhancement) [56,57]. Význam ADE spočívá v tom, že protilátková odpověď je během druhé infekce heterologními sérotypy řízena prvotně proti sérotypům z předchozí nákazy. Tyto protilátky vůči heterologním sérotypům jsou nejen neúčinné ve srovnání s původním sérotypem z přechodí infekce, ale naopak usnadňují vstup viru do buněk. Při druhé infekci nastávají vážnější formy DHF a DSS [58]. V roce 2019 byla doložena paralelní cirkulace všech čtyř sérotypů v Brazílii, Guatemale a v Mexiku. V Kolumbii, na ostrovech Guadeloupe a Martinik, v Panamě a ve Venezuele se objevily sérotypy DENV-1, DENV-2 a DENV-3, narozdíl od Paraguaye a Peru, kde byly zjištěny DENV-1, DENV-2 a DENV-4 [59].

Proti DENV neexistuje žádná specifická léčba. V zemích s endemickým výskytem DENV je k dispozici komerční vakcína CYD-TDV/Dengvaxia s ochrannou funkcí, která patří mezi vakcíny z oslabeného viru vyrobené technologií rekombinantní DNA, ale může být indikována jenom těm, kteří nemoc už prodělali. Velmi se však diskutuje o tom, zda je ochrana dostatečně účinná proti odlišným sérotypům, protože tato vakcína má nižší účinnost vůči sérotypům 1 a 2. I přesto, že se několik léčiv účastnilo malého počtu pokusů, většina těchto původně vhodných léčiv selhala ve snižování množství virů v krvi zúčastněných dobrovolníků [60–62]. Avšak s ohledem na zvyšující se nárůst nákaz DENV v již zmíněných oblastech světa je potřeba nového léčiva čím dál tím více opodstatněná [63].

1.5 Helikasy

Helikasy jsou neobyčejně víceúčelové enzymy s ohromnou různorodostí, které se vyskytují ve všech organismech. Díky svým vlastnostem jsou schopny vykonávat v buňce širokou škálu funkcí. Patří mezi enzymy využívající nukleové kyseliny jako substrát a jsou schopny tuto kyselinu, ať už DNA nebo RNA, rozvinout (tzn. rozrušit její suprahelikální strukturu). Právě proto jsou významnými enzymy v každém buněčném procesu spojeným s DNA nebo RNA – replikace, oprava, transkripce, translace, syntéza ribozomů, maturace a sestřih RNA [64].

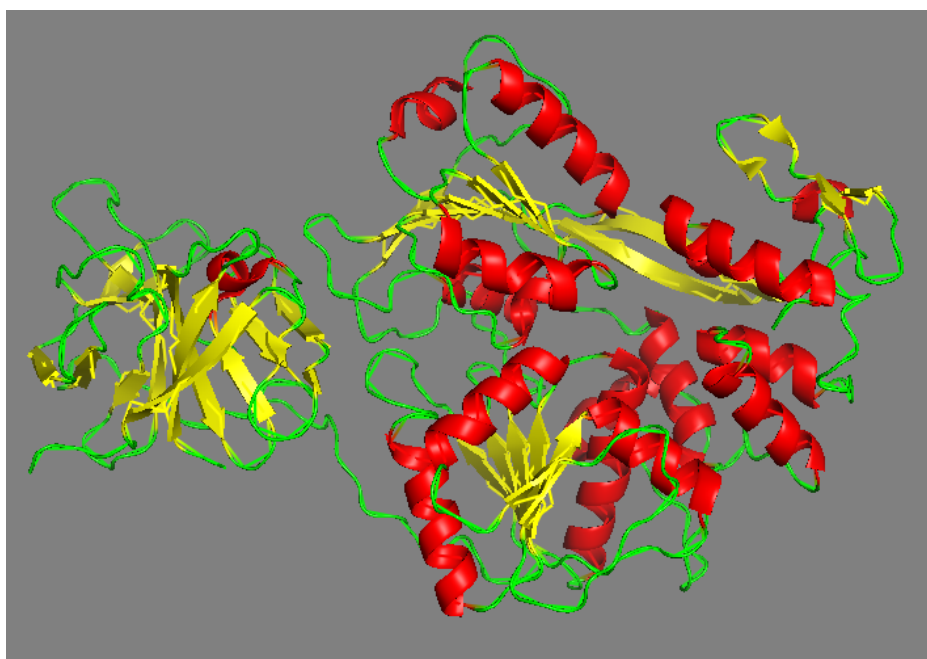
Je obecně známo, že RNA helikasy rozpojují páry bazí ve dvouvláknové RNA (dsRNA, z angl. double – strand RNA), což je součástí mnoha metabolických aktivit RNA. Ale dosud není popsán mechanismus toho, jak se helikasy pohybují a katalyzují oddělení řetězců RNA, i když v nedávné době došlo k pokroku ve studiu těchto proteinových motorů [65]. Co se týče DNA helikas, některé z nich rozplétají DNA vcelku rychle. Například helikasa RecBCD z *E. coli* translokuje 500 – 1 000 nukleotidů za sekundu. I přesto, že DNA helikasy byly popsány před více než dvaceti lety a je známo, jak helikasy vážou vlákna DNA, hydrolyzují nukleotidy a určují směr pohybu podél DNA, nejsou příliš známé molekulární mechanismy, které určují translokaci a rozplétání DNA [66].

Helikasy jsou členěny do rodin a superrodin (SF, z angl. Superfamily). Mezi těmito rodinami jsou jisté podobnosti v jejich 3D struktuře. Blízce příbuznými helikasovými superrodinami jsou SF1 a SF2 helikasy obsahující několik domén a 1 vazebné místo nukleosid-5'-trifosfátu (NTP, z angl. nucleoside-5'-triphosphate) na rozhraní 2 domén [67]. Obě superrodiny mají ve svých sekvencích 12 charakteristických motivů, které se nacházejí na daných pozicích ve středu helikasy. Každá rodina má v motivech svou sekvenční konzervovanost, ale napříč rodinami tato konzervovanost klesá, z čehož vyplývá, že ne všechny motivy sekvencí jsou přítomné v každé rodině. Z hlediska superrodin však omezená sekvenční uzavřenost zůstává [68]. SF3 a SF4 jsou prstencové helikasy s NTP vazným místem na rozhraní sousedících podjednotek. Vazné místo na nukleovou kyselinu je v helikasách sice odlišné, ale je alostericky napojené na místo nukleosid-5'-trifosfatasy (NTPasy, z angl. nucleoside-5'-triphosphatase). I když jsou helikasy ve stejné superrodině, často vykazují odlišnou substrátovou specifitu (RNA či DNA) a směrovost translokace (3' – 5' nebo 5' – 3'). Toto může být důsledkem malých

změn v primární struktuře [67]. Helikasa z flavivirového proteinu NS3 patří do superrodiny SF2 [69].

1.5.1 Helikasová doména nestrukturního proteinu NS3

Nestrukturní protein NS3 (Obr. č. 5), jenž je důležitý pro virový polypeptidový proces a genomovou replikaci, je složen z proteasové domény na N-konci a helikasové domény na C-konci, ta se při vazbě RNA projevuje vlastní NTPasovou aktivitou. Tato aktivita je zdrojem chemické energie pro oddělení virových RNA replikačních meziproductů, tím společně s RdRp usnadňuje replikaci virového genomu [70].



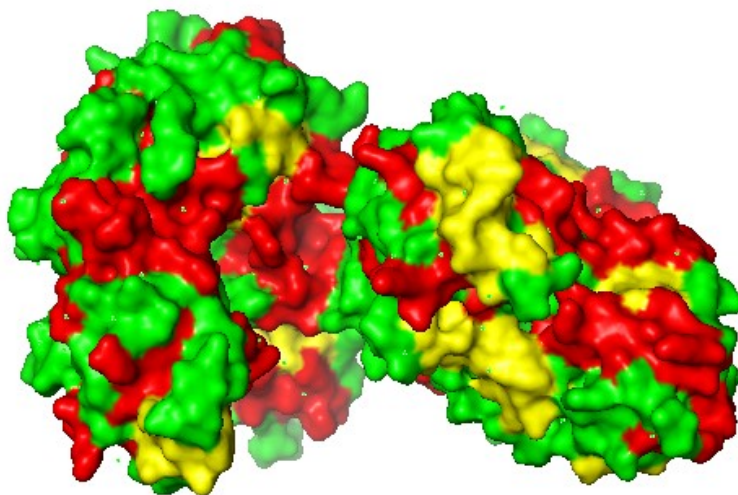
Obrázek č. 5: Struktura NS3 proteinu DENV-4 (PDB ID: 2VBC), kde jsou znázorněny obě domény – proteasová (vlevo) a helikasová (vpravo) [71]. Na obrázku vytvořeném v programu PyMOL je vidět, že proteasa je složena většinou z β -skladaných listů (zvýrazněny žlutou barvou), helikasa z α -helixů (zvýrazněny červenou barvou), zelenou barvou jsou zvýrazněny smyčky [72].

Helikasa je s proteasou spojená spojkou, která je zodpovědná za celkovou mezidoménovou flexibilitu. Tato změna mezi dvěma konformačními stavy vede k přechodu mezi polyproteinovou proteolysou a RNA replikací [71]. Zatímco proteasová doména je více hydrofobní, jejím odstraněním z NS3 proteinu se zvýší rozpustnost helikasy a lépe se exprimuje a purifikuje [73]. Helikasa interaguje s množstvím proteinů.

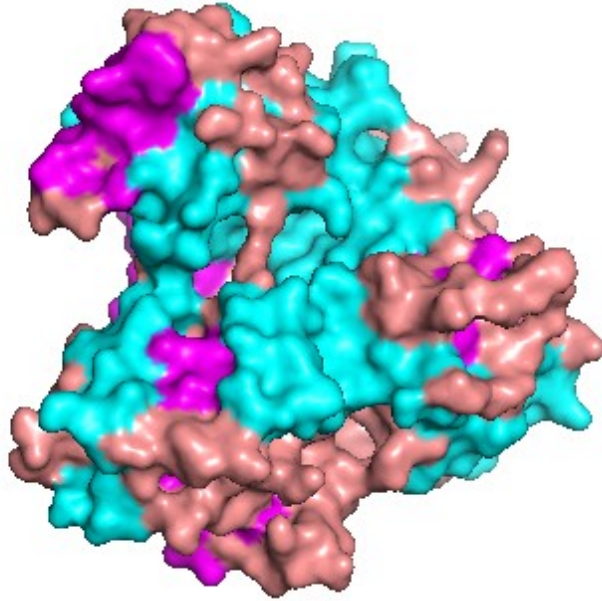
Ze známých, například s NS3 proteasovou doménou a s NS4A proteinem. Tato vazba (pravděpodobně ovlivňující aktivitu NTPasy) je silnější a daleko více ovlivňuje aktivitu enzymu, než interakce proteasy a helikasy uvnitř NS3 proteinu (v řádech μM). [74].

Ve struktuře NS3 helikasy (Obr. č. 6; Obr. č. 7, str. 23) se nachází 3 poddomény. Poddoména 1 a poddoména 2 spolu vytváří místo pro vazbu NTP a poddoména 3 ve spojení s těmito doménami tvaruje RNA vazebnou štěrbinu. NS3 helikasa flavivirů má uspořádanou strukturu, ale helikasa ZIKV obsahuje ohebnou a neuspořádanou P-smyčku, respektive RNA vazebnou smyčku na svých aktivních místech NTPasy a RNA helikasy, právě tyto smyčky jsou kritické pro helikasovou funkci [75]. Zmíněné strukturní motivy (I, Ia, II, III, IV, IVa, V, VI), které jsou vysoce konzervované v podrodinách podobných strukturou virovým a lidským helikasám, se nachází mezi NTPasovým aktivním místem a RNA vazebnou štěrbinou. Tyto strukturní motivy nesou zodpovědnost za vazbu substrátu a enzymatické aktivity v rámci helikasy [76,77].

Právě proto, že je helikasa pro replikaci virového genomu a následně jeho rozmnožování v organismu natolik důležitá, je vhodným adeptem na vývoj léčiv [70].



Obrázek č. 6: Povrchová struktura NS3 helikasy DENV-2 (PDB ID: 2BHR) [78]. Struktura byla vytvořena v programu PyMOL [72], červenou barvou jsou zvýrazněny α -helixy, žlutou barvou β -skládané listy, zelenou barvou jsou zvýrazněny smyčky



Obrázek č. 7: Povrchová struktura NS3 helikasy ZIKV (PDB ID: 5JMT) [70]. Struktura byla vytvořena v programu PyMOL [72], modrou barvou jsou zvýrazněny α -helixy, fialovou β -skládané listy, růžovou barvou jsou zvýrazněny smyčky

2 Cíle práce

Prvním cílem této práce bylo připravit helikasu NS3 proteinu z virů Zika a Dengue pro další výzkumné účely. Tento cíl se sestává z těchto dílčích cílů:

- 1) Příprava plasmidů pro expresi flavivirových helikas (NS3)
- 2) Purifikace vybrané flavivirové helikasy
- 3) Ověření enzymové aktivity purifikovaného proteinu

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

Agilent	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)RIL
Bio-Helix	Agarosa
Bio Rad	Precision Plus Protein™ All Blue Standards
Biotika	Ampicilin 0,5
Biotium	GelRed
Bio-Techne R&D Systems s.r.o.	Malachite Green Phosphate Detection Kit
New England Biolabs	100% DMSO
	DpnI
	Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS
	Gibson Assembly mix
	Phusion® GC Buffer Pack
	Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase
Penta	NaCl
QIAGEN	GelPilot 1 kb Ladder
	QIAquick Gel Extraction Kit
Roth	Tris-HCl
Sigma Aldrich	akrylamid (AA)
	inhibitor proteas cOmplete
	peroxodisíran amonný (APS, z angl. Ammonium persulfate)
	β-merkptoethanol
	His-Taq NiNTA
	isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)
	LB médium
	nukleotidy
	primery (Příloha 1)
	tetramethylethylendiamin (TEMED)

ÚOCHB AV ČR

Zymo Research

pET-16b

Zyppy Plasmid Miniprep Kit

3.2 Použité přístroje

AND	EK – 3000i
Avestin	Emulsiflex C3
BIOER	Mixing block MB-102
BIOMETRA	Thermocycler T-Gradient ThermoBlock
Bio Rad	PowerPac™ Basic Power Supply
Eppendorf	BioSpectrometer Kinetic
GE Healthcare/Amersham Biosciences	ÄKTA purifier
	HiLoad 16/60 Superdex 200 pg
Heraeus	Biofuge pico
	Megafuge 2.0 R
Memmert	Peltier IPP 400
New Brunswick	Innova 44
Stuart	Roller mixer SRT 9D
Tecan	The Infinite® M1000
ThermoFisher Scientific	NanoDrop 1000
	Sorvall Evolution RC

3.3 Použité metody

3.3.1 Metoda polymerasové řetězové reakce

Na přípravu roztoků pro metodu PCR byly použity tyto chemikálie: GC pufr 5x koncentrovaný s hořčnatými kationty (New England BioLabs), destilovaná voda, 100% DMSO (New England BioLabs), nukleotidy (10 mM, Sigma Aldrich), primery (100 μM, Sigma Aldrich), DNA polymerasa (2 000 U/ml, New England Biolabs) a templát (ÚOCHB AV ČR). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Příloze 1. DNA polymerasa byla přidávána jako předposlední složka kvůli zachování její stability a enzymové aktivity. Po přidání templátu byly všechny vzorky zamíchány nasáváním a vypuzováním automatickou pipetou.

Vzorky byly vloženy do termocykleru, kde byl nastaven vhodný program pro amplifikaci: typicky počáteční denaturace při 98 °C po dobu 30 s, poté proběhl cyklus, který se 35x opakoval: 98 °C, 10 s denaturační krok; nasedání primerů v rozmezí teplot 50 – 70 °C po dobu 30 s; prodlužování primerů, tedy vlastní syntéza DNA, 72 °C, 30 s pro insert a 2 min 30 s pro vektor. Následovala extenze nedosyntetizovaných fragmentů při 72 °C a po dobu 5 min. Po uběhnutí PCR byly mikrozkušavky připraveny na agarosovou elektroforézu.

3.3.2 Restrikční štěpení

Před započítím elektroforézy bylo pipetováno do všech vzorků 0,25 μl enzymu DpnI (20 000 U/ml, New England BioLabs), který patří mezi restrikční endonukleasy II. typu a přestřihává řetězec se sekvencí GATC/CTAG s rozpoznávacím místem mezi thyminem a adeninem, pokud je na adeninu navázaný methyl. Restrikční štěpení bylo provedeno proto, aby byla odstraněna templátová DNA, která je (narozdíl od PCR produktů) methylována během syntézy v bakteriích. Tyto vzorky byly poté dány do inkubátoru při 37 °C na 30 minut.

3.3.3 Agarosová elektroforéza

Mezitím byl do nástavce na elektroforetický gel nalit roztok 1% agarosy, který vznikl smísením 50 ml TAE pufru (tris, kyselina octová, Na₂ EDTA, rozpuštěno v destilované vodě) a 0,5 g agarosového prášku od firmy BIO-HELIX, smíchané s 6 μl fluorescenčního barviva GelRed od firmy Biotium na obarvení gelu. Po ztuhnutí gelu (cca 20 minut) se nástavec spolu s gelem přesunul do elektroforetické soupravy k provedení samotné

elektroforézy a přidalo se takové množství TAE pufru, aby byl gel zcela ponořen. Krátce potom byly vzorky vyjmuty z inkubátoru a smíchány s 3 µl nanášecího barviva Gel Loading Dye Purple (New England Biolabs) a naneseny do jamek. Po aplikaci vzorků na gel byla elektroforetická souprava uzavřena víčkem a připojena elektrodami na zdroj stejnosměrného napětí. Elektroforéza probíhala 40 minut při napětí 120 V. Po elektroforéze byl gel vyjmut a vyfocen pod ultrafialovým (UV, z angl. ultraviolet) světlem při 365 nm. DNA fragmenty byly vyříznuty, zváženy na předvážkách a připraveny k purifikaci.

3.3.4 Purifikace DNA z gelu

Při purifikaci byla použita soustava QIAquick Gel Extraction Kit od firmy QIAGEN. V tomto případě bylo postupováno zcela podle vloženého protokolu.

3.3.5 Spojení fragmentů DNA metodou Gibson Assembly

Do již předem připraveného Gibson Assembly mixu obsahujícího exonukleasu, DNA polymerasu a DNA ligasu (New England Biolabs) bylo pipetováno 4,0 µl insertu a 3,5 µl vektoru. Tento roztok byl inkubován 60 minut při 50 °C.

Exonukleasa je enzym, který vytváří jednořetězcové 3' – přečnívající konce, čímž usnadňuje nasedání fragmentů, které sdílí komplementaritu na jednom konci. DNA polymerasa je enzym, který zaplňuje mezeru uvnitř každého nasednutého fragmentu. DNA ligasa je enzym, který zaceluje oblasti, kde došlo k porušení vlákna spojené DNA.

Před samotnou transformací byly agarové plotny obsahující ampicilin dány do inkubátoru při 37 °C pro následnou lepší aplikaci bakteriální suspenze. Objem PCR zkumavky obsahující produkt reakce pomocí metody Gibson Assembly byl převeden do mikrozkuavky s bakteriemi *Escherichia coli* kmene TOP 10 a byla provedena transformace.

3.3.6 Transformace kompetentních bakterií *E. coli*

Po přidání DNA byla mikrozkuavka ponechána stát na ledu 30 minut. Poté proběhl teplotní šok při 42 °C na 90 vteřin. Po teplotním šoku byla mikrozkuavka opět ponechána stát na ledu po dobu 2 minut. Následně bylo pipetováno 200 µl LB média bez antibiotik a dáno do inkubace na přibližných 45 minut. Po inkubaci byly transformované

bakterie rozetřeny na agarové plotny s ampicilinem, každá plotna obsahovala 200 μ l roztoku. Poté byla bakteriální kultura rozetřena po agaru a plotny byly vloženy do inkubátoru, při 37 °C probíhala kultivace do dalšího dne.

3.3.7 Minipreparace plasmidové DNA

Do kónických zkumavek bylo nalito přibližně 10 ml LB média obsahující ampicilin (Biotika, 100 μ g/ml) a zaočkováno z bakteriálních kolonií agarových ploten transformovaných předchozí den. Tyto zkumavky byly poté dány do třepačky při 37 °C do dalšího dne. Druhý den byla využita souprava Zyppey Plasmid Miniprep Kit pro přípravu roztoků v mikrozskumavkách na sekvenování plasmidové DNA. Při přípravě těchto roztoků bylo postupováno dle instrukcí výrobce.

Nakonec byly mikrozskumavky poslány na sekvenaci firmou SEQme, kde byly sekvenovány Sangerovou metodou s přidavkem fluorescenčně značených didedoxynukleotidů.

3.3.8 Příprava LB média a jeho zaočkování

Přes noc rostlá kultura byla druhý den očkována do LB media s ampicilinem (100 μ g/ml) tak, že z každé Petriho misky byly narostlé kolonie smyty 2 ml média do Erlenmayerovy baňky obsahující celkově 500 μ l média. Tyto baňky byly následně inkubovány při 37 °C na třepačce při 220 ot/min na třepačce Innova 44 (orbit 2,5 cm) v 2,5 l Erlenmayerových baňkách. Během inkubace byly měřeny hodnoty optické denzity (OD) na spektrometru BioSpectrometer Kinetic (Eppendorf) po přibližně půl hodině. Když optická denzita nenaředeného vzorku dosáhla hodnoty 0,8, byl do všech baněk pipetován roztok IPTG do finální koncentrace 500 μ M pro indukci exprese proteinu, přičemž byl odebrán vzorek před i po indukci k následné analýze na polyakrylamidové gelové elektroforéze v prostředí dodecylsírnanu sodného (SDS-PAGE). Po indukci byly bakteriální suspenze inkubovány při 18 °C přes noc.

Následující den byly všechny Erlenmayerovy baňky vyjmuty z inkubátorové třepačky a byl odebrán vzorek na změření OD, jejíž hodnota se pohybovala v intervalu 1,1 až 1,2. Poté bylo odpipetováno do mikrozskumavky 200 μ l této směsi a přidán vzorkový pufr (10,5 ml 1M Tris, pH = 6,8; 3 g SDS; 9 ml glycerol; 3,6 mg bromfenolová modř; 1,2 ml merkaptoethanol; doplněno vodou do 30 ml) na SDS-PAGE.

Buňky byly od média odděleny centrifugací při 4 445x g po dobu 20 minut. Po vyjmutí kyvet z centrifugy, byl supernatant slit do odpadu a peleta se převedla do lyzačního pufru (50 mM Tris-HCl, pH = 8,00; 150 mM NaCl). Po převedení pelet do kónických zkumavek byl přidán též inhibitor proteas cOmplete od firmy Sigma Aldrich a dáno do mrazícího boxu do následujícího dne.

3.3.9 Homogenizace

Druhý den byly bakteriální buňky rozbity nejprve mikrohomogenizátorem podle Potter-Elvehjema. Vzniklá suspenze byla nalita přes sítko do kádinky, která se poté dala na led. Vzorek byl dále homogenizován pomocí přístroje Emulsiflex při asi 2 barech a 1 100 rázech ve třech opakovaných cyklech.

3.3.10 Purifikace na nosiči Ni-NTA

Po homogenizaci byla provedena centrifugace po dobu 20 minut při 11 683x g a 4 °C. Proteiny s histidinovou kotvou (v našem případě 10x histidin rekombinantně připojen na N-konec purifikovaného proteinu) byly purifikovány pomocí suspenze agarosového nosiče nesoucího dvojmocný nikelnatý kation chelatovaný nitrilotrioctovou kyselinou (nosič Ni-NTA, z angl. Nickel-Nitrilotriacetic acid). Nosič, uchovávaný v ethanolu, byl 2x promyt promývacím pufrem (50 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol) a následně byl přidán k bakteriální suspenzi obsahující fúzní protein. Ze supernatantu a pelety vzniklého centrifugací byl odebrán vzorek na SDS-PAGE o objemu 200 µl. K purifikovanému proteinu byly přidány 2 µl DNAasy I (New England Biolabs, 2 000 U/ml) a suspenze byla dána na rolovací třepačku do chladové místnosti na 6 hodin.

Po půldenním míchání na třepačce byl preparát stočen při 3 000x g a 4 °C na 5 minut. Ze supernatantu byl odebrán vzorek 1. proteklé frakce na SDS-PAGE. S tím byla stočena další várka nosiče, která poté byla 3x stočena 3 ml promývacího pufru. Po třetím stočení byl smíchán supernatant z preparátu a peleta z nového stočení nosiče, což bylo dáno do chladové místnosti na rolovací třepačku do následujícího dne. Peleta z preparátu byla promyta 8 ml promývacího pufru a stočena za stejných podmínek jako při předešlé centrifugaci. Supernatant byl uchován jako 1. promytá frakce a odebrán vzorek na SDS-PAGE. Peleta opět byla promyta 3 ml promývacího pufru a po stočení za stejných podmínek byl supernatant uchován jako 2. promytá frakce. Zbylá peleta byla promyta 10 ml elučního pufru (50 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 300mM NaCl; 250 mM imidazol) a dána

na rolovací třepačku do následujícího dne (1. eluční frakce).

Druhý den bylo provedeno stočení nového nosiče s proteklou frakcí z předešlého dne při 3 000x g a 4 °C. Po stočení byl odebrán supernatant jako 2. proteklá frakce a vzorek na SDS-PAGE. Poté se přidalo 8 ml promývacího pufru do každé falkonky a stočeno za stejných podmínek. Po stočení se odebral supernatant jako 3. promytá frakce a vzorek na SDS-PAGE. Následně byly přidány 3 ml promývacího pufru, stočeno (3 000x g, 4 °C, 5 min) a supernatant posloužil jako 4. promytá frakce. K peletě bylo přidáno 10 ml elučního pufru a dáno na rolovací třepačku do chladové místnosti (2. eluční frakce).

Námi připravený dialyzační pufr (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 14 mM β-merkaptoethanol; zředěno 1 000x) byl z části přefiltrován a z části byl použit na dialýzu (1:3). Eluční frakce byly stočeny (3 000x g, 5 min, 4 °C) a supernatant byl poté nalit do dialyzačních střev, část byla použita jako vzorek na SDS-PAGE. Tato střeva byla dána do dialyzačního pufru, kde zůstala přes noc.

3.3.11 Měření koncentrace proteinu na přístroji NanoDrop

Po dialýze byl protein přefiltrován přes kolonku s fritou a byla změřena jeho koncentrace na přístroji NanoDrop 1000 od firmy ThermoFisher Scientific. Měření probíhalo tak, že na velmi malou plochu byla nanесena kapka roztoku pro změření pozadí. Poté byla přidána kapka roztoku helikasy a změřena její koncentrace, která byla vypočítána z absorbance při 280 nm. Tento postup byl proveden i po chromatografii, kdy byla změřena výsledná koncentrace proteinu.

3.3.12 Vysokorychlostní kapalinová chromatografie

Následovala vysokorychlostní kapalinová chromatografie (FPLC, Fast-Protein Liquid Chromatography). Protein byl nejprve převeden do mikrozkušavek. Z těchto mikrozkušavek byly odebrány 2,4 ml roztoku, jenž byl vstříknut do chromatografického systému FPLC ÄKTA purifier, chromatografie probíhala na koloně HiLoad 16/60 Superdex 200 pg v pufru o pH = 7,2 se složením: 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl. Zbytek tohoto roztoku, asi 0,4 ml, byl uchován v mrazícím boxu, malá část byla použita na SDS-PAGE.

3.3.13 Polyakrylamidová gelová elektroforéza

Na SDS-PAGE bylo ke vzorkům přidáno odpovídající množství vzorkového pufru (6x koncentrovaný). Tyto vzorky byly dále povařeny při 98 °C na 3 minuty. Mezitím byla připravena elektroforetická souprava se dvěma elektroforetickými destičkami, kdy byl namíchán 16% polyakrylamidový pufr o celkovém objemu 10 ml (4 ml 40% AA; 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH = 8,8; 0,1 ml 10% SDS; 0,1 ml 10% APS; 0,01 ml TEMED; 3,3 ml vody). Po nalití do soustavy bylo připraveno 5 ml 5% zaostřovacího pufru (0,625 ml 40% AA; 1,25 ml 1 M Tris-HCl, pH = 6,8; 0,05 ml 10% SDS; 0,05 ml 10% APS; 0,01 ml TEMED, 3,0 ml vody). Ten byl přidán k prvnímu pufru a čekalo se, až vznikne rozhraní mezi oběma gely.

Do soupravy byl nalit naředěný elektroforetický pufr o objemu přibližně 1 litru (1:9). Poté byly pipetovány marker Precision Plus ProteinTM All Blue Standards (BioRad) a vzorky. Hodnota napětí na zdroji byla nastavena na 150 V, doba elektroforézy na 1 hodinu a 20 minut.

3.3.14 Vizualizace gelu

Po uběhnutí elektroforézy byly gely opatrně vyndány z destiček a dále byly barveny dvěma způsoby. Jeden gel byl barven stříbrem a druhý gel v barvivu Coomassie Brilliant Blue (CBB).

3.3.14.1 Barvení stříbrem

Do vaničky s gelem byl nalit fixační roztok [12% (v/v) kyselina octová; 50% (v/v) methanol; 0,5 ml 37% formaldehydu]. Po hodině promývání byl fixační roztok vylit a místo něj byl přidán promývací roztok [50% (v/v) methanol; 50% H₂O], tímto roztokem byl gel promýván 15 minut. Promývací roztok byl vyměněn novým objemem promývacího roztoku, který byl ve vaničce po stejný časový úsek jako při předešlém promývání. Poté byl naposledy vyměněn promývací roztok a ponechán ve vaničce přes noc. Druhý den byl promývací roztok vylit a na 1 minutu byl přidán exponační roztok [Na₂S₂O₃ · 5H₂O, (0,2 g/l H₂O)]. Následně byl gel promyt 3x 20 vteřin destilovanou vodou. Po posledním vylití destilované vody byl na 20 minut nalit impregnační roztok (2 g/l AgNO₃; 0,5 ml 37% formaldehydu; doplněno vodou do 1 litru). Po této době byl gel opět promyt 3x 20 vteřin destilovanou vodou a poté byl nalit vyvolávací roztok (60 g/l Na₂CO₃; 4 mg/l Na₂S₂O₃·H₂O; 0,5 ml 37% formaldehydu; doplněno vodou do 1 litru) do

té doby, než se objevily proužky s dostatečnou intenzitou, což trvalo asi 30 minut. Následně byl gel vyfocen mobilním telefonem.

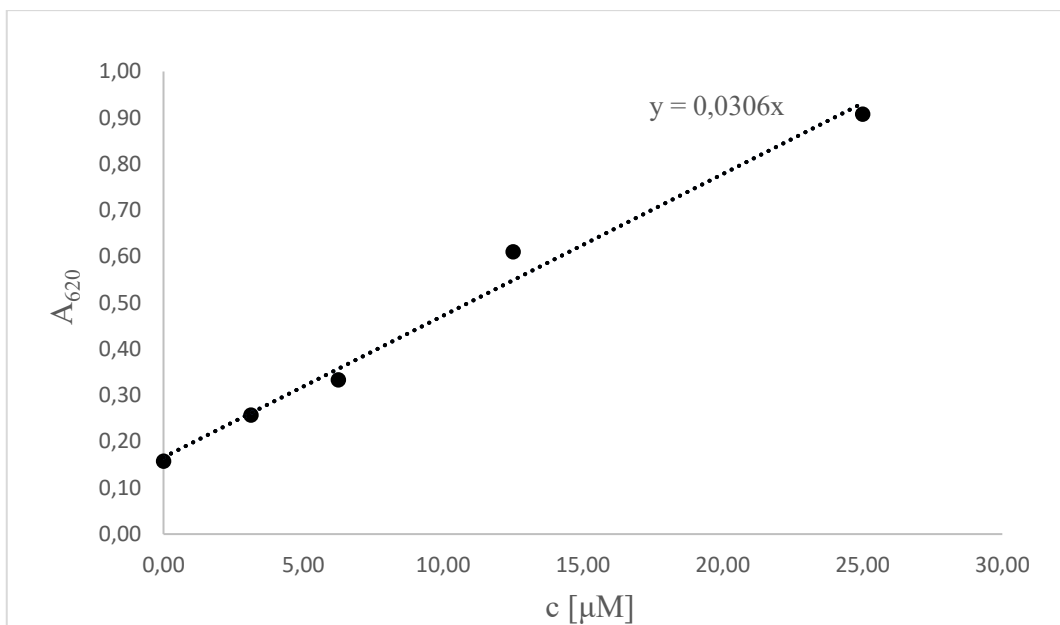
3.3.14.2 Barvení Coomassie Brilliant Blue

Barvivo bylo nalito do vaničky s gelem a celé to bylo ponecháno stát přes noc. Následující den byl CBB vylit a místo něj byl přidán odbarvovací roztok, který byl ještě jednou vyměněn tak, aby se na gelu dostatečně odbarvilo pozadí. Po promytí destilovanou vodou byl gel vyfocen mobilním telefonem.

3.3.15 Měření NTPasové aktivity

Do mikrotitrační destičky byla v duplikátech pipetována koncentrační řada adenosin-5'-trifosfátu (ATP, z angl. adenosine-5'-triphosphate), jehož objem byl v každé jamce 2,5 μ l, k tomu bylo pipetováno 46,25 μ l pufru určeného pro měření helikasové aktivity (40 mM Tris; 80 mM NaCl; 8 mM Mg(AcO)₂; 1 mM EDTA, pH = 7,5) a nakonec bylo přidáno 1,25 μ l helikasy (zásobní roztok 1 mg/ml). Po hodinové inkubaci při laboratorní teplotě bylo přidáno 10 μ l roztoku A (roztok molybdenanu amonného v 3 M kyselině sírové) ze soupravy pro detekci fosfátu Malachite Green Phosphate Detection Kit od firmy Bio-Techne R&D Systems s.r.o. Po deseti minutách inkubace byl přidán roztok B (roztok oxalátu malachitové zeleně a polyvinyl alkoholu) ze soupravy od stejné firmy, díky tomuto roztoku se směs v jamkách mikrotitrační destičky zbarvila do zelené barvy. Stanovení enzymové aktivity pomocí malachitové zeleně je citlivé a jednoduché měření založené na rozdílném množství fosfátových zbytků v roztoku.

Po dvaceti minutách byla změřena absorbance na čtečce mikrodestiček The Infinite® M1000 od společnosti Tecan. Absorbance byla měřena při vlnové délce 620 nm. Pro stanovení pozadí byly změřeny stejným postupem i vzorky s denaturovanou helikasou. Aktivita NTPasové domény byla proměřena při různých koncentracích substrátu ATP. Ze získané koncentrační závislosti byla zjištěna hodnota K_M a V_{max} použitím programu GraphPad. Na Obr. č. 8 (str. 35) je znázorněna kalibrační křivka fosfátového standardu, díky které byla vypočítána koncentrace vzniklého produktu a následně vypočítaná katalytická konstanta k_{cat} .



Obrázek č. 8: Kalibrační křivka fosfátového standardu (Malachite Green Phosphate Detection Kit, Bio-Techne R&D Systems s.r.o), absorbance byla měřena při 620 nm na přístroji The Infinite® M1000 (Tecan), měření bylo prováděno v triplikátech, reakční objem byl 100 μl.

4 Výsledky

4.1 Příprava expresních plasmidů pro získání virových helikas

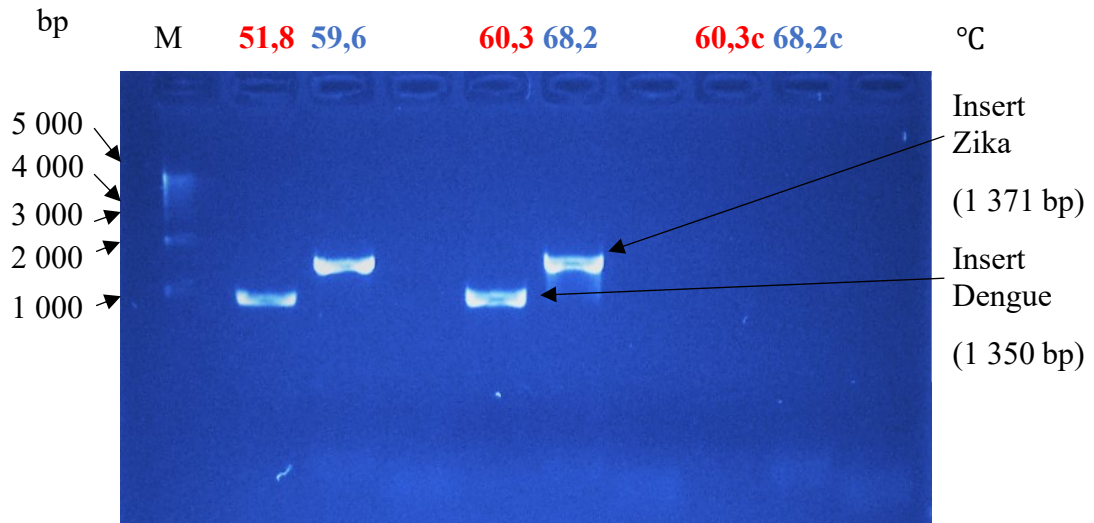
Jako vektor byl použit modifikovaný expresní plasmid pET-16b. Tento typ plasmidu umožňuje vložení genu požadovaného proteinu pod T7 promotor. Díky tomu dochází k silné expresi daného proteinu, je-li plasmid transformován do vhodného kmene bakterií *E. coli*, který obsahuje chromozomální kopii T7 polymerasy. Pro účely klonování byl použit bakteriální kmen *E. coli* TOP 10, který nemá T7 polymerasu, nedochází v něm k expresi daného proteinu a je vhodný pro amplifikaci DNA.

Expresní vektor pET-16b umožňuje získat fúzní protein s histidinovou kotvou na jeho N-konci. Na ÚOCHB připravený plasmid se od pET-16b liší tím, že za histidinovou kotvou následuje štěpné místo pro proteasu viru tabákové mozaiky (TEVpr, z angl. Tobacco Etch Virus protease), pomocí níž může být kotva z proteinu odstraněna.

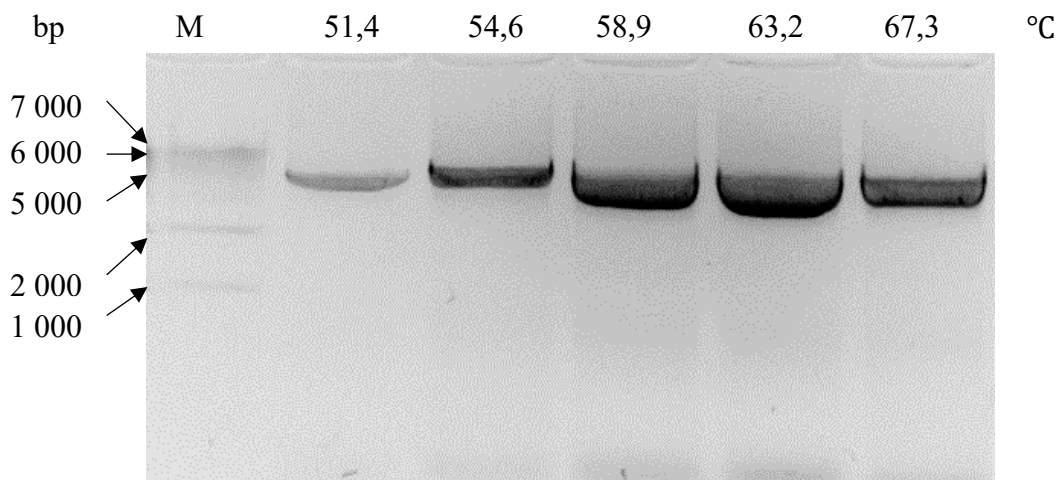
Jako templát pro insert byl použit plasmid pET-16b s vloženým virovým fúzním proteinem NS2-NS3 (sekvence tohoto proteinu byla získána na pracovišti ÚOCHB pomocí PCR za použití reversní transkriptasy z virového genomu).

Metodou PCR, která probíhala při různých teplotách pro nasedání primerů na templát (pro každý jednotlivý fragment), se získaly požadované sekvence insertů a vektoru DENV a ZIKV. Na Obr. č. 9 (str. 37) a Obr. č. 10 (str. 38) jsou znázorněny příklady agarosových elektroforéz těchto fragmentů

Naklonované konstrukty kódují DNA pro helikasy z obou virů. Konstrukty obsahují i histidinovou kotvu a sekvenci ENLYFQ/G pro rozpoznání TEVpr. DNA sekvence byly ověřeny sekvenováním získaných konstruktů (firma SEQme)



Obrázek č. 9: Příklad agarosové elektroforézy DNA fragmentů insertu z virů **Dengue** a **Zika** v 1% agarosovém gelu v TAE pufru po PCR. Barvivem na obarvení gelu bylo fluorescenční barvivo GelRed (Biotium), nanášecím barvivem do vzorků byl Gel Loading Dye Purple (New England Biolabs), jako marker byl použit GelPilot 1 kb Ladder (QIAGEN), délka fragmentů insertu **Zika** byla 1 371 bp, délka fragmentů insertu **Dengue** byla 1 350 bp, pod označeními *c* se nachází negativní kontroly. Dráhy jsou označeny teplotami ve stupních Celsia zvolenými pro nasedání primerů při PCR. Dráhy označené teplotami zbarvenými **červenou barvou** jsou dráhy fragmentů viru **Dengue**, dráhy označené teplotami zbarvenými **modrou barvou** jsou dráhy fragmentů viru **Zika**. Gel byl vyfocen pod UV světlem při vlnové délce 365 nm.



Obrázek č. 10: Příklad agarosové elektroforézy DNA fragmentů vektoru DENV, v 1% agarosovém gelu v TAE pufru po gradientové PCR. Barvivem na obarvení gelu bylo fluorescenční barvivo GelRed (Biotium), nanášecím barvivem do vzorků byl Gel Loading Dye Purple (New England Biolabs), jako marker byl použit GelPilot 1 kb Ladder (QIAGEN), délka fragmentů vektoru DENV byla 5 691 bp, dráhy jsou označeny teplotami ve stupních Celsia zvolenými pro nasedání primerů při PCR, gel byl vyfocen pod UV světlem při vlnové délce 365 nm

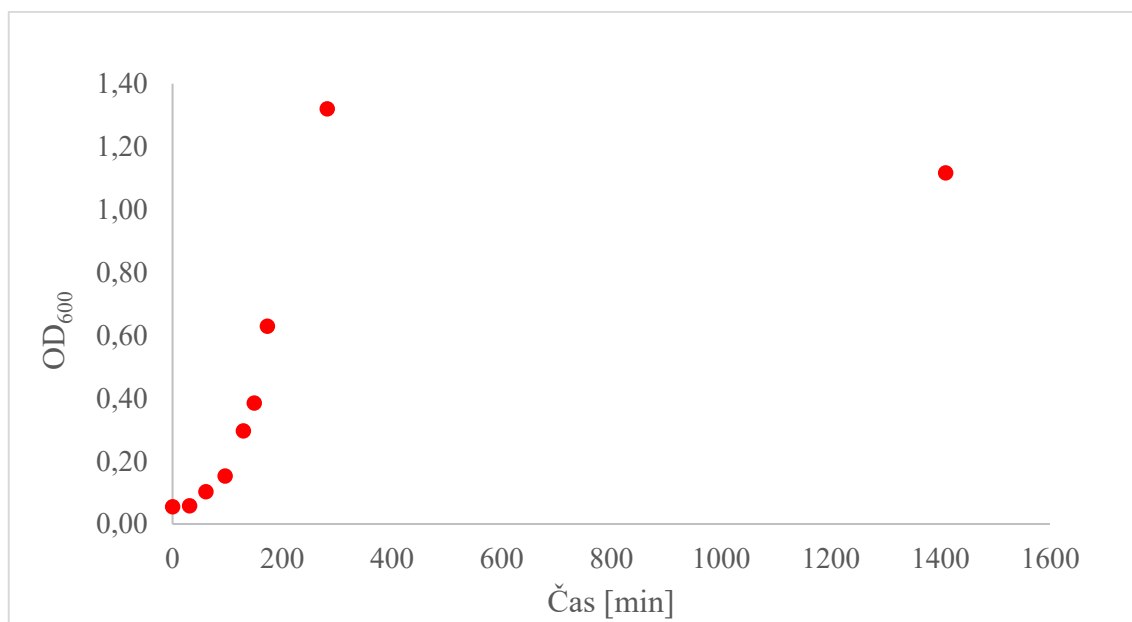
V Příloze 2 jsou znázorněny mapy amplifikovaných insertů a vektorů použité k metodě Gibson Assembly. Mapy byly vytvořené v programu SnapGene.

4.2 Expresse

Pro expresi v bakteriích *E. coli* BL21(DE3)RIL, které mají v sobě zabudovaný T7 expresní systém, byl vybrán plasmid pET-16b-ZIKAHel. Díky T7 expresnímu systému je zajištěna vysoká úroveň exprese. V tomto systému je cílový gen klonován do expresního vektoru po směru T7 promotoru a tento konstrukt je zaveden do T7 expresního hostitele, čímž je profágový kmen DE3. Tento kmen DE3 nese chromozomální kopii genu pro fágovou T7 RNA polymerasu. Expresse T7 polymerasy je inhibována *lac* represorem. Poté, co je přidán induktor IPTG, je T7 RNA polymerasa exprimována a díky tomu může probíhat transkripce genu pod T7 promotorem v pET plasmidu. V námi použitým bakteriálním kmeni, pod označením RIL se nacházejí kopie genů pro *argU*, *ileY* a *leuW* transferové RNA (tRNA), které kódují tRNA rozeznávající kodóny AGA/AGG (arginin), AUA (isoleucin) a CUA (leucin), které jsou jinak málo zastoupeny v prokaryotech, ale více se vyskytují v eukaryotech

Po transformaci amplifikované DNA do bakterií *E. coli* BL21(DE3)RIL byla měřena optická denzita nárůstu buněčné suspenze v LB médiu v přibližně půlhodinových intervalech. Vlnová délka při tomto měření byla 600 nm.

Na začátku růstové křivky (Obr. č. 11) mezi prvním a druhým měření je vidět mírná lag fáze, kdy se buňky přizpůsobovaly novému prostředí. Po lag fázi následuje exponenciální fáze neboli fáze zrychleného růstu, kdy buňky rostly do té doby, než množství živin bylo limitující pro jejich další růst. V této fázi, přibližně 3 hodiny po začátku lag fáze, došlo ke zdvojnásobení absorbance na hodnotu 0,629. Když OD dosáhla hodnoty 0,8, byla provedena indukce IPTG, po níž se bakteriální růst zpomalil, což signalizuje, že dochází k masivní expresi proteinu. Následující den po přidání IPTG byly bakterie sklizeny a centrifugovány, aby mohly být dále homogenizovány.



Obrázek č. 11: Růstová křivka transformované bakterie *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL plasmidem pET-16b-ZIKAhel. Optická denzita byla měřena na přístroji BioSpectrometer Kinetic (Eppendorf) při 600 nm po zhruba půlhodinových intervalech, indukce pomocí IPTG proběhla při OD₆₀₀. Jako poslední bod je znázorněno měření následující den.

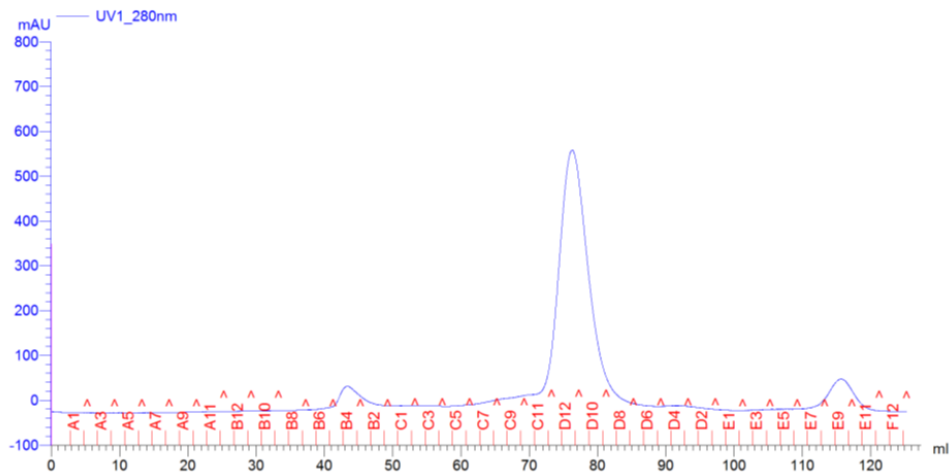
Celkový objem LB média s narostlými bakteriemi byl 2 litry. Tyto bakterie byly následně zhomogenizovány v ručním homogenizátoru a na přístroji Emulsiflex. V Příloze 3 jsou uvedeny aminokyselinové sekvence obou fúzních proteinů HisTaq-TEV-DengueHel a HisTaq-TEV-ZikaHel.

4.3 Purifikace Zika helikasy

V lyzačním pufru (50 mM Tris-HCl, pH = 8,00; 150 mM NaCl) proběhlo rozbití buněk. Díky tomuto rozbití buněk mohl být protein přečištěn na nosiči Ni-NTA a ve dvou různých pufrech – promývacím (50 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol) a elučním (50 mM Tris-HCl, pH = 8,00; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol). Na Obr. č. 13 z SDS-PAGE (str. 42) je vidět protein, který byl tímto způsobem purifikován. Jamka č. 7 ukazuje, že protein po purifikaci byl zhruba ze 75 % čistý.

Po purifikaci na Ni-NTA byl protein přes noc dialyzován v dialyzačních sřevech, která byla ponořena v dialyzačním pufru (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH = 8,00; 14 mM β -merkaptoethanol).

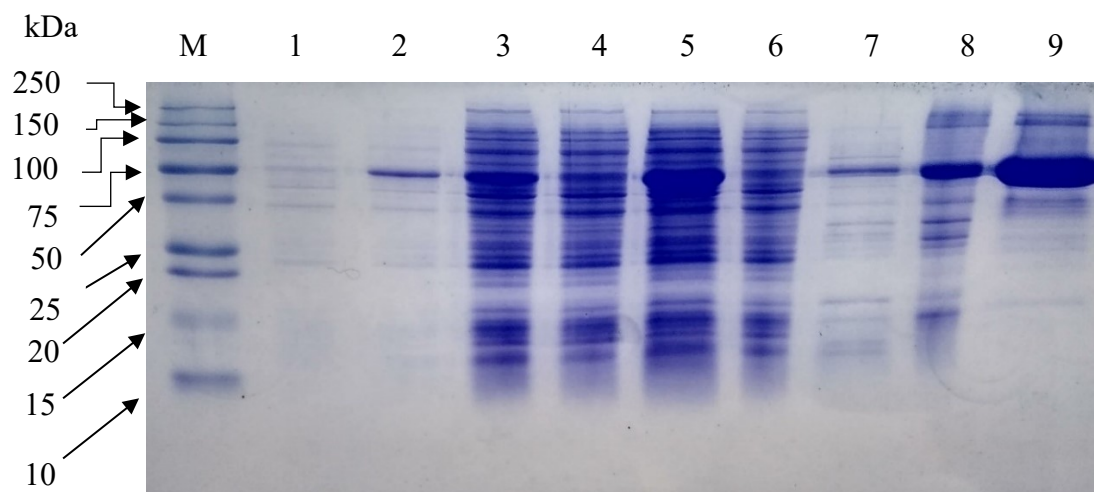
Po dialýze a přefiltrování přes kolonku s fritou byla změřena koncentrace proteinu a z toho vypočítaná hmotnost, která činila 1,15 mg ze 2 litrů média. Na FPLC a koloně HiLoad 16/60 Superdex 200 pg byl protein naposledy přečištěn, chromatogram je znázorněn na Obr. č. 12 (str. 41). Chromatografie probíhala na přístroji ÄKTA purifier, v pufru o pH 7,2 se složením 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, rychlost průtoku byla 1 ml/min, na výstupu z kolony byla měřena absorbance při 280 nm. Výsledný chromatogram byl porovnán s kalibrační křivkou použité kolony HiLoad 16/60 Superdex 200 pg. Na kalibrační křivce je vrchol albuminu (5 mg/ml; Mr 66 000) při elučním objemu $V_e = 75$ ml, vedle něho je vrchol ovalbuminu (5 mg/ml; Mr 44 000), který má eluční objem $V_e = 83$ ml. Právě mezi těmito vrcholy se nachází vrchol získané helikasy, což znamená, že majoritní vrchol se nachází v oblasti předpokládané molekulové hmotnosti získaného enzymu (53,6 kDa). Frakce C11 – D8 byly spojeny.



Obrázek č. 12: Chromatogram z FPLC při purifikaci helikasy viru Zika, chromatografie probíhala na přístroji ÄKTA purifier na koloně HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (obojí GE Healthcare/Amersham Biosciences) v pufru o pH = 7,2 se složením: 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl. Detekce UV (280 nm)

Na Obr. č. 13 (str. 42) je znázorněn polyakrylamidový gel obarvený CBB. Na jamkách označené čísly 1 a 2 (před indukci a po indukci) je vidět znatelný rozdíl, protože oproti jamce č. 1 se v jamce č. 2 objevil výrazný proužek proteinu, patřící pravděpodobně helikase, který se nacházel v zatím nerozbitých buňkách bakterie *E. coli*, ale již byl exprimován. V jamce č. 3 jsou rozbité buňky pomocí přístroje Emusiflex. 1. proteklá frakce (jamka č. 4) znázorňuje to, co se nenavázalo při purifikaci na NiNTA nosič. Helikasy v této promyté frakci zůstalo minimum, většina helikasy se zřejmě navázala na nosič. V jamce č. 5 (1. promytá frakce), která byla promyta z kolony promývacím pufrům, je výrazný proužek proteinu, ale vzhledem k jeho šířce se lze domnívat, že jeho nanáška na gel (10 µl) byla příliš vysoká. 2. proteklá frakce (supernatant z 1. proteklé frakce a peleta z nově stočeného nosiče) z následujícího dne (jamka č. 6) je podobná jamce č. 4, ale je vidět, že proužek helikasy má světlejší odstín než v jamce č. 4. Jamka č. 7 znázorňuje eluční frakci, tedy purifikovaný protein uvolněný z Ni-NTA nosiče imidazolem, je patrné, že většina nečistot byla odstraněna během promývání a po eluci byl získán vzorek, kde většinový podíl tvořila helikasa. V jamce č. 8 je protein po dialýze a zahuštění, ale je vidět, že se v roztoku objevily ještě jiné proteiny, což je zřejmě důsledek vyšší nanášky vzorku na gel.

Molekulová hmotnost vyčištěného proteinu byla 53,6 kDa. Proužek v jamce č. 9 zhruba odpovídá této molekulové hmotnosti.



Obrázek č. 13: Gel z SDS polyakrylamidové gelové elektroforézy po barvení CBB pro vizualizaci helikasy s linkerem z viru Zika. M – marker All Blue (2 μ l), 1 – před indukcí (2 μ l/500 ml), 2 – po indukci (2 μ l/500 ml), 3 – po homogenizaci (2 μ l/50 ml), 4 – 1. proteklá frakce (2 μ l/30 ml), 5 – 1. promytá frakce (10 μ l/3 ml), 6 – 2. proteklá frakce (2 μ l/25 ml), 7 – eluční frakce (10 μ l/8 ml), 8 – po dialýze (2 μ l/3 ml), 9 – výsledný protein helikasa ZIKV (15 μ l/1,5 ml), v závorkách je zmíněna nanáška z celkového získaného objemu, vzorky byly před započítím elektroforézy povařeny ve vzorkovém pufru (10,5 ml 1 M Tris, pH = 6,8; 3 g SDS; 9 ml glycerol; 3,6 mg bromfenolová modř; 1,2 ml merkaptoethanol; doplněno vodou do 30 ml)

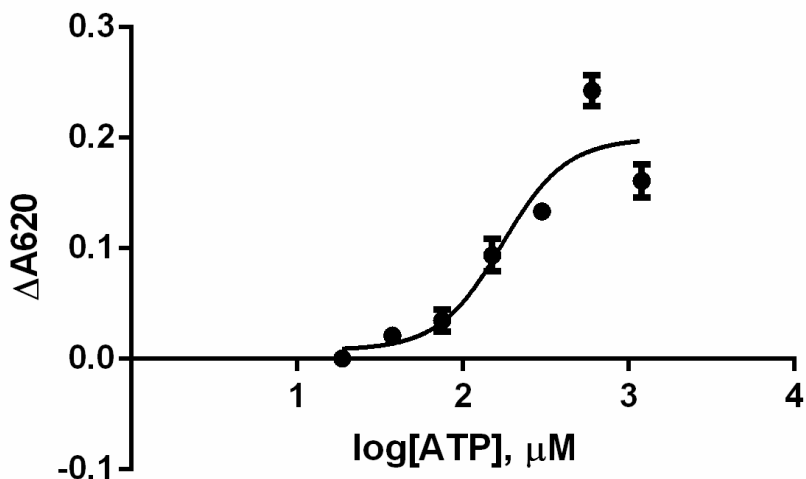
Při měření koncentrace proteinu na přístroji NanoDrop bylo zjištěno, že finální výtěžek po celkové purifikaci helikasy ZIKV byl 4,80 mg ze 2 litrů LB média.

4.4 Enzymová aktivita

Zika helikasa byla následně využita pro měření ATPasové aktivity stanovením fosfátových zbytků metodou pomocí malachitové zeleně a zjištění K_M a k_{cat} . K měření byla použita souprava Malachite Green Phosphate Detection Kit. Měření bylo prováděno v duplikátech v pufru vhodném pro měření helikasové aktivity (40 mM Tris; 80 mM NaCl; 8 mM $Mg(AcO)_2$; 1 mM EDTA, pH = 7,5). Pro měření byla připravena koncentrační řada ATP od 0 μ M do 1 200 μ M. Po hodinové inkubaci helikasy v pufru s koncentrační řadou byl přidán reagent A a po 10 minutách inkubace byl přidán reagent B. Po dvacetiminutové inkubaci byla změřena absorbance při 620 nm na přístroji Tecan. Všechny inkubace probíhaly při laboratorní teplotě.

Výsledná data byla dále zadána do programu GraphPad (Obr. č. 14), který z těchto dat vypočítal Michaelisovu konstantu K_M a maximální rychlost reakce V_{max} . Ze získaných výsledků byla vypočítána katalytická konstanta k_{cat} .

Michaelisova konstanta K_M této enzymové reakce byla $170 \pm 50 \mu\text{M}$. Maximální rychlost reakce V_{max} měla hodnotu $0,20 \pm 0,02 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vypočítaná katalytická konstanta k_{cat} byla $3,2 \cdot 10^{-3} \text{s}^{-1}$.



Obrázek č. 14: Stanovení enzymové aktivity helikasy z viru Zika změřením koncentrace fosfátových zbytků uvolněných hydrolýzou ATP v roztoku, koncentrace ATP je v jednotkách μM , koncentrace enzymu v každé jamce byla $24,4 \mu\text{g/ml}$. Graf je ve formě log plot. Pufir pro měření této helikasové aktivity měl složení: 40 mM Tris; 80 mM NaCl; 8 mM $\text{Mg}(\text{AcO})_2$; 1 mM EDTA, $\text{pH} = 7,5$. Koncentrační řada ATP byla od $0 \mu\text{M}$ do $1\,200 \mu\text{M}$. Koncentrace enzymu byla vzata jako koncentrace celkového proteinu při 280 nm. K měření byla využita metoda malachitové zeleně, která zbarvila roztoky do různě zelených odstínů, k tomuto účelu sloužila souprava pro detekci fosfátu Malachite Green Phosphate Detection Kit od firmy Bio-Techne R&D Systems s.r.o. Absorbance byla měřena při 620 nm na přístroji The Infinite® M1000 (Tecan), získaná data byla vyhodnocena v programu GraphPad. Měření bylo prováděno v duplikátech, na grafu je znázorněna standardní chyba, pro vyhodnocení pozadí byla změřena absorbance denaturované helikasy.

V této práci byly připraveny expresní plasmidy pET-16b-hel virů Zika a Dengue v bakteriích *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL. Helikasa viru Zika byla dále exprimována pomocí T7 expresního systému a purifikována na nosiči Ni-NTA pomocí histidinové kotvy. Následovala dialýza v dialyzačních střevech a vysokorychlostní kapalinová chromatografie. Čistota proteinu byla zhodnocena pomocí SDS-elektroforézy. Byla změřena ATPasová aktivita helikasy.

5 Diskuze

V této práci byly připraveny expresní plasmidy pro přípravu rekombinantních helikas virů Zika a Dengue, helikasa z viru Zika byla purifikována a byla ověřena její ATPasová aktivita. Geny pro obě helikasy byly vloženy do expresního plasmidu pET-16b ve formě fúzního proteinu s histidinovou kotvou. Histidinová kotva umožňuje purifikaci proteinu koordinačně kovalentní vazbou na ionty kovu, které jsou navázány na chromatografickém nosiči, v našem případě tímto nosičem byl Ni-NTA nosič. Mezi kotvu a helikasu bylo vloženo štěpné místo pro TEV proteasu, aby kotva mohla být v případě potřeby odstraněna.

Aby mohla být provedena izolace a purifikace proteinu, byly narostlé bakterie kultivovány přes noc při 18 °C a lyzovány v lyzačním pufru. Nízká koncentrace chloridu sodného v lyzačním pufru (150 mM) vytvoří hypotonické prostředí a bakterie snadněji lyzují. Naproti tomu vyšší koncentrace soli v promývacím a elučním pufru (300 mM) zamezí nespecifické vazbě na nosič a rozruší případné nespecifické iontové vazby mezi purifikovaným proteinem a ostatními proteiny. Stejně tak se vlivem nízké koncentrace imidazolu vymývají nespecificky navázané proteiny. Další využitý pufr byl pufr dialyzační, v němž je důležitou složkou merkaptoethanol, který zajišťuje redukující prostředí a rozrušuje disulfidické můstky.

V jiné práci byl použit bakteriální expresní systém, který měl mezi N-terminální histidinovou kotvou a helikasu vložen thioredoxin [70], který slouží k lepší solubilizaci exprimovaného proteinu. Mezi thioredoxin a helikasu bylo vloženo štěpné místo pro PreScission proteasu, která umožňuje odstranění těchto pomocných sekvencí. Na N-konci purifikovaného proteinu zbyde sekvence Ala-Pro. V našem případě, kdy jsme vložili štěpné místo pro TEVpr, na N-konci helikasy zbyde po odštěpení kotvy navíc pouze glycin. Námi použitá TEVpr rozpoznává sedm aminokyselin svého štěpného místa ENLYFQ/G a štěpí za šestou aminokyselinou. Ve zmíněné práci probíhala kultivace bakterií *E. coli* BL21(DE3) přes noc při 16 °C.

V další práci autoři použili plasmid s histidinovou kotvou na N-konci bez dalších pomocných proteinů ve fúzi a provedli pouze jednokrokovou purifikaci pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA agarose. Dostatečné čistoty takto získaného proteinu dosáhli zřejmě díky použití lyzačního pufru s vysokou iontovou silou (pro rozrušení nežádoucích iontových interakcí) a s detergentem Triton X-100 pro rozrušení hydrofobních interakcí

mezi proteiny v lyzátu a purifikovaným proteinem a pro zamezení nespécifických vazeb proteinů z lyzátu na afinitní nosič. Oproti předchozí publikaci byla provedena dialýza v dialyzačním pufru [79]. Právě proto, že purifikační postup v této publikaci zahrnoval pouze jednokrokovou purifikaci, byl zřejmě finální výtěžek helikasy vyšší než výtěžek helikasy připravené v této bakalářské práci. Každý purifikační krok sice zvyšuje čistotu daného proteinu, ale také znamená ztrátu určitého množství čištěného proteinu. Proto je vždy potřeba zvážit, za jakým účelem je protein purifikován, a zvolit optimální kompromis mezi výtěžkem a čistotou

Jako jeden z dalších purifikačních kroků by bylo možné zařadit ionexovou chromatografii. Může být zvolena jako alternativa gelové chromatografie nebo být zařazena před ní. Jako vodítko pro odhad prvních pokusných podmínek pro tento typ purifikace slouží teoreticky spočítaný isoelektrický bod pI. Pro získanou helikasu má hodnotu 7,71. Jelikož pH použitých pufrů bylo 8,00, pracovalo by se s pufrů o $\text{pH} \geq 8,00$ a nosičem by byl anex.

Při měření enzymové aktivity helikasy metodou stanovení fosfátových zbytků malachitovou zelení za použití soupravy Malachite Green Phosphate Detection Kit (Bio-Techne R&D Systems s.r.o.) byla změřena Michaelisova konstanta $K_M = 170 \pm 50 \mu\text{M}$. V jedné již zmíněné publikaci se objevuje i menší hodnota, ve které naměřili hodnotu $K_M = 120 \mu\text{M}$, koncentrace látek obsažené v pufru oproti tomu našemu byly poloviční. Toto měření bylo stanoveno metodou stanovení fosfátových zbytků za použití malachitové zeleně pomocí soupravy QuantiChrom™ ATPase/GTPase Assay Kit od firmy BioAssay Systems [79]. Na druhou stranu se objevují i vyšší hodnoty. V publikaci, kde pracovali s konstruktem helikasy pro měření 3D struktury, naměřili hodnotu $K_M = 191 \pm 26 \mu\text{M}$, složení pufru bylo stejné jako v našem případě. Pro stanovení fosfátu byla využita souprava QuantiChrom™ ATPase/GTPase Assay Kit od firmy BioAssay Systems [70]. Nebo v publikaci zabývající se inhibicí helikasy epigallocatechin-3-gallátem změřili hodnotu $K_M = 345,9 \pm 30,31 \mu\text{M}$. I zde bylo složení pufru stejné jako v našem případě. Pro stanovení ATPasové aktivity helikasy zde byly použity tyto reagenty: 1 mg/ml malachitové zeleně, 2 mg/ml molybdenanu amonného, 0,7 M HCl, 0,05% Triton X-100. Absorbance byla měřena při 630 nm [75]. Hodnota K_M změřená v této bakalářské práci se pohybuje v rozmezí obvykle naměřených hodnot této konstanty.

Výsledná katalytická konstanta k_{cat} měla hodnotu $3,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Tato hodnota je celkem nízká, ale vzhledem k tomu, že NTPasová doména helikas bez přídavku DNA nebo RNA vykazuje nižší aktivitu, není překvapivá [80].

Díky stanovené ATPasové aktivitě metodou stanovení fosfátových zbytků za použití malachitové zeleně je zřejmé, že enzym je aktivní. Může být použit pro enzymologické studie při hledání nových inhibitorů a při vývoji nových testovacích systémů, i pro strukturní studie.

6 Závěr

V této práci se podařilo připravit plasmidy pro bakteriální expresi helikasy virů Zika a Dengue. Jeden z připravených plasmidů byl použit pro expresi a purifikaci helikasy viru Zika. Výtěžek NS3 helikasy viru Zika byl 2,40 mg/l média. Čistota tohoto proteinu byla ověřena pomocí SDS – PAGE a byla prokázána ATPasová aktivita metodou stanovení koncentrace volných fosfátových zbytků pomocí malachitové zeleně.

Získané expresní plasmidy a purifikovaný protein budou použity pro další studium, např. nalezení vhodných inhibitorů těchto enzymů nebo strukturní analýzu enzymu pomocí rentgenové krystalografie.

Použitá literatura

- [1] G.J. Sips, J. Wilschut, J.M. Smit, Neuroinvasive flavivirus infections: Neuroinvasive flavivirus infections, *Rev. Med. Virol.*, 22 (2012) 69–87.
- [2] J. Patterson, M. Sammon, M. Garg, Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World, *West. J. Emerg. Med.*, 17 (2016) 671–679.
- [3] Wong, Jassey, Wang, Wang, Liu, Lin, Virus-Like Particle Systems for Vaccine Development Against Viruses in the Flaviviridae Family, *Vaccines*, 7 (2019) 123.
- [4] P. Simmonds, P. Becher, J. Bukh, E.A. Gould, G. Meyers, T. Monath, S. Muerhoff, A. Pletnev, R. Rico-Hesse, D.B. Smith, J.T. Stapleton, ICTV Report Consortium, ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae, *J. Gen. Virol.*, 98 (2017) 2–3.
- [5] P. Simmonds, P. Becher, J. Bukh, E.A. Gould, G. Meyers, T. Monath, S. Muerhoff, A. Pletnev, R. Rico-Hesse, D.B. Smith, J.T. Stapleton, ICTV Report Consortium, ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae, *J. Gen. Virol.*, 98 (2017) 2–3.
- [6] Z. Zhang, L. Rong, Y.-P. Li, *Flaviviridae* Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019 (2019) 1–17.
- [7] K. Rogers, Aedes: Description, Life Cycle, & Disease Transmission, *Encycl. Br.*
- [8] D.J. Paton, Pestivirus diversity, *J. Comp. Path.* 112 (1995) 215–236
- [9] P.F. Nettleton, G. Entrican, Ruminant pestiviruses, *Br. Vet. J.*, 151 (1995) 615–642.
- [10] M.S. Collett. V. Moennig, M. C. Horzinek, Recent Advances in Pestivirus Research, *J. gen. Virol.* 70 (1989) 253-266.
- [11] L. Liu, H. Xia, N. Wahlberg, S. Belák, C. Baule, Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses, *Virology*, 385 (2009) 351–357.
- [12] O.G. Pybus, J. Thézé, Hepacivirus cross-species transmission and the origins of the hepatitis C virus, *Curr. Opin. Virol.*, 16 (2016) 1–7.
- [13] D.B. Smith, P. Becher, J. Bukh, E.A. Gould, G. Meyers, T. Monath, A.S. Muerhoff, A. Pletnev, R. Rico-Hesse, J.T. Stapleton, P. Simmonds, Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family, *J. Gen. Virol.*, 97 (2016) 2894–2907.
- [14] C. Manickam, A.J. Martinot, R.A. Jones, V. Varner, R.K. Reeves, Hepatic immunopathology during occult hepacivirus re-infection, *Virology*, 512 (2017) 48–55.
- [15] E. Billerbeck, R. Wolfisberg, U. Fahnøe, J.W. Xiao, C. Quirk, J.M. Luna, J.M. Cullen, A.S. Hartlage, L. Chiriboga, K. Ghoshal, W.I. Lipkin, J. Bukh, T.K.H. Scheel, A. Kapoor, C.M. Rice, Mouse models of acute and chronic hepacivirus infection, *Science*, 357 (2017) 204–208.
- [16] D.B. Smith, P. Becher, J. Bukh, E.A. Gould, G. Meyers, T. Monath, A.S. Muerhoff, A. Pletnev, R. Rico-Hesse, J.T. Stapleton, P. Simmonds, Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family, *J. Gen. Virol.*, 97 (2016) 2894–2907.
- [17] M.G. Berg, D. Lee, K. Coller, M. Frankel, A. Aronsohn, K. Cheng, K. Forberg, M. Marcinkus, S.N. Naccache, G. Dawson, C. Brennan, D.M. Jensen, J. Hackett, C.Y. Chiu, Discovery of a Novel Human Pegivirus in Blood Associated with Hepatitis C Virus Co-Infection, *PLOS Pathog.*, 11 (2015):e1005325.
- [18] A. Kapoor, A. Kumar, P. Simmonds, N. Bhuvu, L. Singh Chauhan, B. Lee, A.A. Sall, Z. Jin, S.S. Morse, B. Shaz, P.D. Burbelo, W.I. Lipkin, Virome Analysis of Transfusion Recipients Reveals a Novel Human Virus That Shares Genomic Features with Hepaciviruses and Pegiviruses, *MBio*, 6 (2015):e01466-15.

- [19] S. Greenhalgh, R. Schmidt, T. Day, Fighting the Public Health Burden of AIDS With the Human Pegivirus, *Am. J. Epidemiol.*, 188 (2019) 1586–1594.
- [20] F.X. Heinz, K. Stiasny, Flaviviruses and flavivirus vaccines, *Vaccine*, 30 (2012) 4301–4306.
- [21] Y.-J. Huang, S. Higgs, K. Horne, D. Vanlandingham, Flavivirus-Mosquito Interactions, *Viruses*, 6 (2014) 4703–4730.
- [22] A. Grifoni, Y. Tian, A. Sette, D. Weiskopf, Transcriptomic immune profiles of human flavivirus-specific T-cell responses, *Immunology*, (2020):imm.13161.
- [23] M. Renner, W. Dejnirattisai, L. Carrique, I.S. Martin, D. Karia, S.L. Ilca, S.F. Ho, A. Kotecha, J.R. Keown, J. Mongkolsapaya, G.R. Screaton, J.M. Grimes, Flavivirus maturation leads to the formation of an occupied lipid pocket in the surface glycoproteins, *Nat. Commun.*, 12 (2021) 1238.
- [24] U. Ashraf, J. Ye, X. Ruan, S. Wan, B. Zhu, S. Cao, Usutu Virus: An Emerging Flavivirus in Europe, *Viruses*, 7 (2015) 219–238.
- [25] S. Ramos-Lorente, C. Romero-López, A. Berzal-Herranz, Information Encoded by the Flavivirus Genomes beyond the Nucleotide Sequence, *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (2021) 3738.
- [26] Y. Pan, A. Cheng, M. Wang, Z. Yin, R. Jia, The Dual Regulation of Apoptosis by Flavivirus, *Front. Microbiol.*, 12 (2021) 654494.
- [27] W. Kong, H. Li, J. Zhu, Zika virus: The transboundary pathogen from mosquito and updates, *Microb. Pathog.*, 114 (2018) 476–482.
- [28] M. Bollati, K. Alvarez, R. Assenberg, C. Baronti, B. Canard, S. Cook, B. Coutard, E. Decroly, X. de Lamballerie, E.A. Gould, G. Grard, J.M. Grimes, R. Hilgenfeld, A.M. Jansson, H. Malet, E.J. Mancini, E. Mastrangelo, A. Mattevi, M. Milani, G. Moureau, et al., Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design, *Antiviral Res.*, 87 (2010) 125–148.
- [29] C. Baronti, J. Sire, X. de Lamballerie, G. Quérat, Nonstructural NS1 proteins of several mosquito-borne Flavivirus do not inhibit TLR3 signaling, *Virology*, 404 (2010) 319–330.
- [30] J.Y. Leung, G.P. Pijlman, N. Kondratieva, J. Hyde, J.M. Mackenzie, A.A. Khromykh, Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly, *J. Virol.*, 82 (2008) 4731–4741.
- [31] P.Y. Ke, The Multifaceted Roles of Autophagy in Flavivirus-Host Interactions, *Int. J. Mol. Sci.*, 19 (2018) 3940.
- [32] World Health Organization, *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. Geneva, Switzerland: 2009
- [33] M.K. Kindhauser, T. Allen, V. Frank, R.S. Santhana, C. Dye, Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus, *Bull. World Health Organ.*, 94 (2016) 675-686C.
- [34] D. Musso, D.J. Gubler, Zika Virus, *Clin. Microbiol. Rev.*, 29 (2016) 487–524.
- [35] J. Sun, S. Du, Z. Zheng, G. Cheng, X. Jin, Defeat Dengue and Zika Viruses With a One-Two Punch of Vaccine and Vector Blockade, *Front. Microbiol.*, 11 (2020) 362.
- [36] European Centre for Disease Prevention and Control Zika virus disease in Var department, France – 16 October 2019 ECDC: Stockholm; 2019
- [37] C.A. Klofstad, J.E. Uscinski, J.M. Connolly, J.P. West, What drives people to believe in Zika conspiracy theories?, *Palgrave Commun.*, 5 (2019) 36.
- [38] A.I. Chiramel, S.M. Best, Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis, *Virus Res.*, 254 (2018) 34–40.
- [39] M. Díaz-Menéndez, C. Crespillo-Andújar, *Zika Virus Infection: Risk of Spreading in Europe*, Springer International Publishing, Cham, 2017.

- [40] Q. Liang, Z. Luo, J. Zeng, W. Chen, S.-S. Foo, S.-A. Lee, J. Ge, S. Wang, S.A. Goldman, B.V. Zlokovic, Z. Zhao, J.U. Jung, Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy, *Cell Stem Cell*, 19 (2016) 663–671.
- [41] R. Gratton, A. Agrelli, P. Tricarico, L. Brandão, S. Crovella, Autophagy in Zika Virus Infection: A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication, *Int. J. Mol. Sci.*, 20 (2019) 1048.
- [42] C.B. Marcondes, *Arthropod Borne Diseases*, Springer International Publishing, Cham, 2017.
- [43] N. Ahmad, A.U. Rehman, S.L. Badshah, A. Ullah, A. Mohammad, K. Khan, Molecular dynamics simulation of zika virus NS5 RNA dependent RNA polymerase with selected novel non-nucleoside inhibitors, *J. Mol. Struct.*, 1203 (2020) 127428.
- [44] Guillain-Barré Syndrome Fact Sheet, NINDS, National Institutes of Health Bethesda, MD 20892 June 2018. <https://www.ninds.nih.gov/disorders/patient-caregiver-education/fact-sheets/Guillain-barr%C3%A9-syndrome-fact-sheet#top>
- [45] V. Blažek, Zvětšuje se dál lidský mozek?, *Vesmír*, 86 (2007) 276
- [46] C.G. Woods, Human microcephaly, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 14 (2004) 112–117.
- [47] C. Smith, Microcephaly Then and Now, (2014) www.prezi.com/microcephaly-then-and-now
- [48] B.E.E. Martina, P. Koraka, A.D.M.E. Osterhaus, Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View, *Clin. Microbiol. Rev.*, 22 (2009) 564–581.
- [49] M.G. Guzman, E. Harris, Dengue, *The Lancet*, 385 (2015) 453–465.
- [50] K.C. Wei, W.-J. Wei, Y.-S. Liu, L.-C. Yen, T.-H. Chang, Assessment of Prolonged Dengue Virus Infection in Dermal Fibroblasts and Hair-Follicle Dermal Papilla Cells, *Viruses*, 12 (2020) 267.
- [51] D.A. Muller, A.C.I. Depelsenair, P.R. Young, Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection, *J. Infect. Dis.*, 215 (2017) S89–S95.
- [52] E. Holmes, S. Twiddy, The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus, *Infect. Genet. Evol.*, 3 (2003) 19–28.
- [53] D.J. Gubler, Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, *Clin. Microbiol. Rev.*, 11 (1998) 17.
- [54] K. Patel, L. Dauphin, Of Mosquitoes and Models: Tracking Disease by Satellite, (2020), <https://earthobservatory.nasa.gov/features/disease-vector>
- [55] K.H. Sellahewa, Pathogenesis of Dengue Haemorrhagic Fever and Its Impact on Case Management, *ISRN Infect. Dis.*, 2013 (2013) 1–6.
- [56] O. Lisova, L. Belkadi, H. Bedouelle, Direct and indirect interactions in the recognition between a cross-neutralizing antibody and the four serotypes of dengue virus: Cross-recognitions between antibody 4E11 and the four Dengue viruses, *J. Mol. Recognit.*, 27 (2014) 205–214.
- [57] R. Chen, N. Vasilakis, Dengue — Quo tu et quo vadis?, *Viruses*, 3 (2011) 1562–1608
- [58] R. Narayan, S. Tripathi, Intrinsic ADE: The Dark Side of Antibody Dependent Enhancement During Dengue Infection, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 10 (2020) 580096.
- [59] Pan American Health Organization / World Health Organization., *Epidemiological Update: Dengue*, (2019).
- [60] J. Jaratsittisin, B. Xu, W. Sornjai, Z. Weng, A. Kuadkitkan, F. Li, G.-C. Zhou, D.R. Smith, Activity of vitamin D receptor agonists against dengue virus, *Sci. Rep.*, 10 (2020) 10835.

- [61] Dengue vaccine: WHO position paper Weekly Epidemiological record, 30 (2016)
- [62] A. Zacheo, J. Hodek, D. Witt, G.F. Mangiatordi, Q.K. Ong, O. Kocabiyik, N. Depalo, E. Fanizza, V. Laquintana, N. Denora, D. Migoni, P. Barski, F. Stellacci, J. Weber, S. Krol, Multi-sulfonated ligands on gold nanoparticles as virucidal antiviral for Dengue virus, *Sci. Rep.*, 10 (2020) 9052.
- [63] M. Rai, S.D. Deshmukh, A.P. Ingle, I.R. Gupta, M. Galdiero, S. Galdiero, Metal nanoparticles: The protective nanoshield against virus infection, *Critical Reviews in Microbiology*, 42:1 (2016) 46-56
- [64] S.L. Badshah, N. Ahmad, A. Ur Rehman, K. Khan, A. Ullah, A. Alsayari, A.B. Muhsinah, Y. N. Mabkhot, Molecular docking and simulation of Zika virus NS3 helicase, *BMC Chem.*, 13 (2019) 67.
- [65] W. Cheng, S. Dumont, I. Tinoco, C. Bustamante, NS3 helicase actively separates RNA strands and senses sequence barriers ahead of the opening fork, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104 (2007) 13954–13959.
- [66] K.J. Marians, Helicase structures: a new twist on DNA unwinding, *Structure*, 5 (1997) 1129–1134.
- [67] S.S. Patel, I. Donmez, Mechanisms of Helicases, *J. Biol. Chem.*, 281 (2006) 18265–18268.
- [68] E. Jankowsky, RNA helicases at work: binding and rearranging, *Trends Biochem. Sci.*, 36 (2011) 19–29.
- [69] R. Jain, J. Coloma, A. García-Sastre, A.K. Aggarwal, Structure of the NS3 helicase from Zika virus, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 23 (2016) 752–754.
- [70] H. Tian, X. Ji, X. Yang, Z. Zhang, Z. Lu, K. Yang, C. Chen, Q. Zhao, H. Chi, Z. Mu, W. Xie, Z. Wang, H. Lou, H. Yang, Z. Rao, Structural basis of Zika virus helicase in recognizing its substrates, *Protein Cell*, 7 (2016) 562–570.
- [71] D. Luo, N. Wei, D.N. Doan, P.N. Paradkar, Y. Chong, A.D. Davidson, M. Kotaka, J. Lescar, S.G. Vasudevan, Flexibility between the Protease and Helicase Domains of the Dengue Virus NS3 Protein Conferred by the Linker Region and Its Functional Implications, *J. Biol. Chem.*, 285 (2010) 18817–18827.
- [72] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.6.3, Schrödinger, LLC
- [73] The Hepatitis C Virus NS3 Protein: A Model RNA Helicase and Potential Drug Target, *Curr. Issues Mol. Biol.*, (2007).
- [74] J. Lescar, S. Soh, L.T. Lee, S.G. Vasudevan, C. Kang, S.P. Lim, The Dengue Virus Replication Complex: From RNA Replication to Protein-Protein Interactions to Evasion of Innate Immunity, v: R. Hilgenfeld, S.G. Vasudevan (Eds.), *Dengue Zika Control Antivir. Treat. Strateg.*, Springer Singapore, Singapore, (2018) 115–129.
- [75] D. Kumar, N. Sharma, M. Aarthy, S.K. Singh, R. Giri, Mechanistic Insights into Zika Virus NS3 Helicase Inhibition by Epigallocatechin-3-Gallate, *ACS Omega*, 5 (2020) 11217–11226.
- [76] K.E. Du Pont, R.B. Davidson, M. McCullagh, B.J. Geiss, Motif V regulates energy transduction between the flavivirus NS3 ATPase and RNA-binding cleft, *J. Biol. Chem.*, 295 (2020) 1551–1564.
- [77] M.K. Studer, L. Ivanović, M.E. Weber, S. Marti, S. Jonas, Structural basis for DEAH-helicase activation by G-patch proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 117 (2020) 7159–7170.
- [78] T. Xu, A. Sampath, A. Chao, D. Wen, M. Nanao, P. Chene, S.G. Vasudevan, J. Lescar, Structure of the Dengue Virus Helicase/Nucleoside Triphosphatase Catalytic Domain at a Resolution of 24 Å, *J. Virol.*, 79 (2005) 10278–10288.

- [79] S. Xu, Y. Ci, L. Wang, Y. Yang, L. Zhang, C. Xu, C. Qin, L. Shi, Zika virus NS3 is a canonical RNA helicase stimulated by NS5 RNA polymerase, *Nucleic Acids Res.*, 47 (2019) 8693–8707.
- [80] S.J. Johnson, M.K. Yim, Closing in on ATPase Activity by an RNA Helicase, *Structure*, Cell Press, 28 (2020) 143–144.

Příloha 1

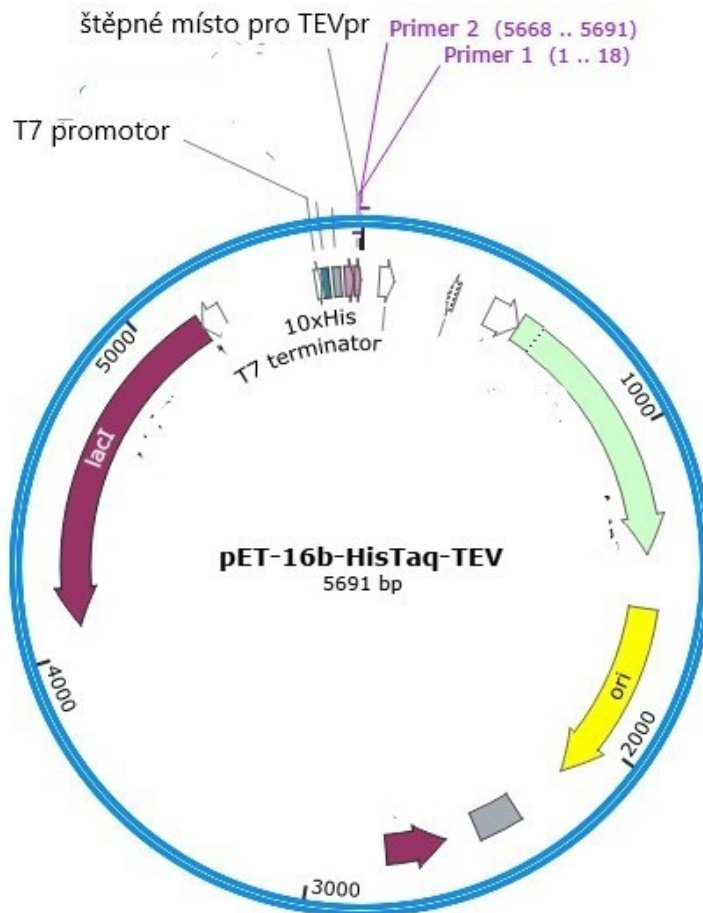
Seznam použitých primerů

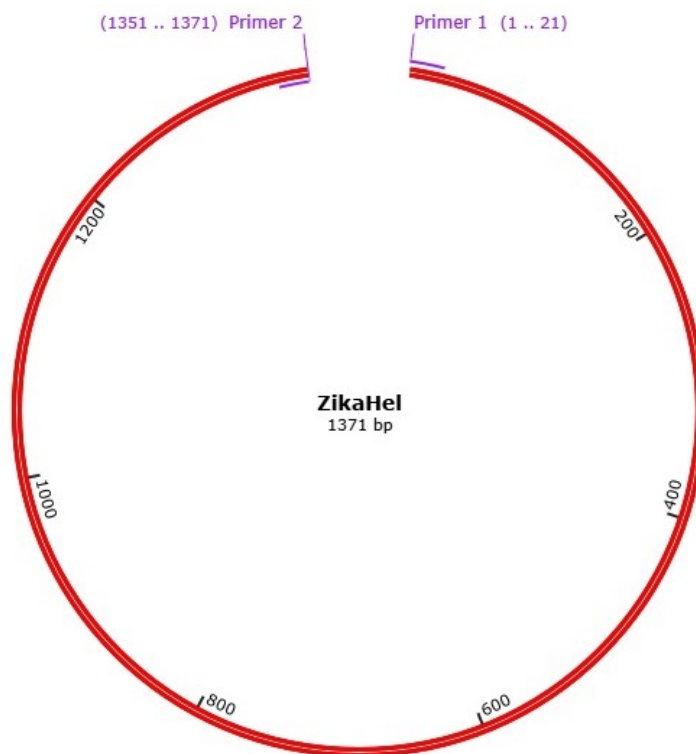
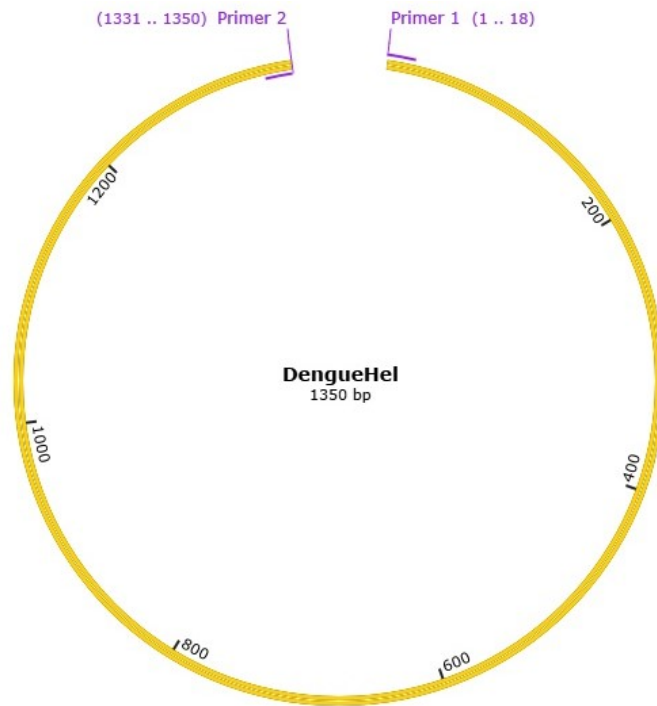
Název primeru	Sekvence (5' - 3')	Popis
UpVectHelZika	AAGATAATAGGGCTGCTAACAAAGCCCG	Přímý primer vektoru ZIKV
DwnVectHelZika	TTATAGCACTACCCTGAAAATACAGGTTTTTCATG	Zpětný primer vektoru ZIKV
UpInsHelZika	TTTTTCAGGGTAGTGCTATAACCCAGGGAAAG	Přímý primer insertu ZIKV
DwnInsHelZika	GTTAGCAGCCCTATTATCTTTTTCCAGCGGC	Zpětný primer insertu ZIKV
DenHVectup	AAAGTAATAGGGCTGCTAACAAAGCCCG	Přímý primer vektoru DENV
DenHVectdwn	CTTCAATGCTACCCTGAAAATACAGGTTTTTCATG	Zpětný primer vektoru DENV
DenHINSup	TTTTTCAGGGTAGCATTGAAGACAACCCC	Přímý primer insertu DENV
DenHINSdwn	GTTAGCAGCCCTATTACTTTCTTCCGGCTG	Zpětný primer insertu DENV

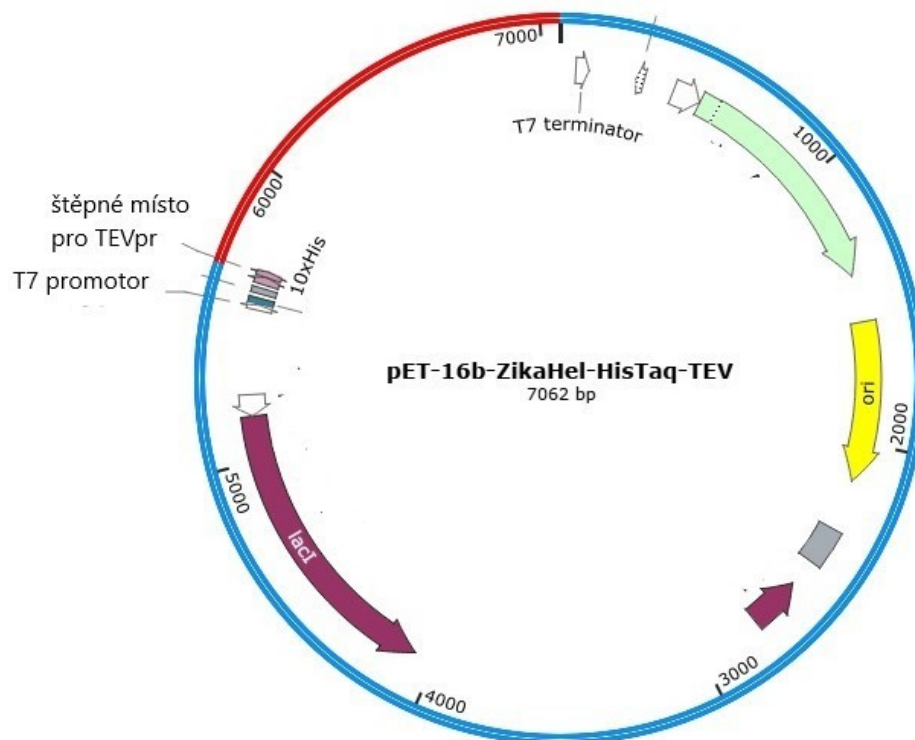
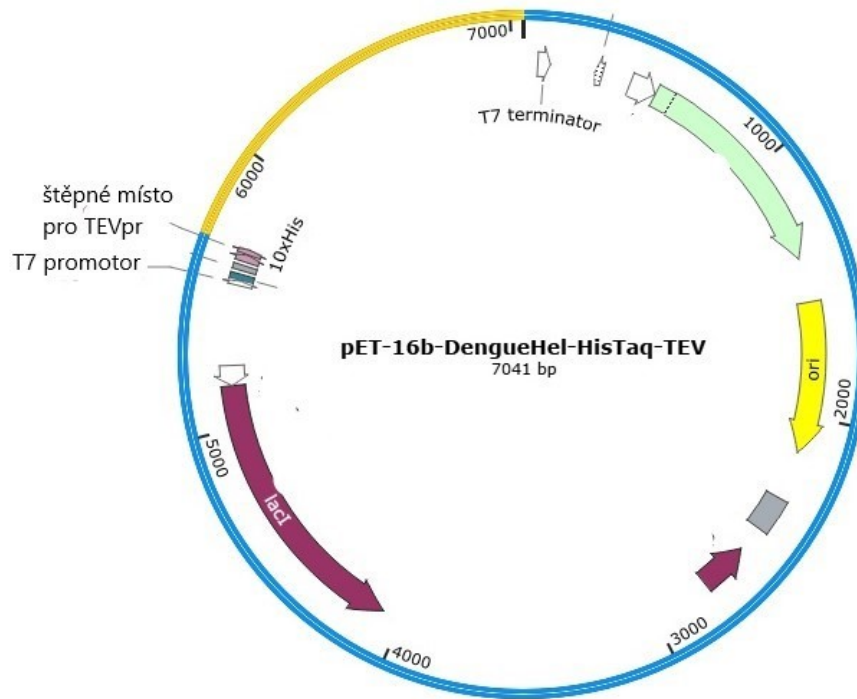
Příloha 2

Gibson Assembly

Na mapách jsou znázorněny fragmenty insertů a vektoru použité k metodě Gibson Assembly. U výchozích fragmentů jsou vyznačeny primery navržené pro zdařilou amplifikaci fragmentu.







Příloha 3

Aminokyselinové sekvence obou fúzních proteinů

HisTaq-TEV-DengueHel

MGHHHHHHHHHHENLYFQGSIEDNPEIEDDIFRKRRLTIMDLHPGAGKTKRYLPAIVRE
AIKRGRLRTLILAPTRVVAEMEEALRGLPIRYQTPAIRAHTGREIVDLMCHATFTMRL
LSPVRVPNYNLIIMDEAHFTDPASIAARGYISTRVEMGEAAGIFMTATPPGSRDPFPQS
NAPIIDEEREIPERSWNSGHEWVTDKFKGKTWVWFVPSIKAGNDIAACLKNGKVIQLSR
KTFDSEYVKTRTNDWDFVVTDDISEMGANFKAERVIDPRRCMKPVILTDGEERVILAGP
MPVTHSSAAQRRGRIGRNPKNENDQYIYMGEPLENDEDCAHWKEAKMLLDNINTPEGII
PSMFEPEREKVDAIDGEYRLRGEARKTFVDLMRRGDLPVWLAYKVAEGINYADRRWCF
DGIKNNQILEENVEVEIWTKEGERKCLKPRWLDARIYSDPLALKEFKFAAGRK

HisTaq-TEV-ZikaHel

MGHHHHHHHHHHENLYFQGSAITQKREEETPVECFEPSMLKKKQLTVLDLHPGAGKTR
RVLPEIVREAIKKRLRTVILAPTRVVAEMEEALRGLPVRYMTTAVKVTHSGTEIVDLM
CHATFTSRLLQPIRVPNYNLYIMDEAHFTDPSSIAARGYISTRVEMGEAAAIFMTATPP
GTRDAFPDSNSPIMDTEVEVPERAWSSGFDWVTDHSGKTWVWFVPSVRNGNEIAACLTKA
GKRVIQLSRKTFEFQKTKNQEWDFVITDDISEMGANFKADRVIDSRCLKPVILDGE
RVILAGPMPVTHASAAQRRGRIGRNPKNPGDEYMYGGCAETDEDHAHWLEARMLLDNI
YLQDGLIASLYRPEADKVAIEGEFKLRTQQRKTFVELMKRGDLPVWLAYQVASAGITY
TDRRWCFDGTNNNTIMEDSVPAEVWTKYGEKRVLKPRWMDARVCSHAALKSFKEFAAG
KR