

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

**Vliv prolinu na pozici 229 na ATPázovou aktivitu
helikázové domény nestrukturního proteinu NS3
viru klíšťové encefalitidy**

**Václav Krásnický
Jihočeský kraj**

České Budějovice 2024

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

**Vliv prolinu na pozici 229 na ATPázovou aktivitu
helikázové domény nestrukturního proteinu NS3
viru klíšťové encefalitidy**

**The effect of prolin in position 229 on the ATPase
activity of the helicase domain
of non-structural protein NS3 of the tick-borne
encephalitis virus**

Autor: Václav Krásnický

Škola: Gymnázium J. V. Jirsíka,
Fráni Šrámka 23, 371 46 České Budějovice

Kraj: Jihočeský

Konzultant: RNDr. Zdeněk Franta, Ph.D.

České Budějovice, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Českých Budějovicích dne 7. 4. 2024.....

Václav Krásnický

Poděkování

Chtěl bych moc poděkovat vedoucímu této práce RNDr. Zdeňku Frantovi, Ph.D. za obrovské úsilí a čas, který mi věnoval, ať už se jednalo o každou jednu laboratorní techniku, kterou mi musel vysvětlit, velké množství teorie, na kterém tato práce stojí a které se mnou musel probrat, a konečně i nespočet revizí, kterými prošel samotný text této práce. Díky panu doktorovi se mi dostalo mimořádné příležitosti rozšířit své znalosti v oblasti, která mě zajímá, a získal jsem zkušenost, ze které budu velice dlouho čerpat. Děkuji.

Chtěl bych také poděkovat Ing. Šárce Petákové za dohled a pomoc, které mi věnovala u velké části laboratorních úkonů, za velikou trpělivost, která byla často potřeba, a především za kamarádský přístup.

Dále bych chtěl poděkovat své rodině, která mě celou dobu podporovala a díky které jsem se mohl této práci naplno věnovat.

A jako z dobrého důvodu posledního děkuji Marku Pučejdlovi za velké množství vyžádaných, ještě větší množství nevyžádaných, ale téměř vždy cenných rad, které mi poskytl.

Anotace

Cílem práce bylo vyprodukovat a purifikovat dva proteiny: helikázovou doménu nestrukturního proteinu NS3 viru klíšťové encefalitidy a její mutantní variantu, ve které byl prolin na pozici 229 cílenou mutagenezí nahrazen alaninem, a následně zjistit ATPázovou aktivitu mutantního proteinu. Oba proteiny byly úspěšně získány a enzymatická aktivita mutantního proteinu zdárně změřena. Tato aktivita byla ve srovnání s helikázovou doménou NS3 značně oslabena, z čehož vyplývá, že prolin na pozici 229 je zásadní pro správnou funkčnost enzymu. Detailní charakteristika mutovaného proteinu může být použita pro vývoj specifického allosterického inhibitoru proti VKE.

Klíčová slova

Virus klíšťové encefalitidy • helikázová doména nestrukturního proteinu NS3 • Enzymatická aktivita • afinita k jednovláknové RNA • Prolin na pozici 229 • allosterie

Annotation

The goal of this thesis was to produce and purify two proteins: the helicase domain of non-structural protein NS3 and its mutant variant, in which the proline in position 229 was substituted with alanine by site-directed mutagenesis, and afterwards to test the ATPase activity of said mutant protein. Both proteins were successfully produced and purified and the mutant was tested. By comparison to the unchanged helicase domain of NS3, the mutant's enzymatic activity was significantly weakened, which points to the conclusion that proline in position 229 plays a vital role in the enzyme's function. The detailed characterization of the mutant will pave the way for design of new allosteric inhibitor against TBEV.

Keywords

Tick-borne encephalitis virus • helicase domain of the non-structural protein NS3 • enzymatic activity • affinity to single-stranded RNA • Proline in position 229 • allosterity

Obsah

1	ÚVOD	- 6 -
2	VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY A JEHO PROTEINY	- 8 -
2.1	FLAVIVIRY	- 8 -
2.2	VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY	- 9 -
2.2.1	Struktura virové částice	- 10 -
2.2.2	Životní cyklus VKE	- 12 -
2.3	NESTRUKTURNÍ PROTEIN NS3	- 14 -
2.3.1	Helikázová doména NS3	- 15 -
2.3.2	Závislost NTPázové aktivity na přítomnosti ssRNA	- 16 -
3	PRINCIPY VYBRANÝCH METOD	- 18 -
3.1	BAKTERIÁLNÍ EXPRESNÍ SYSTÉM	- 18 -
3.1.1	Buňky <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL	- 18 -
3.1.2	Plasmid pET-19b	- 19 -
3.1.3	T7 expresní systém	- 20 -
3.2	PILOTNÍ PRODUKCE	- 21 -
3.3	GELOVÁ ELEKTROFORÉZA SDS-PAGE	- 22 -
3.4	KOLONOVÁ CHROMATOGRRAFIE	- 23 -
3.4.1	Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech	- 25 -
3.4.2	Heparinová afinitní chromatografie	- 26 -
3.4.3	Velikostně vylučovací chromatografie	- 27 -
3.5	ENZCHEK® PHOSPHATE ASSAY KIT	- 28 -
4	MATERIÁL A METODY	- 29 -
4.1	OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO PRODUKCI NS3HP	- 29 -
4.1.1	Transformace <i>E. coli</i>	- 29 -
4.1.2	Pilotní produkce	- 29 -
4.1.3	Příprava vzorků na analýzu	- 30 -
4.1.4	Analýza vzorků pomocí gelové elektroforézy (SDS-PAGE)	- 30 -
4.2	VELKOOBJEMOVÁ PRODUKCE NS3HP A NS3H	- 31 -
4.3	PURIFIKACE NS3HP A NS3H	- 31 -
4.3.1	Lýza buněk	- 31 -
4.3.2	Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech	- 32 -
4.3.3	Heparinová afinitní chromatografie	- 32 -
4.3.4	Velikostně vylučovací chromatografie	- 33 -
4.3.5	Měření koncentrace pomocí NanoDrop™ One	- 33 -
4.4	BIOCHEMICKÁ ANALÝZA NS3HP A NS3H S VYUŽITÍM ENZCHEK® PHOSPHATE KIT	- 33 -
4.4.1	Standardní fosfátová křivka	- 34 -
4.4.2	Ověření optimální koncentrace NS3H	- 34 -
4.4.3	Zjištění optimální koncentrace NS3HP	- 35 -
4.4.4	Enzymová kinetika	- 35 -
5	VÝSLEDKY	- 37 -
5.1	PRODUKCE NS3HP	- 37 -
5.1.1	Pilotní produkce	- 37 -
5.1.2	Velkoobjemová produkce	- 37 -
5.2	PRODUKCE NS3H	- 38 -
5.3	PURIFIKACE NS3HP A NS3H	- 38 -
5.3.1	Lýza buněk	- 38 -
5.3.2	Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech	- 38 -
5.3.3	Heparinová afinitní chromatografie	- 41 -
5.3.4	Velikostně vylučovací chromatografie	- 43 -
5.4	BIOCHEMICKÁ ANALÝZA NS3HP A NS3H S VYUŽITÍM ENZCHEK® PHOSPHATE KIT	- 46 -

5.4.1 Standardní fosfátová křivka	- 47 -
5.4.2 Ověření optimální koncentrace NS3H	- 47 -
5.4.3 Zjištění optimální koncentrace NS3Hp	- 48 -
5.4.4 Enzymová kinetika	- 48 -
6 DISKUZE	- 51 -
7 ZÁVĚR	- 53 -
SEZNAM ZDROJŮ.....	- 54 -
SEZNAM PŘÍLOH.....	- 57 -

1 ÚVOD

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) je závažný lidský patogen, který v některých případech způsobuje záněty centrální nervové soustavy, souhrnně označované jako klíšťová encefalitida (KE). Patří do rodu flavivirů. Řada dalších zástupců z této skupiny je rovněž patogenních (např. virus západonilské horečky, ZIKA nebo Dengue) a způsobuje mnohá závažná onemocnění, jakými jsou např. hemorhagické horečky či encefalitidy [6].

Proti VKE se lze preventivně chránit očkováním stejně jako proti některým dalším flavivirům. Míra proočkovanosti populace je však v řadě rizikových oblastí (včetně Evropy) nízká. V současné době navíc neexistuje žádná účinná léčba a značná pozornost je věnována vývoji specifických antivirotik, jež by byly schopny narušit životní cyklus viru v lidském hostiteli, a tím mírnit nebo přímo léčit příznaky KE [3][19].

Tato práce navazuje na studii provedenou Paulinou D. Aninditou & kol. v roce 2022 na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, která se zabývala jedním ze dvou nestrukturních proteinů VKE, které vykazují enzymatickou aktivitu. Tímto proteinem je nestrukturní protein NS3, konkrétně pak jeho helikázová doména (NS3H), která je nezbytná pro průběh virového životního cyklu (viz kapitola 2.2.2). Pro svou klíčovou úlohu se jedná o slibnou kandidátní molekulu pro vývoj specifických antivirotik. Pokud by se podařilo vyvinout vhodnou léčbu cílící na tento konkrétní protein, došlo by ke značnému oslabení VKE v hostiteli. Problémem NS3H ovšem je, že sdílí řadu podobností s některými helikázami lidského organismu, což nám znemožňuje cílit přímo na aktivní místa tohoto proteinu. Takovou léčbou bychom totiž nepoškodili pouze virus, ale i infikovaného hostitele [3].

Již zmiňovaná studie však odhalila poměrně jedinečný mechanismus v NS3H, který ji od většiny podobných helikáz odlišuje; pro správnou funkci tohoto proteinu je třeba allosterického modifikátoru v podobě jednovláknové RNA (ssRNA) (viz kapitola 2.3.2). Pozornost tedy byla zaměřena na konkrétní aminokyseliny v peptidovém řetězci NS3H, které jsou zodpovědné za afinitu proteinu k ssRNA. Doposud byl testován vliv pěti různých aminokyselin, přičemž jako nejdůležitější pro vazbu se v tuto chvíli jeví arginin na pozici 231. V jeho těsné blízkosti se nachází prolin na pozici 229 (P229). Z nepublikovaných *in silico* experimentů vyplývá, že P229 by rovněž mohl mít na tuto interakci vliv. Cílem této práce je tuto hypotézu ověřit, případně vyvrátit [3].

Za tímto účelem byly v rámci této práce vyprodukovány a purifikovány dva proteiny: NS3H a jeho mutantní varianta, na níž byl cílenou mutagenezí nahrazen prolin na pozici 229 alaninem (P229A), což je velice málo reaktivní aminokyselina. Následně byla otestována enzymatická aktivita mutantního proteinu a jejím porovnáním s NS3H bylo možné určit, jaký je vliv P229 na enzymatickou aktivitu NS3H [3].

Poznámka k členění práce

Tato práce vznikala primárně jako středoškolská odborná činnost, ale také jako práce maturitní, a vzhledem k univerzitnímu prostředí, ve kterém byla prováděna, bylo snahou autora splnit rovněž náležitosti práce vědecké. Této snaze padla za oběť struktura typická pro středoškolskou práci, kterou by bylo možné jednoznačně rozdělit na úvod, teoretickou část, praktickou část a závěr. Výsledkem je práce, která obsahuje *Úvod* následovaný rozsáhlejším teoretickým úvodem, jenž plní funkci teoretické části a je nazván *Virus klišťové encefalitidy a jeho proteiny* (kapitola 2). V akademické práci by následovala kapitola *Materiál a metody* (kapitola 4) popisující přesný průběh všech experimentů. Tu zde však ještě předchází kapitola *Principy vybraných metod* (kapitola 3), která má za cíl objasnit některé zajímavé techniky, jež byly v této práci použity, ale se kterými se obvykle student na úrovni střední školy nedostane do styku. Po kapitole *Materiál a metody* následuje kapitola *Výsledky* (kapitola 5), ve které jsou uvedena veškerá data získaná touto prací. Ke konci práce se nachází kapitola *Diskuze* (kapitola 6), která obsahuje poohlédnutí za celou prací doplněné o návrhy na další možný výzkum. Závěrečnou kapitolou je, jak už tomu tak bývá, *Závěr* (kapitola 7), ve které jsou krátce shrnuty dosažené cíle a výsledky práce.

2 VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY A JEHO PROTEINY

2.1 Flaviviry

Flaviviry jsou rodem obalených virů z čeledi *Flaviviridae*, do kterého řadíme více než 70 zástupců. Jejich genetická informace má formu jednovláknové RNA (ssRNA) s pozitivní polaritou. Jedná se většinou o tzv. arboviry, tedy viry přenášené členovci, typicky komáry nebo klíšťaty. Jejich finálními hostiteli jsou savci (virová replikace však probíhá i v přenašečích), včetně člověka, na něž je virus nejčastěji přenesen při sání krve nakaženým členovcem [6].

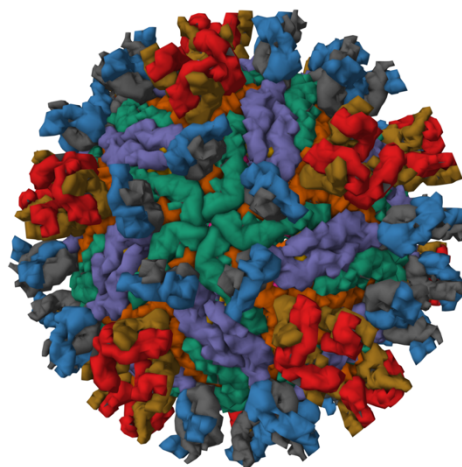
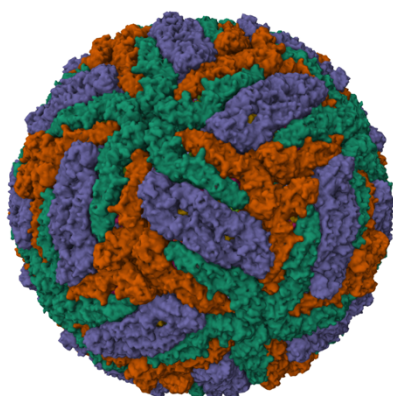
Mnoho flavivirů patří mezi závažné lidské patogeny. Jako příklad můžeme uvést virus Zika (ZIKV), který způsobuje horečku zika, virus Dengue (DENV), původce horečky dengue, virus žluté zimnice (YFV, z anglického „yellow fever virus“) nebo virus způsobující západonilskou horečku (WNV, z anglického „west nile virus“). Většina flavivirových infekcí je bezpříznaková nebo se projevuje příznaky podobnými chřipce (horečkou, bolestí hlavy, kloubů a svalů, nevolností či zvracením). V některých případech však dochází k rozvinutí mnohem závažnějších příznaků, jakými jsou např. meningitida či encefalitida v případě viru klíšťové encefalitidy (VKE), paralýza a žloutenka, ke kterým dochází v některých případech nákazy YFV, nebo vnitřní krvácení způsobené virem Dengue. Více než polovina světové populace je v současnosti ohrožena alespoň jedním flavivirem. Proti některým z nich je možné se preventivně chránit vakcinací, stále však není k dispozici účinná léčba v podobě specifických antivirotik [6].

2.2 Virus klíšťové encefalitidy

Jedním ze zástupců flavivirů je virus klíšťové encefalitidy (VKE, případně TBEV z anglického „Tick-Borne Encephalitis Virus,“ viz obrázek 1). Jím způsobovaná klíšťová encefalitida (KE) je velmi závažné onemocnění postihující člověka, které v některých případech poškozuje centrální nervovou soustavu [19]. Přenašeči tohoto viru jsou klíšťata z čeledi *Ixodidae*, v ČR se jedná o klíště obecné (*Ixodes ricinus*) [22]. Byť přenos klíšťaty je tím nejběžnějším, byly zaznamenány i případy nákazy konzumací nepasterizovaných mléčných produktů infikovaných domácích zvířat [19]. Rozeznáváme pět variant VKE, které se zásadně liší svou virulencí (závažností infekce). Těmito variantami jsou evropská (TBEV-Eu), sibiřská (TBEV-Sib), dálnovýchodní (TBEV-FE) a dvě nedávno objevené: bajkalská (TBEV-Bkl) a himalájská (TBEV-Him) [14][19]. Za zmínku stojí, že jednotlivé varianty se liší jen minimálně co do aminokyselinové sekvence svých proteinů. Z toho lze usuzovat, že jejich značně rozdílná virulence je způsobena pouze několika málo aminokyselinami, případně nekódujícími oblastmi jejich genetické informace (tedy úseky RNA, které nejsou translatovány ribozomy hostitele na proteiny, ale mají signální či regulační funkci) [19].

Zralá virová částice

Nezralá virová částice



(Füzik &kol., 2018)

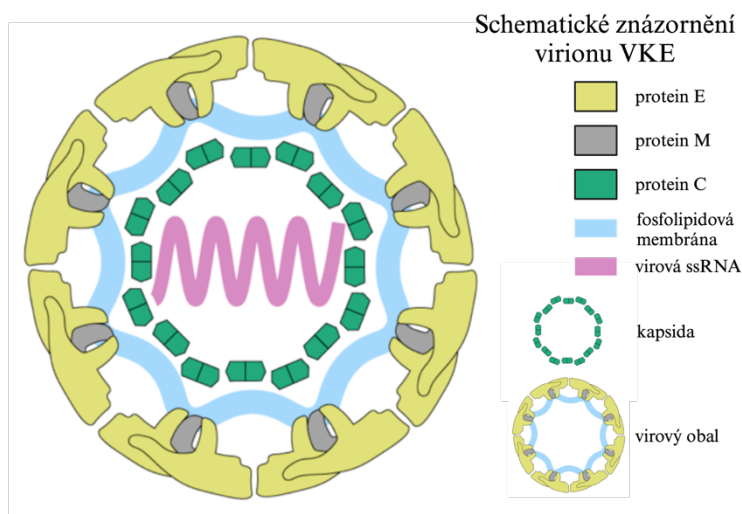
Obrázek 1: Struktura virové obálky VKE. Na obrázku je zobrazeno srovnání zralé virové částice (nalevo) s nezralou (napravo). Tři E-M dimery tvořící základní jednotku ikosaedrální symetrie zralé částice jsou od sebe na levém snímku barevně odlišeny (zelená, fialová, oranžová). Velikosti částic byly upraveny pro potřeby obrázku a vzájemný poměr velikostí je pouze přibližný. Snímky byly pořízeny kryoelektronovou mikroskopií [13]. Zdroj původních snímků: Füzik &kol., 2018 [13]. Snímky upraveny v programu BioRender.com

Ročně je celosvětově hlášeno více než 10 000 případů nákazy VKE. Předpokládá se však, že skutečný počet je značně vyšší, vzhledem k tomu, že onemocnění klíšťovou encefalitidou bývá většinou asymptomatické, případně je v akutní fázi svými příznaky podobné chřipce. V části případů ale dochází k rozvoji encefalitidy či meningitidy, tedy zánětů centrální nervové soustavy (CNS), které jsou provázeny závažnými neurologickými příznaky, jež často přetrvávají řadu let po odeznění akutní fáze. Některé infekce VKE končí i smrtí pacienta.

Smrtnost KE je výrazně variabilní v závislosti na variantě viru. Nejvyšší je u TBEV-FE, kde se pohybuje až okolo 40 % [19].

2.2.1 Struktura virové částice

VKE je, stejně jako ostatní flaviviry, sférickým obaleným virem (tzn. využívajícím ve své virové částici membránu hostitele), jehož částice (viriony) mají průměr přibližně 50nm (viz obrázek 2) [19]. Každý virion nese jednu jednovláknovou nukleovou kyselinu RNA (ssRNA) o pozitivní polaritě (tzn. může být rovnou přepisována do proteinů bez předchozí tvorby komplementárního vlákna) a délce přibližně 11 000 dusíkatých bází. Tato ssRNA obsahuje jeden otevřený čtecí rámeček (ORF, z anglického „open reading frame“), který je z obou stran doplněn o nekódující oblasti, tzv. 5'UTR a 3'UTR (z anglického „untranslated region“), podle nichž nejsou tvořeny proteiny, ale hrají důležitou roli při virové replikaci. Posledním komponentem virové nukleové kyseliny je koncová struktura na 5'UTR zvaná 5' čepička, která chrání virovou RNA před degradací v buňkách hostitele a napomáhá iniciaci translace [6]. Genetická informace je schematicky znázorněna na obrázku 3. Tato ssRNA kóduje pro jediný protein (tzv. polyprotein), který je následně enzymaticky štěpen na jednotlivé strukturální a nestrukturní proteiny. Těmito proteiny jsou: tři strukturální proteiny C, E a M, jimiž se zabývá následující text, a sedm nestrukturních proteinů (NS1-NS5)ⁱ, o kterých se pojednává v kapitolách níže [19].



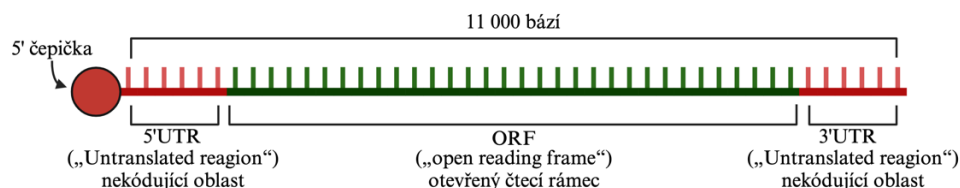
Obrázek 2: Schematické znázornění virionu VKE [19]. Původní obrázek: Pulkkinen & kol., 2018 [19]. Obrázek upraven pomocí programu BioRender.com

Nejvnitřnějším obalem nukleové kyseliny je kapsida (případně nukleokapsida, hovoříme-li o struktuře včetně uvnitř obsažené nukleové kyseliny), tvořená více jednotkami kapsidového

ⁱ označení *nestrukturní* neznamená, že by snad tyto proteiny neměly vlastní strukturu: mají vlastní primární, sekundární i terciární strukturu. Virové proteiny dělíme podle toho, zda jsou součástí struktury virionu (strukturální), či nikoliv (nestrukturní). Všechny tyto proteiny jsou však nezbytné pro existenci viru. Nestrukturní proteiny jsou důležité pro např. replikaci viru v buňkách, interakci s imunitním systémem hostitele nebo zastávají funkci kofaktorů

proteinu (protein C). V současné době máme více poznatků o samotném proteinu C než o celé kapsidě, jejíž struktura není zcela objasněna. Předpokládá se, že virion obsahuje přibližně 500 kopií tohoto proteinu. Přesná struktura proteinu C byla identifikována u několika flavivirů (např. DENV, ZIKV WNV, VKE). I přes poměrně velkou variabilitu v primární struktuře (tj. pořadí aminokyselin v peptidovém řetězci) sdílí všechny proteiny C jednotlivých virů obdobnou sekundární a terciární strukturu, tedy prostorové uspořádání. Protein C z VKE má 105 aminokyselin a tvoří antiparalelní dimer [19].

ssRNA viru klíšťové encefalitidy



Obrázek 3: Schematické znázornění virové ssRNA VKE [6]. Obrázek vytvořen v programu BioRender.com

Obal virionu VKE tvoří fosfolipidová membrána, do které jsou zasazeny dva virové proteiny, jež označujeme jako protein E (z anglického „envelope“ protein) a protein M (z anglického „membrane“ protein). Oba proteiny jsou v membráně (pocházející původně z drsného endoplazmatického retikula hostitele) zasazeny v takovém množství, že kryjí celý její povrch a způsobují její deformaci. Společně pak vytvářejí E-M heterodimery. Tři takovéto dimery tvoří základní jednotku ikosahedrální symetrie celého virionu. Tento virový obal je také zodpovědný za hladký povrch zralé virové částice, jenž je pro flaviviry typický. Snímek struktury virionu VKE byl již s využitím kryoelektronové mikroskopie pořízen (Füzik, 2018) a je k nalezení na obrázku 1 [19].

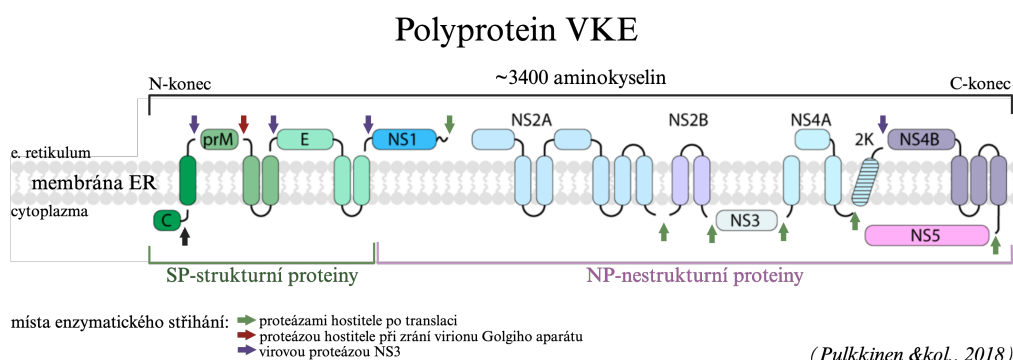
Peptidový řetězec proteinu E se skládá ze 496 aminokyselin. Každý monomer proteinu E má čtyři domény, z nichž tři vytváří ektodoménu, která pokrývá povrch virového obalu. Jedná se o glykoprotein, tedy o protein obsahující tzv. glykosylační oblast, kam se může navázat sacharid, nebo derivát sacharidu. To hraje významnou roli při opouštění buňky virem. Při zkoumání kryoelektronovou mikroskopií byla na tomto místě pozorována látka, která svou hustotou odpovídá N-acetyl-D-glukosaminu. Protein E je rovněž zásadní při pronikání viru do buňky a při uvolňování virové RNA do cytoplasmy (viz kapitola 2.2.2) [19].

Protein M je mnohem menší než protein E. Skládá se pouze ze 75 aminokyselin a slouží nejspíše jako stmelovací protein, který spojuje jednotlivé proteiny E dohromady, za vzniku heterotetrameru E-M-M-E, které jsou základní stavební jednotkou virového obalu. Další předpokládanou funkcí proteinu M je zabránění předčasné konformační změně, kterou prochází protein E při nízkém pH, a uvolňuje tak RNA z endozomu do cytoplasmy (viz kapitola 2.2.2). Protein M je translatován v podobě tzv. „pre-membrane protein“ (prM), který je více než dvakrát delší (162 aminokyselin) a jehož následná (post-translační) úprava v Golgiho aparátu je zásadním procesem pro maturaci virionů [19].

2.2.2 Životní cyklus VKE

Životní cyklus VKE po infekci organismu obnáší proniknutí do buňky, syntézu virových proteinů a replikaci virové RNA, sestavení a maturaci virionů a následně opuštění buňky. Následující shrnutí se bude zabývat pouze virovým cyklem v savčím hostiteli, který sice probíhá i v klíštěti, ale je do značné míry neprozkoumán [19].

Virus proniká do buňky nejčastěji na základě receptory-řízené endocytózy. Předpokládá se, že povrchové struktury virionu jsou rozpoznány buněčnými receptory buďto laminin-vázajícím proteinem (anglicky „laminin-binding protein“, LBP), nebo $\alpha V\beta 3$ integrinem. Proniknutí do buňky může proběhnout bez již zmíněného sacharidového derivátu (navázaného na glykosylační oblast proteinu E), ale jeho absence významně snižuje schopnost viru infikovat nervové buňky. Po navázání virionu na receptor dochází k endocytóze. Membrána spolu s virem se vchlípí dovnitř za vzniku membránového váčku, endosomu [19].



Obrázek 4: Schematické znázornění virové polyproteinu VKE v membráně endoplazmatického retikula (ER) [19]. Původní obrázek: Pulkkinen & kol., 2018 [19].
Obrázek upraven v programu BioRender.com

Uvnitř endosomu dochází k prudkému snížení pH v rámci štěpných procesů buňky. To spustí konformační změny proteinu E, které vedou ke splynutí virové a endosomální membrány a k uvolnění nukleokapsidy do cytosolu. Zde dojde k jejímu rozpadu a uvolnění virové RNA. Přesný mechanismus rozpadu není u VKE znám, ovšem u DENV se ukázalo, že souvisí s procesy, které jsou vlastní eukaryotickým buňkám a slouží k odstraňování poškozených proteinů [19].

Virová RNA je po uvolnění do vnitřního prostoru buňky translatována hostitelskými ribozomy na membráně drsného endoplazmatického retikula (ER) za vzniku polyproteinu o délce zhruba 3400 aminokyselin. Ten prochází dovnitř a ven membránou ER tak, aby se jednotlivé strukturální (SP) a nestrukturní (NP) proteiny, které vzniknou jeho enzymatickým rozstříháním, nacházely na té straně membrány, kde mají plnit svou funkci. Část proteinů membránou přímo prochází, což má také svou roli v následujících procesech. Po syntéze polyproteinu dochází k jeho stříhání, které vykonávají zejména virové (NS3), ale i hostitelské proteázy. Schematické zobrazení polyproteinu se nachází na obrázku 4 [19].

Výsledkem štěpení jsou tři SP (protein C, protein E a protein prM) a sedm NP (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5) [19]. Hlavní funkcí NP je tvorba tzv. RNA-replikačního

komplexu, který následně slouží, jak název napovídá, k replikaci virové RNA. Jedinými NP, které vykazují enzymatickou činnost, jsou NS3 a NS5. Ostatní proteiny pak buďto slouží jako jejich kofaktory, nebo je vážou k membráně ER, kterou zároveň deformují a vytvářejí v ní specifickou vchlípeninu, tzv. replikační kompartment. Zde poté probíhá samotná replikace. NS3 zastává enzymatickou funkci proteázy, RNA helikázy, nukleosidtrifosfatázy a RNA trifosfatázy. NS5 pak katalyzuje reakce související se syntézou 5' čepičky (methyltransferázová a guanylyltransferázová aktivita), především však funguje jako samotná RNA-dependentní RNA polymeráza [6]. Oba proteiny se nacházejí na cytosolové straně ER membrány, uvnitř replikačního kompartmentu, kde následně dochází k replikaci virové RNA [19].

Nově vzniklé kopie RNA nacházející se na cytosolové straně membrány ER jsou obalovány proteinem C za vzniku nukleokapsidy. Byť samotná vazba RNA na protein C je podle všeho nescifického charakteru, existují různé mechanismy, které zajišťují, že nedochází k obalování převážně jiných RNA (např. mRNA hostitele) než té nesoucí genetickou informaci viru. Výzkum ostatních flavivirů naznačuje, že jedním z těchto mechanismů by mohlo být časové provázání procesů replikace RNA a translace proteinu C. Tím je zajištěno, že se protein C a virové RNA budou vyskytovat v blízkosti membrány ER ve stejnou chvíli a jejich vzájemná interakce tak bude pravděpodobnější než vazba proteinu na jinou RNA. Další variantou je, že skládání kapsidy není způsobeno pouze vlastnostmi proteinu C, ale že se na něm podílejí i některé virové NP, které RNA specifitu způsobují [19].

Po složení nukleokapsidy dochází k jejímu proniknutí do ER a obalení virionu membránou ER, v níž jsou zasazeny proteiny E a prM. Přesný mechanismus obalení nukleokapsidy membránou není objasněn. Proniknutím nukleokapsidy do ER vznikají tzv. nezralé viriony: obsahují ve své membránové obálce prM, tedy proteinový prekurzor (předchůdce) proteinu M. Protein prM tvoří heterodimery s proteinem E. Při pokusech určit strukturu těchto heterodimerů pomocí kryoelektronové mikroskopie, byly opakovaně pořizovány snímky s nižším rozlišením, než jaké je možné získat stejným způsobem u zralých virových částic. To naznačuje, že tyto membránové struktury nezralé částice vykazují vyšší flexibilitu. Povrch nezralých virionů je (na rozdíl od hladkého povrchu zralých virových částic) pokryt řadou hrotů. Rozdílný tvar lze opět připisat proteinu prM, který způsobuje jinou konformaci heterotetrameru na povrchu. Srovnání zralé a nezralé částice je vidět na obrázku 1. Nezralé částice jsou mnohem méně stabilní než ty zralé a nejsou v této podobě schopny infekce dalších buněk [19].

Z ER se nezralé viriony dostávají do Golgiho aparátu. V trans (výstupní) části Golgiho aparátu se nachází oblast s nízkým pH. Když s ní přijde nezralá částice do kontaktu, dochází u ní ke konformačním změnám a její povrch se stává hladkým, stejně jako je tomu tak u zralé částice. Konformačními změnami je zároveň odhalen prM a dochází k odstříhnutí jeho části proteázou hostitele, furinem, čímž vzniká zralý virion [19].

Ne u všech virionů však dochází k úplné maturaci. Vznikají tak pouze částečně zralé virové částice, které jsou však již schopné infekce dalších buněk. Tyto částice jsou značně nejednotné, co do své struktury i antigenity (tj. schopnosti vyvolávat imunitní reakci). Je tedy možné, že se jedná o způsob, kterým se virus vyhýbá imunitnímu systému hostitele. Zralé a částečně zralé viriony opouštějí buňku pomocí exocytózy a napadají další hostitelské buňky [19].

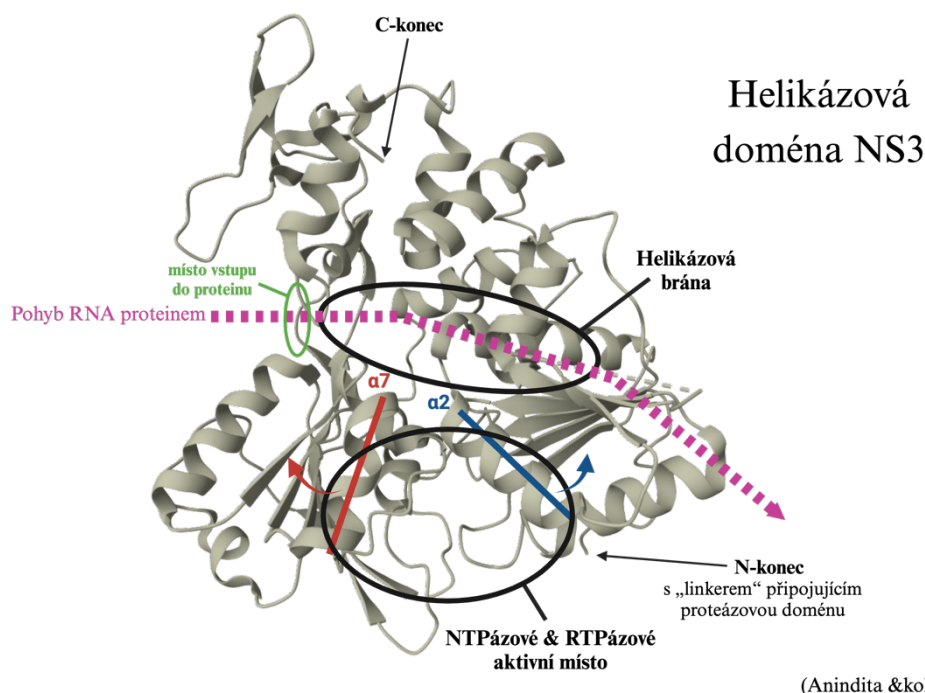
2.3 Nestrukturní protein NS3

V předchozí kapitole bylo nastíněno, jak probíhá životní cyklus VKE v savčích buňkách. Aby probíhat mohl, je zapotřebí řady enzymatických reakcí. Část z nich zajišťují enzymy hostitelské buňky, ale o ty hlavní se musí postarat enzymy samotného viru, které vznikly z virového polyproteinu [6][19]. Těmi jsou již zmíněné nestrukturní proteiny (NP) NS3 a NS5. Oba zastávají hned několik enzymatických funkcí a oba jsou klíčové pro životní cyklus viru [6]. Tato kapitola se ovšem věnuje pouze NP NS3, jenž je středobodem celé této práce.

NS3 (z anglického „non-structural protein 3“) se skládá ze dvou domén. Pod pojmem doména rozumíme strukturní část proteinu, zastávající určitou funkci. Těmito doménami jsou N-terminální (tedy blíže k té straně peptidového řetězce, který je zakončen volnou aminoskupinou) proteázová doména a C-terminální (naopak blíže konci s volnou karboxylovou skupinou) helikázová doména. Zatímco proteázová doména hraje významnou roli ve štěpení virového polyproteinu, u helikázové domény pozorujeme tři navzájem provázané enzymatické aktivity: nukleosidtrifosfátovou aktivitu, RNA trifosfátovou aktivitu a v neposlední řadě RNA helikázovou aktivitu. Obě domény jsou spojeny, krátkým ohebným peptidovým řetězcem, který je označován jako „linker“ (viz obrázek 5). Není zcela jasné, jak úzce jsou činnosti obou domén provázány a zda má přítomnost jedné vliv na funkčnost druhé. Existují studie ukazující, že absence proteázové domény způsobila zásadní pokles aktivity domény helikázové, jiné experimenty ale dokládají, že domény nejsou nijak provázané. Rozdílnost výsledků však může být přisouzena rozdílným technikám, jakými byly jednotlivé experimenty prováděny [6].

2.3.1 Helikázová doména NS3

Helikázová doména NS3 (NS3H) je větší z obou domén tohoto proteinu. Tvoří ji řetězec 434 aminokyselin na C-terminální straně (proteázová doména se oproti tomu skládá pouze ze 172 aminokyselin). Větší délce odpovídá i množství enzymatických aktivit této domény, které byly jmenovány už v předcházejícím textu [3].



Obrázek 5: Model helikázové domény NS3 s přibližným zakreslením aktivních míst [3][6]. Na obrázku jsou dále označeny $\alpha 2$ & $\alpha 7$ helixy, u kterých po navázání ssRNA dochází ke konformačním změnám (viz šipky), které umožní uvolnění P_i z aktivního místa. Poté jsou označeny oba konce peptidového řetězce [3]. Fialová šipka znázorňuje pohyb RNA skrze aktivní místo (helikázovou bránu). Rovněž je označeno místo vstupu dsRNA do proteinu [6]. Model proteinu: Anindita &kol, 2022 [3]. Obrázek vytvořen v programu BioRender.com

První z těchto aktivit je aktivita RNA trifosfátázová (zkráceně RTPázová). Její funkcí je úprava nově vzniklého vlákna virové RNA, ze kterého odštěpuje γ -fosfát (nejkrajnější ze tří fosfátů napojených na poslední nukleotid na 5' konci vlákna) a umožňuje tak tvorbu koncové struktury (5' čepičky), kterou katalyzuje NS5 [6].

Další aktivitou NS3H je nukleosidtrifosfátázová (NTPázová). Enzym štěpí vysokoenergetickou vazbu mezi β - a γ -fosfátem ribonukleosidtrifosfátů (NTP)ⁱⁱ [3][6]. Enzymy katalyzou této reakce získávají energii, jež je následně využita pro třetí enzymatickou činnost této domény, a sice RNA-helikázovou aktivitu. NTPáza je schopna štěpení všech čtyř typů nukleosidtrifosfátů

ⁱⁱ ribonukleosidtrifosfát a nukleosidtrifosfát jsou synonyma. V prvním z nich je pouze zdůrazněna skutečnost, která je v druhém brána za samozřejmou a sice, že v látce je dusíkatá báze navázána na cukr ribózu. Běžně se setkáváme ještě s druhým typem nukleosidu, kde je dusíkatá báze navázána na cukr deoxyribózu. Takový nukleosid by pak měl být označován jako deoxyribonukleosid

(adenosintrifosfát – ATP; guanosintrifosfát – GTP, cytidintrifosfát – CTP, uridintrifosfát – UTP) [3].

Obě výše popsané aktivity (RTPázová a NTPázová) probíhají ve stejné oblasti na NS3H (viz obrázek 5). K poslední, helikázové aktivitě, však dochází v poměrně vzdáleném aktivním místě, které je označováno jako helikázová brána (viz obrázek 5). Tato aktivita enzymu napomáhá rozdělení dvouvláknové RNA (dsRNA) v asociaci s proteinem NS5 na dvě jednovláknové RNA (ssRNA). Mechanismus tohoto procesu je zatím velmi málo popsán, ale předpokládá se že: jedno z vláken následně pokračuje k aktivnímu místu RNA polymerázy NS5, kde je k němu opět syntetizováno komplementární vlákno a celý proces se opakuje, zatímco druhé je dalšími enzymatickými procesy NS3 a NS5 opatřeno strukturou 5'čepičky a stává se tak finální genetickou informací VKE, která může být obalena kapsidou [6]. Už bylo řečeno, že tato aktivita je závislá na energii z NTPázové činnosti. Usuzuje se, že při štěpení NTP dochází ke konformačním změnám na proteinu, které napomáhají v místě helikázové brány k rozdělení dsRNA [3].

Helikáza NS3 patří mezi tzv. DEAD/DEAH-box helikázy, které spadají do skupiny SF2 helikáz (z anglického „superfamily 2“) [2][11]. Řada helikáz v lidském organismu rovněž patří do této kategorie (např. hrají klíčovou roli při replikaci DNA). SF2 helikázy jsou vysoce konzervované (panuje mezi nimi značná podobnost v aminokyselinových sekvencích, které definují oblasti podílející se na enzymatické aktivitě, tzv. motivy), což způsobuje i podobnost mechanismů, jimiž tyto enzymy katalyzují své reakce. Problém pak může nastat, pokud bychom při léčbě VKE cílili přímo na aktivní místa virového enzymu. Zablokujeme tak totiž nejenom virovou helikázu, ale s vysokou pravděpodobností i helikázy lidského organismu, které jsou nezbytné pro jeho správnou funkci [11]. Výzkum se tudíž soustředí na osvětlení mechanismu, jakým mezi sebou aktivní místa NTPázy a helikázy komunikují a jak by se tato komunikace dala využít pro vytvoření allosterického inhibitoruⁱⁱⁱ [3].

2.3.2 Závislost NTPázové aktivity na přítomnosti ssRNA

V předchozím textu je uvedeno, že RNA-helikázová aktivita NS3H je energeticky závislá na jeho NTPázové aktivitě. Rovněž se však ukazuje, že ssRNA má zásadní stimulační efekt na NTPázovou aktivitu a že v její nepřítomnosti dochází prakticky k zastavení NTPázové aktivity. Neprobíhá-li hydrolýza NTP, nedochází ani k helikázovému rozplétání dsRNA, bez kterého nemůže probíhat životní cyklus VKE. Ukazuje se, že vazba určitých aminokyselin v helikázové bráně na ssRNA, způsobuje konformační změny, které vedou k allosterické aktivaci NTPázové

ⁱⁱⁱ jako allosterický inhibiční efekt se označuje vliv určité molekuly, kofaktoru, na enzymatickou aktivitu proteinu, na který se tato molekula váže mimo enzymaticky aktivní oblast. Po navázání dochází ke konformačním změnám na enzymu, jejichž důsledkem dojde i ke změnám v aktivním místě, které mají za následek oslabení enzymatické aktivity

aktivity. Z krystalografických studií^{iv} a *in silico* (počítačových) modelů vyplývá, že bez těchto strukturních změn zůstává fosfát (P_i) po hydrolyze NTP zablokovan v aktivním místě enzymu, čímž znemožňuje vazbu nového NTP a další průběh reakce. Pokud je však na enzym navázaná ssRNA, dochází ke strukturním změnám, konkrétně k posunu helixů $\alpha 2$ a $\alpha 7$ (viz obrázek 5), které umožní uvolnění P_i z aktivního místa a může zde proběhnout další hydrolyza NTP [3].

V současné době bylo identifikováno několik konkrétních aminokyselin v peptidovém řetězci NS3H, které se vyskytují v oblasti helikázové brány a podílejí se na vazbě proteinu k ssRNA. Nejzásadnější vliv z dosud zkoumaných aminokyselin měl arginin na pozici 231 (R231). Při jeho nahrazení alaninem (velmi málo reaktivní aminokyselinou) došlo k téměř úplnému zastavení NTPázové aktivity. Prolin na pozici 229 (P229) se nachází v jeho těsné blízkosti a navíc je (stejně jako R231) přítomen v primární struktuře NS3 hned několika flavivirů. Z *in silico* experimentu vyplynulo, že mutace prolinu na pozici 229 na alanin (P229A) má vliv na vazbu ssRNA, s ní spojené strukturní změny v proteinu a NTPázovou aktivitu. K ověření tohoto *in silico* experimentu, byl cílenou mutagenézí vytvořen P229A mutant helikázové domény proteinu NS3 (ve zbytku práce označován jako pozměněný NS3H, zkráceně NS3H_p) a jeho následnou produkci a biochemickou charakterizací se zabývá tato práce [3].

^{iv} Krystalografie je analytická metoda, ve které využíváme různého chování Röntgenových paprsků v různých typech krystalových mřížek. Povede-li se nám vysokou koncentrací a vhodnými podmínkami docílit vzniku proteinového krystalu, jsme pak na základě tohoto krystalu schopni identifikovat konformaci proteinu, případně konformaci proteinu v komplexu s nějakou látkou. Srovnáním rozdílných krystalů proteinů v komplexu s jednotlivými meziprodukty enzymatické reakce jsme schopni zjistit, jak se mění konformace proteinu v průběhu této reakce [15]

3 PRINCIPY VYBRANÝCH METOD

3.1 Bakteriální expresní systém

Aby mohl být protein testován, musí být nejdříve získán v dostatečném množství a čistotě. *In vitro* syntéza proteinů postupným spojováním aminokyselin je velice náročná, přihlédneme-li k tomu, že peptidové řetězce proteinů se běžně skládají ze stovek, či dokonce tisíců aminokyselin. Také skládání proteinu do správné sekundární a terciární struktury, která je klíčová pro funkci, jde při tomto druhu přípravy jen těžko zajistit. V současné době se k získání proteinů (ať už pro výzkumné, hospodářské, či medicínské účely) nejčastěji využívá buněčných expresních systémů. Princip je velmi jednoduchý: do buňky vložíme DNA, která kóduje zájmový protein a ten je následně produkován spolu s ostatními buněčnými proteiny [7].

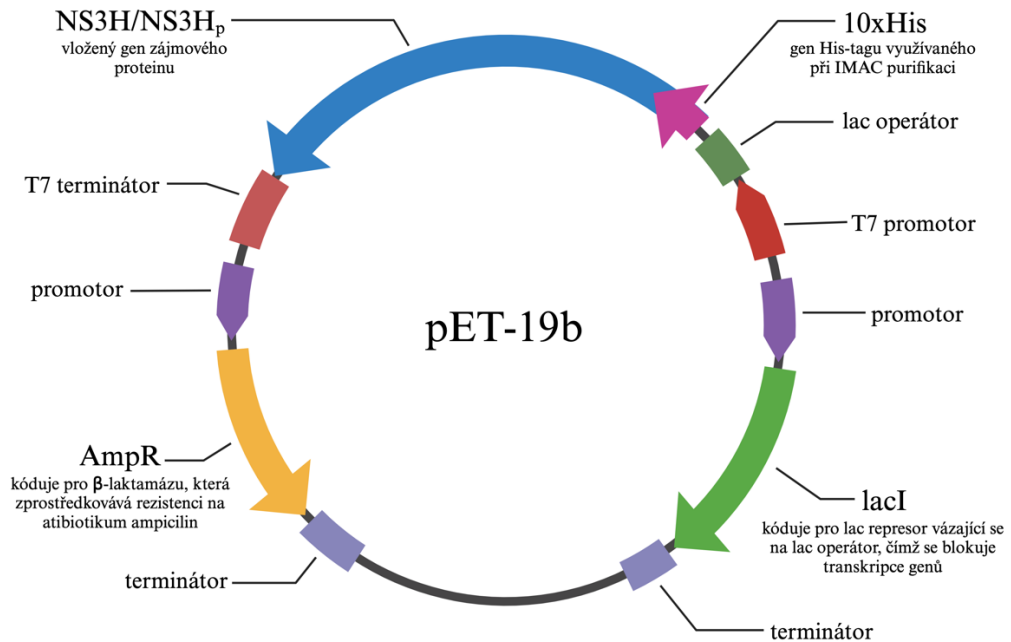
Buněčné expresní systémy rozlišujeme podle typu použitých buněk. Pro umělou přípravu proteinů můžeme využít bakteriální, kvasinkové, hmyzí, rostlinné či savčí buňky. Nejběžněji využívaným je bakteriální expresní systém. Bakterie mají řadu vlastností, které je činí expresním systémem první volby: vyžadují pro svou existenci poměrně snadno zjistitelné podmínky (levné živné médium, nenáročné životní podmínky), rychle se množí, a navíc jsou přirozeně schopny přijímat novou genetickou informaci ve formě plasmidů (viz kapitola 3.1.2), což nám jejich využití dále zjednodušuje [7].

3.1.1 Buňky *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL

Pro produkci proteinů v této práci byl zvolen bakteriální expresní systém, konkrétně buňky *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL competent cells (Agilent Technologies), které byly použity pro produkci NS3H v předcházející studii [3]. Jednou z výhod tohoto kmene je přítomnost plasmidu nesoucího genetickou informaci kódující vybrané druhy tRNA (R-arginin, I-isoleucine, P-prolin, L-leucin), které se v *E. coli* přirozeně vyskytují v poměrně malém množství, což komplikuje expresi heterologních (cizorodých) proteinů. Tento plasmid navíc zprostředkovává rezistenci na antibiotikum chloramfenicol, čehož se využívá při selektivním růstu bakteriální kolonie, který je nezbytný pro efektivní produkci zájmového proteinu. Bakterie jsou inkubovány v prostředí s určitou koncentrací daného antibiotika (u chloramfenicolu se využívá koncentrace 35 $\mu\text{g/ml}$). Pokud by tedy došlo k zavlečení jiných bakterií, či ztrátě plasmidu při buněčném dělení, budou tyto bakterie usmrceny antibiotikem [1].

3.1.2 Plasmid pET-19b

Plasmidy jsou kruhové molekuly DNA, které se běžně vyskytují v bakteriích. Nesou obvykle gen zprostředkovávající určitou novou vlastnost bakterie, která není obsažena v bakteriálním genomu a dává bakterii výhodu nad konkurencí. Může jít např. o rezistenci vůči druhu antibiotik, či schopnost zpracovávat specifický druh potravy. Bakterie nejsou schopny pohlavního rozmnožování, jsou však schopné si vzájemně předávat plasmidy, čímž je udržena jistá úroveň genetické variability [8].



Obrázek 6: Schematické znázornění plasmidu pET-19b použitého k transformaci buněk v této práci. Na plasmidu je zobrazeno umístění jednotlivých genů a pro ně relevantních regulačních sekvencí. Červeně označené T7 promotor a T7 terminátor slouží k signalizaci T7 RNA-polymeráze. Fialové promotory a terminátory pak jiným konkrétním buněčným RNA-polymerázám [20]. Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com

Při použití bakteriálního expresního systému vložíme do plasmidu genetickou informaci kódující náš zájmový protein. Vzniká tzv. rekombinantní DNA, čímž označujeme jakoukoliv genetickou informaci, která se běžně v živých organismech (včetně virů) nevyskytuje a byla vytvořena laboratorně. Vzniklý rekombinantní plasmid poté vložíme do zvolené bakterie procesem zvaným transformace [7].

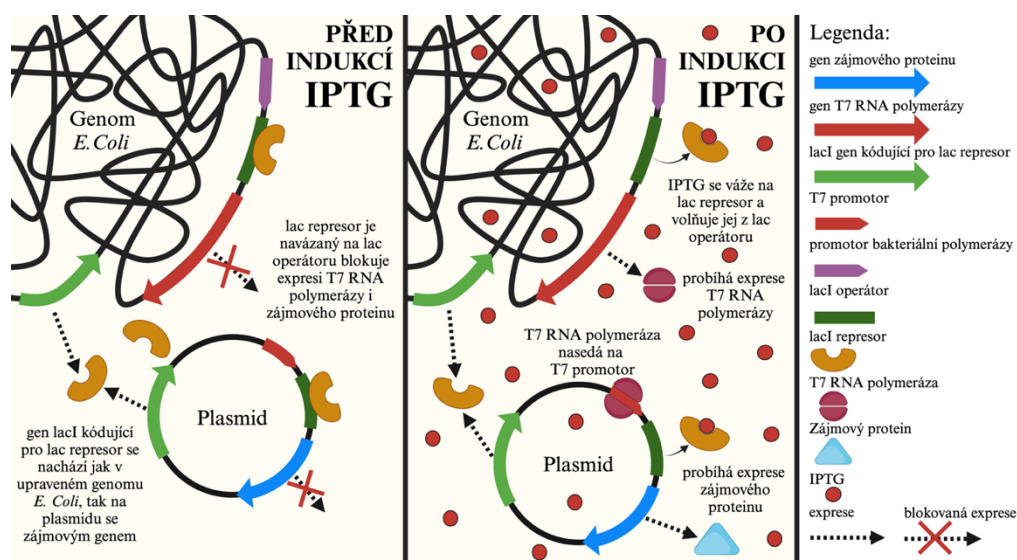
V této práci byl využit plasmid s označením pET-19b, do něhož byl vložen gen kódující buď protein NS3H či mutovaný protein NS3H_p. Gen zájmového proteinu je vložen za T7 promotor (tedy ve směru transkripce) a pod kontrolu lac operonu, což jsou klíčové součásti T7 expresního systému, který byl pro produkci proteinů využit (viz kapitola 3.1.3) [9][20].

Plasmid dále nese gen, jenž kóduje protein zprostředkovávající rezistenci na ampicilin a příbuzná antibiotika, což je zásadní pro selekci buněčných kolonií, u kterých došlo k úspěšnému přijetí plasmidu. Stručná mapa plasmidu pET-19b je zachycena na obrázku 6 [20].

3.1.3 T7 expresní systém

Jako T7 expresní systém označujeme soustavu navzájem provázaných buněčných mechanismů a úseků genetických informací jak v buňkách *E. coli* kmene BL21, tak na plasmidu pET-19b, které společně zajišťují efektivní, ale regulovatelnou expresi zájmového proteinu. Centrálním komponentem tohoto systému je T7 RNA polymeráza (T7 RNAP), která pochází z T7 bakteriofágu a umožňuje genovou transkripci násobně rychlejší než RNA polymeráza *E. coli* [9][21]. Gen kódující T7 RNAP se nachází v genomu námi použitého bakteriálního kmene. Použitý plasmid nese tzv. T7 promotor (specifická sekvence DNA), na nějž se T7 RNAP naváže a začne transkripci genů uložených za tímto místem. Pokud sem uložíme gen našeho zájmového proteinu, bude transkribován T7 RNAP [21].

Pokud by se však T7 expresní systém skládal pouze z výše popsanych složek, nebylo by možné expresi proteinu nijak regulovat. Předčasná exprese je z mnoha důvodů nežádoucí (např. uměle vložený gen může kódovat protein, který je pro buňku toxický). Buňky musí navíc vynakládat velké množství energie na produkci cizorodého proteinu, čímž je jejich růst omezen a nemají šanci dosáhnout fáze exponenciálního růstu, ve které je produkce cizorodého proteinu nejúčinnější. Buňka má také řadu mechanismů, kterými se proti dlouhodobě nadbytečné produkci vlastních či cizích proteinů může bránit, což opět ohrožuje výsledný výtěžek [7]. Je tedy důležité, aby exprese v T7 expresním systému probíhala jen za požadovaných podmínek. Za tímto účelem bylo využito lac operonu (soubor genů kódujících proteiny laktóзовého metabolismu). Genom *E. coli* byl modifikován a byl do něj vložen gen pro lac represor (blokuje expresi genů vazbou na lac operátor – specifická sekvence DNA) a gen kódující T7 RNAP byl vložen za lac promotor (jehož součástí je i lac operátor). Aby byla zajištěna větší specifita, byl lac operator vložen i do T7 promotoru na pET plasmidu. V nepřítomnosti laktózy je tedy produkován lac represor, jenž se váže na lac operátor, čímž nedochází k transkripci genu pro T7 RNAP. I kdyby došlo k určité zbytkové produkci T7 RNAP (děj, při kterém v malé míře dochází k expresi zablokovaných genů, se nazývá „leaky expression“ a je typický pro geny transkribované RNA polymerázami s velmi vysokou aktivitou), vzniklá T7 RNAP nebude schopna transkribovat zájmový gen, jenž je rovněž zablokovaný lac represorem. Byť k jisté úrovni exprese bude docházet vždy, touto dvojitou regulací je produkce zájmového proteinu před indukci snížena natolik, že většinou nepředstavuje překážku pro růst bakteriální kultury [9].



Obrázek 7: Schematické znázornění indukce T7 expresního systému pomocí Isopropyl- β -D-thiogalaktosidu (IPTG). Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com

Samotná indukce proteinové produkce pak probíhá přidáním Isopropyl- β -D-thiogalaktosidu (IPTG), nejčastěji o koncentraci 1mM . Jedná se o neštěpitelný analog laktózy, který se váže na lac represor a způsobí jeho odpojení od lac operátoru. Tím je spuštěna produkce T7 RNAP a následně i zájmového proteinu. Celý proces je znázorněn na obrázku 7 [9].

3.2 Pilotní produkce

Pokud produkujeme v bakteriálním expresním systému protein, který nebyl tímto způsobem dosud získáván, provádíme nejprve tzv. pilotní produkci. Bakteriální kulturu s vloženým plasmidem necháme růst za definovaných podmínek a zjišťujeme, kdy byl výnos zájmového proteinu nejvyšší. Podmínky, které se ukážou jako nejlepší, následně použijeme při velkoobjemové produkci. Standardně testovanými podmínkami jsou teplota, při které bakteriální kultura roste, čas, po který produkce probíhá či množství indukční látky (k tomuto kroku se přistupuje nejčastěji u potenciálně toxických proteinů a v této práci podmínka testována nebyla).

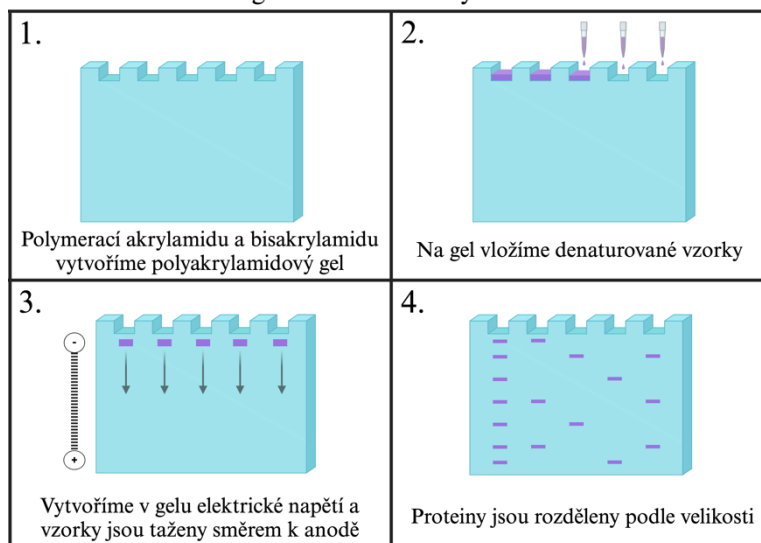
Teplota má zásadní vliv na rychlost všech buněčných procesů. S vyšší teplotou dochází k rychlejší translaci. Vyšší rychlost translace může mít pozitivní vliv na produkci zájmového proteinu, ale často dochází k nesprávnému složení sekundární a terciární struktury, čímž se protein stává nepoužitelným a je uložen do tzv. inkluzních tělísek. Jedná se o útvary tvořené agregovanými látkami (ať už odpadními nebo rezervními), pro které buňka nemá využití. V bakteriích se vyskytují přirozeně a zamezují přehlcení vnitřního prostoru nepotřebnými surovinami. V tělískách přicházejí proteiny o svou správnou sekundární a terciární strukturu a stávají se nefunkčními. Existují sice metody, kterými lze správného složení proteinu docílit i po produkci do inkluzních tělísek, ty jsou však poměrně komplikované a často vedou k nejistému výsledku. Tudíž je žádoucí se bez nich obejít. V rámci pilotní produkce NS3H_p byly otestovány dvě teploty: $18\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota používaná při produkci NS3H, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota bližší teplotě, ve které se *E. coli* přirozeně vyskytuje [7].

Další testovanou podmínkou byl čas, během kterého je buněčná kultura ponechána produkovat protein po indukci IPTG. Čím delší čas je buňkám na produkci dán, tím více zájmového proteinu mají možnost vytvořit. Bakterie jsou však schopny se v případě dlouhodobé produkce neúčinného proteinu chránit například tvorbou již zmíněných inkluzních tělísek či proteolytickým štěpením proteinu pro další účely (energetický metabolismus, vznik nových proteinů). K uložení části zájmového proteinu do inkluzních tělísek dochází téměř vždy, ukončením produkce ve správnou chvíli však můžeme maximalizovat zisk již vyprodukovaného proteinu předtím, než jej buňka stihne tímto způsobem znehodnotit. Při pilotní produkci provedené v rámci této práce bylo množství zájmového proteinu v kulturách rostoucích při různých teplotách zjišťováno ve třech časových intervalech. Při teplotě 30 °C byl vzorek kultury odebrán 2 h, 4 h a 6 h po indukci. S ohledem na pomalejší průběh produkce při nižší teplotě byly odběry u kultury rostoucí při 18 °C provedeny po 3 h, 6 h a následujícího dne [7].

3.3 Gelová elektroforéza SDS-PAGE

SDS-PAGE je zkratka anglického „Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis“ a jedná se o nejběžnější typ elektroforézy, který se používá k analýze proteinových vzorků. Nejde však o kvalitativní analýzu (zabývající se vlastnostmi proteinů), ale pouze velikostní: proteiny jsou nejdříve denaturovány teplotou 95 °C v přítomnosti dodecyl síranu sodného (v angličtině „sodium dodecyl sulphate“, SDS, podle kterého je metoda pojmenována) a β -mercaptoetanolu, který způsobí přerušování disulfidických můstků v molekulách. SDS se zároveň váže na proteiny v množství úměrném jejich velikosti, čímž se stávají záporně nabitými. Vzorek je poté vložen do jamek polyakrylamidového gelu, jenž je ponořený ve specifickém pufru (obsahuje mimo jiné další dodecylsíran sodný) umožňujícím průchod elektrického proudu. V aparatuře je následně vytvořeno elektrické napětí a záporně nabitě proteiny jsou v denaturovaném stavu tlačeny skrze gel směrem k anodě. Rychlost jejich pohybu je nepřímo úměrná velikosti proteinu, neboť větším molekulám klade gel při pohybu větší odpor, a pohybují se tudíž pomaleji. Po vypnutí el. pole nacházíme tedy vzorek rozdělený na jednotlivé proteiny dle jejich velikosti. Nejmenší a nejlehčí proteiny jsou nejdále od místa na gelu, kam byl vzorek vložen, největší proteiny pak urazily vzdálenost nejkratší. Proces je znázorněn na obrázku 8 [18].

Průběh gelové elektroforézy SDS-PAGE



Obrázek 8: Schematické znázornění průběhu gelové elektroforézy SDS-PAGE. Zkoumané vzorky jsou zobrazeny fialově, Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com

Produktem SDS-PAGE je gel, na kterém jsou fixovány a obarveny jednotlivé složky původního vzorku. Vzorky jsou do gelu umisťovány seshora, a to jak v praxi, tak v konvenční orientaci, v jaké jsou snímky gelu pořizovány a prezentovány. Na gel lze umístit více vzorků najednou, každý pak na finálním snímku zaujímá jeden sloupec. Sloupec nejvíce vlevo je pak zpravidla vyhrazen pro tzv. „ladder“ (v přímém překladu „žebřík“), označovaný rovněž jako proteinový standard. Jde o předpřipravenou směs proteinů o definovaných velikostech, která nám pomáhá se zorientovat ve výsledném gelu. K proteinovému standardu je od výrobce dodáván klíč, který k jednotlivým frakcím vzniklým elektroforézou přiřazuje velikost, respektive relativní molekulovou hmotnost^v. Známe-li pak přibližnou velikost zájmového proteinu, můžeme podle „ladderu“ zjistit, zda se v daném vzorku nalézá frakce, která by mu svou velikostí odpovídala, a tím určit, zda je ve vzorku přítomen, či nikoliv. Při všech SDS-PAGE provedených v rámci této práce byl využit PageRuler™ Unstained protein ladder (Thermo Fisher Scientific). Ukázkou popsaného snímku gelu naleznete na obrázku 15 [18].

3.4 Kolonová chromatografie

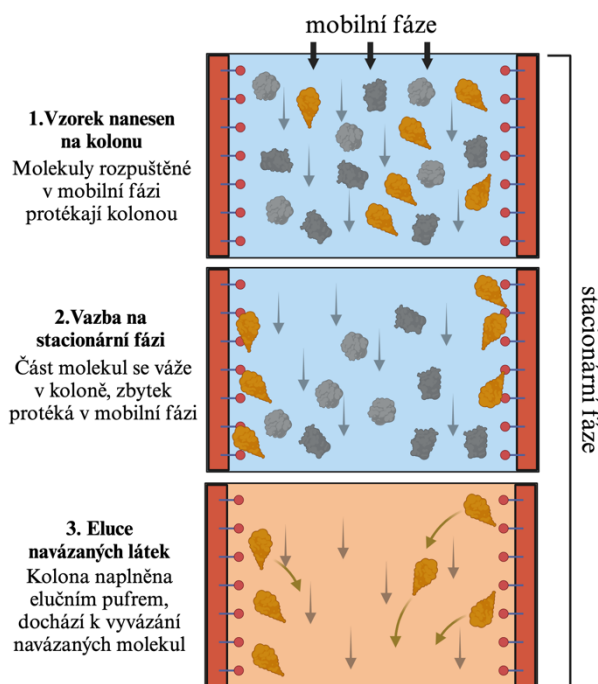
Po produkci v bakteriálním expresním systému nezískáme čistý protein, ale bakteriální kulturu, v níž náš zájmový protein tvoří pouze několik málo promile, nanejvýš procent z celkového objemu přítomných molekul. Aby však mohl být jakkoliv testován, je zapotřebí jej získat v mnohem čistší podobě. Proces získávání látky ze směsi se označuje jako purifikace a je při něm využíváno mnoha různých purifikačních metod. Běžně používanou metodou je tzv. kolonová chromatografie. Tato metoda probíhá v tzv. koloně (viz obrázek 10), kterou si lze představit jako válec obsahující stacionární a mobilní složku neboli fázi. Stacionární fáze je nepohyblivě uchycena ve válci, zatímco mobilní fáze má formu roztoku a válcem protéká.

^v v případě proteinů to bývají řádově desítky *kDa*, neboli kilodaltonů. Jeden kilodalton odpovídá molární hmotnosti 1000 *g/mol*

Složení obou fází závisí na konkrétním typu chromatografie. V mobilní složce je rozpuštěna směs obsahující látku, kterou purifikujeme [24].

Stacionární fáze má schopnost zadržovat látku na základě rozdílných chemicko-fyzikálních vlastností. Může zde docházet například ke vzniku komplexů stacionární fáze s purifikovanou látkou, případně ke vzniku jiného druhu mezimolekulové interakce. Stacionární fáze ale může mít také charakter inertní pórovité látky (nedochází k žádné interakci mezi mobilní a stacionární fází), kterou molekuly procházejí různou rychlostí pouze na základě své velikosti. Ve všech případech je však zásadní, aby na základě rozdílných chemicko-fyzikálních vlastností mezi mobilní a stacionární fází došlo k rozdělení mobilní fáze. Nejrychleji protékají kolonou látky, které jsou největší nebo se stacionární fází interagují nejméně či vůbec. Látky, u kterých k nějaké interakci dochází, pak protékají pomaleji, případně dokonce zůstávají v koloně navázané a je zapotřebí je z ní uvolnit (viz kapitola 3.4.1). Ve všech případech je možné interagující látky odchyťovat samostatně (neboť kolonu opouštějí v jiný okamžik) a tím je purifikovat [24].

Schematický náčrt průběhu afinitní kolonové chromatografie



Obrázek 9: Schematický náčrt průběhu afinitní kolonové chromatografie. Zobrazena je kolona ve třech různých fázích purifikace. Oranžově je zobrazen protein, který purifikujeme, šedě ostatní proteiny ze směsi [24]. Obrázek vytvořen pomocí aplikace BioRender.com

Stacionární fáze často interaguje s více než jednou konkrétní látkou a pro dostatečnou purifikaci je většinou nutné provést více různých kolonových chromatografií, které využívají odlišné vlastnosti zájmové látky [24]. Při purifikaci NS3H a NS3H_p byly využity tři druhy kolonové chromatografie, jimiž se zabývají následující kapitoly.

3.4.1 Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech

Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (zkráceně IMAC, z anglického „Immobilized Metal Affinity Chromatography“) je typem afinitní kolonové chromatografie, při které dochází ke vzniku donor-akceptorové vazby mezi dvoumocnými kovovými ionty (nejčastěji nikelnatými Ni^{2+} či kobaltnatými Co^{2+}) a aminokyselinou histidinu. Zatímco kovové ionty jsou imobilizovány na stacionární fázi, histidiny jsou přítomny v proteinech rozpuštěných v mobilní fázi. Protein obsahující dostatečné množství histidinů (které navíc musí být exponované na jeho povrchu, aby mohly s ionty interagovat), se zachytí na stacionární fázi vznikem komplexu mezi histidinem a kovovým iontem a dojde tak k jeho oddělení od ostatních látek směsi [12].

Abychom nebyli závislí na tom, zda purifikovaný protein obsahuje dostatek vhodně lokalizovaných histidinů, je na něj umístěn tzv. „His-tag.“ Jedná se o několik (nejčastěji 6-10) po sobě jdoucích histidinů zařazených na jeden z konců proteinu (v našem případě deset histidinů na N-konci [20]) [12]. Genetická informace kódující pro „His-tag“ byla uložena již na plasmidu pET-19b těsně před místo, kam byl následně vložen gen zájmového proteinu (viz obrázek 6). „His-tag“ je tudíž na proteinu přítomen již od translace [20].

Zájmový protein je tedy při průchodu kolonou zachycen na stacionární fázi na rozdíl od zbytku směsi, která kolonou protéká. Následně je třeba protein z kolony uvolnit. Toho lze docílit napuštěním kolony látkou, která má vyšší afinitu ke kovovým iontům než histidin. Touto látkou je imidazol. Pokud budeme postupně zvyšovat koncentraci imidazolu, v určitou chvíli dojde k vyvázání zájmového proteinu z komplexů, které jej zadržovaly v koloně, a k jeho vyplavení ven z kolony. Obecný průběh afinitní chromatografie je zachycen na obrázku 9 [12].

Nevýhodou IMAC je přirozený výskyt proteinů bohatých na histidin (v literatuře označovány jako „histidine-rich proteins“), které se v koloně vážou spolu se zájmovým proteinem. Malou část z těchto nespecificky navázaných proteinů, jejíž afinita ke kovovým iontům je sice dostatečná na jejich udržení v koloně, ale přesto výrazně nižší než afinita „His-tagem“ opatřeného proteinu, lze oddělit naplněním kolony nízkou koncentrací imidazolu (používá se koncentrace 50 mM). Tato koncentrace je dostatečně vysoká, aby došlo k uvolnění slabě navázaných proteinů, ale příliš nízká na uvolnění zájmového proteinu (v závislosti na délce použitého „His-tagu“ a potenciální oligomerizaci proteinu dochází k uvolnění z kolony při koncentraci imidazolu 250 mM a více). Část proteinů se však váže s podobnou afinitou a není možné je touto purifikací od zájmového proteinu oddělit. Získaný purifikovaný vzorek je tudíž třeba podrobit dalším purifikačním krokům [12].

3.4.2 Heparinová afinitní chromatografie

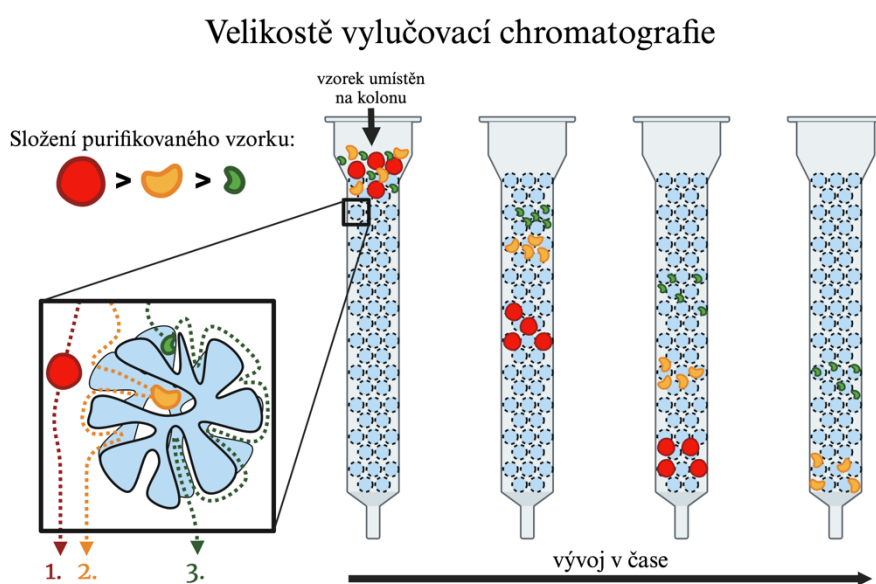
Heparinová chromatografie funguje na velice podobném principu jako chromatografie předchozí. Jedná se rovněž o afinitní chromatografii, na stacionární fázi je však v tomto případě přítomen heparin (negativně nabitý polysacharid), na který se váže široké spektrum proteinů (např. DNA/RNA vázající proteiny, koagulační proteiny). Výhodou této purifikace je, že není zapotřebí zájmový protein nějakým způsobem upravovat, jak je tomu u IMAC, kde je nutné vložit na protein „His-tag“. Nevýhodou je pak již zmíněná skutečnost, že se na heparin váže vícero různých proteinů. Rovněž není tedy možné využít tuto chromatografii jako jediný purifikační krok. V případě NS3H předpokládáme, že afinita k heparinu je způsobena podobností jeho struktury se strukturou fosfát-ribózového řetězce RNA, ke kterému se protein váže. K eluci neboli uvolnění proteinů z kolony se využívá iontového tlaku anorganických solí (např. *NaCl*). Postupně zvyšujeme jejich koncentraci v koloně, čímž v určité chvíli dochází k vyvázání proteinů z vazby s heparinem a k jejich vyplavení [5].



Obrázek 10: Fotografie kolony HiTrap Heparin HP column (Cytiva), použité při obou heparinových afinitních chromatografiích provedených v rámci této práce

3.4.3 Velikostně vylučovací chromatografie

U velikostně vylučovací chromatografie (někdy také označované jako rozměrově vylučovací chromatografie) je stacionární fáze tvořena velkým množstvím inertních sférických útvarů, ve kterých se nachází řada pórů o různé velikosti. Jednotlivé látky v mobilní fázi při průchodu kolonou prochází různým počtem pórů a tím se jejich pohyb stacionární fází prodlužuje. Čím menší molekula, tím větším počtem pórů prochází. Velké molekuly oproti tomu prochází pouze několika málo, či žádnými, póry. Výsledkem je různě rychlý průchod stacionární fází. Největší látky putují nejkratší cestou a opouští kolonu nejdříve, zatímco nejmenší látky putují nejdelší cestou. Díky tomu jsme schopni rozdělit směs na základě velikosti (a s ní související molekulové hmotnosti) jednotlivých složek [4].

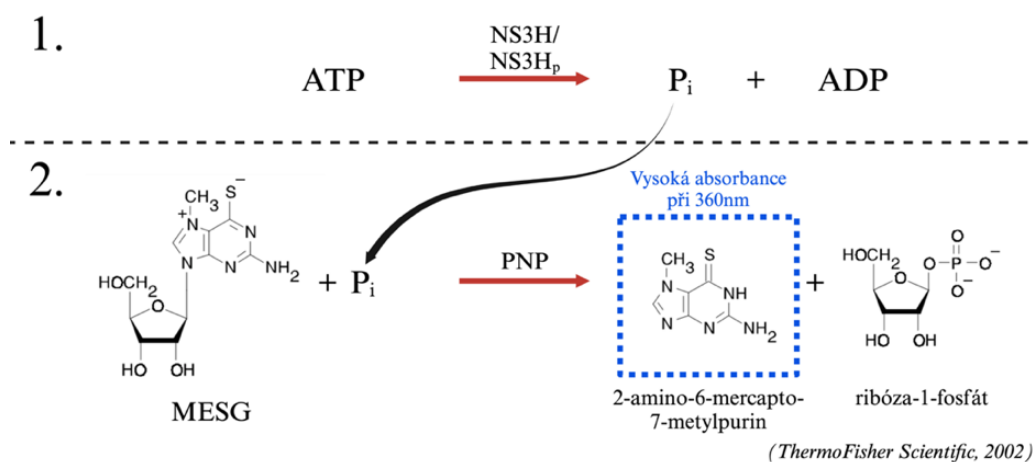


Obrázek 11: Schematické znázornění purifikace vzorku velikostně vylučovací chromatografií. Jednotlivé velikostní složky jsou zobrazeny různými barvami (červená, oranžová, zelená) [4]. Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com

Tato chromatografie je používána k oddělení složek směsi, které nelze oddělit jinými separačními metodami, kterými jsou například již zmíněné afinitní chromatografie. Nelze ji však použít k purifikaci samostatně, protože separace látek podle velikosti není dostatečně přesná. Uvádí se, že pro uspokojivé oddělení dvou různých složek, musí být velikost jedné alespoň dvojnásobkem velikosti té druhé. Navíc velké množství proteinů v mobilní fázi (což je případ většiny buněčných lyzátů) může jednotlivé póry ucpat a zamezit separaci. Z obou těchto důvodů bývá vylučovací chromatografie zařazována jako poslední, dočišťovací krok purifikace [4]

3.5 EnzChek® Phosphate Assay Kit

Při zkoumání enzymatické aktivity purifikované NS3H_p jsme testovali rychlost, jakou je enzym za přítomnosti RNA schopen štěpit Adenosin trifosfát (ATP) na Adenosin difosfát (ADP) a volný fosfát (P_i); tedy na jeho tzv. ATPázovou aktivitu. Kvantitu volného fosfátu (P_i) jsme monitorovali pomocí EnzChek® Phosphate Assay Kitu. Tento kit obsahuje enzym purinovou nukleosidfosforylázu (PNP), která katalyzuje reakci mezi volným fosfátem (P_i), vytvořeným NS3H_p, a 2-amino-6-mercapto-7-metylpurinovým ribosidem (MESG), rovněž obsaženým v sadě, za vzniku ribózy-1-fosfátu a 2-amino-6-mercapto-7-metylpurinu (celá reakční dráha je zachycena na obrázku 12) [23].



Obrázek 12: Reakční schéma zobrazuje dvě navazující reakce: 1. štěpení adenosin trifosfátu (ATP) na adenosin difosfát (ADP) a volný fosfát (P_i) katalyzované zájmovým enzymem (NS3H či NS3H_p), 2. reakci, ve které purinová nukleosidfosforyláza (PNP) katalyzuje reakci vzniklého P_i s 2-amino-6-mercapto-7-methyl-purinovým ribosidem (MESG) za vzniku dvou produktů (ribózy-1-fosfátu a 2-amino-6-mercapto-7-metylpurinu). Modrým rámečkem je označen produkt, jehož absorbcí jsme následně schopni měřit [23]. Původní obrázek: Thermo Fisher Scientific [23]. Obrázek upraven pomocí programu BioRender.com

Produkt (2-amino-6-mercapto-7-metylpurin) vzniklý při této reakci je zajímavý tím, že má vysokou absorbcí při vlnové délce 360 nm. Pokud tedy budeme v různých časových intervalech měřit absorbcí reakční směsi při této vlnové délce, jsme schopni sledovat změnu v množství produktu, která je přímo úměrná množství volného fosfátu (P_i), a tudíž aktivitě zájmového enzymu. Abychom mohli měřit reakční rychlost zájmového enzymu, je zapotřebí si pohlídat několik podmínek: (a) je nezbytné, aby jak PNP, tak MESG byly v nadbytku a limitujícím reaktantem druhé reakce byl pouze vznikající P_i. Pokud tomu tak nebude, bude měření ovlivněno i aktivitou PNP, která nás ovšem nezajímá. Vhodné koncentrace všech komponentů sady jsou stanoveny výrobcem [23]; (b) je nezbytné stanovit podmínky reakce (teplota, složení reakční směsi, koncentrace enzymu), které budou jasně definované a neměnné; (c) pro výpočet enzymové kinetiky je třeba stanovit, jaká absorbcí při 360 nm odpovídá jaké koncentraci volného fosfátu (P_i) (sestavit si tzv. kalibrační, či standardní fosfátovou křivku, viz kapitoly 4.4.1 & 5.4.1) [23].

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Optimalizace podmínek pro produkci NS3H_p

Pro produkci rekombinantního NS3H_p jsme zvolili bakteriální expresní systém na základě výsledků produkce NS3H [3]. Jelikož produkce NS3H_p nebyla dosud nikdy provedena, bylo zapotřebí stanovit pro ni nejvhodnější podmínky provedením tzv. pilotní produkce. Pilotní produkci a procesy s ní spojenými se zabývá tato kapitola (4.1).

4.1.1 Transformace *E. coli*

Buňky *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL je nutno skladovat při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před transformací jsou buňky vyjmuty z mrazáku a ponechány na ledu po dobu 30 *min*. Do 50 μl bakteriální kultury bylo následně přidáno 0,5 μl roztoku plasmidu pET19b o koncentraci 65 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Buňky s přidaným plasmidem byly jemně protřepány a inkubovány po dobu 30 *min* na ledu. Následně byly vystaveny teplotnímu šoku, kdy byly na 20 *s* vloženy do vodní lázně o teplotě $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byly na 2 *min* vráceny na led. Dále bylo k buňkám přidáno 250 μl SOC růstového media (viz příloha 1) předeřátého na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a takto připravený vzorek byl umístěn do třepačky Innova® S44i (Eppendorf) a inkubován po dobu 60 *min* při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 220 *rpm* (rotation per minute). Po uplynutí 60 *min* bylo 50 μl buněčné kultury rozetřeno na Petriho misku s agarem obsahujícím LB medium (viz příloha 1) a antibiotika ampicilin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a chloramfenicol (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Zbytek bakterií (ca 250 μl) byl rozetřen na kontrolní Petriho misku. Rozdílné koncentrace buněk na jednotlivých miskách slouží ke kontrole funkčnosti antibiotik. Pokud jsou funkční, množství narostlých kolonií na obou miskách bude následující den úměrné počtu bakterií, které na ně byly rozetřeny. Petriho misky byly posléze umístěny do inkubátoru INCU-Line® (VWR) a inkubovány přes noc při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2 Pilotní produkce

Následující den byla z Petriho misky odebrána jedna bakteriální kolonie, která byla umístěna do 10 *ml* LB media obsahujícího 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilinu a 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chloramfenicolu a inkubována přes noc v třepačce Innova® S44i (Eppendorf) při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 220 *rpm*. Druhý den jsme inokulovali čtyři zkumavky, obsahující 10 *ml* LB media bez antibiotik s 500 μl noční kultury. Zkumavky byly poté vráceny do třepačky a inkubovány při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 220 *rpm* dokud OD_{600} nedosáhlo hodnoty 0,74 (nulová hodnota stanovena čistým LB mediem). Následně byla proteinová produkce u dvou ze čtyř zkumavek indukována přidáním 10 μl 1M (jednomolární) IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid), výsledná koncentrace 1mM. Nezaindukované kultury slouží jako negativní kontrola. Dvě kultury (vždy jedna zaindukovaná a druhá nezaindukovaná) byly vráceny do třepačky a inkubovány při teplotě $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 220 *rpm*, zbylé dvě při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 220 *rpm*. Produkce zájmového proteinu (NS3H_p) byla monitorována ve stanovených intervalech (viz tabulka 1):

Tabulka 1: Časy odběrů vzorků v pilotní expresi			
	časy odběrů po indukci		
	1. odběr	2. odběr	3. odběr
kultury rostoucí při 18 °C	3 h	6 h	přes noc (tzv. overnight)
kultury rostoucí při 30 °C	2 h	4 h	6 h

Před samotnou indukci a následně ve stanovených intervalech byly z kultur odebrány 1 ml vzorky, které byly poté stočeny v centrifuze 5415 R (Eppendorf) při 11 000 *rcf* (relative centrifugation force^{vi}), čímž jsme oddělili buňky (pelet) od živného média (supernatant). Supernatant byl odsán pipetou a buněčný pelet uložen do mrazáku o teplotě –32 °C před další analýzou.

4.1.3 Příprava vzorků na analýzu

Odebrané vzorky byly vyjmuty z mrazáku a rozpuštěny v 500 μ l lyzačního pufru (viz příloha 1). Poté byly opakovaně (3x) prudce zamrazeny kapalným dusíkem a zahřívány v Block heateru SBH130D (Stuart) na teplotu 42 °C, čímž došlo k prasknutí buněk. Vzorky byly posléze rozděleny 10 *min* stáčením v centrifuze 5415 R (Eppendorf) při 11 000 *rcf* na solubilní (rozpuštěnou, zejména cytoplasmatickou) a insolubilní (nerozpuštěnou, membránovou, obsahující rovněž materiál z inkluzních tělísek) frakci. Solubilní frakce byla přenesena do nové zkumavky a insolubilní frakce ponechána v původní zkumavce ve formě peletu. Obě frakce byly nadále zkoumány samostatně za účelem ověření, ve které z těchto dvou frakcí se NS3H_p nachází.

4.1.4 Analýza vzorků pomocí gelové elektroforézy (SDS-PAGE)

Pro veškeré SDS-PAGE provedené v rámci této práce byly připraveny 12,5% polyakrylamidové gely (viz příloha 1). Horní část gelů s jamkami pro vzorky byla tvořena 5% zaostřovacím gelem (viz příloha 1).

K solubilním vzorkům byl přidán 2X vzorkový pufr (viz příloha 1) v poměru 1:1. K insolubilním vzorkům bylo přidáno 500 μ l 1X vzorového pufru (viz příloha 1) a pelety v něm byly rozmíchány. Všechny vzorky byly poté 5 *min* denaturovány v Block heateru SBH130D (Stuart) při teplotě 95 °C.

Polyakrylamidový gel byl vložen do elektroforetické aparatury firmy Biorad a zalit 1X SDS-PAGE elektroforetickým pufrem. Do jednotlivých jamek gelu bylo napipetováno 10 μ l solubilních vzorků nebo 5 μ l insolubilních vzorků. U každého gelu byl do jamky nejvíce vlevo umístěn proteinový standard PageRuler™ Unstained protein ladder (Thermo Fisher Scientific). Přibližně prvních 20 *min* probíhala elektroforéza při napětí 100 V. Během této doby migrovaly vzorky skrze 5% gel a došlo k jejich seřazení před rozdělovacím 12,5% gelem. Následně bylo napětí zvýšeno na 200 V na zhruba 60 *min* (dokud nedošlo ke kompletnímu rozdělení

^{vi} *rcf* udává, kolikrát je zrychlení působící v centrifuze vyšší než tíhové zrychlení při povrchu Země. 11 000 *rcf* tak odpovídá zrychlení přibližně 108 *km/s* [16]

proteinů). Gel byl poté vyjmut z elektroforeticé aparatury a inkubován 30 min ve 20 ml fixačního roztoku (viz příloha 1), následně dvakrát promyt destilovanou vodou po dobu 10 min, ponechán přes noc v 20 ml barvicího roztoku (viz příloha 1), a nakonec znovu promyt destilovanou vodou a vyfotografován pomocí ChemiDoc (Bio-Rad). Všechny kroky kromě fotodokumentace probíhaly při pokojové teplotě na výkyvné třepačce (Thermo Fisher Scientific).

4.2 Velkoobjemová produkce NS3Hp a NS3H

Oběma produkcím předcházela identická transformace jako pro pilotní produkci (viz kapitola 4.1.1). Při produkci NS3H bylo postupováno dle protokolu *Production and Purification of NS3 Helicase of Tick-borne encephalitis virus* od Pauliny D. Anindita, Ph.D. (viz příloha 2). Tato kapitola se nadále bude soustředit pouze na produkci NS3Hp, která nebyla doposud provedena a jejíž optimalizace patřila mezi cíle této práce.

Z Petriho misky byla odebrána jedna bakteriální kolonie a vložena do 100 ml LB media obsahujícího 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu a 35 $\mu\text{g/ml}$ chloramfenicolu. Kultura byla následně přes noc inkubována v třepačce Innova® S44i (Eppendorf) při 30 °C a 220 rpm. Druhý den bylo 20 ml kultury inokulováno do 800 ml LB media bez antibiotik a kultura inkubována při 30 °C a 180 rpm (kultura byla inkubována ve speciálních žebrovaných lahvích, a proto byly sníženy otáčky. Při příliš rychlých otáčkách dochází k tvorbě pěny, která může zpomalovat růst bakteriální kultury). Po dosažení OD_{600} 0,625 byla kultura indukována 800 μl 1M IPTG, výsledná koncentrace 1mM. Indukovaná kultura byla inkubována při 30 °C a 180 rpm po dobu 6 h. Tímto způsobem jsme připravili 3,2 l bakteriální kultury.

Následně byla kultura stočena (30 min, 4200 rpm, 4 °C) v centrifuze Heraeus-Multifuge X3R (Thermo Fisher Scientific), supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v malém objemu odstraněného supernatantu (ca 30 ml), přenesen do 50ml zkumavek a znovu stočen (30 min, 4200 rpm, 4 °C). Následovalo odstranění supernatantu a získaný pelet byl skladován v mrazicím zařízení (−32 °C) až do purifikace.

4.3 Purifikace NS3Hp a NS3H

Při purifikaci NS3H a NS3Hp se postupovalo téměř identicky. Postup purifikace NS3H je popsán v protokolu *Production and Purification of NS3 Helicase of Tick-borne encephalitis virus* od Pauliny D. Anindita, Ph.D. (viz příloha 2). Následující text se tedy bude zabývat přednostně purifikací NS3Hp.

4.3.1 Lýza buněk

Bakteriální pelet byl vyňat z mrazicího zařízení, rozpuštěn ve 20 ml pufru A (viz příloha 1) a lyzován průchodem skrze lyzační komoru při tlaku 20 000 psi (pounds per square inch) v Microfluzizer LM20 (Microfluidics). Lyzát byl následně 60 min centrifugován v Heraeus-

Multifuge X3R (Thermo Fisher Scientific) při 24 000 *rcf* a 4 °C. Vzniklý supernatant (obsahující cytoplasmatickou frakci s požadovaným proteinem) byl odebrán a dále purifikován.

4.3.2 Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech

Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech byla prováděna v purifikačním systému ÄKTA pure™ 25 M (GE HealthCare) s využitím kolony HisTrap™ HP 5ml (Cytiva).

Kolona byla promyta 25 ml destilované vody, následně ekvilibrována 25 ml pufru A (viz příloha 1), 25 ml elučního pufru B (viz příloha 1) a nakonec opět ekvilibrována 25 ml pufru A. Proteinový vzorek (viz kapitola 4.3.1) byl na kolonu nanášen pomocí vzorkové pumpy rychlostí průtoku 1 ml/min. Průběh chromatografie byl monitorován spektrofotometrickým snímačem za vlnové délky 280 nm. Proteiny, které se nenavázaly na kolonu, byly jímány do tzv. průtočné frakce. Po odmytí této části vzorku byla kolona promývána (průtok 1 ml/min) 90 % ekvilibračním pufrem (pufr A) a 10 % elučním pufrem (pufr B), čímž v ní byla vytvořena koncentrace imidazolu 100 mM a došlo k uvolnění nespecificky navázaných proteinů, které byly jímány do samostatné frakce. Purifikace požadovaného proteinu probíhala gradientem elučního pufru B, kdy bylo postupně během 20 min zvyšováno procentuální zastoupení elučního pufru z 10 % na 100 % a tím koncentrace imidazolu z 100 mM na 1 M. Po zaznamenání zvýšené absorbance na spektrofotometru byl vzorek jímán do číslovaných frakcí po 2 ml. Přítomnost NS3H_p v jednotlivých frakcích byla ověřena pomocí SDS-PAGE (viz kapitola 4.1.4). Celý purifikační systém byl po purifikaci promyt elučním pufrem, ekvilibračním pufrem, destilovanou vodou, a nakonec naplněn 20% etanolem.

4.3.3 Heparinová afinitní chromatografie

I tato chromatografie byla provedena v purifikačním systému ÄKTA pure™ 25 M (GE HealthCare). Byla využita kolona HiTrap Heparin HP column (Cytiva).

Purifikační systém byl analogicky s předchozí purifikací promyt nejprve destilovanou vodou, poté ekvilibrován ekvilibračním pufrem C (viz příloha 1), elučním pufrem D (viz příloha 1) a znovu pufrem C.

Na základě analýzy vzorků pomocí SDS-PAGE byly vybrány frakce obsahující NS3H_p. Ty byly smíchány dohromady a naředěny takovým množstvím dilučního pufru (viz příloha 1), aby byla koncentrace NaCl snížena z 500 mM na 50 mM. Takto naředěný vzorek byl stočen (10 min, 14 000 rpm, 4 °C) v centrifuze Heraeus-Multifuge X3R (Thermo Fisher Scientific) a získaný supernatant byl nanesen na kolonu pomocí vzorkové pumpy o průtoku 1 ml/min a byla jímána průtočná frakce. Po nanesení celého vzorku byla kolona dále promývána ekvilibračním pufrem C při stejném průtoku, dokud se zvýšená absorbance neustálila na základní hodnotě. Protein byl purifikován gradientem elučního pufru D, kdy bylo v průběhu 20 min graduálně zvyšováno procentuální zastoupení elučního pufru D z 0 % na 100 % (při zachování průtoku 1 ml/min), čímž byla koncentrace NaCl postupně navýšena z 50 mM na 1 M. Po zachycení zvýšené absorbance při vlnové délce 280 nm na spektrofotometrickém senzoru byl vzorek jímán do

2 ml frakcí. Vzorky z jednotlivých frakcí byly následně opět testovány pomocí SDS-PAGE na přítomnost NS3H_p. Purifikační systém byl analogicky s předchozí purifikací převeden do etanolu.

4.3.4 Velikostně vylučovací chromatografie

Při této purifikaci byl znovu využit purifikační systém ÄKTA pure™ 25 M (GE HealthCare) s připojenou kolonou Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva). Kolona byla promyta destilovanou vodou a následně ekvilibrována pufrům C (viz příloha 1).

Frakce z heparinové afinitní chromatografie, u které byl pomocí SDS-PAGE zjištěn dostatečný obsah NS3H_p, byla stočena pomocí centrifugy 5415 R (Eppendorf) při 15 000 *rcf* a 4 °C po dobu 60 s (pro odstranění případného precipitátu). Stříkačkou bylo nanášeno 500 μ l vzorku, ze které byl následně vzorek vpraven na kolonu. Purifikace probíhala konstantním průtokem pufru C (0,3 ml/min). Po zachycení nárůstu absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 280 nm byl vzorek jímán do číslovaných frakcí po 0,5 ml. Jednotlivé frakce byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE a přesná koncentrace NS3H_p byla měřena pomocí spektrofotometru NanoDrop™ One (viz kapitola 4.3.5). Purifikační systém byl promyt pufrům C, poté destilovanou vodou, a nakonec převeden do etanolu.

4.3.5 Měření koncentrace pomocí NanoDrop™ One

Vzorky získané velikostně vylučovací chromatografií byly měřeny pomocí spektrofotometru NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific) při vlnové délce 280 nm. Do přístroje byly vloženy informace o našem proteinu^{vii} a následně byl na snímač přístroje nanášen přibližně 1 μ l vzorku, snímač byl poté přiklopen uzávěrem. Změřené koncentrace byly zaznamenány. Před samotným měřením byl snímač očištěn destilovanou vodou, mezi jednotlivými měřeními pak pouze otřen papírovou utěrkou. Po ukončení měření byl opět očištěn destilovanou vodou.

4.4 Biochemická analýza NS3H_p a NS3H s využitím EnzChek® Phosphate Kit

Enzymatické aktivity NS3H_p a NS3H byly měřeny pomocí sady EnzChek® Phosphate Kit (Invitrogen) ve čtečce mikrodětiček Synergy H1 Multimode Reader (BioTek). Jednotlivé komponenty kitu byly skladovány při teplotě -20 °C a pro použití připraveny dle manuálu výrobce. Všechny přísady jsou popsány v příloze 1 [23].

^{vii} absorbance látek v roztoku se řídí tzv. Lambert-Beerovým zákonem. Ten říká, že její velikost bude rovna součinu tloušťky vrstvy roztoku, molární koncentraci a tzv. extinkčnímu koeficientu, který je charakteristický pro konkrétní látku. Pokud tento koeficient známe, absorbanci jsme schopni změřit a tloušťka vrstvy roztoku je charakterizována parametry přístroje, pak jsme na základě tohoto zákona schopni vypočítat molární koncentraci zkoumané látky v roztoku [10]

Pro ověření funkčnosti purinové nukleosidfosforylázy (PNP) obsažené v sadě byla změřena absorbance při vlnové délce 360 nm u triplikátu následující, tzv. standardní reakce:

Tabulka 2: Standardní reakce (výsledný objem 100 μl)			
Chemikálie	Koncentrace zásobního roztoku	Výsledná koncentrace v reakci	Přidaný objem
EnzChek Buffer	20x	1x	5 μl
MESG	1 mM	200 μM	20 μl
PNP	100 U/ml ^{viii}	1 U/ml	1 μl
P_i	50 mM	1 mM	2 μl
Destilovaná voda			72 μl

Reakce probíhala po dobu 30 min při teplotě 30 °C a absorbance byla měřena každých 60 s. Do měření byl zařazen triplikát standardní reakce bez KH_2PO_4 (forma v jaké byl do ostatních reakcí dodáván fosfát- P_i), který sloužil jako negativní kontrola. Naměřené hodnoty absorbance byly v rámci triplikátů zprůměrovány a byla od nich odečtena nulová absorbance stanovená dle negativní kontroly.

4.4.1 Standardní fosfátová křivka

Při stanovování standardní fosfátové křivky byla měřena absorbance při vlnové délce 360 nm u triplikátů standardních reakcí (viz předchozí kapitola) s různými koncentracemi P_i . Byly použity koncentrace 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM a 100 μM . Reakce probíhala opět 30 min při teplotě 30 °C. Do měření byl zařazen také triplikát standardní reakce s nulovou koncentrací P_i , který sloužil jako negativní kontrola.

Naměřené hodnoty absorbance byly zprůměrovány v rámci triplikátů a byla od nich odečtena nulová hodnota absorbance (stanovená podle negativní kontroly).

4.4.2 Ověření optimální koncentrace NS3H

Vhodná koncentrace NS3H byla již zjištěna v rámci předchozích studií a v rámci této práce byla ověřena [3]. Zkoumanými koncentracemi (které lze v tabulce 3 dosadit za x) byly 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, 3,125 nM a 1,562 5 nM. Byl měřen vývoj absorbance při vlnové délce 360 nm u triplikátů reakčních směsí popsanych v tabulce 3:

^{viii} jednotky na mililitr (U z anglického „Units“)

Tabulka 3: Reakce na ověření vhodné koncentrace NS3H (výsledný objem 100 μ l)			
Chemikálie	Koncentrace zásobního roztoku	Výsledná koncentrace v reakci	Přidaný objem
EnzChek Buffer	20x	1x	5 μ l
MESG	1 mM	200 μ M	20 μ l
PNP	100 U/ml	1 U/ml	1 μ l
ATP	100 mM	1 mM	1 μ l
Poly A	20 mg/ml	0,5 mg/ml	2,5 μ l
NS3H	16,52 μ M	x μ M	$y = \frac{100 \times x}{16,52}$ μ l
Destilovaná voda			70,5 μ l - y

Reakce probíhaly po dobu 30 min při teplotě 30 °C, absorbance byla měřena v 60 s intervalech. Do měření byl zahrnut také triplikát reakce neobsahující enzym, který sloužil jako negativní kontrola. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány v rámci triplikátů a byla od nich odečtena nulová hodnota absorbance určená dle negativní kontroly.

4.4.3 Zjištění optimální koncentrace NS3H_p

Zjištění optimální koncentrace NS3H_p bylo provedeno obdobně jako ověření vhodné koncentrace NS3H. Testované koncentrace jsou zaznamenány v následující tabulce:

Tabulka 4: Zkoumané koncentrace NS3H _p					
1.	1000 nM	4.	125 nM	7.	25 nM
2.	500 nM	5.	62,5 nM	8.	12,5 nM
3.	250 nM	6.	31,25 nM	9.	6,25 nM

Do měření byl zahrnut triplikát reakce bez enzymu, sloužící jako negativní kontrola, a triplikát reakce obsahující NS3H o koncentraci 6,25 nM, který měl funkci pozitivní kontroly. Všechny reakce probíhaly 30 min při teplotě 30 °C s periodou měření absorbance 45 s.

Změřené absorbance byly průměrovány v rámci triplikátů a byla od nich odečtena nulová hodnota absorbance stanovená dle negativní kontroly.

4.4.4 Enzymová kinetika

Pro výpočet enzymové kinetiky byla do reakce k 100 nM NS3H_p přidána různá koncentrace ATP. Absorbance byla měřena při 360 nm u triplikátů následujících reakcí:

Tabulka 5: Reakce pro ověření vhodné koncentrace ATP (výsledný objem 100 μl)			
Chemikálie	Koncentrace zásobního roztoku	Výsledná koncentrace v reakci	Přidaný objem
EnzChek Buffer	20x	1x	5 μl
MESG	1 mM	200 μM	20 μl
PNP	100 U/ml	1 U/ml	1 μl
ATP	100 mM	$x \mu\text{M}$	$\frac{x}{1000} \mu\text{l}$
Poly A	20 mg/ml	0,5 mg/ml	2,5 μl
NS3H _p	16,52 μM	100 nM	0,3 μl
Destilovaná voda			34,2 $\mu\text{l} - x$

Zkoumané koncentracemi ATP (které lze v tabulce 5 dosadit za x) jsou zaznamenány v tabulce 6:

Tabulka 6: Zkoumané koncentrace ATP					
1.	2000 μM	4.	250 μM	7.	31,25 μM
2.	1000 μM	5.	125 μM	8.	15,625 μM
3.	500 μM	6.	62,5 μM	9.	7,812 5 μM

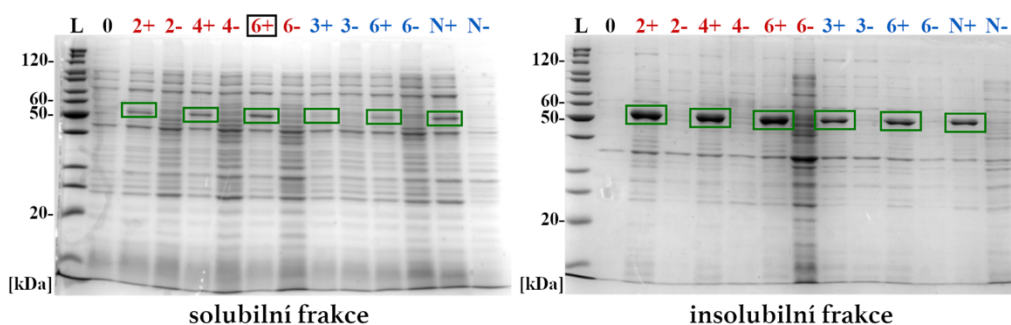
Reakce probíhaly 30 min při 30 °C, absorbance byla měřena každých 40 s. Též byl zařazen triplikát reakce pro negativní kontrolu (neobsahující NS3H_p, při koncentraci ATP 2000 μM) a triplikát pro pozitivní kontrolu (NS3H_p nahrazen NS3H o koncentraci 6,25 nM, při koncentraci ATP 2000 μM). Změřené hodnoty byly průměrovány v rámci triplikátů a byla od nich odečtena nulová hodnota absorbance stanovená dle negativní kontroly.

5 VÝSLEDKY

5.1 Produkce NS3H_p

5.1.1 Pilotní produkce

Při pilotní produkci NS3H_p byl zkoumán výnos proteinu v bakteriálním expresním systému *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL při teplotách 18 °C a 30 °C. Také byl prozkoumán vliv délky produkce po indukci 1 mM IPTG. Zkoumanými časovými úseky byly 2 h, 4 h a 6 h u kultury rostlé při 30 °C a 3 h, 6 h a přes noc (tzv. overnight) u kultury rostlé při 18 °C. V těchto časových intervalech byly odebírány 1 ml vzorky kultur, které byly následně rozděleny na rozpustnou (solubilní) a nerozpustnou (insolubilní) frakci a přítomnost NS3H_p byla zjišťována pomocí SDS-PAGE ve 12,5% polyakrylamidových gelech (viz obrázek 13). K oběma zaindukovaným kulturám byla vytvořena jedna nezaindukovaná, která rostla při stejných podmínkách, rovněž z ní byly odebírány vzorky a sloužila jako negativní kontrola.



Obrázek 13: SDS-PAGE analýza vzorků z pilotní produkce. Solubilní frakce všech vzorků se nachází na gelu vlevo, insolubilní frakce na gelu vpravo. Vzorky z kultur inkubovaných při 30 °C jsou označeny červeným písmem, vzorky z kultur inkubovaných při 18 °C modrým písmem. Vzorky odebírané po 2 h, 4 h a 6 h z kultury inkubované při 30 °C jsou označeny 2, 4 a 6, vzorky odebírané po 3 h, 6 h a následujícího dne (overnight) z kultury inkubované při 18 °C jsou označeny 3, 6 a N. Vzorky z kultur, ve kterých byla indukována produkce 1 mM IPTG, jsou označeny +, vzorky z nezaindukovaných kultur jsou označeny -. Vzorek z kultur před indukcí je označen 0 a ladder (proteinový standard) je označen L. Zeleným rámečkem je označen proteinový vzorek velikostně odpovídající NS3H_p. Černým rámečkem jsou označeny podmínky, při kterých byl výnos NS3H_p v solubilní frakci nejvyšší

Po analýze vzorků pomocí SDS-PAGE byla zjištěna násobně vyšší přítomnost NS3H_p v insolubilní frakci oproti frakci solubilní. Největší množství proteinu v solubilní frakci bylo ve vzorku z kultury inkubované při 30 °C po dobu 6 h. Tyto podmínky byly tudíž zvoleny pro velkoprodukci.

5.1.2 Velkoobjemová produkce

Na základě dat získaných z pilotní produkce byl NS3H_p vyprodukován ve velkém objemu. Buňky *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, byly znovu transformovány plazmidem pET-19b

nesoucím gen pro NS3H_p a rozetřeny na Petriho misku obsahující LB medium s antibiotiky. Z jedné bakteriální kolonie byla připravena noční kultura, která byla inkubována při 37 °C. Následující den byla noční kultura inokulována do LB média a výsledná bakteriální kultura byla inkubována při 30 °C, a po dosažení OD_{600} 0,625 indukována 1 mM IPTG a ponechána 6 h v třepačce při 30 °C a 180 rpm. Tímto způsobem bylo získáno 3,2 l bakteriální kultury, která byla stočena v centrifuze (30 min, 4200 rpm, 4 °C) a buněčný pelet byl poté uložen do mrazáku (−30 °C).

5.2 Produkce NS3H

Při produkci NS3H se postupovalo dle protokolu *Production and Purification of NS3 Helicase of Tick-borne encephalitis virus* od Pauliny D. Anindita, Ph.D. (viz příloha 2). Rovněž bylo využito bakteriálního expresního systému *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL a plasmidu pET-19b. Buňky byly inkubovány při 37 °C a po dosažení OD_{600} 0,934 byla kultura ochlazená inkubací v lednici (30 min) a následně indukována 1 mM IPTG. Produkce probíhala přes noc v třepačce při 18 °C a 180 rpm. Takto jsme připravili 1,6 l bakteriální kultury, která byla stočena (30 min, 4200 rpm, 4 °C) a buněčný pelet byl opět uložen do mrazáku (−30 °C).

5.3 Purifikace NS3H_p a NS3H

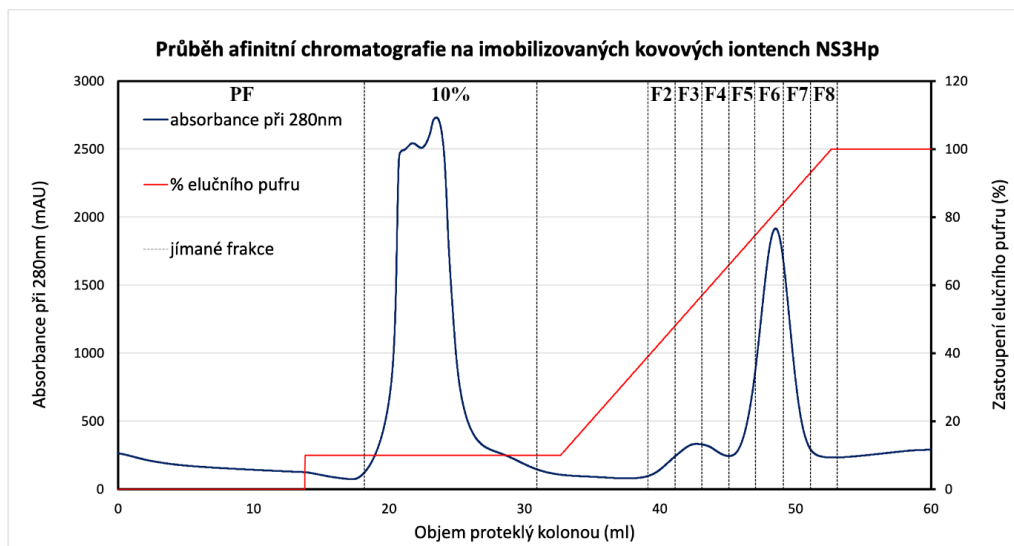
5.3.1 Lýza buněk

Bakteriální pelety obsahující jeden ze zájmových proteinů NS3H_p či NS3H byly rozmrazeny, rozpuštěny ve 20 ml pufru A (viz příloha 1) a lyzovány pomocí hydraulického vysokotlakého homogenizéru Microfluidizer LM20 (Microfluidics) při 20 000 psi. Buněčné lyzáty byly následně stočeny (60 min, 24 000 rcf, 4 °C) a vzniklý supernatant obsahující solubilní frakci včetně zájmového proteinu byl dále purifikován.

5.3.2 Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech

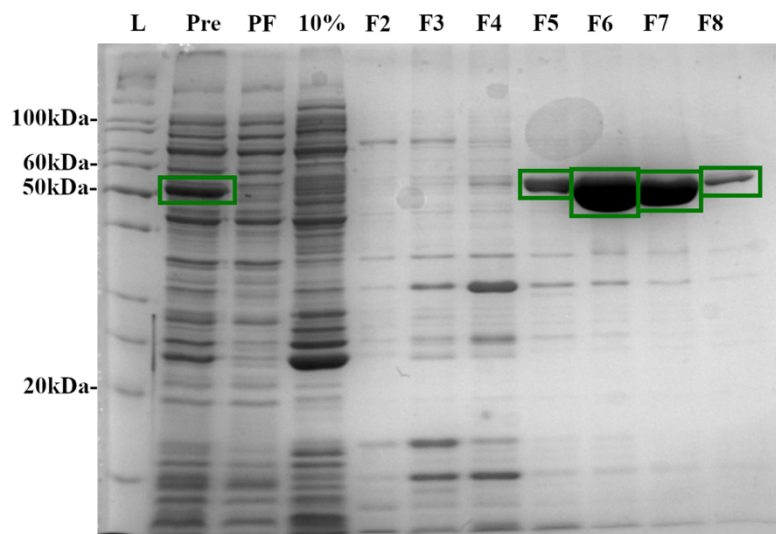
Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC) byla využita k purifikaci zájmových proteinů opatřených „His-tagem“, tedy jak NS3H_p, tak NS3H. Byla provedena v purifikačním systému ÄKTA pure™ 25 M (GE HealthCare) s připojenou kolonou HisTrap™ HP 5ml (Cytiva). Supernatant vzniklý centrifugací lyzátu (viz kapitola 4.3.1) byl nanesen na kolonu. Nejprve byla jímána průtočná frakce (PF). Následně bylo zvýšeno zastoupení elučního pufru B (viz příloha 1) v koloně z 0 % na 10 % (v případě NS3H 5 %), čímž byla vytvořena koncentrace imidazolu 100 mM (v případě NS3H 50 mM). Tím došlo k uvolnění nespecificky navázaných proteinů, které byly jímány do samostatné frakce (značené jako 10%, respektive 5% u NS3H). Poté bylo gradientem během 20 min zvyšováno zastoupení elučního pufru B na 100 %. Po zachycení nárůstu absorbance byly jímány 2 ml frakce. U

NS3H_p bylo takto nasbíráno 7 frakcí (F2-F8)^{ix} a u NS3H šest (F2-F7). Přítomnost proteinu ve frakcích byla ověřena pomocí SDS-PAGE ve 12,5% polyakrylamidových gelech (viz obrázky 15 & 17).

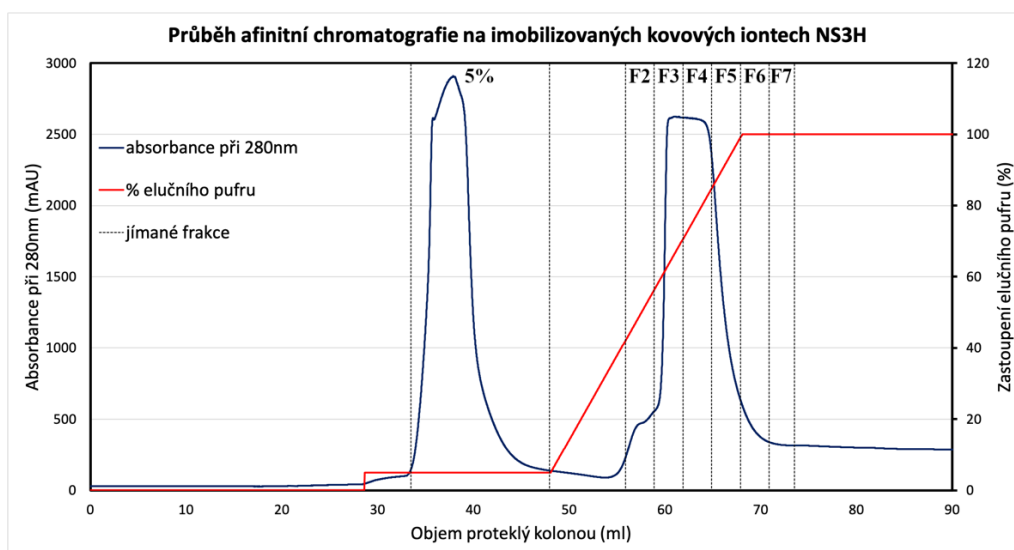


Obrázek 14: Průběh afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech NS3H_p. Jednotlivé jímáné frakce jsou popsány v horní části grafu: PF-průtočná frakce (začátek jímání mimo zobrazený úsek), 10%-nespecificky navázané proteiny, F2-F8-frakce s možným obsahem NS3H_p

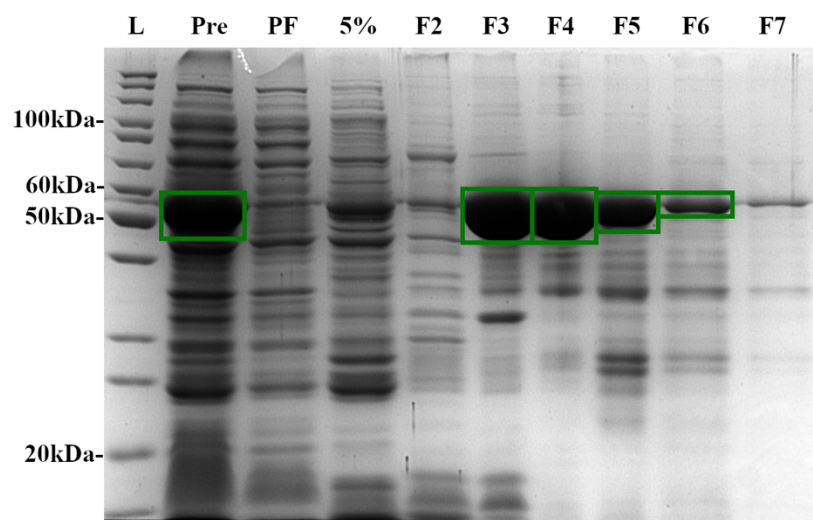
^{ix} vzhledem k principu fungování purifikačního systému neodpovídá absorbance měřená v určitou chvíli přesně vzorku, který zrovna opouští kolonu. Dochází k drobnému časovému posunu. Ten však přístroj automaticky kompenzuje tím, že po začátku jímání frakcí odebírá nejprve určitý přesně definovaný objem do frakce F1 a až poté začíná odebírat frakce o námi stanovené velikosti. Důsledkem toho jsou frakce u afinitních chromatografií číslovány až od F2



Obrázek 15: SDS-PAGE analýza frakcí z afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech NS3H_p. Jednotlivé vzorky jsou označeny: L-ladder (proteinový standard), Pre-vzorek před purifikací, PF-průtočná frakce, 10%-nespecificky navázané proteiny, F2-F8-frakce s možným obsahem NS3H_p. Zeleným rámečkem je označen proteinový vzorek velikostně odpovídající NS3H_p



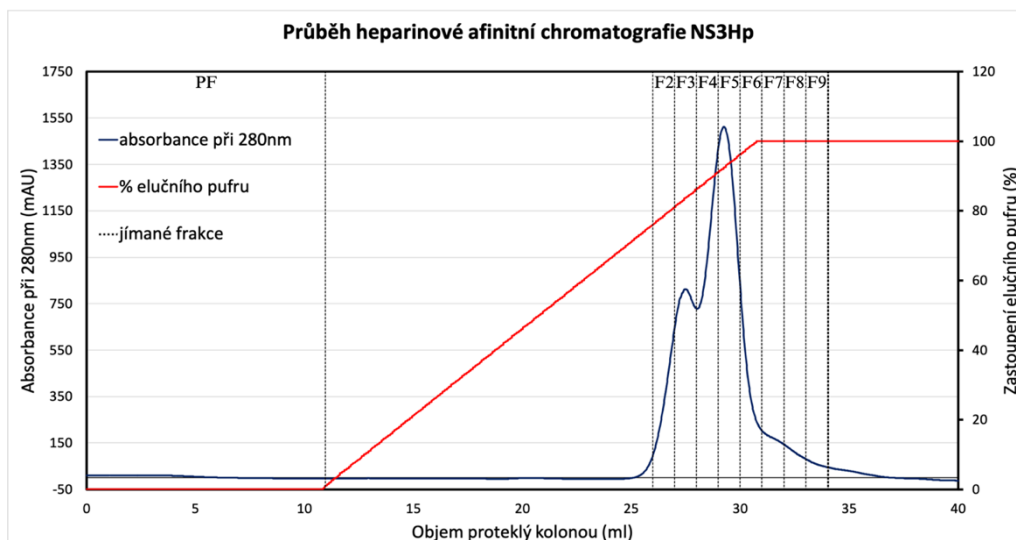
Obrázek 16: Průběh afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech NS3H. Jednotlivé jímané frakce jsou popsány v horní části grafu: 5%-nespecificky navázané proteiny, F2-F7-frakce s možným obsahem NS3H



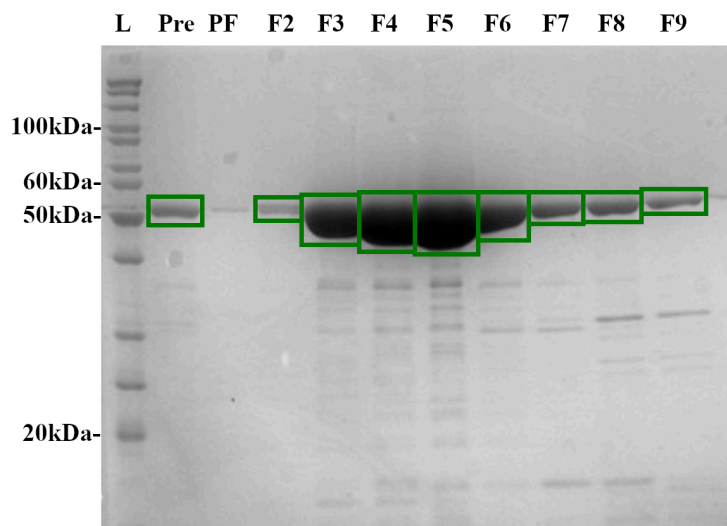
Obrázek 17: SDS-PAGE analýza frakcí z afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech NS3H. Jednotlivé vzorky jsou označeny: L-ladder (proteinový standard), Pre-vzorek před purifikací, PF-průtočná frakce, 5%-nespecificky navázané proteiny, F2-F8-frakce s možným obsahem NS3H. Zeleným rámečkem je označen proteinový vzorek velikostně odpovídající NS3H

5.3.3 Heparinová afinitní chromatografie

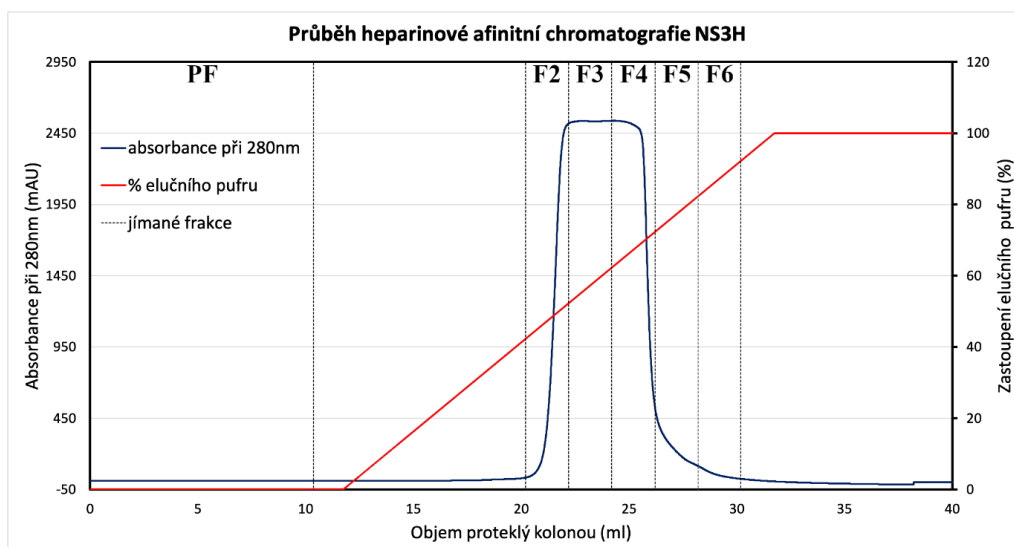
Heparinová afinitní chromatografie byla druhým purifikačním krokem, jenž byl využit k oddělení NS3H_p a NS3H od ostatních bakteriálních proteinů. Pro purifikaci byl využit purifikační systém ÄKTA pure™ 25 M (GE HealthCare) a kolona HiTrap Heparin HP column (Cytiva). Z předchozích chromatografií byly slity frakce s obsahem zájmového proteinu (u NS3H_p F5-F8, u NS3H F3-F5) a ty byly naředěny dilučním pufrem (viz příloha 1) za účelem snížení koncentrace NaCl. Výsledné vzorky byly nanášeny na kolonu (u NS3H byl zjištěn precipitát, který byl před nanesením na kolonu odstraněn stáčením). Nejprve byla sbírána průtočná frakce (PF) a po jejím protečení bylo gradientem v průběhu 20 min zvyšováno zastoupení elučního pufru D (viz příloha 1) z 0 % na 100 %, a tím koncentrace NaCl z ca 50 mM na 1 M. U NS3H byl využit eluční pufr D2 (viz příloha 1) a koncentrace byla ve stejném časovém horizontu zvýšena z ca 50 mM na 2 M. Po zaznamenání nárůstu absorbance (při 280 nm) začaly být jímány frakce s možným obsahem zájmového proteinu. U NS3H_p to bylo osm frakcí (F2-F9) po 1 ml, u NS3H pak pět frakcí (F2-F6) po 2 ml. Jednotlivé frakce byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE ve 12,5% polyakrylamidových gelech (viz obrázky 19 & 21). Při ověřování přítomnosti NS3H ve frakcích F3 & F4 došlo nejspíše k chybě při nakládání vzorků na gel, důsledkem čehož přítomnost proteinu v nich neodpovídá chromatogramu (viz obrázek 20). Obě frakce byly tedy analyzovány stejným způsobem znovu a odpovídající přítomnost NS3H tím byla potvrzena (gel nebyl vložen do práce).



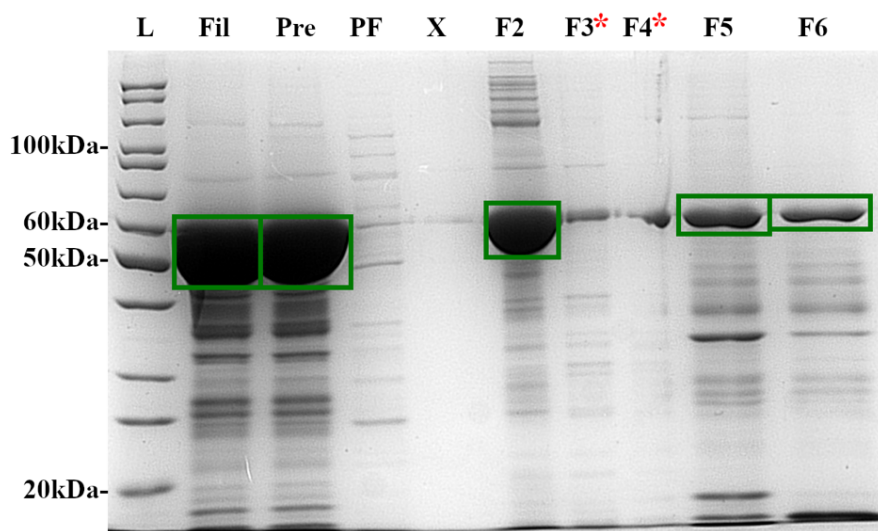
Obrázek 18: Průběh heparinové afinitní chromatografie NS3H_p. Jednotlivé jímané frakce jsou popsány v horní části grafu: PF-průtočná frakce (začátek jímaní mimo zobrazený úsek), F2-F9-frakce s možným obsahem zájmového proteinu



Obrázek 19: SDS-PAGE analýza frakcí z heparinové afinitní chromatografie NS3H_p. Jednotlivé vzorky jsou označeny: L-ladder (proteinový standard), Pre-vzorek před purifikací, PF-průtočná frakce, F2-F9-frakce s možným obsahem NS3H_p. Zeleným rámečkem je označen proteinový vzorek velikostně odpovídající NS3H_p



Obrázek 20: Průběh heparinové afinitní chromatografie NS3H. Jednotlivé jímané frakce jsou popsány v horní části grafu: PF-průtočná frakce (začátek jímaní mimo zobrazený úsek), F2-F6-frakce s možným obsahem NS3H

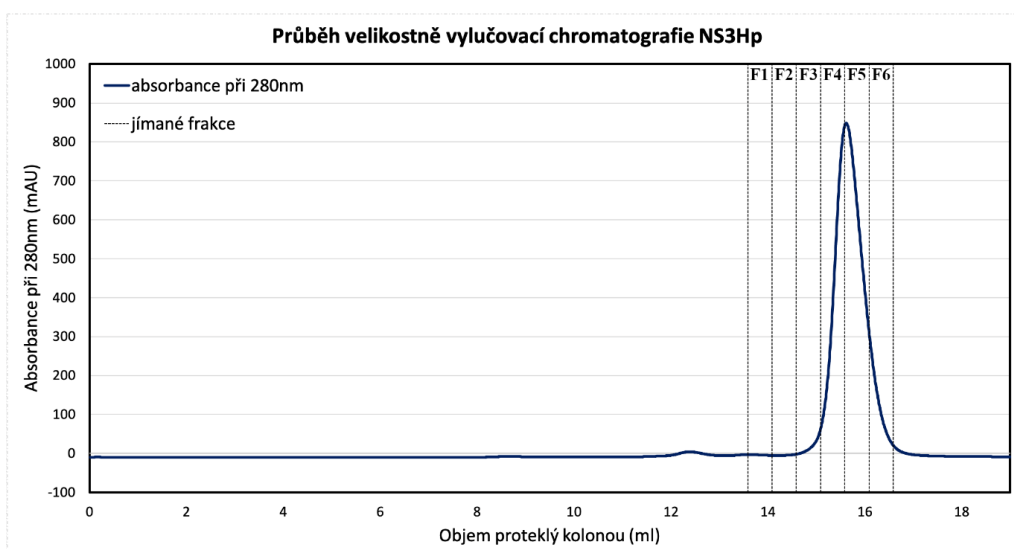


Obrázek 21: SDS-PAGE analýza frakcí z heparinové afinitní chromatografie NS3H. Jednotlivé vzorky jsou označeny: L-ladder (proteinový standard), Fil-vzorek před odstraněním precipitátu, Pre-vzorek před purifikací, PF-průtočná frakce, X-neanalizovaný vzorek, F2-F6-frakce s možným obsahem NS3H. Zeleným rámečkem je označen proteinový vzorek velikostně odpovídající NS3H. Červenou hvězdičkou jsou označeny frakce, které neodpovídaly údajům z chromatogramu a které bylo nutno analyzovat znovu

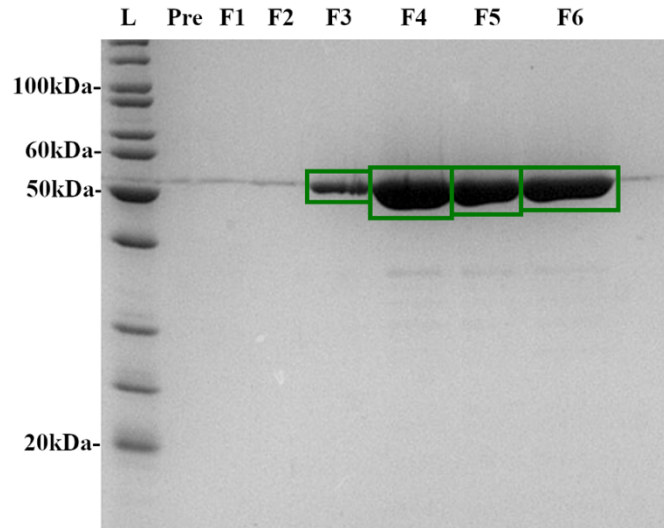
5.3.4 Velikostně vylučovací chromatografie

Velikostně vylučovací chromatografie byla využita k finální purifikaci NS3H_p a NS3H. Byla prováděna v purifikačním systému ÄKTA pure™ 25 M (GE HealthCare) s připojenou kolonou Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva). Z předchozích purifikací byly zvoleny frakce s nejvyšším obsahem zájmového proteinu (u NS3H_p F5, u NS3H F2). Frakce s NS3H_p jsme

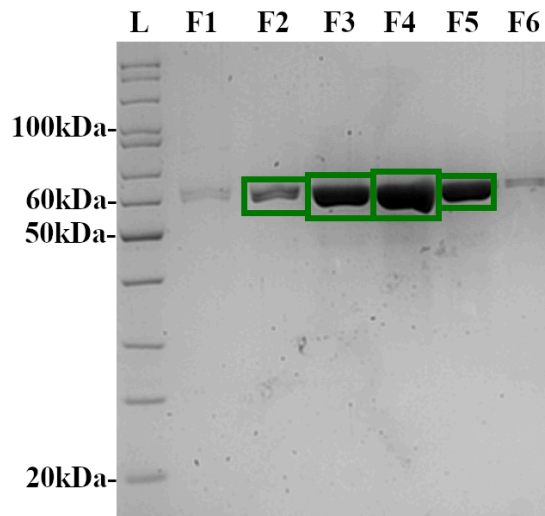
purifikovali rovnou, frakce s NS3H byla nejdříve koncentrována centrifugační filtrací (hrubost filtru 30 *kDa*). Vzorky byly na kolonu postupně nanášeny v objemu po 500 μ l. Průtok kolonou byl nastaven na 0,3 *ml/min* a po zachycení nárůstu absorbance byly jímány frakce po 0,5 *ml*. Frakce byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE ve 12,5% polyakrylamidových gelech (viz obrázky 23 & 24). Chybou autora došlo ke ztrátě dat z velikostně vylučovací chromatografie NS3H, a přiložen je tudíž chromatogram pouze z purifikace NS3H_p (viz obrázek 22). Ve vybraných frakcích obsahujících NS3H_p nebo NS3H byla následně změřena koncentrace zájmového proteinu pomocí spektrofotometru NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific). Změřené hodnoty jsou zapsány v tabulce 7.



Obrázek 22: Průběh velikostně vylučovací chromatografie NS3H_p. Jednotlivé jímání frakce jsou popsány v horní části grafu: F1-F6-frakce s možným obsahem zájmového proteinu



Obrázek 23: SDS-PAGE analýza frakcí z velikostně vylučovací chromatografie NS3H_p. Jednotlivé vzorky jsou označeny: L-ladder (proteinový standard), Pre-vzorek před purifikací (zřejmě chybným nanesením vzorku na gel není patrná přítomnost NS3H_p, o které však nemůže být pochyb vzhledem k analýze vzorků vzniklých purifikací), F1-F6-frakce s možným obsahem NS3H_p. Zeleným rámečkem je označen proteinový vzorek velikostně odpovídající NS3H_p



Obrázek 24: SDS-PAGE analýza frakcí z velikostně vylučovací chromatografie NS3H. Jednotlivé vzorky jsou označeny: L-ladder (proteinový standard), F1-F6-frakce s možným obsahem NS3H. Zeleným rámečkem je označen proteinový vzorek velikostně odpovídající NS3H

Tabulka 7: koncentrace NS3H _p /NS3H ve frakcích z velikostně vylučovací chromatografie						
	NS3H _p					
vzorek	F1	F2	F3	F4	F5	F6
hmotnostní koncentrace (mg/ml)	N*	N	0,096	0,991	1,39	0,798
molární koncentrace (μmol/l) ^x	-	-	1,7981	18,562	26,035	14,947
	NS3H					
vzorek	F1	F2	F3	F4	F5	F6
hmotnostní koncentrace (mg/ml)	0,02	0,08	0,418	0,691	0,367	0,014
molární koncentrace (μmol/l)	0,374 6	1,498 4	7,829 2	12,943	6,874	0,262 2
*neměřitelná						

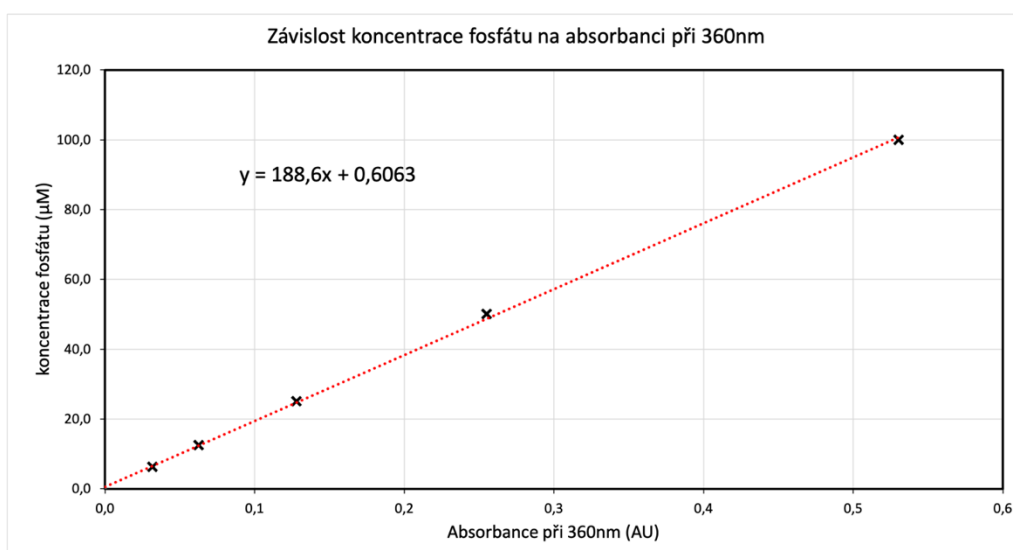
5.4 Biochemická analýza NS3H_p a NS3H s využitím EnzChek® Phosphate Kit

S purifikovanými proteiny bylo následně provedeno několik enzymatických esejí. Ve všech byla využita sada EnzChek® Phosphate Kit (Thermo Fisher Scientific) a čtečka mikrodětiček Synergy H1 Multimode Reader (BioTek).

^x převedeno z hmotnostní koncentrace; molární hmotnost NS3H_p a NS3H je přibližně 53,4 kDa (= 53 400 g/mol), extinkční koeficient je pak 78 295 M⁻¹cm⁻¹

5.4.1 Standardní fosfátová křivka

Byla stanovena standardní fosfátová křivka, pomocí které lze kvantifikovat závislost absorbance reakční směsi při 360 nm na koncentraci fosfátu (P_i). V triplicátech byly připraveny tzv. standardní reakce (viz kapitola 5.4) s různými koncentracemi KH_2PO_4 , (6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM a 100 μM), který sloužil jako zdroj P_i , a u kterých byla následně po dobu 30 min měřena absorbance při 360 nm. Výsledná data byla zanesena do grafu a závislost koncentrace P_i na absorbanci při 360 nm byla vyjádřena funkcí posléze použitou ve výpočtu enzymové kinetiky NS3H_p (viz obrázek 25).



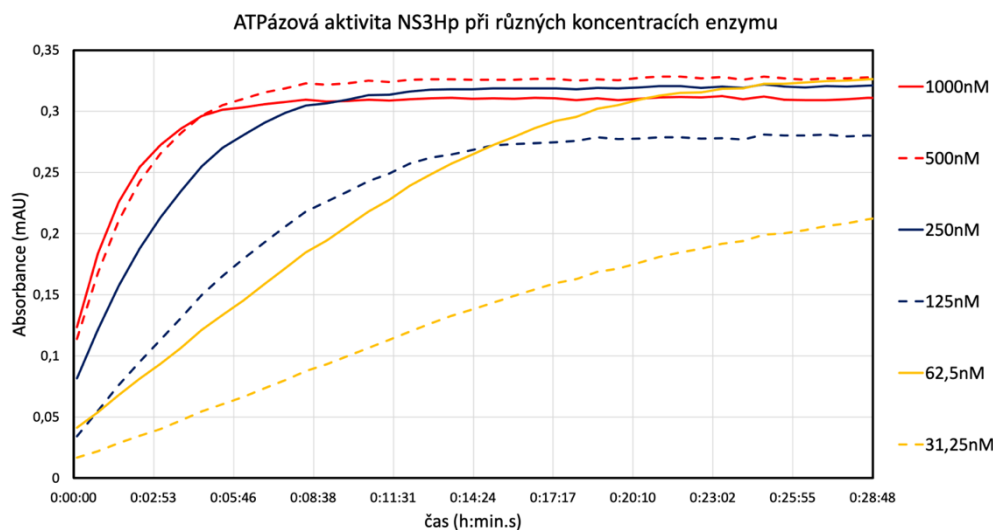
Obrázek 25: Závislost koncentrace fosfátu na absorbanci reakční směsi při 360nm. Černé křížky označují jednotlivá měření, červená přerušovaná linie znázorňuje standardní fosfátovou křivku vygenerovanou na základě získaných dat. Její funkce je zobrazena v grafu

5.4.2 Ověření optimální koncentrace NS3H

Koncentrace NS3H 6,25 nM byla použita pro charakterizaci tohoto enzymu v práci Anindita & kol, 2022. Pro ověření aktivity námi purifikovaného enzymu bylo otestováno několik koncentrací NS3H (25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, 3,125 nM, 1,562 5 nM). Ověřili jsme, že nevhodnější koncentrací pro testování enzymatické aktivity je koncentrace 6,25 nM. Tato koncentrace byla nadále používána v pozitivních kontrolách jednotlivých esejí.

5.4.3 Zjištění optimální koncentrace NS3H_p

Bylo otestováno několik koncentrací NS3H_p s cílem určit tu nejvhodnější pro měření enzymové kinetiky. Testovanými koncentracemi byly 1000 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM, 31,25 nM, 25 nM, 12,5 nM a 6,25 nM. Byl měřen vývoj absorpance při 360 nm u triplikátů reakčních směsí (viz kapitola 5.4.3) po dobu 30 min s periodou měření 45 s. Získaná data byla následně zanesena do grafu (viz obrázek 26.). U koncentrací 25 nM, 12,5 nM a 6,25 nM byla enzymatická aktivita téměř neměřitelná a data nebyla do grafu zahrnuta.



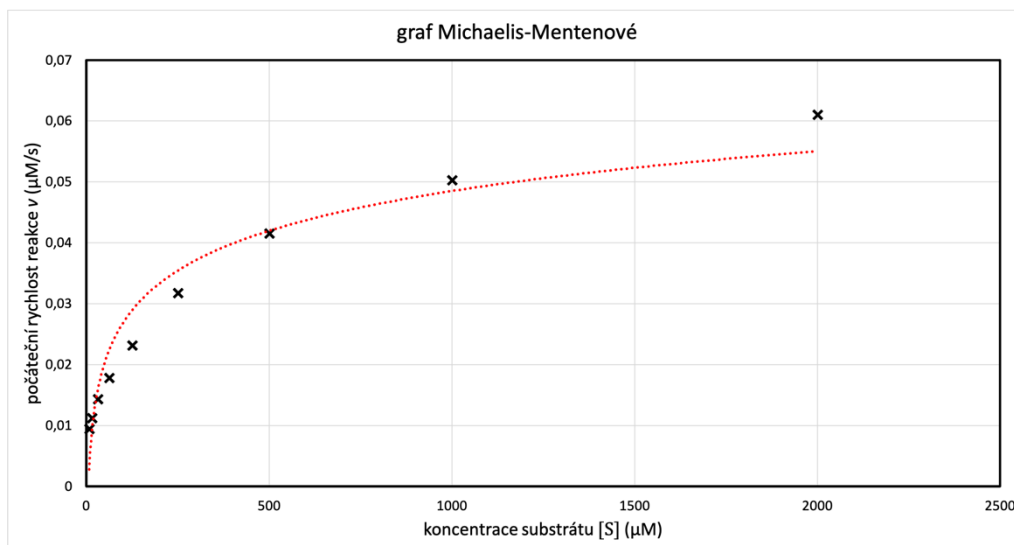
Obrázek 26: Závislost ATPázové aktivity na koncentraci NS3H_p

Z naměřených dat vyplynulo, že optimální koncentrace leží mezi koncentracemi 62,5 nM (při této koncentraci nedosahuje reakce maximální rychlosti) a 125 nM (při které probíhala reakce příliš rychle). Jako nejvhodnější pro další eseje byla proto stanovena koncentrace NS3H_p na 100 nM.

5.4.4 Enzymová kinetika

Posledním krokem bylo stanovení enzymové kinetiky. Byl měřen vývoj absorpance reakčních směsí (viz kapitola 4.4.4) s různými koncentracemi ATP, čímž byla zjištěna závislost rychlosti ATPázové aktivity NS3H_p na koncentraci tohoto substrátu. Jednotlivé koncentrace jsou zapsány v tabulce 6. Získaná data o vývoji absorpance byla převedena na vývoj koncentrace P_i pomocí standardní fosfátové křivky (viz kapitola 5.4.1). Vyšlé hodnoty vývoje koncentrace P_i v čase byly vloženy do grafu a z části, kde se koncentrace vyvíjela lineárně (tzv. reakce 1.řádu),

byla určena počáteční rychlost reakce v . Jednotlivé počáteční rychlosti (pro různé koncentrace substrátu) byly zaneseny do tzv. grafu Michaelis-Mentenové (viz obrázek 27).



Obrázek 27: graf Michaelis-Mentenové zobrazující závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci ATP. Černé křížky zobrazují jednotlivé počáteční rychlosti (v) pro definované koncentrace substrátu, červená přerušovaná křivka znázorňuje vývoj rychlosti enzymatické reakce a byla vygenerována na základě získaných dat

Maximální rychlost V_{max}^{xi} a Michaelis-Mentenové konstanta K_m^{xii} byly vypočítány z Michaelis-Mentenové rovnice:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

kde v je počáteční rychlost reakce, V_{max} je maximální rychlost, $[S]$ je koncentrace substrátu (ATP) a K_m je Michaelis-Mentenové konstanta [17].

V_{max} NS3H_p při koncentraci 100 nM byla vypočítána na 0,061 18 µM/s. Následně z ní byla vypočtena rychlostní konstanta K_{cat}^{xiii} :

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]}$$

^{xi} V_{max} určuje maximální rychlost reakce při plné saturaci enzymu, tedy když jsou všechna aktivní místa obsazena substrátem. Číselně odpovídá maximálnímu počtu molekul substrátu, které je dané množství enzymu schopno přeměnit na produkt za sekundu [17]

^{xii} K_m charakterizuje afinitu enzymu k substrátu. Její hodnota odpovídá koncentraci enzymu, při které je obsazena polovina aktivních míst enzymu a reakce tak probíhá rychlostí poloviční, než je V_{max} . Čím nižší je K_m , tím nižší koncentrace enzymu je třeba na zaplnění poloviny aktivních míst a tím vyšší je tedy afinita enzymu k substrátu [17]

^{xiii} K_{cat} (z anglického „catalytic“) definuje kolik molekul substrátu je přeměněno jednou molekulou enzymu při plné saturaci za sekundu [17]

kde K_{cat} je rychlostní konstanta, V_{max} je maximální rychlost a $[E]$ je celková koncentrace enzymu v reakční směsi (100 nM). Nakonec byla vypočítána efektivita enzymové reakce, která je definována poměrem rychlosti k afinitě enzymu pro substrát (K_{cat}/K_m) [17]. Všechny vypočtené hodnoty byly zaneseny do tabulky 8:

Tabulka 8: Konstanty enzymové kinetiky ATPázové aktivity NS3H _p	
Michaelis-Mentenové konstanta K_m	182 μM
Rychlostní konstanta K_{cat}	0,6 s^{-1}
Efektivita enzymové reakce K_{cat}/K_m	0,003 $s^{-1}\mu M^{-1}$

6 DISKUZE

V rámci práce byly vyprodukovány, purifikovány a otestovány dva proteiny: helikázová doména nestrukturního proteinu NS3 viru klíšťové encefalitidy (NS3H) a především pak pozměněná varianta tohoto proteinu (NS3H_p), ve které byl prolin na pozici 229 cílenou mutagenézí nahrazen alaninem (P229A). Pro produkci se osvědčil bakteriální expresní systém *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, jenž byl v předchozích studiích, na které tato práce navazuje, použit k produkci NS3H.

Pilotní produkce dosud neprodukováného NS3H_p ukázala, že největšího výtěžku enzymu bylo dosaženo, když byly buňky po indukci 1 mM IPTG inkubovány po dobu 6 h při teplotě 30 °C. Tyto podmínky se liší od delší produkce NS3H, která probíhala přes noc, a navíc při nižší teplotě 18 °C. Z toho by se dalo vyvozovat, že i záměna jedné aminokyseliny za jinou může mít zásadní vliv na produkci rekombinantního proteinu v expresním systému a je tedy doporučeno provádět pilotní expresi s každým novým proteinem. Z pilotní produkce ale rovněž vyplývá, že i při podmínkách, ve kterých je produkován NS3H, došlo k značné, byť nižší, produkci NS3H_p. Jaký je přesný důvod odlišnosti optimálních podmínek produkce lze ze získaných dat jen těžko vyvodit a je otázkou, zda by další výzkum této konkrétní rozdílnosti byl nějakým způsobem přínosný.

K purifikaci obou enzymů byly využity tři purifikační kroky. Ve všech třech případech se jednalo o kolonovou chromatografii. První použitou metodou byla kolonová chromatografie na imobilizovaných kovových iontech. Za účelem umožnění této purifikace byly geny kódující oba proteiny vloženy do plasmidu pET-19b, čímž byly rekombinantní proteiny opatřeny N-koncovým „His-tagem“. Purifikace obou proteinů proběhla úspěšně. Při těchto purifikacích byly použity rozdílné koncentrace imidazolu na uvolnění nespecificky navázaných proteinů: zatímco u NS3H byla použita koncentrace 50 mM, u NS3H_p to byla koncentrace 100 mM. Z dat z chromatogramů vyplývá, že použití vyšší koncentrace imidazolu u NS3H_p mohl způsobit vznik druhého „peaku“ (nárůstu absorbance způsobeného uvolňovanými proteiny) v gradientu imidazolu (viz obrázek 14), který odpovídal frakcím F3 a F4. Z SDS-PAGE analýzy těchto frakcí je patrné, že se nejedná o zájmový protein, ale o jiné proteiny, které tímto byly úspěšně odděleny. K tomuto vývoji však při purifikaci NS3H nedošlo (viz obrázek 16), z čehož lze usuzovat, že vyšší koncentrace imidazolu (100 mM) je pro purifikaci NS3H proteinů vhodnější, neboť se nám podařilo odstranit větší část nespecifických proteinů.

Dalším purifikačním krokem byla heparinová afinitní chromatografie. I ta proběhla zdárně v případě obou proteinů. Předpokládá se, že afinita NS3H k heparinu je způsobena podobností jeho struktury s fosfát-ribózovým řetězcem jednovláknové RNA (ssRNA), ke které se enzym přirozeně váže. Posledním purifikačním krokem byla velikostně vylučovací chromatografie, která rovněž proběhla zdárně u obou proteinů.

Z dat z biochemických esejí byla získána Michaelis-Mentenové konstanta K_m , rychlostní konstanta K_{cat} , a efektivita enzymové reakce K_{cat}/K_m pro ATPázovou aktivitu NS3H_p (viz

tabulka 8). V předchozí studii Anindity & kol., 2022 na kterou tato práce navazuje, byly již tyto údaje definující enzymovou kinetiku zjištěny jak pro samotný NS3H, tak pro pět dalších mutantních enzymů, ve kterých byla vždy pozměněna jedna aminokyselina. Hodnoty zjištěné ve studii a v této práci jsou zachyceny v tabulce 9 (mutantní protein z této práce zvýrazněn tučně):

Tabulka 9: Konstanty enzymové kinetiky pro ATPázovou aktivitu NS3H a jejich mutantních proteinů [3]				
název	mutace	K_m (μM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($s^{-1}\mu M^{-1}$)
NS3H	žádná	125 ± 15	$8,8 \pm 0,2$	$0,07 \pm 0,01$
R231A	arginin na p.* 231 za A**	<i>N***</i>	$0,4 \pm 0,2$	-
T270A	treonin na p. 270 za A	87 ± 13	$6,9 \pm 0,3$	$0,08 \pm 0,02$
R274A	arginin na p. 274 za A	$31,1 \pm 6,8$	$2,3 \pm 0,4$	$0,07 \pm 0,06$
D296A	kys. asparagová na p. 296 za A	105 ± 13	$7,3 \pm 0,4$	$0,07 \pm 0,03$
K394A	lysin na p. 394 za A	$74,4 \pm 9,1$	$5,2 \pm 0,5$	$0,07 \pm 0,05$
P229A	prolin na p. 229 za A	182	0,6	0,003
*pozici, **alanin, ***neměřitelná, mutantní protein testovaný v této práci				

Hodnota námi zjištěné K_m pro NS3H_p je značně vyšší než její hodnota pro NS3H, což znamená, že mutací P229A došlo ke snížení afinity enzymu k substrátu, tedy adenosin trifosfátu. Pokles K_{cat} u NS3H_p je ještě znatelnější, a to jak ve srovnání s NS3H, tak s ostatními mutantními proteiny. Při srovnání obou konstant enzymové kinetiky u jednotlivých proteinů se jeví, že jediná dosud provedená mutace, která ovlivnila funkčnost ATPázové aktivity NS3H více než P229A, byla mutace argininu na pozici 231 za alanin. Při ní došlo k tak velkému snížení aktivity, že K_m nebylo možné změřit a K_{cat} se pohybovala v hodnotách ještě nižších než u P229A.

Lze tedy se značnou jistotou prohlásit, že *prolin na pozici 229 má výrazný vliv na ATPázovou aktivitu helikázové domény nestrukturního proteinu NS3 viru klíšťové encefalidity*. Vzhledem k jeho umístění v oblasti zodpovědné za afinitu proteinu k ssRNA, se dá předpokládat, že se na této afinitě nezanedbatelně podílí a při jeho nahrazení nereaktivní aminokyselinou (např. alaninem) dochází k ovlivnění této afinity, bez níž nemohou proběhnout konformační změny na proteinu, což v konečném důsledku vede k inhibici NTPázové aktivity [3].

V návaznosti na tuto práci bude zapotřebí změřit konkrétní afinitu NS3H_p k ssRNA. Ta byla měřena u všech dříve testovaných mutantních proteinů a v této práci tak z časových důvodů nebylo učiněno. Tím bude možné potvrdit, zda je inhibice NTPázové aktivity při odstranění P229 způsobena oslabením afinity k ssRNA, či zda aminokyselina hraje v enzymu nějakou jinou, dosud neznámou roli. Další výzkum by se následně mohl zaměřit na detailní charakterizaci allosterické komunikace mezi P229 a NTPázovým aktivním místem, či na tvorbu molekul, které by se vázaly specificky na P229 a allostericky inhibovaly NTPázovou aktivitu NS3H. Takováto látka, která by účinkovala specificky na virový enzym, aniž by ovlivňovala funkci podobných lidských enzymů, by pak v budoucnu mohla sloužit jako specifické antivirotikum pro léčbu VKE.

7 ZÁVĚR

V rámci této práce byla vyprodukována helikázová doména nestrukturní proteinu NS3 viru klíšťové encefalitidy a mutantní varianta tohoto proteinu ve které byl prolin na pozici 229 nahrazen alaninem. Proteiny byly vyprodukovány v bakteriálním expresním systému s využitím buněk *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL a expresního vektoru pET-19b. V rámci pilotní produkce byly zjištěny nejvhodnější podmínky pro produkci mutantního proteinu. Největší výtěžek proteinu byl získán, probíhala-li produkce při 30 °C po dobu 6 h. Oba proteiny byly poté purifikovány ve třech purifikačních krocích, kterými byly afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech, heparinová afinitní chromatografie a velikostně vylučovací chromatografie.

Následně byla zjištěna enzymová kinetika mutantního proteinu, konkrétně jeho ATPázové aktivity. Zjištěná Michaelis-Mentenové konstanta K_m byla rovna 182 μM , rychlostní konstanta K_{cat} pak 0,6 s^{-1} a efektivita enzymové reakce K_{cat}/K_m 0,003 $s^{-1}\mu M^{-1}$. Ze získaných dat vyplývá, že při odstranění prolinu na pozici 229 dochází k výraznému snížení ATPázové aktivity virového enzymu.

SEZNAM ZDROJŮ

1. AGILENT TECHNOLOGIES. SBL21-CodonPlus Competent Cells Instruction Manual: Catalog #230240, #230245, #230250, #230255, #230265, #230275 and 230280. Online. In: *Agilent Technologies*. 2024. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/230240.pdf>. [cit. 2024-02-06].
2. ANDRISANI, Ourania; LIU, Qian; KEHN, Patricia; LEITNER, Wolfgang W.; MOON, Kyung et al. Biological Functions of DEAD/DEAH-box RNA Helicases in Health and Disease. Online. *Nature Immunology*. 2022, vol. 23, no. 3, s. 354-357. ISSN 1529-2908. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01149-7>. [cit. 2024-02-03].
3. ANINDITA, Paulina Duhita; HALBEISEN, Marco; ŘEHA, David; TUMA, Roman a FRANTA, Zdenek. Mechanistic Insight into the RNA-stimulated ATPase Activity of Tick-Borne Encephalitis Virus Helicase. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2022, vol. 298, no. 10. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102383>. [cit. 2023-12-23].
4. BIO-RAD. *Introduction to Size Exclusion Chromatography*. Online. [2024]. Dostupné z: [https://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/introduction-size-exclusion-chromatography?ID=LUSMV015#:~:text=Size%20exclusion%20chromatography%20\(SEC\)%20separates,the%20pores%20within%20the%20matrix](https://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/introduction-size-exclusion-chromatography?ID=LUSMV015#:~:text=Size%20exclusion%20chromatography%20(SEC)%20separates,the%20pores%20within%20the%20matrix). [cit. 2024-02-06].
5. BOLTEN, Svenja Nicolin; RINAS, Ursula a SCHEPER, Thomas. Heparin: Role in Protein Purification and Substitution with Animal-Component Free Material. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, vol. 102, no. 20, s. 8647-8660. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9263-3>. [cit. 2024-01-04].
6. BRAND, Carolin; BISAILLON, Martin a GEISS, Brian J. Organization of the Flavivirus RNA Replicase Complex. Online. *WIREs RNA*. 2017, vol. 8, no. 6. ISSN 1757-7004. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/wrna.1437>. [cit. 2023-12-23].
7. BROWN, T. A. *Gene Cloning & DNA Analysis: An Introduction*. Eight edition. Wiley Blackwell, 2021. ISBN 978-1-119-64078-3.
8. CHEN, Chin-Yi; FUQUA, Clay; JACKSON, Charlene R.; KADLEC, Kristina a TOP, Eva M. Editorial: Plasmid Transfer-Mechanisms, Ecology, Evolution and Applications. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2022, vol. 13. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.993628>. [cit. 2024-01-23].
9. DU, Fei; LIU, Yun-Qi; XU, Ying-Shuang; LI, Zi-Jia; WANG, Yu-Zhou et al. Regulating the T7 RNA Polymerase Expression in E. coli BL21 (DE3) to Provide More Host Options for Recombinant Protein Production. Online. *Microbial Cell Factories*. 2021, vol. 20, no. 1, s. 1-10. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6>. [cit. 2023-12-29].

10. EDINBURGH INSTRUMENTS. *Blog. The Beer-Lambert Law*. Online, blogový příspěvek. [2024]. Dostupné z: <https://www.edinst.com/blog/the-beer-lambert-law/>. [cit. 2024-02-07].
11. FAIRMAN-WILLIAMS, Margaret E; GUENTHER, Ulf-Peter a JANKOWSKY, Eckhard. SF1 and SF2 Helicases: Family Matters. Online. *Current Opinion in Structural Biology*. 2010, vol. 20, no. 3, s. 313-324. ISSN 0959440X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.03.011>. [cit. 2024-02-03].
12. FALKE, J.J. a CORBIN, J.A. Affinity Tags for Protein Purification. Online. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2013, s. 61-65. ISBN 9780123786319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00173-0>. [cit. 2024-01-08].
13. FÜZIK, Tibor; FORMANOVÁ, Petra; RŮŽEK, Daniel; YOSHII, Kentaro; NIEDRIG, Matthias et al. Structure of Tick-Borne Encephalitis Virus and Its Neutralization by a Monoclonal Antibody. Online. *Nature Communications*. 2018, roč. 9, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02882-0>. [cit. 2024-02-01].
14. HOORNWEG, Tabitha E.; GODEKE, Gert-Jan; HOOGERWERF, Marieke N.; VAN KASTEREN, Puck B.; DE VRIES, Ankje et al. Rescue and In Vitro Characterization of a Divergent TBEV-Eu Strain from the Netherlands. Online. *Scientific Reports*. 2023, vol. 13, no. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29075-0>. [cit. 2024-01-31].
15. IOWA STATE UNIVERSITY. *Crystallography Basics*. Online. [2024]. Dostupné z: <https://www.cif.iastate.edu/services/acide/xrd-tutorial/crystallography>. [cit. 2024-02-06].
16. MERCK. *G Force Calculator — RCF to RPM*. Online. [2024]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/support/calculators-and-apps/g-force-calculator>. [cit. 2024-02-06].
17. *Michaelis-Menten Kinetics*. Online. In: LibreTexts Chemistry. [2024]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Biological_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Biological_Chemistry\)/Enzymes/Enzymatic_Kinetics/Michaelis-Menten_Kinetics](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Biological_Chemistry/Supplemental_Modules_(Biological_Chemistry)/Enzymes/Enzymatic_Kinetics/Michaelis-Menten_Kinetics). [cit. 2024-02-11].
18. NOWAKOWSKI, Andrew B.; WOBIG, William J. a PETERING, David H. Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins with Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. Online. *Metallomics*. 2014, vol. 6, no. 5, s. 1068-1078. ISSN 1756-5901. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C4MT00033A>. [cit. 2023-12-29].
19. PULKKINEN, Lauri; BUTCHER, Sarah a ANASTASINA, Maria. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View. Online. *Viruses*. 2018, vol. 10, no. 7. ISSN 1999-4915. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/v10070350>. [cit. 2023-12-23].
20. SNAPGENE. *PET-19b*. Online. [2024]. Dostupné z: [https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_\(novagen\)/pET-19b](https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-19b). [cit. 2024-02-06].
21. SOUSA, R. T7 RNA Polymerase. Online. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2013, s. 355-359. ISBN 9780123786319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00267-X>. [cit. 2024-01-23].

22. THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. *Ixodes ricinus*.
Online. 2022. Dostupné z:
https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/ixodes_ricinus.pdf. [cit. 2024-02-06].
23. THERMO FISHER SCIENTIFIC. EnzChek Phosphate Assay Kit: E-6646. Online. In:
Thermo Fisher Scientific. 2002. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp06646.pdf>. [cit. 2024-02-06].
24. URH, Marjeta; SIMPSON, Dan a ZHAO, Kate. Chapter 26 Affinity Chromatography.
Online. Guide to Protein Purification, 2nd Edition. *Methods in Enzymology*. 2009, vol. 463, s. 417-438. ISBN 9780123745361. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63026-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63026-3). [cit. 2024-01-04].

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Použité chemikálie a pufry (součást tohoto dokumentu)

Příloha 2: Paulina D. Anindita, Ph.D.-*Production and Purification of NS3 Helicase of Tick-borne encephalitis virus* (přiloženo v elektronické verzi ve formátu PDF)

Příloha 1: Použité chemikálie a pufrы

Transformace & produkce	
SOC růstové medium	0,5 % kvasničný extrakt; 2 % trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂
LB medium	LB: 10 g trypton; 5 g kvasničný extrakt; 5 g NaCl 16 g LB rozpuštěno v 800 g destilované vody
SDS-PAGE	
lyzační pufr	50 mM KH ₂ PO ₄ ; 400 mM NaCl; 100 mM KCl; 10 % glycerol; 0,5 % Triton X-100; 10 mM imidazol; pH 7,8
12,5% polyakrylamidový gel	6,3 ml 4 % akrylamid; 8,3 ml H ₂ O; 5 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 200 µl 10 % SDS; 200 µl 10% APS; 20 µl TEMED
2X vzorkový pufr	2,5 ml 0,5M Tris-HCl, pH 6,8; 2 ml glycerol (100%); 0,4 ml β-mercaptoetanol; 0,02 g bromofenolová modř; 0,4 g SDS, destilovanou vodou doplněno na objem 10 ml
1X vzorkový pufr	1,25 ml 0,5M Tris-HCl, pH 6,8; 1 ml glycerol (100%); 0,2 ml β-mercaptoetanol; 0,01 g bromofenolová modř; 0,2 g SDS; destilovanou vodou doplněno na objem 10 ml
1X SDS-PAGE elektroforetický pufr	25 mM Tris; 192 mM glycín; 0,1 % SDS
fixační roztok	50 % etanol; 2 % kys. fosforečná
barvicí roztok	1,2 g Coomassie Blue G-250; 23,4 ml kys. fosforečná; 100 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ; doplněno destilovanou vodou na 800 ml; 200 ml 100% etanol
Purifikace	
pufr A	20 mM Na-HEPES pH 7.0; 500 nM NaCl
pufr B	20 mM Na-HEPES pH 7.0; 500 nM NaCl; 1M imidazol
diluční pufr	20 mM Na-HEPES pH 7.0
pufr C	20 mM Na-HEPES pH 7.0; 150 mM NaCl
pufr D1	20 mM Na-HEPES pH 7.0; 1 M NaCl
pufr D2	20 mM Na-HEPES pH 7.0, 2 M NaCl
EnzChek® Phosphate Assay Kit (invitrogen)	
MESG	1 mM MESG
PNP	100 U/ml PNP
EnzChek buffer	1 M Tris-HCl; 20 mM MgCl ₂ , pH 7,5; 2 mM NaN ₃
P _i	50 mM KH ₂ PO ₄ ; 2 mM NaN ₃
Poly A*	20 mg/ml
*není součástí kitu	