

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Michal Hanigovský

Příprava rekombinantního čepičkujícího enzymu z viru opičích neštovic a jeho
biochemická charakterizace

Preparation of recombinant capping enzyme from the monkeypox virus and its
biochemical characterization

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D. a řádně sem citoval všechny použité zdroje a literaturu. Zároveň prohlašuji, že tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného či stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli Mgr. et Mgr. Evženu Bouřovi, Ph.D., za odborné vedení práce. Děkuji také Mgr. Barboře Landové, Ph.D., za pomoc při řešení různých otázek a čas strávený vysvětlováním problematiky. Rovněž bych rád poděkoval Mgr. Janě Havlíkové a Mgr. Viktorii Beňové za podrobnou osvětu ohledně hmyzích buněk a značnou pomoc při práci s nimi. Dále patří poděkování Mgr. Dominice Chalupské, Ph.D., za její vysvětlení problematiky enzymatických esejí a množství času, který mi věnovala. Poděkování patří také RNDr. Karlovi Chalupskému, Ph.D., který mi pomohl s měřením na hmotnostním spektrometru. Současně bych chtěl poděkovat celému kolektivu za vytvoření příjemných pracovních podmínek. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům, kteří mě podpořili a hnali dopředu.

Práce byla podpořena projektem Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií - Next Generation EU.

This work was supported by the project National Institute of virology and bacteriology (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5103) - Funded by the European Union - Next Generation EU.

Abstrakt

Po nedávné globální pandemii způsobené koronavirem SARS-CoV-2 se začátkem května 2022 znovu objevil patogenní virus opičích neštovic (MPXV), který vzbudil značné obavy. Od vyhubení smrtelných pravých neštovic v 90. letech minulého století je to další vir z rodiny *Poxviridae* ohrožující lidstvo. První případy infekce tímto virem byly zaznamenány v Africe, kde se čas od času objeví malá epidemie. Postupně však byly hlášeny i případy nákazy v Evropě a Americe, včetně osob, které nenavštívily postižené země v Africe. Do dnešního dne bylo zaznamenáno více než 99 000 případů ve 116 zemích. Tento virus napadá nejen lidi ale také psy, hlodavce, primáty a další. Naštěstí smrtnost tohoto viru není tak vysoká jako u pravých neštovic a symptomy jsou podobné chřipce, doprovázené charakteristickou vyrážkou. MPXV je obalený virus o velikosti 200–250 nm s typickým „cihlovým“ tvarem a řadíme ho k větším virům. Jeho genom se skládá z dvouvláknové DNA (dsDNA) o velikosti 200 kb a kóduje zhruba 200 proteinů. Mezi tyto proteiny patří také čepičkující enzym, který je zodpovědný za syntézu 5' mRNA čepičky 0 (cap-0). Tento enzym se skládá ze dvou podjednotek, E1 a E12. Podjednotka E1 je katalycky aktivní a obsahuje všechny katalytické moduly potřebné pro tvorbu čepičky, RNA trifosfatasu, guanylyltransferasu a methyltransferasu. Podjednotka E12 sama o sobě katalycky aktivní není, avšak váže se na C-koncovou methyltransferasovou doménu a stimuluje její aktivitu.

V praktické části této práce jsme se zaměřili na charakterizaci aktivity čepičkujícího enzymu z viru opičích neštovic. Hlavní pozornost jsme věnovali methyltransferasové doméně. Heterodimerní komplex E1-E12 byl exprimován v bakteriálním systému *E. coli* a v hmyzích buňkách linie Sf9. Tvorba mRNA čepičky byla sledována *in vitro* pomocí aktivitních esejí se substráty RNA, GTP a SAM (S-adenosyl-methionin). Dále byla zkoumaná inhibice methyltransferasové domény nespécifickým inhibítoem sinefunginem. Výsledky této práce poukazují na aktivitu podjednotky E1 a na roli E12 v procesu N-7 methylace mRNA čepičky. Tyto poznatky přispívají k lepšímu pochopení tvorby cap-0 a můžou podpořit budoucí výzkum a hledání nových inhibítoů.

Klíčová slova: virus opičích neštovic, čepičkující enzym, mRNA čepička, E1, E12, inhibice

Abstract

Following the recent global pandemic caused by the SARS-CoV-2 coronavirus, a new pathogenic virus, monkeypox virus (MPXV), reemerged in early May 2022, raising significant concern. Since the eradication of the deadly smallpox virus in the 1990s, MPXV represents another virus from the Poxviridae family threatening humanity. Initial cases of this virus were recorded in Africa, where occasional small epidemics occur. However, cases have also been reported in Europe and the Americas, including individuals who had not visited affected regions in Africa. As of today, more than 99,000 cases have been recorded in 116 countries. This virus infects not only humans but also dogs, rodents, primates, and other animals. Fortunately, the mortality rate of this virus is not as high as that of smallpox, and symptoms resemble those of influenza, followed by a characteristic rash. MPXV is an enveloped virus with a size of 200–250 nm and a typical "brick" shape, classifying it as one of the larger viruses. Its genome consists of double-stranded DNA (dsDNA) with a size of 200 kb and encodes approximately 200 proteins. Among these proteins is the capping enzyme responsible for synthesizing the 5' mRNA cap 0 (cap-0). This enzyme comprises two subunits, E1 and E12. The E1 subunit is catalytically active and contains all the catalytic modules necessary for cap formation, including RNA triphosphatase, guanylyltransferase, and methyltransferase. The E12 subunit, while not catalytically active on its own, binds to the C-terminal methyltransferase domain and stimulates its activity.

In the practical part of this study, we focused on characterizing the activity of the capping enzyme from the monkeypox virus. The primary attention was directed towards the methyltransferase domain. The heterodimeric complex E1-E12 was expressed in both a bacterial system (*E. coli*) and insect cells (Sf9 cell line). The formation of the mRNA cap was studied *in vitro* using activity assays with RNA, GTP, and SAM (S-adenosyl-methionine) substrates. Additionally, the inhibition of the methyltransferase domain by the nonspecific inhibitor sinefungin was investigated. The results of this study highlight the activity of the E1 subunit and the role of E12 in the N-7 methylation of the mRNA cap. These findings contribute to a better understanding of cap-0 formation and may support future research and the search for new inhibitors.

Key words: Monkeypox virus, capping enzyme, mRNA cap, E1, E12, inhibition

Obsah

1	Úvod	12
2	Literární přehled	13
2.1	Virus opičích neštovic.....	13
2.1.1	Transmise.....	14
2.1.2	Patogeneze.....	16
2.1.3	Klinický obraz.....	19
2.2	mRNA čepička.....	20
2.2.1	Virová mRNA čepička.....	22
2.2.2	Monkeypox virus capping enzyme.....	24
3	Cíle práce	27
4	Materiál a metody	28
4.1	Přístrojové vybavení.....	28
4.2	Laboratorní pomůcky.....	29
4.3	Chemikálie.....	29
4.4	Média a pufry.....	31
4.5	Enzymy a buňky.....	32
4.6	DNA plazmidy.....	32
4.7	Příprava rekombinantních proteinů E1 a E12 v buňkách <i>E. coli</i> BL21(DE3) – Codon plus RIL.....	33
4.7.1	Transformace bakterií.....	33
4.7.2	Exprese rekombinantních proteinů.....	34
4.7.3	Izolace rekombinantních proteinů.....	34
4.7.4	Afinitní chromatografie.....	35
4.7.5	Dialýza a štěpení histidinové kotvy.....	35
4.7.6	Reversní afinitní chromatografie.....	36

4.7.7	Gelová permeační chromatografie a elektroforéza v polyakrylamidovém gelu ..	36
4.8	Příprava rekombinantního proteinu E1 v hmyzích buňkách Sf9	37
4.8.1	Příprava rekombinantního bacmidu	37
4.8.2	Izolace bacmidu z bakterií <i>E. coli</i> DH10BacY	38
4.8.3	Transfekce hmyzích buněk z linie Sf9	38
4.8.4	Výroba 2. generace bakulovirů	39
4.8.5	Expresní test a SDS-PAGE	39
4.8.6	Exprese proteinu E1 v buňkách Sf9	40
4.8.7	Izolace rekombinantního proteinu E1	40
4.8.8	Afinitní chromatografie.....	41
4.8.9	SDS-PAGE.....	41
4.9	Aktivitní esej	41
4.9.1	Příprava vzorku	42
4.9.2	Optimalizace RNA	43
4.9.3	Optimalizace GTP	44
4.9.4	Optimalizace SAM.....	45
4.9.5	Aktivita E a inhibice sinefunginem	46
4.9.6	Kvantifikace SAH	48
4.9.7	Efektivní dávka (EC ₅₀) SIN.....	48
4.9.8	Analýza aktivity podjednotky E1	48
5	Výsledky	50
5.1	Příprava proteinů E1 a E12 v buňkách <i>E. coli</i> BL21(DE3) - Codon Plus RIL	50
5.1.1	Transformace bakterií	50
5.1.2	Izolace a purifikace podjednotky E12	50
5.2	Příprava proteinu E1 v hmyzích buňkách linie Sf9.....	52
5.2.1	Transfekce buněk	52
5.2.2	Izolace a purifikace proteinu E1	54

5.3	Aktivitní esej	54
5.3.1	Optimalizační reakce	54
5.3.2	Aktivita a inhibice komplexu E1-E12	61
5.3.3	EC ₅₀	65
5.3.4	Kontrola E1 podjednotky	67
6	Diskuse	71
7	Závěr	75
8	Seznam použité literatury	76

Seznam zkratek

2'-O-MTase	Methyltransferasa metylující RNA v pozici 2'-O
A	Absorbance
AA	Aminokyseliny (z angl. <i>Amino acid</i>)
AMP	Ampicilin
BACMID	Rekombinantní bakulovirový plazmid
CB	Konžská republika (z angl. <i>Congo Basin</i>)
CE	Čepičkující enzym (z angl. <i>Capping enzyme</i>)
D1	Protein D1
D12	Protein D12
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Dvouvláknová DNA (z angl. <i>Double-stranded DNA</i>)
DTT	Dithiotreitol
E1	Protein E1
E12	Protein E12
EC ₅₀	Efektivní dávka (z angl. <i>Effective dose</i>)
EDTA	Kyselina etyléndiamíntetraoctová
EK	Extinkční koeficient
ESI	Ionizace elektrosprejem (z angl. <i>Electrospray ionization</i>)
EV	Mimobuněčná virová částice (z angl. <i>Extracelullar virion</i>)
GFP	Zelenej fluorescenční protein (z angl. <i>Green fluorescence protein</i>)
GMP	Guanylmonofosfát
GTase	Guanyltrasnferasa
GTP	Guanyltrifosfát
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>High performance liquid chromatography</i>)
IV	Nezralý virion (z angl. <i>Immature virion</i>)

Kan	Kanamycin
MBP	Protein vázající maltózu (z angl. <i>Maltose binding protien</i>)
MPOX	Opičí neštovice (z angl. <i>Monkey pox</i>)
MPXV	Virus opičích neštovic (z angl. <i>Monkeypox virus</i>)
MRM	Multiple Reaction Monitoring
mRNA	Mediátorová RNA
MTase	Methyltrasferasa
MV	Zralá virová částice (z angl. <i>Mature virion</i>)
MW	Molární hmotnost (z angl. <i>Mollar weight</i>)
NK	NK buňka (z angl. <i>Natural killer</i>)
NTase	Nukletidtransferasa
OB	Oligonukleotidová/oligosacharidová vázající doména (z angl. <i>oligonucleotide/oligosacharide binding</i>)
OD ₆₀₀	Optická hustota při vlnové délce 600 nm (z angl. <i>Optic density</i>)
pI	Izoelektrický bod
poly(A)	Polyadenyovaný konec mRNA
pre-mRNA	prekurzorová mRNA
RIG-I	Z angl. <i>Retinoic Acid Inducible Gene-I</i>
RNA	Ribonukleová kyselina (z angl. <i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	Ribozomální RNA
SAH	S-adenosyl-L-homocystein
SAM	S-adenosyl-L-methionin
SARS-CoV-2	Koronavirus 2 způsobující těžký akutní respirační syndrom (z angl. <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
SDS	Dodecylsírán sodný (z angl. <i>Sodium dodecyl sulfat</i>)
SDS-PAGE	Polyakrylamidová elektroforéza v prostředí SDS
SIN	Sinefungin
ssRNA	Jednovlákonová RNA (z angl. <i>Single-stranded RNA</i>)

SUMO	Sumo protein (z angl. <i>Small ubiquitin-like modifier</i>)
TE	Tris/EDTA
TLR	Toll-like receptor
TPase	Trifosfatasa
Tris	Tris(hydroxymetyl)aminometán
tRNA	Transferová RNA
TTM	Trifosfátový tunelový metaloenzym (z angl. <i>Triphosphate tunnel metaloenzyme</i>)
VACV	Vakcína virus (z angl. <i>Vaccinia viru</i>)
VP39	Methyltransferasa VP39
WA	Západoafrický (z angl. <i>Western African</i>)
WHO	Světová zdravotnícka organizace (z angl. <i>World health organisation</i>)
X-Gal	Bromchlorindoxyl galaktozid

1 Úvod

Virus opičích neštovic (MPXV, z angl. *Monkeypox virus*), způsobující zoonotické onemocnění opičích neštovic (MPOX, z angl. *Monkeypox*), patří do rodiny *Poxviridae*, rodu *Orthopoxvirus*, kde se nacházejí také viry velbloudích neštovic, kravských neštovic, variola virus (původce pravých neštovic) a vaccinia virus. Od vyhubení pravých neštovic v roce 1980, potvrzeného Světovou zdravotní organizací (WHO, z angl. *World Health Organization*), je MPXV nejvíce nakažlivým virem z rodu *Orthopoxvirus*, který postihuje lidskou populaci [1,2].

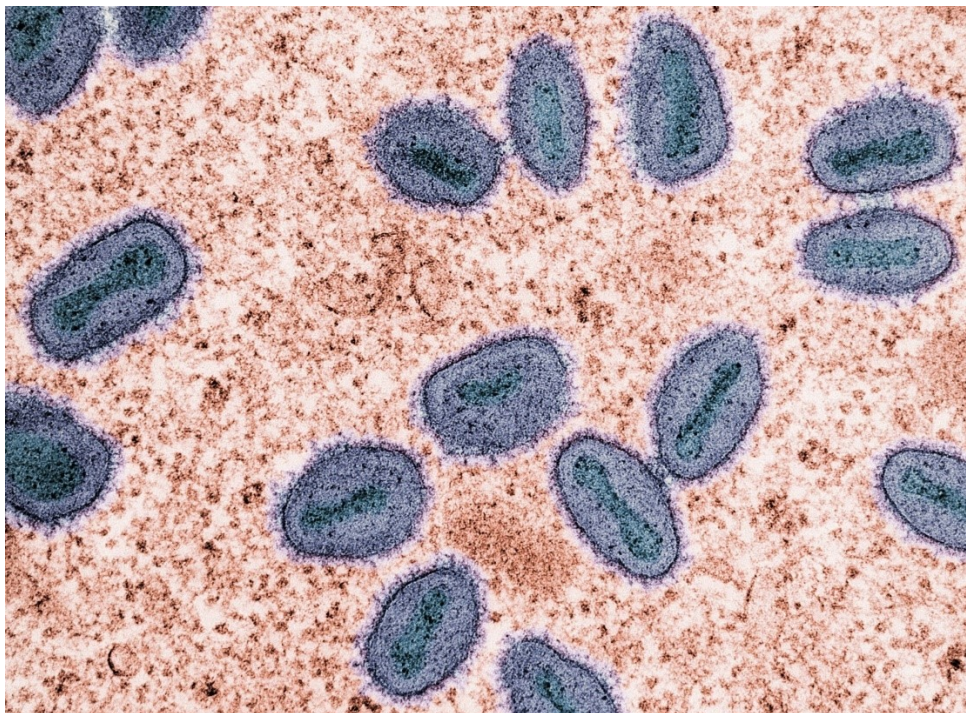
Tento patogen byl poprvé objeven a izolován z nakažených opic v roce 1959, které byly transportovány ze Singapuru do dánské výzkumné laboratoře. O jedenáct let později, v roce 1970, byl zaznamenán první případ nákazy u devíti měsíčního dítěte v Kongu [3]. Nemoc se převážně šířila v centrální a západní Africe. Dřívější výzkum naznačil vysokou míru nákazy u dětí ve věku 5–9 let, a to převážně v malých vesnicích, kde tyto děti lovily a jedly malé savce. V uplynulých letech se MPXV rozšířil ve Spojených státech amerických, Spojeném království, Izraeli a Singapuru. K dni 29. 8. 2022 bylo podle WHO zaznamenáno přes 45 tisíc případů ve více než 90 zemích Evropy, Ameriky, východního Středomoří, západního Pacifiku a jihovýchodní Asie. Postupně se zvyšující MPXV epidemie představuje potenciální nebezpečí pro světovou populaci [4].

Genom MPXV se skládá z dvoušroubovice DNA (dsDNA), avšak jeho replikace probíhá v cytoplazmě, což naznačuje přítomnost zakódovaných mechanismů pro replikaci DNA a RNA. Kromě těchto dvou drah je zde přítomen také zakódovaný mechanismus pro syntézu RNA čepičky, který vytváří RNA čepičku na 5' konec virové RNA. Tato RNA čepička hraje klíčovou roli při infekci hostitelské buňky. Zajišťuje translaci virové RNA, chrání RNA před vrozenou imunitní odpovědí hostitele a také je pro virus důležitá z hlediska stability RNA [5,6]. Čepička se skládá ze 7-methylguanozinu, který je spojen přes 5'5'-trifosfátový můstek s prvním nukleotidem mRNA. Syntéza RNA čepičky probíhá postupně ve třech enzymatických krocích, které zajišťují RNA triphosfatáza (TPase), guanylyltransferáza (GTase) a N7-guanine methyltransferáza (MTase) [7]. U MPXV jsou tyto tři katalytické moduly součástí enzymu E1. Pro svou aktivitu vyžaduje tento enzym přítomnost podjednotky E12, která stimuluje MTase doménu, a společně podjednotky E1 a E12 tvoří čepičkující enzym [8].

2 Literární přehled

2.1 Virus opičích neštovic

MPXV patří do rozsáhlé rodiny *Poxviridae*, která zahrnuje viry s dvoušroubovicovou DNA (dsDNA) a které se replikují v cytoplazmě infikovaných hostitelských buněk. Díky jejich schopnosti manipulovat a modulovat imunitní odpověď mají tyto viry schopnost infikovat širokou škálu hostitelů. Poxviry jsou považovány za velmi rozsáhlou skupinu virů, protože byly nalezeny v hmyzu, obojživelnících, ptácích a savcích. Poxviry mají oválnou nebo cihlovitou (z angl. *brick-shaped*) strukturu, což platí i pro virové částice MPXV, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 200–250 nm. Pomocí elektronového mikroskopu byl u MPXV zjištěn bikonkávní tvar jádra [9].



Obrázek 1: MPXV pod elektronovým mikroskopem. Virus je obarven fialovou barvou. Bikonkávní jádro má tmavě zelenou barvu. Vir nabírá tvar cihly nebo oválu [65].

V roce 1980 se podařilo celosvětově vyhubit pravé neštovice pomocí očkování virem Vaccinia. Od prvního zaznamenaného případu nákazy člověka virem MPXV v roce 1970, který měl podobnou klinickou manifestaci jako pravé neštovice, se zvýšila pozornost věnovaná tomuto viru [10,11]. Přibližně o 30 let později byl zaznamenán první případ nákazy mimo

Afriku, kde se potvrdil zoonotický přenos z nakaženého zvířete v USA. Hlavní příčinou nákazy byl import infikovaných zvířat a cestování z afrických zemí. Od té doby se infekce MPXV vyskytovala pouze sporadicky [12]. Na začátku května 2022 propukla nákaza MPXV v Evropě. U mnoho případů se nepotvrdila předešlá návštěva Afriky. Virus se začal šířit celosvětově. Zpočátku nebyl zcela jasný způsob přenosu. Zdálo se, že k většině přenosů docházelo při specifických lidských interakcích, zejména mezi muži, kteří měli pohlavní styk s jinými muži. To naznačovalo adaptaci viru na lidskou populaci a změny v dynamice přenosu [13].

MPXV lze rozdělit do dvou větví: centrální africké (CB, z angl. *Congo Basin*) větve neboli Klad I, která má velmi podobný průběh onemocnění jako pravé neštovice a jejíž smrtnost dosahuje 10 % u neočkované populace, a Klad II nebo západoafrické (WA, z angl. *Western African*) větve, která neměla tak závažný dopad. Smrtnost dosahovala přibližně 4 % a přenos mezi lidmi byl nižší. S novým neendemickým MPXV se začalo diskutovat o přejmenování těchto větví. V rámci společného konsenzu vznikla nová třetí větev, která se vyznačuje jako podskupina WA větve. Aby se názvy zbytečně nekomplikovaly, rozhodlo se, že větve budou pojmenovány jako Klad 1 (CB větev) a Klad 2 a 3 (WA větve) [14].

2.1.1 Transmise

Současná epidemie je první svého druhu, kdy je potvrzeno velké množství případů a také mezilidský přenos mimo oblasti Afriky. Většina nemocných měla lehký průběh choroby, ale některé případy vyžadovaly hospitalizaci [15]. MPXV řadíme k zoonotickým onemocněním, která se mohou přenášet ze zvířat na lidi, z lidí na zvířata nebo mezi lidmi [14]. Přestože byl virus poprvé izolován z opice *Macaca fascicularis*, identita rezervoárového hostitele zůstává nadále nejasná. Některé důkazy naznačují spojitost s domorodými hlodavci Afriky [16].

2.1.1.1 Transmise ze zvířat na lidi

Mnoho epidemií začíná tzv. „spillover“ událostí, tedy evolucí viru, který překoná řadu bariér, aby byl schopen infikovat člověka. Pravděpodobnost „spilloveru“ je podmíněna dynamikou v rezervoáru zvířete, expozicí patogenu a faktory uvnitř člověka, které rozhodují o úspěšnosti infekce. Lidské tělo je takovým patogenům vystavováno neustále, ale většina těchto mikroorganismů není schopna člověka úspěšně infikovat [17].

Potenciálních cest přenosu MPXV ze zvířat na lidi může být několik. V endemických oblastech Afriky jsou hlavními způsoby přenosu přímý kontakt lidí s infikovanými zvířaty,

včetně mrtvých zvířat, kontakt s tělními tekutinami nebo při zpracování a konzumaci masa z těchto zvířat. Byly také zaznamenány případy přenosu v důsledku kousnutí, škrábanců a kontaktu s kontaminovanými předměty [18].

2.1.1.2 Transmise mezi lidmi bez sexuálního styku

MPXV je méně přenosný než nedávno rozšířený smrtící virus SARS-CoV-2, protože se přenáší především při bližším kontaktu, a to prostřednictvím respiračních kapének, přímého dotyku s kontaminovanými objekty, infikovanou vyrážkou na kůži a tělními tekutinami [14]. Vstupní mechanismus orthopoxvirů umožňuje překonání rezistentní syncytiotroblastové bariéry, což znamená, že MPXV může přestupovat placentou a infikovat plod. Po potvrzení vertikálního přenosu MPXV u těhotných žen byla detekována DNA viru v tkáních plodu, pupeční šňůře a placentě.

2.1.1.3 Transmise skrz sexuální styk

Historicky nebyl MPXV spojován se sexuálním kontaktem. Nicméně během současné epidemie se začalo zdát, že sexuální přenos je vysoce pravděpodobný. Analýzy vzorků slin, rektálních stěrů, semene, moči a fekálních vzorků ukázaly značný obsah viru [19]. Mnoho mladých mužů nahlásilo nákazu po předchozím sexuálním kontaktu s jiným mužem a většina pacientů zaznamenala vyrážky v genitální a anální oblasti. Infekce MPXV byla disproporčně častější u bisexuálních a homosexuálních mužů s již existující pohlavně přenosnou chorobou. Sexuální přenos zatím nebyl oficiálně uznán jako způsob přenosu u jiných poxvirových onemocnění. MPXV je první, u kterého byla uznána sexuální cesta jako predominantní cesta vstupu. Avšak prodloužený intimní kontakt během sexu a expozice tělním sekrecím mohou přispět k přenosu [20,21].

antigény. Virotransdukční proteiny manipulují s elementy zodpovědnými za signální transdukcí v infikovaných buňkách, například brání apoptóze. K viromimikrům řadíme molekuly cílící na extracelulární dráhy, které hostitelská buňka využívá k regulaci prvotních fází zánětlivých odpovědí [25].

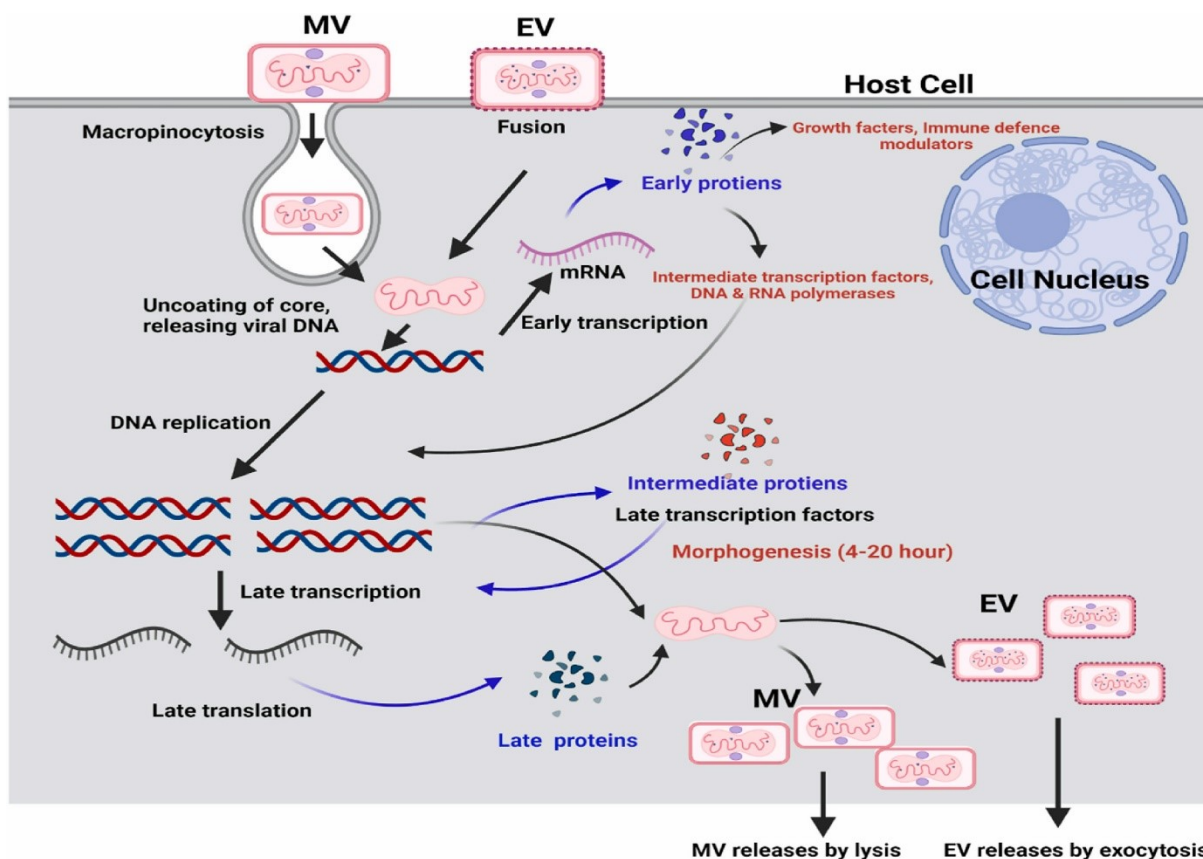
MPXV může vstupovat do organismu prostřednictvím nasopharyngu, oropharyngu nebo přes pokožku. Virus se nejprve replikuje v místě infekce a následně vstupuje do nejbližších lymfatických uzlin. Poté se dostává do krevního oběhu a infikuje další orgány [26]. Všechny Poxviry obsahují virovou membránu, a přestože se jedná o DNA viry, jejich replikace probíhá výhradně v cytoplazmě [27]. Poxviry jsou unikátní tím, že vytvářejí dvě různé infekční částice: zralou částici (MV, z angl. *mature virion*) a extracelulární částici (EV, z angl. *extracellular virion*). Tyto částice se liší v epitopických charakteristikách na svém povrchu. MV částice obsahují DNA genom, dvě laterální bílkovinné části a lipidovou dvouvrstvu. MV částice mohou být dále obaleny a vytvářejí EV částice. Přesný mechanismus vzniku těchto částic však dosud není zcela objasněn. Předpokládá se, že MV částice jsou nejvíce zapojeny do přenosu mezi hostiteli, zatímco EV částice hrají roli v přenosu uvnitř hostitele. Elektronová mikroskopie naznačila, že EV částice využívají fúzi s plazmatickou membránou pro vstup do buňky, zatímco MV částice jsou do buňky transportovány prostřednictvím makropinocytózy [28,29,30]. Dosud není znám specifický receptor, který by MPXV využíval pro vstup do buňky [23].

MPXV větve (CB, WA) jsou geneticky odlišné. CB větev, která je více virulentní, obsahuje ve svém genomu zakódované inhibitory komplementárních enzymů, zatímco WA větve tyto inhibitory postrádá. To vysvětluje nižší patogenitu WA větve. Obě větve jsou však obecně méně virulentní než variola virus. Ukázalo se, že inhibitory komplementu z CB větve nejsou tak efektivní jako inhibitory komplementu z variola viru. Tyto inhibitory jsou strukturně a funkčně homologmi s lidskými regulátory, které kontrolují aktivaci komplementu. MPXV tedy není schopen efektivně regulovat protizánětlivou odpověď prostřednictvím komplementárních enzymů a jeho schopnost stimulovat imunitní odpověď v lymfatických uzlinách činí infekci MPOX méně závažnou než pravý neštovice [31,32].

Vstup viru do buňky může probíhat při neutrálním pH prostřednictvím fúze s povrchem buňky, ale také makropinocytózou, která může probíhat současně s virovou fúzí. Z posledních studií vyplývá, že makropinocytóza probíhající při nízkém pH je dominantnější cestou vstupu. Po vstupu viru do buňky je virový obsah transportován hlouběji do cytoplazmy, kde začíná první fáze transkripce [33]. V okolí jádra se rovněž zahajuje replikace DNA a vytváří se tzv. virová továrna [34]. Geny jsou klasifikovány do časných, středních a pozdějších tříd na základě

jejich exprese. Velká virová DNA-dependentní RNA polymeráza a proteiny odpovědné za potlačení imunitní odpovědi se nacházejí přímo uvnitř viru, což umožňuje okamžitou syntézu mRNA po napadení hostitele. Exprese dalších genů vyžaduje syntézu proteinů de novo. V časně fázi infekce jsou virové továrny vázány na drsné endoplazmatické retikulum, které se v pozdějších fázích disintegruje [35]. Transkripce středních a pozdějších genů je závislá na replikaci DNA, i když část těchto proteinů může být exprimována z primární DNA. Funkčně jsou proteiny ze třídy středních genů nejvíce zodpovědné za vazbu a balení DNA a neenzymaticky spojené s vnitřkem viru. Pozdější geny kódují enzymy pro redoxní disulfidové vazby, morfogenezi viru, membránové MV proteiny a komponenty pro fúzi viru s buňkou. Z uvedeného vyplývá, že úloha středních genů spočívá v interakci s nově syntetizovanou DNA, zatímco pozdější geny jsou klíčové pro formaci primární virové membrány [36].

Virové továrny nacházející se v cytoplasmě produkují membrány ve tvaru pŕlměsíce, které obsahují viroplasmu, a po rozšíření tvoří sférické nezralé částice (IV, z angl. *Immature virion*). IV částice, které ve svém jádru obsahují množství vnitřních a membránových proteinů, podléhají maturaci za vzniku zralých MV částic. Tyto MV částice jsou po lŕze uvolněny z buňky [37]. Nicméně ne všechny MV částice jsou okamžitě uvolněny; část z nich je obalena druhou membránou odvozenou z trans-Golgiho aparátu nebo endosomální cisterny a je transportována k plazmatické membráně pomocí mikrotubulů. Na plazmatické membráně dochází k fúzi EV částic s plazmatickou membránou. EV částice může zůstat zakomponována v buňce, nebo po formování s aktinem dochází k exocytóze, případně napadá sousední buňku [30,37].



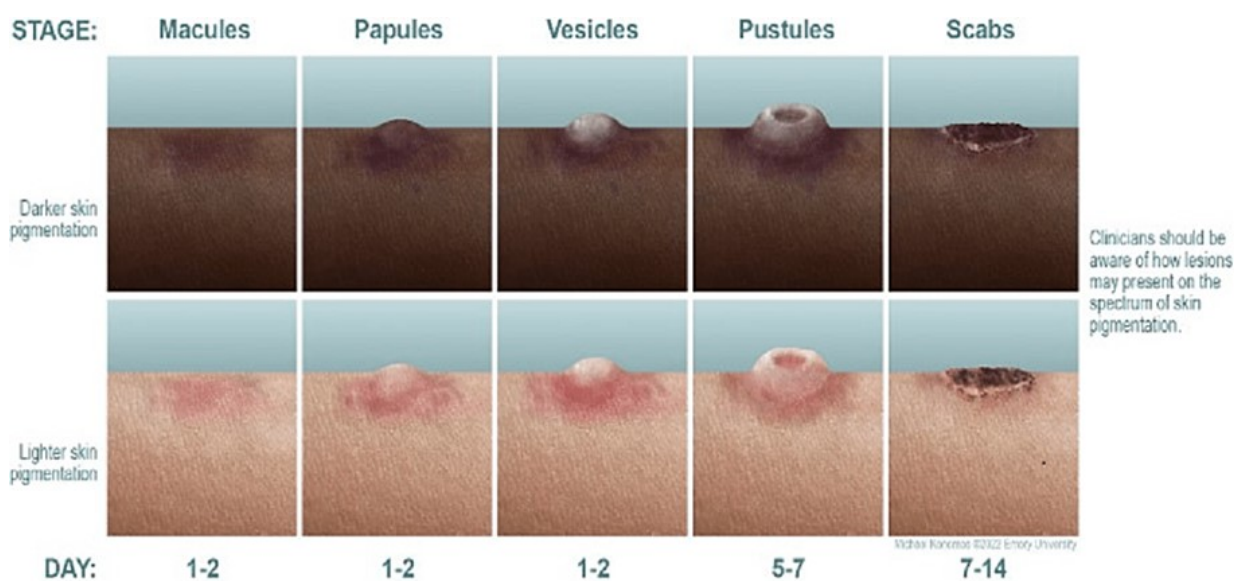
Obrázek 3: Cytosolická dráha a cyklus MPXV. MV částice vstupují do buňky prostřednictvím makropinocytózy, zatímco EV částice využívají fúzi s plazmatickou membránou. Po uvolnění virové DNA začíná primární transkripce, jejímž hlavním cílem je potlačení imunitní odpovědi hostitele. Replikace DNA následně vede k sekundární transkripci a tvorbě MV a EV částic. MV částice se z buňky uvolňují lýzou, přičemž část z nich se transformuje na EV částice, které jsou uvolňovány prostřednictvím exocytózy [26].

2.1.3 Klinický obraz

Po každém novém vypuknutí onemocnění příslušné státní instituce vypracují kritéria pro definici případu na základě zpráv od WHO. U MPXV je jednoznačné definování klinického obrazu poněkud složitější, protože se podobá jiným virovým onemocněním, jako jsou herpes, syfilis nebo plané neštovice. Proto je důležité definovat tato kritéria s větší specifikací, abychom předešli nadměrnému odběru vzorků [38].

Inkubační doba MPOX se pohybuje v rozmezí od 5 dnů až 3 týdnů po expozici a infikování. Předchází jí prodromální fáze, která trvá přibližně 2 dny. Během této doby se mohou objevit symptomy jako horečka nad 38,5 °C, zimnice, nevolnost, bolesti hlavy, zad a hrdla, dušnost, svalové křeče a lymfadenopatie [39,40,41]. Následně se vyvine charakteristická

vyrážka, která je typická pro toto onemocnění. Tvorba vyrážky začíná makulou o velikosti 2–5 mm, která se postupně vyvíjí do papuly, vezikuly, a nakonec do pustuly. Po 1–2 týdnech se pustuly odlupují (Obr. 4) [42]. Tento rys je odlišný od jiných onemocnění s vezikopustulární vyrážkou. Nicméně nelze jej s jistotou odlišit od pravých neštovic, a proto je nezbytná laboratorní diagnostika v kombinaci s epidemiologickou rešerší [43]. Nálezy vyrážek byly lokalizovány v oblasti inokulace, což může vysvětlovat, proč byly pozorovány v blízkosti genitálií, análů a úst. Léze se dále rozšiřují od úst a trupu ke končetinám, včetně dlaní a chodidel [39,40]. Vyrážka může na těle přetrvávat 14–21 dnů a pacient zůstává infekční po celou tuto dobu, až do úplného vymizení vyrážky [44].

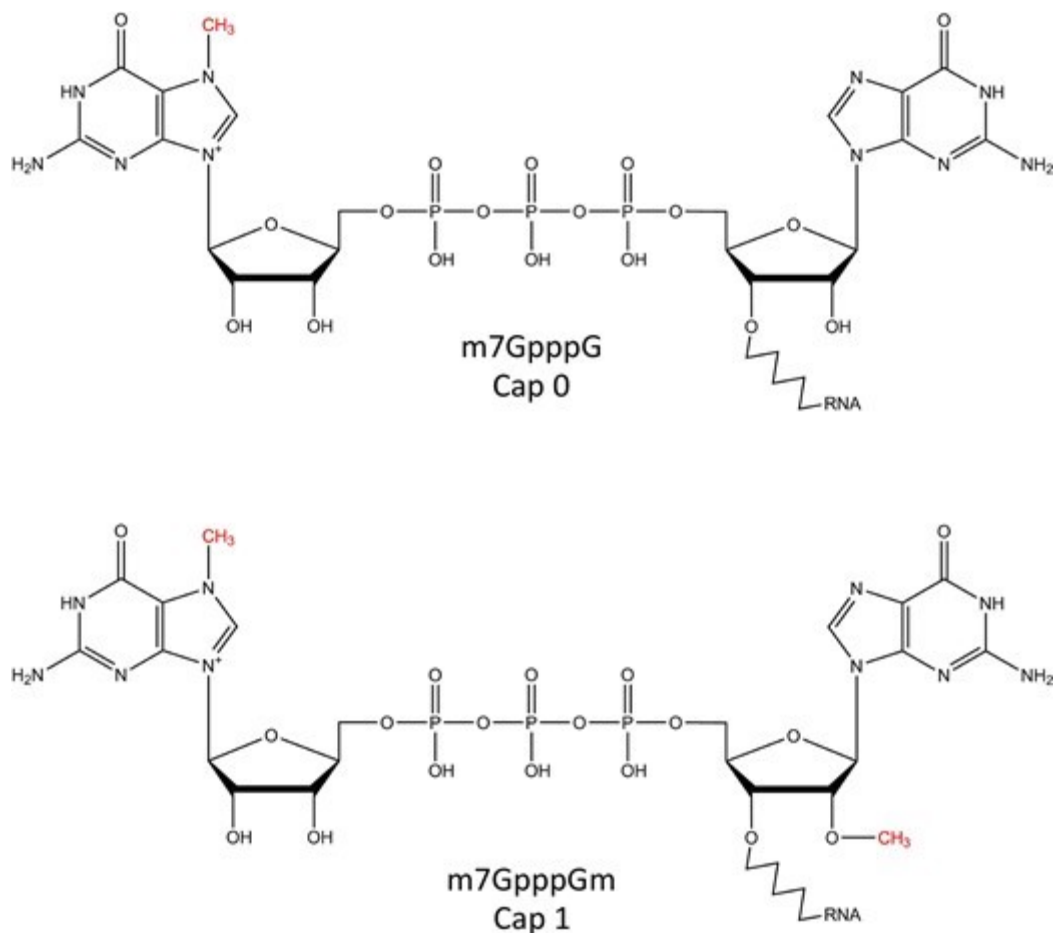


Obrázek 4: Fáze rozvoje MPOX vyrážky [42]. Vrchní řád popisuje rozvoj a stádia vyrážky na tmavší pokožce. Spodní řád popisuje rozvoj na světlejší pokožce. Obrázek upozorňuje na rozdílnou prezentaci vyrážky na základě odlišné pigmentace.

2.2 mRNA čepička

V eukaryotické buňce se nachází různé typy RNA, přičemž většina z nich, včetně tRNA a rRNA, se účastní procesu translace mRNA. Eukaryotická mRNA je komplexní molekula, která se skládá z několika nukleotidových částí ohraničených 5' a 3' koncem; pouze přibližně 5 % buněčného transkriptu je kódováno v mRNA. 3' konec mRNA se skládá ze stovek adenosinmonofosfátů. Tento poly(a) řetězec stabilizuje mRNA, a významně přispívá k translaci

[7,45]. Na opačném konci transkriptu se nachází mRNA čepička (anglicky „cap“), označená m7GpppN, která se skládá ze 7-methylguanosinu připojeného k 5' konci prostřednictvím 5'-5' fosfátového můstku. Mnoho evolučně nižších eukaryotických buněk, včetně kvasinek a hub, obsahuje tuto strukturu nazývanou cap-0. Vyšší eukaryoty mají cap-1 a cap-2, kde jsou navíc 2'-O-methylovány na 1. a 2. mRNA nukleotidu (Obr. 5). Methylace čepičky se zvyšuje s komplexností organismu, což nám umožňuje odlišit prokaryoty od eukaryot, a také rozlišit mezi vyššími a nižšími eukaryoty [46].



Obrázek 5: Struktury mRNA čepiček v eukaryotech [47]. Horní struktura představuje cap 0. Methyl (červená barva) je navázán jen na guanosin v pozici N-7. Ve spodní části (cap 1) je methyl navázán také na poslední nukleotid RNA v pozici 2'-O.

Čepička se připojuje na mRNA prekurzor vytvořený RNA polymerázou II v jádře. Tento proces se uskutečňuje v počáteční fázi transkripce, ještě před dalšími posttranskripčními procesy, jako je přidání poly(A) chvostu a splicing exonů [48]. Úlohou mRNA čepičky je

stabilizace mRNA, podpora splicingu, export z jádra, iniciace translace a degradace mRNA, čímž slouží jako kontrola kvality transkriptu. Kromě toho je čepička důležitá pro odlišení buněčné mRNA od virové trifosforylované RNA, která spouští vrozenou imunitní odpověď [49].

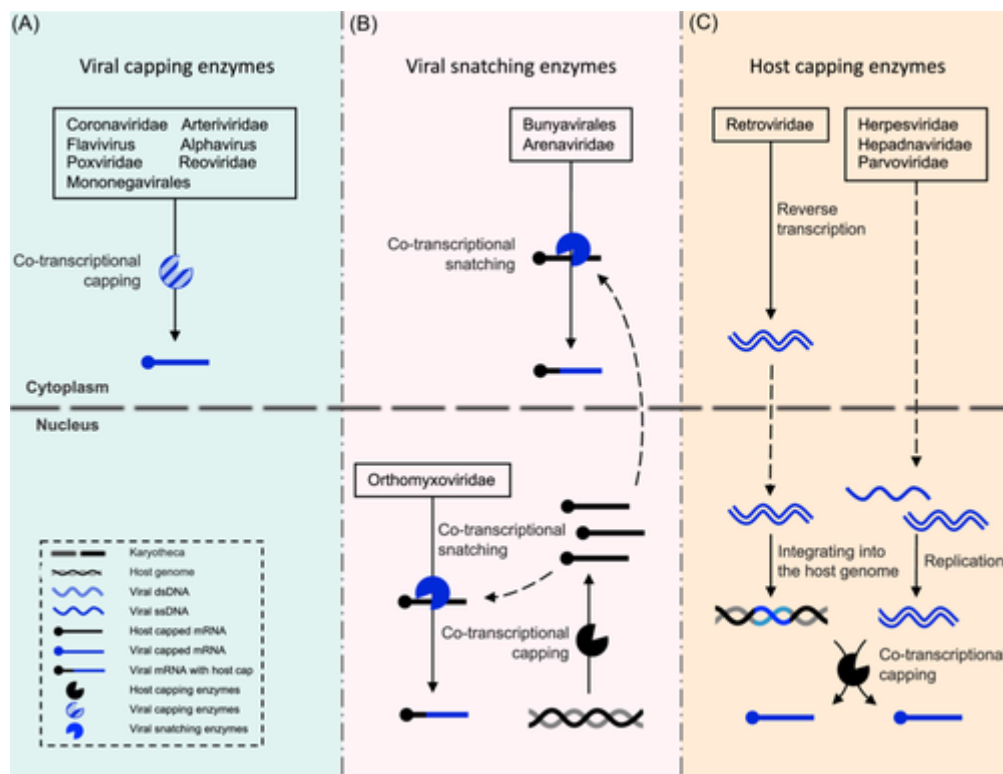
Biosyntéza mRNA čepičky zahrnuje tři enzymatické kroky. Nejprve je trifosforylovaný 5' konec štěpen na difosfát enzymem mRNA 5'-trifosfátasou (TPase). Následně guanylyltransferasa (GTase) připojí GMP, čímž vzniká GpppN. Poslední krok je katalyzován methyltransferasou (MTase), která přenáší methylovou skupinu ze S-adenosylmethioninu (SAM) na terminální guanyl v pozici N-7 [50]. Čepička typu cap-0 může být dále modifikována na prvním a druhém nukleotidu mRNA enzymem 2'-O-methyltransferázou (2'-O-MTase), čímž vznikají čepičky typu cap-1 a cap-2 [51].

2.2.1 Virová mRNA čepička

Virová infekce, jako jeden z mnoha spouštěčů buněčného stresu, může vést k deregulaci buněčné mRNA. Kromě vyvolání stresu v hostitelské buňce jsou viry schopné přivlastnit si translační proces a zajistit vlastní virové produkci. Aby dosáhly úspěšné infekce, vyvinuly si viry mechanismy, které napadají proces degradace buněčné mRNA. Tyto mechanismy mohou inaktivovat enzymy a kofaktory, které jsou součástí degradačních drah mRNA indukovaných virových infekcí [52]. Pro umožnění virové translace a produkce potřebují viry zamaskovat svou mRNA před vrozeným imunitním systémem tvorbou vlastní virové mRNA čepičky na 5' konci. mRNA s 5'-trifosfátovým koncem je detekována v cytoplazmě receptorem RIG-I (z angl. *Retinoic Acid Inducible Gene-1*) a receptorem TLR (z angl. *Toll-like receptor*), jejíž aktivace spouští odpověď interferonů typu I [53]. Eukaryotická virová mRNA čepička, s výjimkou několika případů, má stejnou strukturu jako buněčná mRNA, bez ohledu na genové rozdíly a replikační formy virů. Míra methylace virové mRNA obvykle koreluje s buněčnou mRNA hostitele. Nicméně mezi viry existují rozdílné přístupy v biosyntéze čepičky [46].

Existují tři odlišné mechanismy, kterými viry tvoří mRNA čepičky. První mechanismus zahrnuje využití buněčné RNA polymerázy II. Tento přístup využívají především DNA viry (kromě *Poxviridae*) a RNA viry, zejména z rodu *Retroviridae* (ss(+)RNA). Druhou možností je tzv. „cap-snatching“, kdy je čepička získávána endonukleolytickým odštěpováním z nascentní hostitelské pre-mRNA. Na tuto čepičku se navazuje virová polymeráza, která syntetizuje virovou RNA. Tento mechanismus je typický pro viry s ss(-)RNA genomem (*Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*). Poslední způsob je vlastní čepičkující

mechanismus, který si viry vyvinuly a příslušné enzymy mají zakódovány přímo ve svém genomu. Mnoho ssRNA virů využívá pro syntézu nebo získání čepičky svůj vlastní set enzymů. Tvorba virové mRNA čepičky se dále klasifikuje na konvenční, kde imituje proces syntézy u eukaryot (sled po sobě jdoucí RTase, GTase, MTase), nebo nekonvenční, kdy využívá jiný mechanismus [54,55].



Obrázek 6: Mechanismus tvorby virové mRNA čepičky.

(A) Viry s vlastní sadou enzymů, které syntetizují čepičku přímo na nascentní virovou mRNA. Syntéza probíhá ko-transkripčně v cytoplazmě.

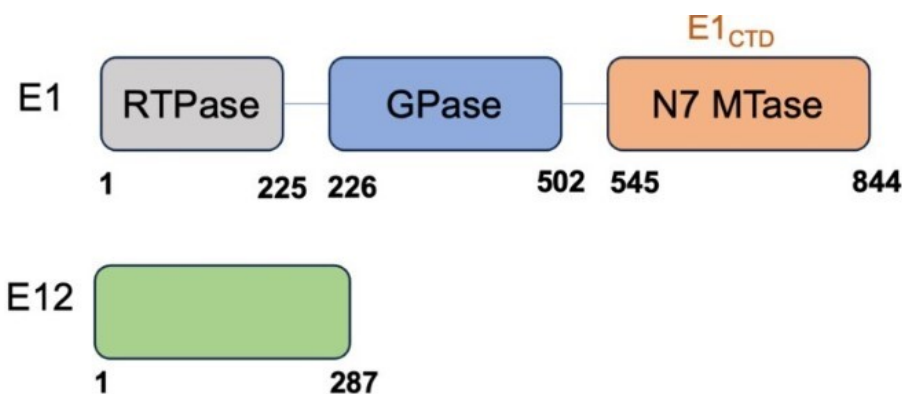
(B) Virový „cap-snatching“ mechanismus, při kterém je čepička získávána z hostitelské pre-mRNA/mRNA. Získání čepičky probíhá ko-transkripčně v cytoplazmě i v jádře.

(C) Viry využívající čepičkující mechanismus hostitelské buňky. Retroviry využívají v cytoplazmě reverzní transkripci a svůj genom začlení do hostitelské DNA v jádře. Druhá skupina virů replikuje svůj genom v jádře hostitelské buňky. Čepička je pak syntetizována ko-transkripčně v jádře [56].

Vzhledem k tomu, že některé viry vyvinuly vlastní sady enzymů pro tvorbu mRNA čepičky, představují tyto enzymy potenciální cíle pro vývoj antivirotek. Rozdílné mechanismy syntézy čepičky a odlišnosti ve struktuře proteinů zapojených do tohoto procesu u lidí a virů přispívají k výzkumu a vývoji nových terapeutických postupů pro léčbu virových infekcí [7].

2.2.2 Monkeypox virus capping enzyme

Poxviry se vyznačují schopností syntetizovat cap 0 prostřednictvím vlastních čepičkujících enzymů (CE, z angl. *capping enzyme*) [56]. Prvním purifikovaným a studovaným CE byl enzym z viru vaccinia (VACV), který je složen z heterodimerní struktury s podjednotkami D1 a D12, přičemž D1 má 844 aminokyselin a D12 má 287 aminokyselin [57]. RNA čepičkující enzymy vykazují značný stupeň homologie napříč celou rodinou poxvirů. Katalytické moduly potřebné pro syntézu cap 0 jsou u VACV lokalizovány na podjednotce D1, která odpovídá E1 podjednotce u MPXV a má stejnou velikost 844 aminokyselin. Tyto moduly jsou uspořádány těsně za sebou v pořadí: N-terminální RNA trifosfatasa (TPase), prostřední guanylyltransferáza (GTase) a C-terminální guanin-N7 methyltransferáza (MTase) [58].



Obrázek 7: Schematické znázornění komplexu E1-E12 s jeho doménami. Na N-konci (levá strana) se nachází doména RNA trifosfatasa (RTPase), uprostřed doména guanylyltransferasa (GPase/GTase) a na C-konci (pravá strana) doména methyltransferasy (MTase), na kterou se váže podjednotka E12. Čísly je uveden počet aminokyselin, kterými jsou tvořeny domény [58].

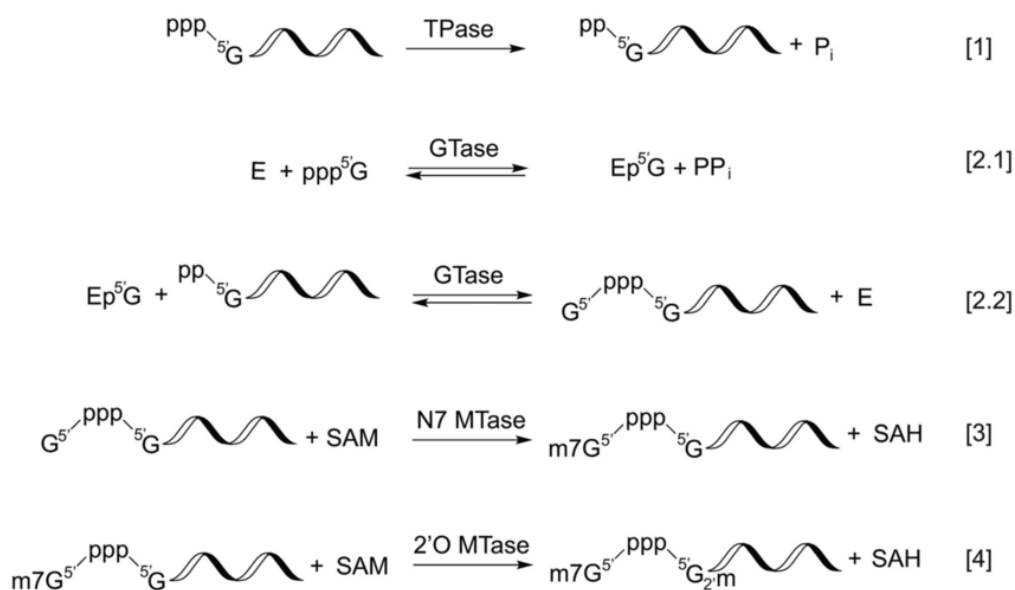
První fáze enzymatického procesu zahrnuje trifosfatázu (RTase), která hydrolyzuje γ -fosfát z nascentní RNA, čímž vzniká 5'-difosfát RNA s uvolněním anorganického fosfátu (Pi) [58]. RTase u MPXV je metalodependentní, využívající Mn^{2+} nebo Co^{2+} , a vykazuje charakteristickou strukturu trifosfátového tunelového metaloenzymu (TTM, z angl. *Triphosphate tunnel metaloenzyme*). RNA se začleňuje do „tunelu“, který je obklopen nabitými a hydrofilními skupinami koordinovanými Mn^{2+} a SO_4^{2-} . SO_4^{2-} pravděpodobně určuje pozici γ -fosfátu mRNA [54].

Následně guanylyltransferáza (GTase) odštěpuje pyrofosfát z GTP, čímž vzniká GMP, který je přenesen na 5'-difosfát RNA za vzniku Gppp-NpRNA. Tento proces se vyznačuje tzv.

ping-pong mechanismem, kdy GMP vytváří fosfoamidovou vazbu s ϵ -amino skupinou lysinu, než je přenesen na cílovou molekulu. GTP-dependentní CE obsahují kovalentní nukleotidyltransferázovou (NTase, z angl. *nucleotidetransferase*) a oligonukleotidovou/oligosacharidovou (OB, z angl. *oligonucleotide/oligosaccharide-binding*) doménu, podobnou těm, které se vyskytují u DNA ligáz [54,58,59,60]. V posledním kroku guanyl-N7 methyltransferáza (MTase) přenáší methylovou skupinu z S-adenosyl-L-methioninu (SAM) na guanyl, čímž vzniká cap 0 a zároveň se uvolňuje S-adenosyl-L-homocystein (SAH) [58].

Z předchozích studií na vakcínovém viru (VACV) vyplývá, že D1 podjednotka vykazuje nízkou aktivitu methyltransferázy (MTase), avšak po navázání D12 podjednotky na MTase doménu D1 došlo k 40- až 50-násobnému zvýšení aktivity. D12, ačkoliv neobsahuje vazebné místo pro S-adenosyl-L-methionin (SAM), je klíčová pro replikaci viru. Vysoký stupeň homologie mezi D12 z VACV a E12 z MPXV naznačuje, že jejich funkce budou podobné, a tedy že E12 pravděpodobně alostericky stimuluje MTase aktivitu podjednotky E1 [61,62]. Kromě toho komplex D1-D12 reguluje jak iniciaci, tak i terminaci střední fáze transkripce [63]. Vnitřní struktura D12 vykazuje podobnost s jinými MTase, ale postrádá katalytické místo pro SAM. Nejbližší homologii vykazují 2'-O-methyltransferázy z flavivirů, přičemž se předpokládá, že její primární úloha byla v syntéze cap 1 [62].

Pro úplné zamaskování virové mRNA je nutná syntéza cap 1, kterou zprostředkovává 2'-O-methyltransferáza označovaná jako VP39. Methylace prvního nukleotidu na 5' konci v pozici 2' zamezuje aktivaci vrozené imunitní odpovědi [64]. Proteín VP39, který plní funkci 2'-O-MTase, umožňuje poxvirům degenerovat katalytickou funkci E12 a měnit ji na alosterický stimulator MTase aktivity E1, čímž ovlivňuje další regulaci transkripce [62].



Obrázek 8: Přehled enzymatické syntézy virové mRNA čepičky komplexem E1-E12. TPase odštěpuje γ -fosfát z 5' konce RNA a vytváří difosfát-RNA. GTase přeměňuje GTP na GMP kovalentním navázáním na enzym a následně přenáší GMP na 5'-difosfátový konec RNA. Syntézu cap 0 zajišťuje N-7 MTase, kde donorem methylové skupiny je SAM. Ve finálním kroku VP39 modifikuje cap 0 na cap 1 za účasti SAM [47].

3 Cíle práce

Tato diplomová práce se zaměřila na charakterizaci biochemické aktivity čepičkujícího enzymu z viru opičích neštovic (MPXV), zejména MTase domény proteinového komplexu E1-E12. Abychom dosáhli tohoto cíle, bylo nutné provést následující kroky:

1. Exprese a Purifikace Proteinů:

- Exprese rekombinantních proteinů E1 a E12 v buňkách *E. coli* a hmyzích buňkách z linie Sf9.
- Izolace a purifikace těchto proteinů pro další analýzu.

2. Enzymatické Eseje:

- Sledování *in vitro* enzymatické aktivity s použitím 35-mer RNA, GTP a SAM.
- Testování inhibičního účinku sinefunginu na methyltransferázovou aktivitu.

3. Kvantitativní Analýza metodou Hmotnostní Spektrometrie:

- Stanovení SAH (S-adenosyl-L-homocystein) jako vedlejšího produktu methylace mRNA čepičky pomocí kvantitativní hmotnostní spektrometrie (MS).

Tyto kroky byly navrženy k tomu, aby poskytly detailní pohled na enzymatickou aktivitu MTase domény heterodimerního komplexu E1-E12.

4 Materiál a metody

4.1 Přístrojové vybavení

- Centrifuga Centrifuge 5418 R, rotor FA-45-18-11 (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga Allegra X-15 R, rotor SX4750A (Beckman Coulter, USA)
- Centrifuga Avanti J-26S XPI, rotor JLA-9.1000 (Beckman Coulter, USA)
- Centrifuga Avanti J-30I, rotor JA-25.50 Ti (Beckman Coulter, USA)
- Chromatografický systém ÄKTA pure (Cytiva, USA)
- CO2 inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX81 (Olympus, Tokio, Japonsko)
- Gelová kolona HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (Sigma-Aldrich, USA)
- Homogenizátor POLYTRON™ PT 2500 E (Kinematica AG, Švýcarsko)
- Horizontální třepačka WiseShake Wisd (Witeg Labortechnik, Německo)
- Hmotnostní systém Sciex 6500 + triple quadrupole (Sciex, Kanada)
- Inkubátorová třepačka Innova 40 Series (New Brunswick Scientific, USA)
- Inverzní mikroskop Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)
- Magnetická míchačka KMO-2 Basic (IKA, USA)
- Míchačka válcová TubeRoller R3005 (Benchmark Scientific, USA)
- Orbitální třepačka IKA VORTEX 1 (IKA-Werke, Německo)
- Předvážky EMB 2000-2 (KERN & SOHN, Německo)
- Sonikátor Q700 (QSonica, USA)
- Sonikační sonda CL-334 (QSonica, USA)
- Soustava pro elektroforézu Mini-PROTEAN TETRA Vertical (Bio-Rad, USA)
- Spektrofotometr BioPhotometer plus (Eppendorf, Německo)
- Spektrofotometr Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA)
- Termocykler TProfessionalTRIO (Biometra, Německo)
- Třepačka Incubating Mini Shaker (VWR, Česká republika)
- Třepačka s inkubátorem Innova 44 (New Brunswick Scient, USA)
- Vodní lázeň JB Aqua 2 Plus (Grant Instruments, UK)

- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)
- Zdroj pro SDS elektroforézu PowerPac HV Basic (Bio-Rad, USA)

4.2 Laboratorní pomůcky

- 12 jamkové kultivační destičky (Sigma-Aldrich, USA)
- 96 jamková polypropylenová destička s hlubokým dnem (Axygen, USA)
- 384 jamková polypropylenová mikrodestička (Beckam Coulter, USA)
- Centrifugační zkumavky typu Falcon (Carl Roth, Německo)
- Eppendorfovy zkumavky (Kartell, Milán, Itálie)
- Gel pro SDS-PAGE 7.5% Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad, USA)
- Gel pro SDS-PAGE 12% Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad, USA)
- Hemocytometr pro počítání buněk (Housser Scientific, USA)
- Koncentrátor Vivaspin Turbo 4 (MWCO 10 000) (Sartorius AG, Německo)
- Laboratorní sklo (Simax, Česká republika)
- Odstředivé filtrační zkumavky Amicon Ultra 10K (Merck Millipore, Irsko)
- PCR stripy 200 ul Ultraflux (Scientific Specialties Inc, USA)
- Pipety (Gilson, USA)
- Stříkačkové filtry PVDF-L 0,22 μm (Carl Roth, Německo)
- Špičky (Sorenson, Bioscience, USA)

4.3 Chemikálie

- Acetonitril (Carl Roth, Německo)
- Akrylamid/Bisakrylamid 30% Rotiphorese (37,5:1) (Carl Roth, Německo)
- Ampicilin (Carl Roth, Německo)
- Amylosa resin (New England BioLabs, USA)
- β -merkapt ethanol (Carl Roth, Německo)
- Brom-fenolová modř (Carl Eoth, Německo)

- Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma-Aldrich, USA)
- Dialyzační membrána Membra-Cel MD34 (MWCO 14000) (Carl Roth, Německo)
- Dithiotreitol (DTT) (Penta chemicals, Česká republika)
- Dodecyl síran sodný (SDS) (Carl Roth, Německo)
- Ethanol (Penta chemicals, Česká republika)
- Ethylendiamin tetraoctová kyselina (EDTA) (Carl Roth, Německo)
- FuGENE 6 roztok (Promega, USA)
- Gentamycin (Carl Rothe, Německo)
- Glycerol (Lach-Ner, Česká republika)
- Guanosintrifosfát (GTP) (New England Biolabs, USA)
- His pur Ni-NTA resin (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Hovězí inhibitor RNase (Carl Roth, Německo)
- Chlorid draselný (KCl) (Lach-ner, Česká republika)
- Chlorid horečnatý ($MgCl_2$) (Lach-ner, Česká republika)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-ner, Česká republika)
- Isopropanol (Penta chemicals, Česká republika)
- Imidazol (Penta chemicals, Česká republika)
- Kanamycin (Carl Roth, Německo)
- Kyselina mravenčí ($HCOOH$) (Penta chemicals, Česká republika)
- Maltóza (Lach-ner, Česká republika)
- Proteinový standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Síran zinečnatý ($ZnSO_4$) (Penta chemicals, Česká republika)
- Tripanová modř (barvivo na buňky) (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-HCl) (Carl Roth, Německo)

4.4 Média a pufry

- 20x koncentrovaný fosfátový pufr: 1 M Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 1M KH₂PO₄, 0,5 M (NH₄)₂SO₄
- 50x koncentrovaný 5052 pufr (+100 mg MgCl₂): 25% glycerol, 2,5% glukóza, 10% laktóza
- 1000x koncentrovaný roztok Ampicilinu: 100 mg/ml = EtOH : H₂O (1:1)
- 1000x koncentrovaný roztok Gentamycínu: 41 mg/ml vodní roztok
- 1000x koncentrovaný roztok Kanamycínu: 40 mg/ml vodní roztok
- Coomassie Brilliant Blue barvicí roztok na gely (50 % methanol (v/v), 3mM Coomassie Brilliant Blue G-250, 1,5M CH₃COOH)
- Ekvilibrační pufr (pro gelovou permeační chromatografií): 20mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 3mM β-merkapt ethanol, 10% glycerol (v/v)
- Eluční pufr A (pro afinitní chromatografii s amylosa-resinem): 200mM NaCl, 20mM Tris pH 8, 3mM β-merkapt ethanol, 10% glycerol (v/v), 20mM maltóza
- Eluční pufr B (pro afinitní chromatografii s Ni-NTA resinem): 200mM NaCl, 50mM Tris pH 8, 300mM imidazol, 3mM β-merkapt ethanol, 10% glycerol (v/v)
- Gibco médium pro kultivaci hmyzích buněk bez séra Sf-900TM II SFM (1X) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- LB médium s agarem pro kultivaci buněk *E. coli* dle Lennox (Sigma-Aldrich, USA): 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1 % (w/v) trypton, 85 mM NaCl
- LB agar podle Lennox (Sigma-Aldrich, USA)
- Lyzační pufr A: 200mM NaCl, 20mM Tris pH 8, 5mM MgSO₄, 3mM β-merkapt ethanol, 10% glycerol (v/v)
- Lyzační pufr B: 200mM NaCl, 50mM Tris pH 8, 20mM imidazol, 5mM MgSO₄, 3mM β-merkapt ethanol, 10% glycerol (v/v)
- Mobilní fáze pro hmotnostní analýzu: 70% acetonitril, 0,1% kyselina mravenčí
- PBS pufr: 137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2,7mM KCl, 1,8mM KH₂PO₄
- Pufr P1: 50mM Tris pH 8, 10mM EDTA, 100 mg/ml RNAasa A
- Pufr P2 (lyzační pufr): 200mM NaOH, 1% SDS (w/v)
- Pufr P3 (neutralizační pufr): 3M acetát draselný pH 5

- Reakční pufr 10x koncentrovaný: 50mM Tris pH 8, 5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM DTT
- Sterilní bez proteinové médium určené pro kultivaci hmyzích buněk s L-Glutaminem Insect-Xpress (BioWhittaker, Belgie)
- TE pufr: 10mM Tris pH 8, 1mM EDTA
- Tris-glycinový pufr (25 mM Tris pH 8,8, 0,26 M glycin, 0,1 % SDS (v/v))
- Vymývací pufr A: 500mM NaCl, 20mM Tris pH 8, 3mM β-merkapt ethanol, 10% glycerol
- Vymývací pufr B: 1M NaCl, 50mM Tris pH 8, 20mM imidazol, 3mM β-merkapt ethanol, 10% glycerol
- Vzorkový pufr: 125mM Tris pH 6,8; 20% (v/v) glycerol; 0,2% (v/v) bromfenolová modř; 4% (w/v) SDS; 10% (v/v) β – merkapt ethanol
- ZY médium: 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 2,8mM Glukóza, 6mM laktóza, 0,5% (v/v) glycerol, 1mM MgCl₂, 25mM (NH₄)₂SO₄, 50mM KH₂PO₄, 50mM Na₂HPO₄

4.5 Enzymy a buňky

- Benzonasa, nukleasa (Merck Millipore, Irsko)
- *E. coli* DH10BacY buňky
- *E. coli* BL21 (DE3) – Codon Plus RIL
- Hmyzí buňky z druhu Blýskavky kukuřičné (lat. *Spodoptera frugiperda*), linie Sf9
- SUMO proteasa s histidinovou kotvou (připraveno v laboratoři)

4.6 DNA plazmidy

- E1-E12_pSUMO vektor s His_{8x} značkou
- E1_pACEBac vektor s MBP značkou
- E1_pET24 vektor s His_{8x} značkou
- E1_pSUMO vektor s His_{8x} značkou

- E12_pKUMO vektor s His_{8x} značkou

4.7 Příprava rekombinantních proteinů E1 a E12 v buňkách *E. coli* BL21(DE3) – Codon plus RIL

4.7.1 Transformace bakterií

Plazmidy obsahující požadované geny byly připraveny Mgr. et Mgr. Evženem Bouřem, PhD. a Mgr. Barborou Landovou, PhD. Pro transformaci v buňkách *E. coli* BL21(DE3) – Codon plus RIL byly použity rekombinantní plazmidy:

- **E1-E12_pSUMO**: Obsahující geny pro proteiny E1 a E12, oba označeny SUMO tagem.
- **E1_pET-24**: Obsahující gen pro protein E1.
- **E1_pSUMO**: Obsahující gen pro protein E1 se SUMO proteinem na N-konci.
- **E12_pKUMO**: Obsahující gen pro protein E12 se SUMO proteinem na N-konci s kanamycinovou rezistencí.

Všechny plazmidy obsahují histidinovou kotvu na N-konci pro usnadnění purifikace proteinů. Fyzikální vlastnosti exprimovaných proteinů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Fyzikální vlastnosti rekombinantních proteinů. AA – aminokyselina; MW – molekulová hmotnost; pI – izoelektrický bod, EK – extinkční koeficient; SUMO (z angl. *Small ubiquitin-like modifier*) – protein nesoucí histidinovou kotvu a štěpné místo pro SUMO proteasu.

Protein	Počet AA	MW	pI	EK
E1	845	96852	8,10	0,878
E12	287	33453	8,88	0,997
E1-E12	1132	130287	8,50	0,909
E12-SUMO	398	46196	7,74	0,755

Rozmražené kompetentní buňky *E. coli* BL21(DE3) – Codon plus RIL, uložené na ledu v mikrozkuvkách (20 µl), byly smíchány s rekombinantními plazmidy (1,5 µl). Samotná transformace plazmidů do buněk probíhala tepelným šokem: mikrozkuvky byly vloženy do

vodní lázni (42 °C) na 42 sekund, poté byly okamžitě přemístěny na led na 5 minut. K buněčné suspenzi bylo přidáno 0,5 ml LB média s agarem dle Lennox (Sigma-Aldrich) a mikrozkušavky byly následně umístěny do třepačky (VWR) při 37 °C a 400 rpm po dobu 30 minut.

Mezitím byly připraveny 15 ml zkumavky s 6 ml LB média s agarem dle Lennox a 6 µl příslušného 1000x koncentrovaného antibiotika (viz tabulka 2). Po vyjmutí buněk z orbitálního inkubátoru byly bakterie přeneseny do těchto zkumavek obsahujících příslušné komponenty. Takto připravené suspenze byly uloženy zpět do orbitálních třepaček (za stejných podmínek) přes noc.

Tabulka 2: Plazmidy a jejich rezistence na antibiotika.

Plazmid	Antibiotikum
E1-E12_pSUMO	Ampicilin
E1_pET-24	Kanamycin
E1_pSUMO	Ampicilin
E12_pKUMO	Kanamycin

4.7.2 Expresse rekombinantních proteinů

Do dvou litrových Erlenmayerových baňkách bylo k 1 l ZY média přidáno 50 ml 20x koncentrovaného fosfátového pufru a 20 ml 50x koncentrovaného 5052 pufru. K připraveným médiím bylo přidáno 5 µl 1M roztoku ZnSO₄ a 1 ml příslušného 1000x koncentrovaného rezistentního antibiotika. Buněčné suspenze byly rozděleny do jednotlivých Erlenmayerových baňek. Baňky byly uloženy do orbitální třepačky (37 °C, 200 rpm) až do dosažení optické hustoty při 600 nm (OD₆₀₀) v rozmezí 0,6 – 0,7. Jakmile byla tato hodnota dosažena, byla teplota snížena na 18 °C a exprese proteinů probíhala při noční inkubaci.

4.7.3 Izolace rekombinantních proteinů

Při práci s bakteriálními peletami, suspenzemi, lyzáty nebo proteiny byly vzorky vždy udržovány na ledu nebo v chladu. Po noční inkubaci byly buňky odstředěny (6 000× g, 6 min, 4 °C) v 1 l kyvetách (Beckman Coulter) v centrifuze Avanti J-26S XPI, rotor JLA-9.1000 (Beckman Coulter). Vzniklý supernatant byl odstraněn a k peletě byl přidán lyzační pufr B (10–20 ml). Peleta byla resuspendována pomocí laboratorní lžičky a homogenizátoru

POLYTRON™ PT 2500 E (Kinematica AG) (10 000 rpm). Suspenze byla následně lyzována pomocí ultrazvukového sonikátoru Q700 (QSonica Sonicators) (amplituda 80 Hz, puls 1 s, pauza 3 s, čas sonikace 1 min, 2 cykly). Zlyzovaná buněčná suspenze byla přenesena do 50 ml zkumavek (Beckman Coulter) a centrifugována v centrifuze Avanti J-30I, rotor JA 25.50 Ti (Beckman Coulter) (30 000× g, 30 min, 4 °C). Vzniklý supernatant byl pomalu přelit do 50 ml zkumavek, přičemž peleta se uvolnila.

4.7.4 Afinitní chromatografie

K oddělení proteinů od zbylých buněčných komponent byla využita afinitní chromatografie pomocí agarosového Ni-NTA resinového nosiče (Thermo Fisher), přičemž Ni²⁺ ionty se nespecificky vážou (jsou chelatovány) na imidazolový kruh nacházející se v histidínech. 8 ml nosiče Ni-NTA resin bylo přidáno do plastové kolony s fritou, která byla přečištěna destilovanou vodou (2×) a lyzačním pufrem B. K připravenému resinu bylo přidáno 5 ml lyzačního pufru B a směs byla rozdělena do 50 ml zkumavek obsahujících supernatant po izolaci. Vzorky byly uloženy na válcovou třepáčku Tube Roller (Benchmark Scientific) (30 min, 4 °C).

Vzorky byly poté centrifugovány na centrifuze Allegra X-15R, rotor SX7450A (Beckman Coulter) (500× g, 3 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a k resinu bylo přidáno 20–30 ml vymývacího pufru B. Peleta byla opatrně resuspendována otáčivým pohybem a následně centrifugována za stejných podmínek. Po odstranění supernatantu bylo k vzorkům přidáno 40 ml lyzačního pufru B. Zkumavky byly opět vloženy do centrifugy a odstředěny za stejných podmínek. Vzorky byly takto očištěny od vysoké koncentrace NaCl (3×).

Po posledním očištění bylo k peletě přidáno 5 ml lyzačního pufru B, peleta byla resuspendována a následně přenesena do plastových kolon s fritou. Po přetečení lyzačního pufru B přes kolonu bylo napipetováno 5 ml elučního pufru B. Eluované vzorky byly zachyceny do 15 ml zkumavek.

4.7.5 Dialýza a štěpení histidinové kotvy

Eluované vzorky proteinů byly vloženy do dialyzačních membrán Membra-Cel MD34 (Carl Roth). Ke vzorkům byla přidána SUMO proteasa (100 µl). Membrány byly uzavřeny a vloženy do lyačního pufru B. Štěpení probíhalo přes noc na magnetické míchače KMO-2 Basic (USA) (50 rpm, 4 °C).

4.7.6 Reversní afinitní chromatografie

Tento krok sloužil k oddělení SUMO proteasy od proteinů, a také k odstranění proteinů pocházejících z bakterií, které se nespecificky vážaly na Ni-NTA resin. Ni-NTA nosič byl nejprve přečištěn 0,5 M EDTA roztokem a destilovanou vodou (4x) v plastové koloně s fritou. Nosič byl aktivován 100 μ M roztokem NiCl₂. Resin byl ekvilibrován lyzačním pufrem B. Po resuspendování resinu v 6 ml lyačního pufru B byl rozdělen do vzorků proteinů v 15 ml zkumavkách. Zkumavky byly uloženy na válcovou třepačku Tube Roller (Benchmark Scientific) (30 min, 4 °C). Poté byly vzorky přeneseny do plastových kolonek s fritou a eluát byl rovnou zachycován do 15 ml zkumavek.

4.7.7 Gelová permeační chromatografie a elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Proteinové vzorky byly odstředěny na centrifuze Allegra X-15R, rotor SX7450A (Beckman Coulter) (4000× g, 10 min, 4 °C). Vzorky byly následně dávkovány do chromatografického systému ÄKTA pure (Cytiva), na který byla připojena kolona HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (Sigma-Aldrich). Objem plnicí smyčky byl 5 ml. Pro mobilní fázi byl zvolen ekvilibrační pufr s průtokovou rychlostí 1 ml/min. Na výstupu byla měřena absorbance při 280 a 254 nm. Frakce byly jímány v objemu 1,5 ml do 96-jamkové deštičky s hlubokým dnem (Axygen).

Podle hodnot absorbance (A_{280}) z výstupního chromatogramu byly analyzovány vybrané frakce pomocí elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE, z angličtiny *Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*). 10 μ l vzorku frakce bylo smícháno s 2 μ l 5× koncentrovaného vzorkového pufru a naneseno na 12% Mini-PROTEAN TGX gel (Bio-Rad). Do první jamky byl nanesen proteinový standard PageRuler™ Plus (Thermo Fisher Scientific) (5 μ l). Gel byl vložen do SDS-PAGE soustavy Mini-PROTEAN TETRA Vertical (Bio-Rad), připojen zdroj napětí PowerPac HV (Bio-Rad, USA) a elektroforéza byla spuštěna (45 min, 210 V, laboratorní teplota).

Po ukončení SDS-PAGE byl gel promyt vodou a uložen do misky s barvicím roztokem Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma-Aldrich, USA) a krátce zahřát. Následovala 3minutová inkubace na horizontální třepačce WiseShake (Witeg Labortechnik). Poté byl barvicí roztok odstraněn a gel byl odbarven analogickým způsobem ve vodě (inkubace přes noc).

4.8 Příprava rekombinantního proteinu E1 v hmyzích buňkách Sf9

4.8.1 Příprava rekombinantního bacmidu

Rekombinantní plazmid E1_pACEBac byl zaklonovaný Mgr. Barborou Landovou, PhD. Plazmid obsahoval gen kódující protein E1, který byl na N-konci označený maltózou vázajícím proteinem (MBP, angl. *Maltose binding protein*). Vlastnosti genu jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Fyzikální vlastnosti exprimovaného proteinu. 3C – specifická sekvence štěpená 3C proteasou; MBP značka

Protein	Počet AA	MW	pI	EK
E1	845	96852	8,10	0,878
E1-3C-MBP	1240	140200	6,24	1,080
E1(MBP)-E12	1519	172751	6,95	1,069

Prvním krokem byla transformace buněk *E. coli* DH10BacY. Byla využita metoda tepelného šoku (viz postup v kapitole 4.7.1). Inkubační doba trvala 3 hodiny.

Po inkubaci byla suspenze buněk sterilně nanesena na misku s agarem, která obsahovala směs antibiotik (50 µg/ml kanamycin, 10 µg/ml tetracyklin, 7 µg/ml gentamycin), IPTG a X-Gal. Misky byly uloženy do CO₂ inkubátoru (Sanyo) (37 °C, 24 h). Buňky, ve kterých se úspěšně transpozoval gen do rekombinantního bacmidu, byly bílé; modré bakterie gen neobsahovaly. To vychází z toho, že v místě začlenění insertu se nachází gen pro β-galaktosidasu, který zůstává aktivní v případě neúspěšné transpozice a reaguje s chromogenním substrátem X-gal. Z misky bylo pomocí sterilních špiček odebráno 6 různých bílých kolonií obsahujících požadovaný gen a přeneseny do 13 ml zkumavek, kde se nacházelo LB médium s agarem (5 ml), 1000× koncentrovaný gentamycin (0,7 µl) a 1000× koncentrovaný Kan (5 µl). Takto připravené vzorky byly uloženy do inkubátorové třepačky (VWR) (400 rpm, 37 °C, 24 h).

4.8.2 Izolace bacmidu z bakterií *E. coli* DH10BacY

Bakteriální buňky byly po 24h inkubaci odstředěny v centrifuze Allegra X-15R (Beckman Coulter) (4 000× g, 15 min, 4 °C). Vzniklé pelety byly resuspendovány v pufru P1 (300 µl) a přeneseny do 1,5ml mikrozkušavek. K suspenzím byl pipetován pufr P2 (300 µl), mírně promíchaný na Vortexu Genie 2 (Scientific Industries) a inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. K vzorkům byl opatrně přidán pufr P3 (300 µl) a mikrozkušavky byly uloženy na led (10 min).

Bílá vysrážená *E. coli* DNA a proteiny byly odstředěny na stolní centrifuze Centrifuge 5418 R, rotor FA-45-18-11 (Eppendorf) (14 000× g, 10 min, laboratorní teplota). Do mikrozkušavek, kde bylo předem připraveno 800 µl isopropanolu, se přenesly supernatanty obsahující bacmidovou DNA. Vzorky byly několikrát převráceny a inkubovány na ledu (10 min). Bacmidová DNA se vysrážela a následně byla odstředěna na stolní centrifuze (14 000× g, 15 min, laboratorní teplota). Obezřetně byl odstraněn supernatant a k peletám (špatně viditelným) byl přidán studený 80% ethanol (500 µl). Pelety byly přečištěny pomalým převrácením mikrozkušavek a odstředěny na stolní centrifuze (14 000× g, 5 min, laboratorní teplota). Bylo odstraněno co nejvíce supernatantu a pelety byly rozpuštěny v TE pufru (40 µl). Koncentrace bacmidové DNA byla změřena na spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) (254 nm, blank vůči TE pufru) a uskladněna v lednici.

4.8.3 Transfekce hmyzích buněk z linie Sf9

Pro nadcházející kapitoly 4.8.3; 4.8.4; 4.8.5 probíhala práce v laminárním boxu určeném pouze pro infikované buňky Sf9. Bacmidová DNA byla přidána do sterilního PBS pufru tak, aby výsledné množství DNA činilo 1–3 µg a konečný objem roztoku byl 50 µl. Současně bylo potřeba připravit činidlo pro samotnou transfekci buněk, které pro 1 vzorek DNA obsahovalo 1 µl roztoku FuGENE 6 (Promega) a 49 µl PBS pufru. Vzorky DNA byly smíchány s transfekčním činidlem v poměru 1:1 (50 µl + 50 µl) a směs byla inkubována při laboratorní teplotě (30 min).

Mezitím byla připravena kultivační 24-jamková destička s hmyzími buňkami linie Sf9 (500 µl), jejichž koncentrace byla 1 milion/ml. Koncentrace buněk byla předem vypočítaná pomocí hemocytometru (Hausser Scientific) a vizualizačního barviva trypanová modř (Sigma-Aldrich) pod inverzním mikroskopem Nikon Eclipse TS100 (Nikon). K zředění buněk bylo

použito sterilní médium bez proteinů určené pro kultivaci hmyzích buněk s L-Glutaminem Insect-Xpress (BioWhittaker).

Po ukončení inkubace byl každý vzorek směsi (DNA a transfekční činidlo) rozdělen do dvou jamek (75 μ l a 25 μ l) obsahujících kultivační médium. Prázdné jamky byly doplněny PBS pufrům (500 μ l). Kultivační destička byla vložena do CO₂ inkubátoru (Sanyo) na 4–5 dní při 27 °C. Během inkubace byla sledována fluorescence zeleného fluorescenčního proteinu (GFP, z angl. *Green fluorescent protein*) pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81 (Olympus). Gen pro tento protein je původně kódovaný v bacmidu DH10BacY bakterií. Z jamek, které vykazovaly silnou fluorescenci, bylo odebráno kultivační médium obsahující bakulovirus 1. generace a uskladněno v lednici nebo použito pro další práci.

4.8.4 Výroba 2. generace bakulovirů

Do 250ml sterilních Erlenmayerových baněk byla připravena Sf9 buněčná suspenze ($c = 3$ miliony/ml). Výpočet koncentrace a zředění buněk proběhlo stejným postupem jako v kapitole 4.8.3. K těmto suspenzím byly přidány vybrané bakuloviry 1. generace (500 μ l). Baňky byly vloženy opět na 4-5 dní do inkubátorové třepačky Innova 40 Series (New Brunswick) (105 rpm, 27 °C). Po inkubaci byly vzorky odstředěny v centrifuze Allegra X-15 R (Beckman Coulter) (2000 \times g, 10 min, laboratorní teplota). Bakuloviry 2. generace obsažené v supernatantech byly uskladněny v lednici.

4.8.5 Expresní test a SDS-PAGE

Do 24 jamkové kultivační destičky byly připraveny Sf9 buňky ($c = 2-3$ miliony/ml, 500 μ l) a přidány jednotlivé bakuloviry 2. generace (po 10 μ l a 20 μ l). Zbylé jamky byly naplněny PBS pufrům (500 μ l). Destička byla uložena do CO₂ inkubátoru (Sanyo) na 4-5 dní (27 °C). Fluorescence GFP byla sledována na fluorescenčním mikroskopu Olympus IX81 (Olympus).

Po inkubaci byly z jamek odebrány média obsahující bakuloviry. Sražené buňky na dně byly resuspendovány v PBS pufru (100 μ l), který obsahoval 10 mM MgCl₂. Suspenze byla přesunuta do 1,5ml mikrozkuvek. Do každé suspenze byla přidána benzonasa (Merck Millipore) (1 μ l) a promíchána na Vortexu Genie 2 (Scientific Industries). Po 5 minutové inkubaci bylo z každého vzorku odebráno 20 μ l a 5x zředěno v PBS pufru.

Pro sledování exprese genu byla použita SDS-PAGE v 10% polyakrylamidovém gelu (viz. Tabulka 4). Ke vzorkům (i zředěným) byl přidán 5x koncentrovaný vzorkovací pufr. Byl nanesen proteinový standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) (5 µl), kontrolní vzorky (20 µl) a jednotlivé vzorky infikovaných buněk (20 µl). Gel byl umístěn do elektroforetické soustavy Mini-PROTEAN TETRA Vertical (Bio-Rad) a připojen k zdroji napětí PowerPac HV Basic (Bio-Rad) (45 min, 200 V, laboratorní teplota).

Tabulka 4: Složení 10% gelu pro SDS.

Složení	Zaostřovací gel	Separční gel
Akrylamid/bisakrylamid (37,5:1)	4 % (v/v)	10 % (v/v)
Tris-Cl	125 mM pH 6,8	375 mM pH 8,8
TEMED	0,005 % (v/v)	0,001 % (v/v)
Persíran amonný	0,05 % (w/v)	0,05 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)

Odbarvení gelu probíhalo podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.7.

4.8.6 Expresa proteinu E1 v buňkách Sf9

Do tří dvoulitrových Erlenmayerových baňek byla připravena Sf9 hmyzí buněčná suspenze (0,5 l, $c = 4$ miliony/ml), přičemž výpočet koncentrace a zředění buněk probíhal podle postupu v kapitole 4.8.3. Do každé baňky byl přidán vybraný bakulovirus 2. generace (5 ml). Baňky byly umístěny do inkubátorové třepačky Innova 40 Series (New Brunswick Scientific) a inkubovány po dobu 3 dnů (105 rpm, 27 °C).

4.8.7 Izolace rekombinantního proteinu E1

Při práci s buněčným lyzátem bylo dbáno na to, aby byly vzorky chlazeny na ledu. Po ukončení inkubace byly suspenze přelity do 1l kyvet (Beckman Coulter) a odstředěny na centrifuze Avanti J-26S XPI, rotor JLA-9.1000 (Beckman Coulter) (3000× g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl opatrně zlit kvůli slabě usazené peletě, která byla resuspendována v 30 ml lyzačního pufru A. Buňky byly přeloženy do kovových kelímků a homogenizovány pomocí homogenizátoru POLYTRON™ PT 2500 E (Kinematica AG) (5000 rpm). Lýza buněk probíhala pomocí sonikátoru Q700 (QSonica Sonicators) (amplituda 80 Hz, pulz 2 s, pauza 6 s, čas sonikace 2 min, 2 cykly). Lyzáat byl přenesen do 50 ml kyvet (Beckman Coulter) a odstředěn

na centrifuze Avanti J-30I, rotor JA 25.50 Ti (Beckman Coulter) ($30\ 000\times g$, 30 min, $4\ ^\circ\text{C}$). Po odstředění byl supernatant přelit do 50 ml zkumavky.

4.8.8 Afinitní chromatografie

K oddělení proteinu E1 od ostatních buněčných složek byl použit resin, který má na sobě navázanou amylosu. Na tuto amylosu se specificky vážou proteiny schopné vázat maltózu, v našem případě MBP. 5 ml amylosového resinu (New England BioLabs) bylo napipetováno do plastové kolony s fritou. Po přepláchnutí destilovanou vodou ($2\times$), lyzačním pufrem A ($1\times$) a resuspendování v lyzačním pufru A (5 ml) byl resin přelit k supernatantu. Vzorky byly uloženy na válcovou třepačku Tube Roller (Benchmark Scientific) (přes noc, $4\ ^\circ\text{C}$).

Resin byl vložen do centrifugy Allegra X-15 R (Beckman Coulter) ($600\times g$, 3 min, $4\ ^\circ\text{C}$). Peleta byla rozpuštěna ve vymývacím pufru A (25 ml) a odstředěna za stejných podmínek. Následně byla peleta očištěna od vysoké koncentrace soli pomocí lyzačního pufru A ($2\times$) (25 ml). Po posledním očištění byl resin přenesen do plastové kolony s fritou. K resinu byl pipetován elučný pufr A (4 ml) a eluát byl zachycován do 15 ml zkumavky.

4.8.9 SDS-PAGE

K analýze byl vybrán 12% gel pro SDS-PAGE Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad). Vzorek eluátu (10 μl) byl smíchán s $5\times$ koncentrovaným vzorkovým pufrem (2 μl). Do první jamky byl nanesen proteinový standard PageRuler™ Plus (Thermo Fisher Scientific) (5 μl) a do druhé jamky vzorek proteinu (12 μl). Gel byl umístěn do soupravy pro elektroforézu Mini-PROTEAN TETRA Vertical (Bio-Rad) a připojen k zdroji PowerPac HV (Bio-Rad). Elektroforéza probíhala při 210 V po dobu 45 minut při laboratorní teplotě.

Odbarvení gelu probíhalo stejným postupem jako je uvedeno v kapitole 4.7.7.

4.9 Aktivitní esej

Při enzymových testech *in vitro* probíhala práce v laminárním boxu zbavených od RNás. Všechny reakce probíhaly v reakčním pufru s příslušnými substráty a $40\times$ zředěným hovčím RNase inhibítorem (Carl Roth) při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Celkový objem reakce činil 15 μl . Pokud nějaká složka nebyla přítomná v dané reakci, byla do reakční směsi doplněna ekvivalentním objemem roztoku, v kterém byla rozpuštěna. Reakce byla zahájena posledním přídatkem enzymu. Každá reakce byla provedena v triplicáttech. Enzymové reakce byly

zastaveny přidáním kyseliny mravenčí (45 μ l), čímž byla její finální koncentrace v reakční směsi nastavena na 5 %.

Po ukončení enzymových reakcí byly vzorky (60 μ l) přeneseny do 384-jamkové polypropylenové mikrodestičky (Beckman Coulter), určené pro hmotnostní analýzu v hmotnostním systému Sciex 6500+ Triple Quadrupole (Sciex). Tento systém pracoval s ESI (z angl. *Electrospray ionization*). Aktivita MTase byla měřena jako množství produktu reakce, SAH.

Analýza probíhala v režimu MRM (z angl. *Multiple-reaction-monitoring*), přičemž rozhraní spektrometru bylo vyhřáto na 350 °C. Deklasterizační potenciál byl nastaven na 20 V, vstupní potenciál na 10 V a kolizní energie na 28 eV.

Z mikrotitrační destičky bylo odebráno 10 nl vzorku a přidáno do mobilní fáze určené pro hmotnostní analýzu s průtokovou rychlostí 0,46 ml/min. Pro kvantifikaci ionu SAH byla měřena charakteristická hodnota $m/z = 385,1$. Každý vzorek byl měřen třikrát.

4.9.1 Příprava vzorku

Vzorek proteinu E1, označený maltózou vázajícím proteinem (MBP), byl přenesen do koncentrační zkumavky Vivaspin Turbo 4 (MWCO 10 000) (Sartorius AG). Vzorek byl centrifugován v centrifuze Allegra X-15 R (Beckman Coulter) při 4000 \times g po dobu 15 minut při 4 °C. Centrifugace probíhala v cyklech, dokud nebyla dosažena koncentrace 10,83 mg/ml, což odpovídalo 77,75 μ M. Koncentrace byla měřena spektrofotometrem Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

Podobný postup byl použit pro zkoncentrování proteinu E12. Vybrané frakce z gelové permeační chromatografie (kapitola 4.7.7) byly sloučeny do jedné vzorky a následně koncentrovány, až byla dosažena koncentrace 2,53 mg/ml, což odpovídalo 75,63 μ M.

Vzorky proteinu E1-MBP a E12 byly smíchány v poměru 1:1,5. Smíšený komplex byl následně koncentrován pomocí koncentračních zkumavek Vivaspin Turbo 4 (MWCO 10 000) (Sartorius AG). Koncentrace komplexu byla sledována během centrifugace v centrifuze Allegra X-15 R (Beckman Coulter) při 4000 \times g po dobu 15 minut při 4 °C, dokud nebyla dosažena konečná koncentrace 10,08 mg/ml, což odpovídalo 58,26 μ M.

4.9.2 Optimalizace RNA

Pro všechny reakce byla vybrána RNA o délce 35 bází. Výsledná koncentrace komplexu E1-E12 (dále jen „E“) byla stanovena na 0,5 μM . Koncentrace RNA se pohybovala v rozmezí 0-60 μM . Koncentrace substrátu SAM byla 60 μM a GTP jako dalšího substrátu 500 μM . Současně byla měřena kontrolní reakce bez GTP. Přehled koncentrací RNA a GTP pro jednotlivé reakce je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5: Přehled koncentrací hlavních složek pro optimalizaci RNA.

Reakce	Složka	Výslední koncentrace [μM]
1.	RNA	0
	GTP	500
2.	RNA	0
	GTP	×
3.	RNA	15
	GTP	500
4.	RNA	15
	GTP	×
5.	RNA	30
	GTP	500
6.	RNA	30
	GTP	×
7.	RNA	45
	GTP	500
8.	RNA	45
	GTP	×
9.	RNA	60
	GTP	500
10.	RNA	60
	GTP	×

Přehled všech složek reakcí a jejich příslušných objemů jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Objemy složek reakci.

Složka	Objem [μ l]
RNA	7
GTP	2
10x koncentrovaný reakční pufr	1,5
Hovězí inhibitor RNás	1
SAM	1,5
Komplex E1-E12	2

4.9.3 Optimalizace GTP

Škála pro optimalizaci GTP byla v rozsahu 0–1 mM. Výsledná koncentrace enzymového komplexu E1-E12 činila 0,5 μ M, koncentrace SAM byla 60 μ M a koncentrace RNA byla 30 μ M. Kontrolní vzorky byly měřeny bez přítomnosti RNA. Přehled optimalizačních reakcí pro GTP jsou uvedeny v tabulce 7. Objemy složek reakce jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 7: Charakteristické složení v optimalizačních reakcích pro GTP.

Reakce	Složka	Výslední koncentrace [μM]
1.	RNA	30
	GTP	0
2.	RNA	×
	GTP	0
3.	RNA	30
	GTP	250
4.	RNA	×
	GTP	250
5.	RNA	30
	GTP	500
6.	RNA	×
	GTP	500
7.	RNA	30
	GTP	750
8.	RNA	×
	GTP	750
9.	RNA	30
	GTP	1000
10.	RNA	×
	GTP	1000

4.9.4 Optimalizace SAM

Poslední optimalizovanou složkou byl MTase substrát SAM. Pro něj byla vytvořena škála v rozsahu 0–60 μM . Koncentrace RNA činila 30 μM a koncentrace GTP 500 μM . V reakcích byl přítomen 0,5 μM E a kontroly neobsahovaly žádný enzym. Přehled složek reakcí je uveden v tabulce 8. Objemy reakcí jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 8: Charakteristické složení v optimalizační směsi pro SAM.

Reakce	Složka	Výslední koncentrace [μM]
1.	SAM	0
	E	0,5
2.	SAM	0
	E	×
3.	SAM	15
	E	0,5
4.	SAM	15
	E	×
5.	SAM	30
	E	0,5
6.	SAM	30
	E	×
7.	SAM	45
	E	0,5
8.	SAM	45
	E	×
9.	SAM	60
	E	0,5
10.	SAM	60
	E	×

4.9.5 Aktivita E a inhibice sinefunginem

Koncentrace enzymu byla zvolena na 0,5 μM a 0,1 μM . Koncentrace GTP činila 400 μM , koncentrace SAM činila 25 μM a koncentrace RNA byla 12 μM . Jako kontroly byly zvoleny reakce bez RNA a jeden vzorek s pouze velkou podjednotkou enzymu E1 o koncentraci 0,5 μM .

Byla také sledována inhibice enzymatické aktivity nespecifickým inhibitem MTase sinefunginem (dále jen „SIN“). Byly vybrány dvě rozdílné koncentrace SIN. Při sledování inhibice nebyly ze směsi odebrány žádné substráty. Přehled složek reakcí je uveden v tabulce 10. Množství jednotlivých složek je uvedeno v tabulce 9.

Tabulka 9: Objem složek použitých při sledování enzymové aktivity a její inhibice.

Složka	Objem [μ l]
RNA	7
GTP	1
10x koncentrovaný reakční pufr	1,5
Hovězí inhibitor RNase	1
SAM	1,5
SIN	1
Enzym	2

Tabulka 10: Koncentrace charakteristických složek v reakční směsi.

Reakce	Složka	Koncentrace [μ M]
1.	E1 enzym	0,5
	RNA	25
2	E	0,5
	RNA	25
3.	E	0,1
	RNA	25
4.	E	0,5
	RNA	×
5.	E	0,1
	RNA	×
6.	E	0,5
	SIN	1
7	E	0,1
	SIN	1
8.	E	0,5
	SIN	20
9.	E	0,1
	SIN	20

4.9.6 Kvantifikace SAH

Pro kvantifikaci vzniklého produktu enzymatické reakce byly připraveny vzorky se standardem SAH (15 μl). K těmto reakcím byla rovněž přidána kyselina mravenčí (45 μl). Z naměřených výsledků byl stanoven kalibrační graf s příslušnou kalibrační rovnicí. Kalibrační rozsah byl v rozsahu 0,3-10 μM .

4.9.7 Efektivní dávka (EC_{50}) SIN

Efektivní dávka SIN byla stanovena při koncentraci E 0,5 μM . Koncentrace SAM činila 25 μM , RNA 12 μM a koncentrace GTP byla 400 μM . Při měření EC_{50} nebyly použity kontrolní vzorky. Rozsah koncentrací SIN byl 0–10 μM . Přehled reakčních směsí je uveden v tabulce 11. Objemy přidávaných komponent jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 11: Koncentrační rozsah pro EC_{50} .

Reakce	Koncentrace SIN [μM]
1.	10^{-5}
2.	10^{-4}
3.	10^{-3}
4.	10^{-2}
5.	10^{-1}
6.	10^0

4.9.8 Analýza aktivity podjednotky E1

Sledována byla také aktivita samotné E1 podjednotky. Byly zvoleny reakce bez GTP, RNA a také bez inhibice SIN. Koncentrace E1 byla 0,5 μM a koncentrace ostatních komponent reakcí byly totožné jako v kapitole 4.9.6. Rozdělení reakcí je uvedeno v tabulce 12. Objemy složek jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 12: Přehled charakteristických složek reakce.

Reakce	Charakteristická složka
1.	- GTP
2.	- RNA
3.	+ 1 μ M SIN

5 Výsledky

5.1 Příprava proteinů E1 a E12 v buňkách *E. coli* BL21(DE3) - Codon Plus RIL

5.1.1 Transformace bakterií

Kompetentní buňky *E. coli* BL21(DE3) - Codon Plus RIL byly transformovány jednotlivými plazmidy nesoucí geny pro E1 a E12 podjednotku. Expese těchto proteinů probíhala v autoindukčním kultivačním médiu ZY. Úspěšnost expese proteinů byla sledována pomocí SDS-PAGE a výsledky jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13: Výsledky expese proteinů z jejich plazmidů.

Plazmid	Výsledek
E1-E12_pSUMO	Špatná syntéza podjednotky E1, E12 v malém množství
E1_pET-24	Dobrá syntéza podjednotky, nerozpustný protein
E1_pSUMO	Špatná syntéza podjednotky E1
E12_pKUMO	Dobrá syntéza podjednotky

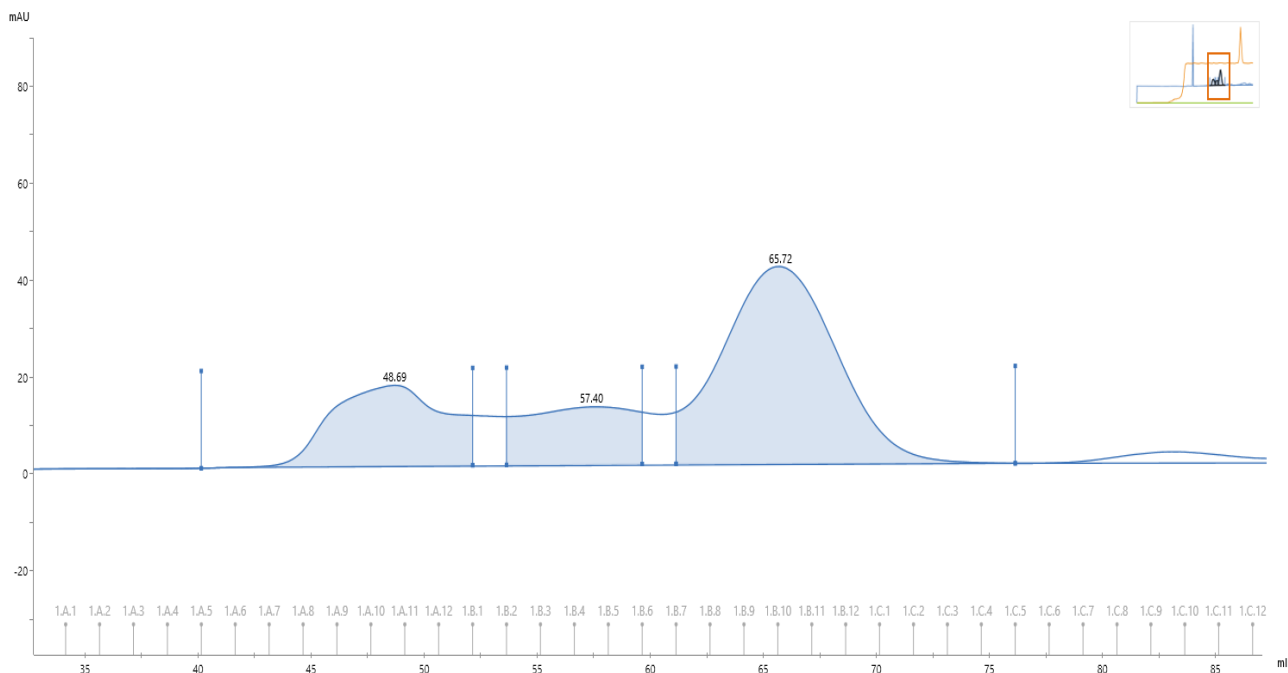
V buňkách *E. coli* probíhala dále jenom expese proteinu E12.

5.1.2 Izolace a purifikace podjednotky E12

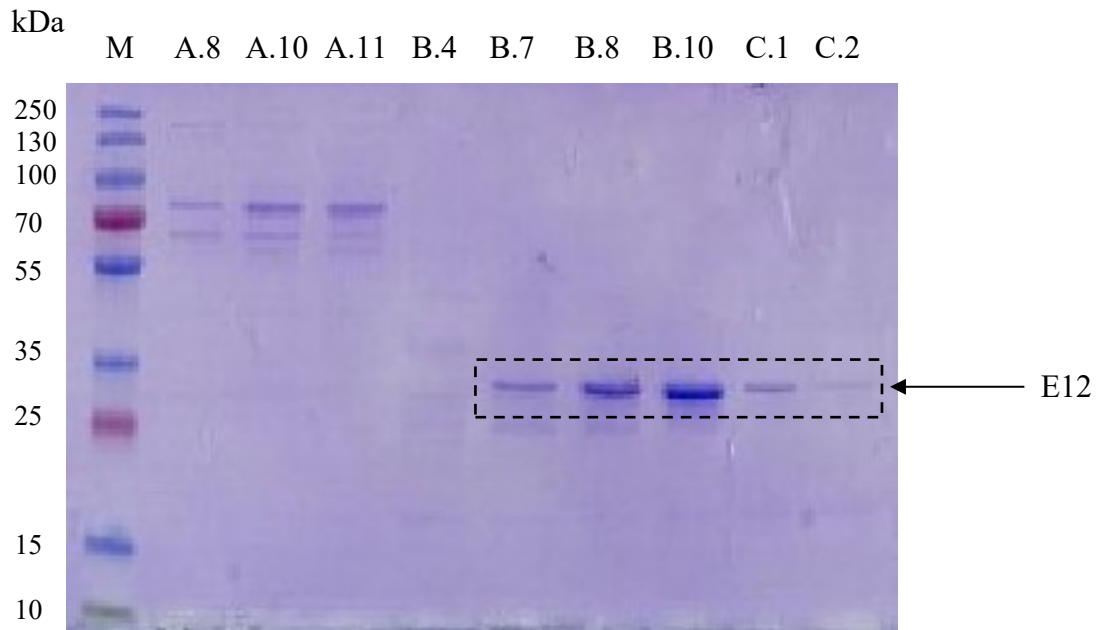
Prvním krokem v izolaci proteinu byla lýza buněk pomocí sonikátoru. Po centrifugaci lyzátu byl protein izolován prostřednictvím afinitní chromatografie na nosiči Ni-NTA resin. Protein byl imobilizován na tomto nosiči a očištěn od ostatních složek využitím vymývacího a lyzačního pufru B. Eluce podjednotek probíhala pomocí elučního pufru B.

Štěpení polyhistidinové kotvy probíhalo v dialyzační membráně. Poté byl protein E12 oddělen od nečistot pomocí reverzní chelatační chromatografie.

Vzorek byl odstředěn v centrifugální nádobě před jeho vložením do HPLC systému a vzorek byl plně očištěn na základě různé velikosti molekul (Obr. 9). Frakce byly sbírány po 1,5 ml do hluboké destičky, u kterých byla měřena absorbance při 280 nm. Analýza frakcí probíhala pomocí SDS-PAGE na 12% gelu (Obr. 10). Frakce s obsahem proteinu E12 (B.8 – C.1) byly spojeny.



Obrázek 9: Chromatogram po gelové permeační chromatografii. Modrá křivka znázorňuje absorbanci A_{280} . Ve spodní části je znázorněn eluční objem a frakce.

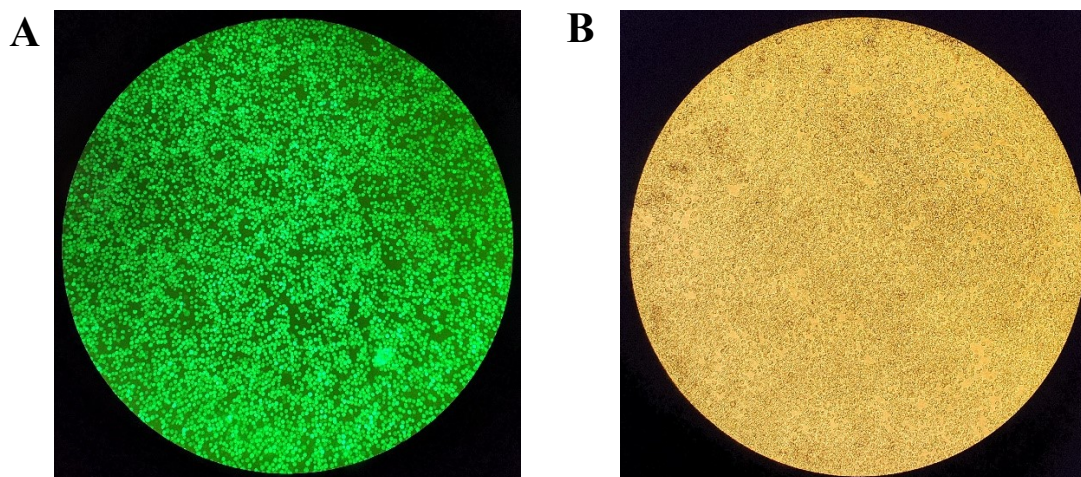


Obrázek 10: Elektroforeogram vybraných frakcí po HPLC proteinu E12. M = proteinový standard (marker), kDa = velikost molekul v kilodaltnech, B.8 – C.1 = vybraný proteinové frakce.

5.2 Příprava proteinu E1 v hmyzích buňkách linie Sf9

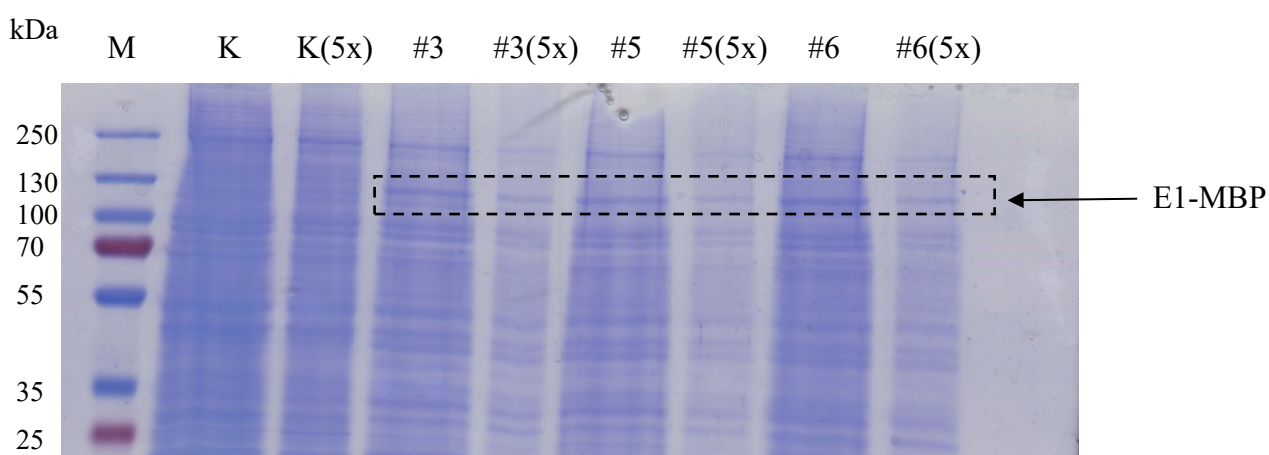
5.2.1 Transfekce buněk

Po transformaci buněk DH10BacY bylo vybráno 6 různých bacmidových plazmidů nesoucí gen pro protein E1. Tyto bacmidy byly použity k transfekci hmyzích buněk Sf9. Míra infekčnosti byla sledována pomocí fluorescenčního mikroskopu, přičemž intenzita fluorescence hmyzích buněk byla korelována s úspěšností infekce (Obr. 11A). Neinfikované buňky fluorescenci nevykazovaly (Obr. 11B).



Obrázek 11: Buňky Sf9 pod mikroskopem. (A) Infikované hmyzí buňky bakulovirem, které jsou fluorescentní díky expresi GFP, zobrazené pod fluorescenčním mikroskopem (10× zvětšení). (B) Neinfikované kontrolní buňky zobrazené pod světelným mikroskopem (10× zvětšení).

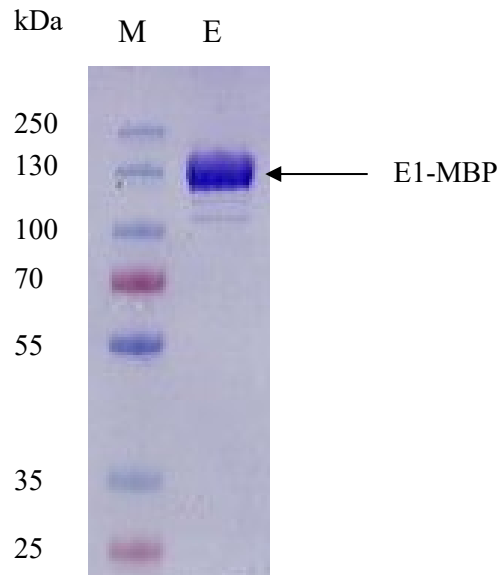
Úroveň exprese genu E1 proteinu byla sledována pomocí expresního testu a vizualizace na SDS-PAGE (Obr. 12). Byly testovány tři různé infikované kultury, přičemž všechny vykazaly pozitivní výsledek s podobnou intenzitou exprese. Pro expresi proteinu ve 1,5 l médiu byl vybrán klon 6 na základě těchto výsledků.



Obrázek 12: Expresní test Sf9 buněk infikovaných bakulovirem na 10% polyakrylamidovém gelu. V buňkách byl přítomen gen pro E1-MBP. Číslo v závorce udává ředění vzorku. K = kontrola (neinfikované buňky), # = virový klon, M = proteinový marker.

5.2.2 Izolace a purifikace proteinu E1

Protein E1 byl izolován z buněčného supernatantu využitím afinitní chromatografie po jeho předchozím sonikování a odstředění lyzátu. Protein E1 byl zachycen na amylozovém resinu prostřednictvím MBP vázající se na tento nosič. Po noční inkubaci s resinem byl pročištěn vymývacím a lyzačním pufrem A. Eluát byl poté analyzován na 7,5% SDS-PAGE gelu (Obr. 13).



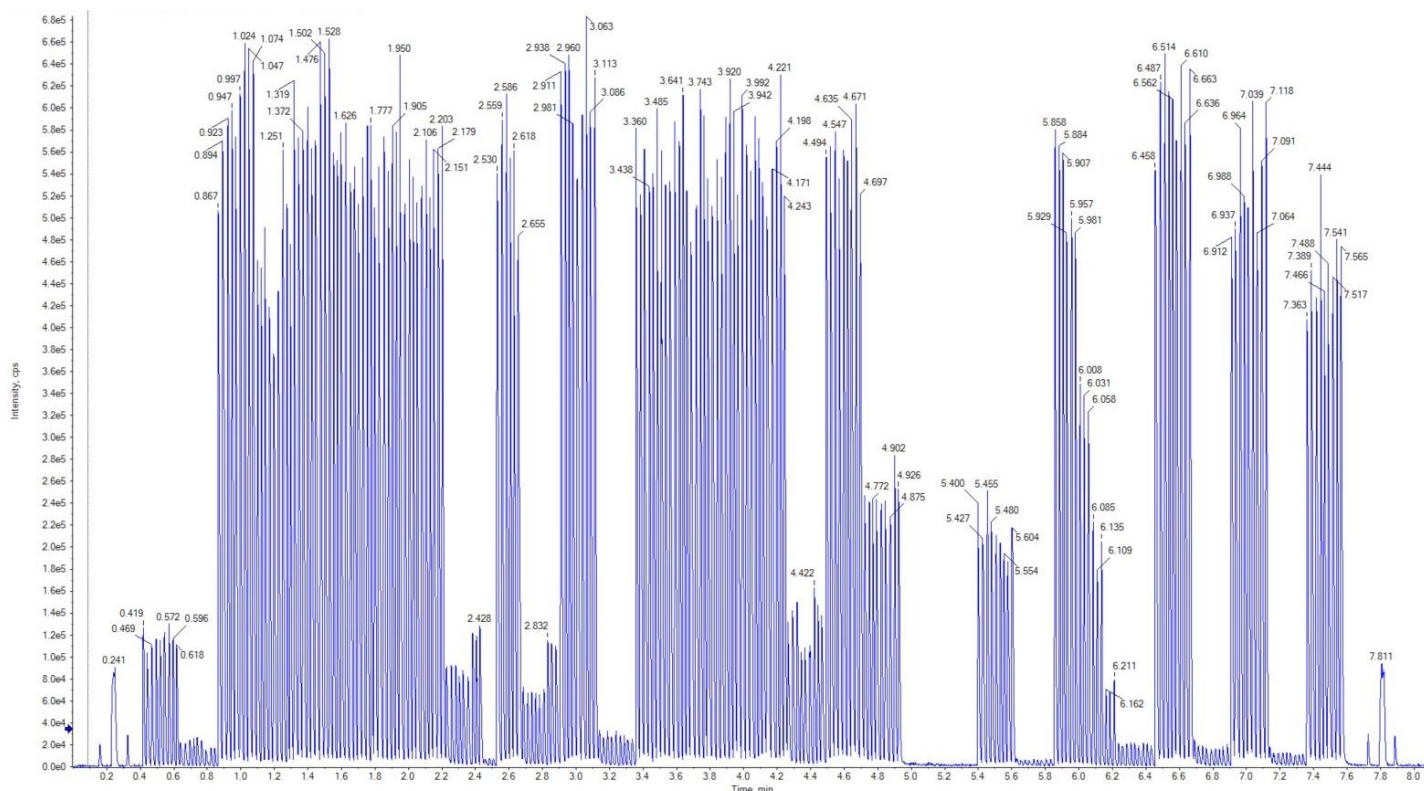
Obrázek 13: Elektroforeogram proteinu E1 po afinitní chromatografií na amylozovém nosiči. E = dráha E obsahuje eluát po chromatografií, M = proteinový marker.

5.3 Aktivitní esej

Vzorek proteinu E1 s navázanou MBP kotvou byl zkoncentrován na hodnotu 77,75 μM . Vzorek E12 byl zkoncentrován na hodnotu 75,63 μM . Oba proteiny byly smíchány v poměru 1:1,5 (E1:E12). Výsledná koncentrace komplexu E1-E12 činila 58,26 μM .

5.3.1 Optimalizační reakce

Pro zjištění optimálního množství substrátu byly provedeny reakce, při kterých byla sledována účinnost enzymatické aktivity na základě různých koncentrací RNA, GTP a SAM. Všechny tři reakce probíhaly současně a byly měřeny na hmotnostním spektrometru (Obr. 14).



Obrázek 14: Hmotnostní spektra získaná pro optimalizační reakce. Intenzita vrcholu je závislá na množství měřeného SAH. Horizontální osa představuje čas, ve kterém byla daná reakce měřena. Číselný údaj nad vrcholem značí konkrétní čas měření.

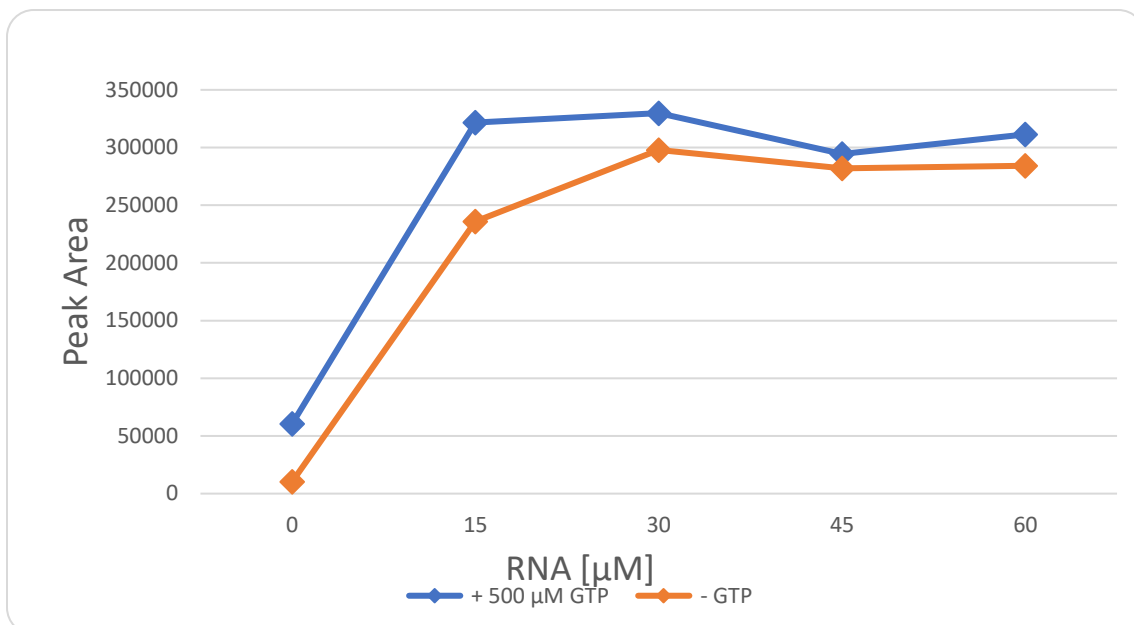
Z těchto dat byly pomocí integrace získány hodnoty ploch pod křivkou (dále jen „peak area“). Jednotky vrcholů jsou úměrné intenzitě signálu. Hodnoty ploch pro optimalizaci RNA jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14 A.: Naměřené hodnoty pro reakce s 500 μM GTP.

Koncentrace RNA [μM]	Peak Area	\bar{x}
0	61030	60503
	62576	
	57903	
15	310533	321633
	322200	
	332166	
30	319833	329822
	324266	
	345366	
45	285266	294333
	293966	
	303766	
60	324500	311266
	310966	
	298333	

Tabulka 14 A.: Naměřené hodnoty pro reakce bez GTP.

Koncentrace RNA [μM]	Peak Area	\bar{x}
0	11643	10266
	11556	
	7598	
15	226966	236011
	235400	
	245666	
30	288233	297900
	305866	
	299600	
45	270900	281922
	280433	
	294433	
60	275366	284233
	275733	
	301600	



Obrázek 16: Graf závislosti enzymatické aktivity E na koncentraci RNA o velikosti 35 párů. Modrou barvou je vyznačená křivka pro reakce s 500 μM GTP, oranžovou barvou je vyznačená křivka pro reakce bez GTP. „Peak Area“ představuje plochu pod křivkou vrcholu.

Maximální aktivita byla dosažena při koncentraci RNA v rozmezí 15–30 μM, přičemž pro aktivní reakce byla zvolena koncentrace 12 μM.

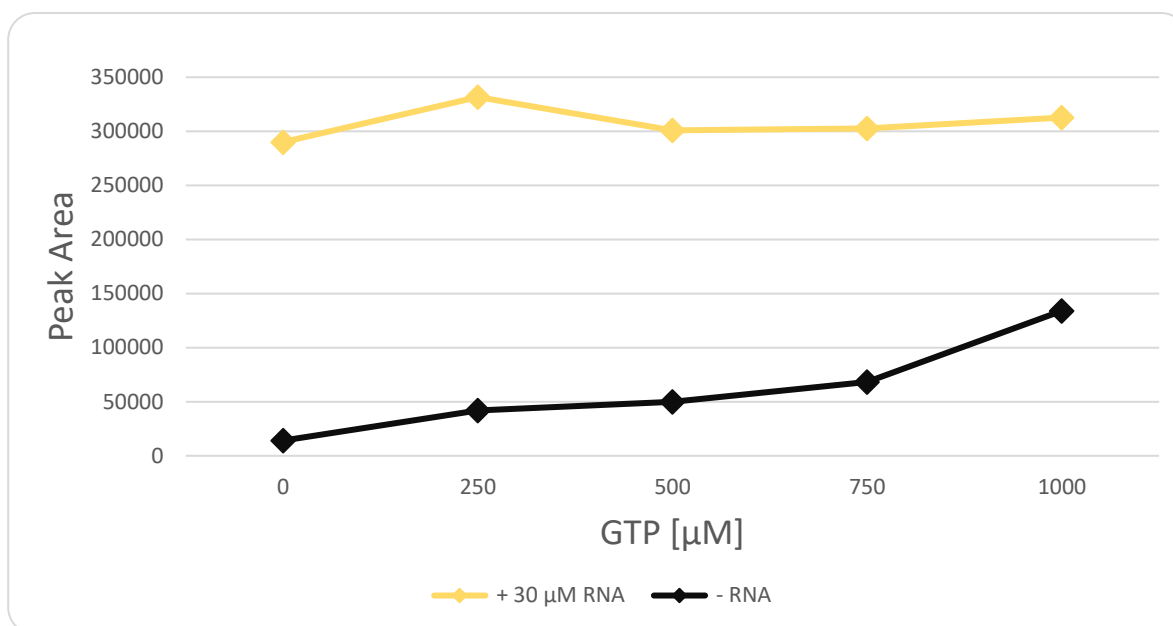
Optimalizace GTP byla prováděna obdobně; jako kontrola byly použity reakce bez RNA. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 15A a 15B.

Tabulka 15 A: Naměřené hodnoty pro reakce s 30 μM RNA. \times = hodnota, která nebyla započtena kvůli vysoké odchylce

Koncentrace GTP [μM]	Peak Area	\bar{x}
0	294100	290022
	286633	
	289333	
250	326833	331644
	343000	
	325100	
500	276266	300783
	325300	
	2670 \times	
750	297233	302566
	317000	
	293466	
1000	323833	312777
	292800	
	321700	

Tabulka 15 A: Naměřené hodnoty pro reakce bez RNA.

Koncentrace GTP [μM]	Peak Area	\bar{x}
0	13580	14093
	14516	
	14183	
250	60536	41972
	33943	
	31436	
500	59403	49863
	43956	
	46230	
750	68226	68093
	57620	
	78433	
1000	127300	133966
	139100	
	135500	



Obrázek 17: Graf závislosti enzymatické aktivity E na koncentraci GTP. Žlutou barvou je vyznačená křivka pro optimalizaci s 30 μM RNA, černá křivka představuje reakce bez RNA. „Peak Area“ představuje plochu pod křivkou vrcholu.

Maximální aktivita byla dosažena při koncentraci 250 μM GTP, přičemž hodnota pouze mírně klesala při vyšších koncentracích. Pro aktivní reakce byla zvolena koncentrace 400 μM GTP. Hodnota při 500 μM (2670) nebyla zahrnuta kvůli vysoké odchylce, která mohla být způsobena chybou při přípravě.

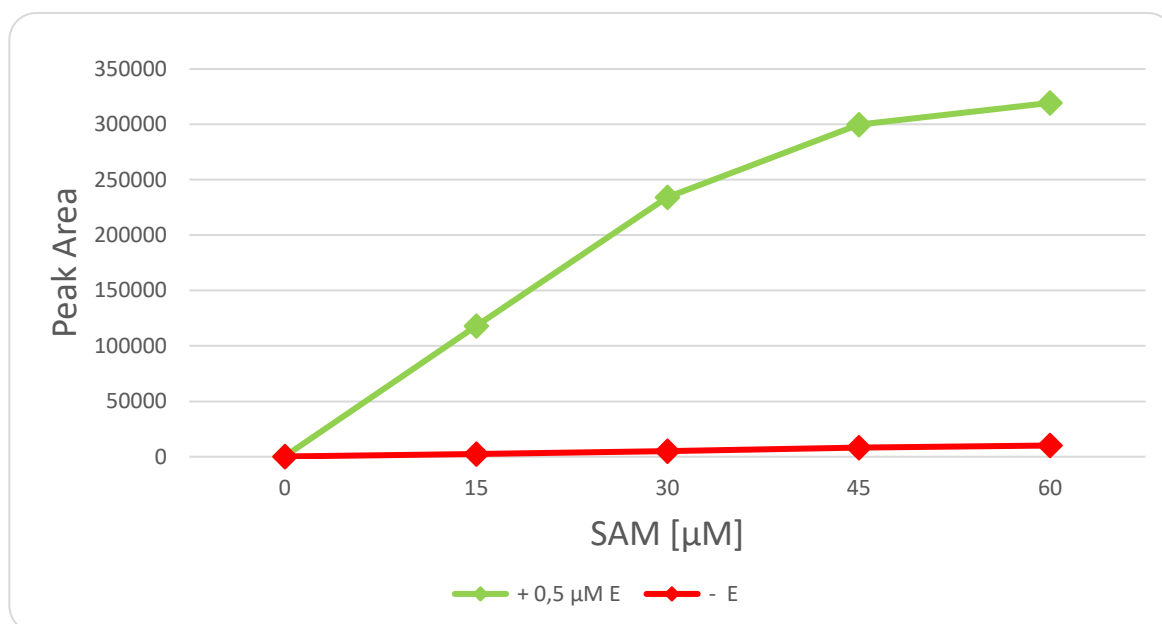
Poslední optimalizovanou složkou byl SAM. Jako kontrola byla použita simultánní reakce bez E. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 15 A: Naměřené hodnoty pro reakce s 0,5 μM E.

Koncentrace GTP [μM]	Peak Area	\bar{x}
0	455	495
	554	
	477	
15	129233	118033
	112766	
	112100	
30	237766	234355
	227733	
	237566	
45	317866	299866
	295366	
	286366	
60	335333	319377
	290933	
	331866	

Tabulka 15 A: Naměřené hodnoty pro reakce bez E.

Koncentrace GTP [μM]	Peak Area	\bar{x}
0	273	219
	227	
	158	
15	2451	2373
	2206	
	2462	
30	5316	5181
	5355	
	4873	
45	8105	8294
	8015	
	8762	
60	10236	10131
	9647	
	10509	



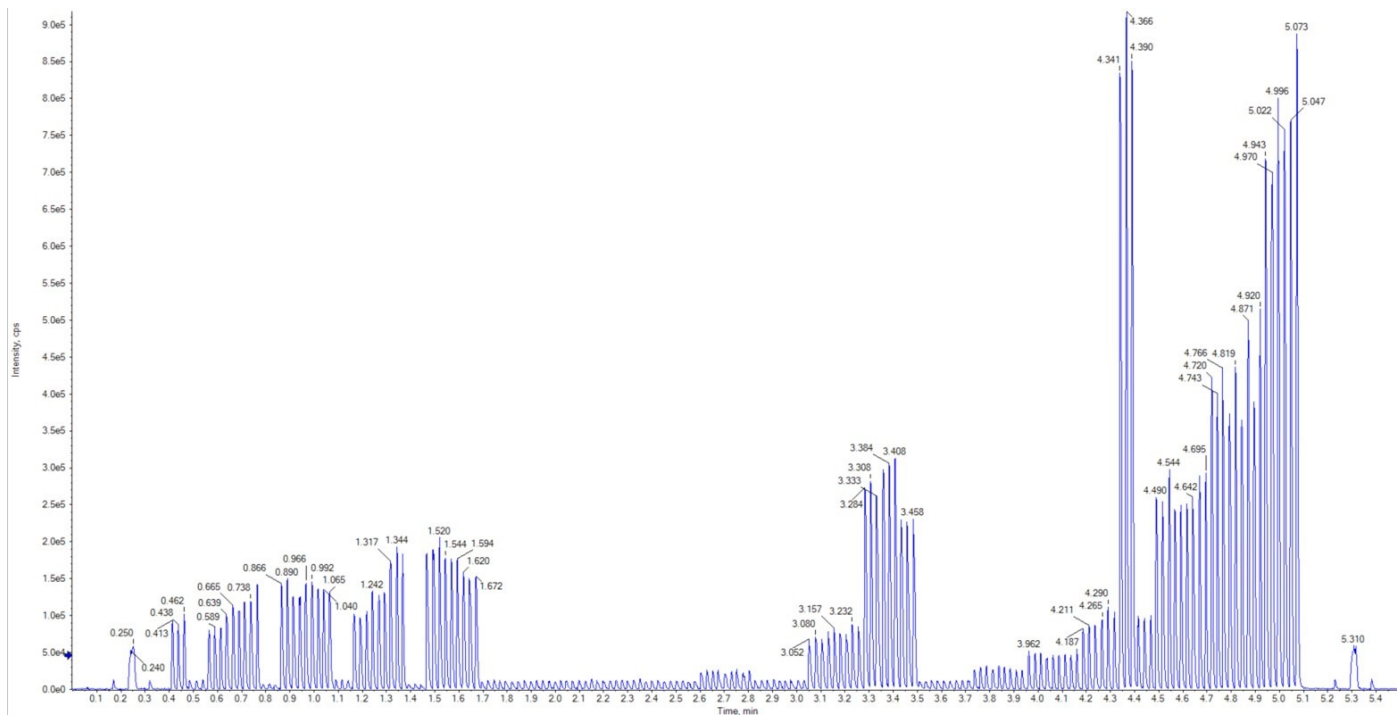
Obrázek 18: Graf závislosti enzymatické aktivity E na koncentraci SAM. Zelenou křivkou je vyznačena závislost aktivity s přidavkem 0,5 µM E, červenou barvou je vyznačena křivka pro závislost bez přidavku E. „Peak Area“ představuje obsah plochy pod vrcholem signálu.

Pro aktivní reakce byla zvolena koncentrace SAM 25 µM.

5.3.2 Aktivita a inhibice komplexu E1-E12

Pro kvantifikaci přeměněného SAM enzymatickou reakcí byla vytvořena kalibrační křivka pro SAH s koncentračním rozsahem 0,3 – 10 µM (Obr. 20). Příslušné naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 16.

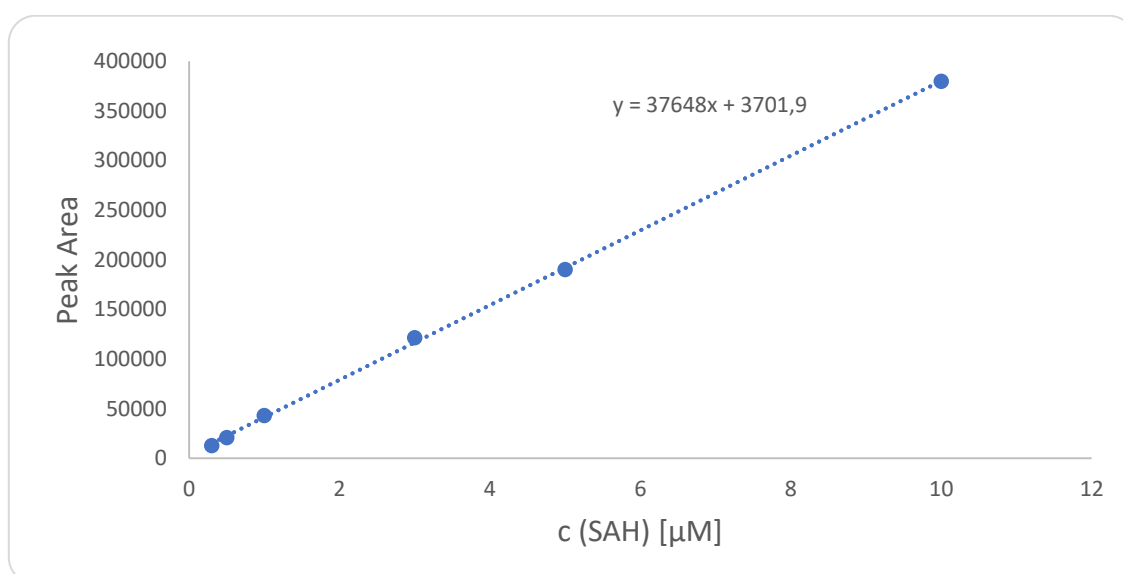
Následně bylo provedeno měření enzymatické aktivity E za různých podmínek. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 17 a na obrázku 21.



Obrázek 19: Hmotnostní spektra enzymatické aktivity komplexu E1-E12. Horizontální osa představuje čas, ve kterém byla měřena daná reakce. Vertikální osa představuje intenzitu měřeného signálu. Číselný signál označuje čas, ve kterém byla změřena daná reakce.

Tabulka 15 A: Naměřené hodnoty pro reakce s 0,5 μM E.

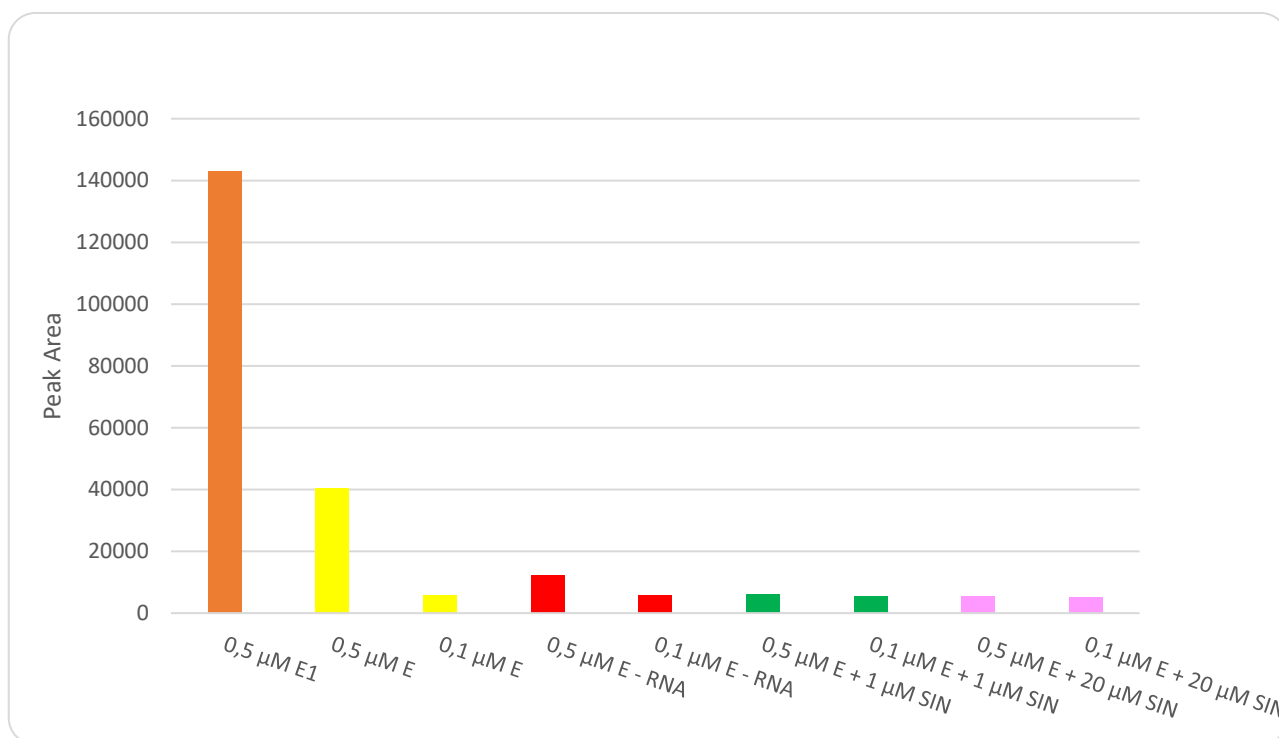
Koncentrace SAH [μM]	Peak Area	\bar{x}
0,3	12786	12564
	13253	
	11653	
0,5	21016	20880
	20930	
	20693	
1	40293	42980
	45666	
	384866	
3	43983	121516
	126633	
	116400	
5	124666	190033
	189100	
	190966	
10	208133	379666
	386500	
	372833	



Obrázek 20: Kalibrační křivka. Závislost koncentrace SAH na ploše pod křivkou („Peak Area“).

Tabulka 16. Hodnoty pro kvantifikaci enzymatické aktivity a inhibice E (E1).

Reakce	Peak Area	\bar{x}	c (SAH) [μM]
0,5 μM E1	120266	143111	3,70
	166966		
	142100		
0,5 μM E	42746	40468	0,98
	40866		
	37793		
0,1 μM E	5902	5795	≈ 0
	5957		
	5526		
0,5 μM E - RNA	12580	12287	0,23
	12410		
	11873		
0,1 μM E - RNA	5974	5888	≈ 0
	5858		
	5833		
0,5 μM E + 1 μM SIN	5870	5929	≈ 0
	5907		
	6011		
0,1 μM E + 1 μM SIN	5558	5430	≈ 0
	5368		
	5364		
0,5 μM E + 20 μM SIN	5244	5333	≈ 0
	5390		
	5365		
0,1 μM E + 20 μM SIN	4775	5202	≈ 0
	5550		
	5280		



Obrázek 21: Grafické znázornění enzymatické aktivity. Všechny reakce obsahovaly 25 µM SAM a 400 µM GTP. Všechny reakce obsahovaly 12 µM RNA, výjimku tvoří reakce s označením „- RNA“, které neobsahovali v reakci žádnou RNA. V reakcích byly použity 2 koncentrace E, ti jsou označeny v horizontální části grafu. „Peak Area“ představuje obsah plochy pod křivkou. Oranžovou barvou je vyznačena kontrola s podjednotkou E1; žlutou barvou reakce s 0,5 µM a 0,1 µM E; červenou barvou kontrola bez RNA pro obě koncentrace E. Inhibice 1 µM SIN je znázorněna zelenou barvou; růžovou barvou je znázorněna inhibice při 20 µM SIN.

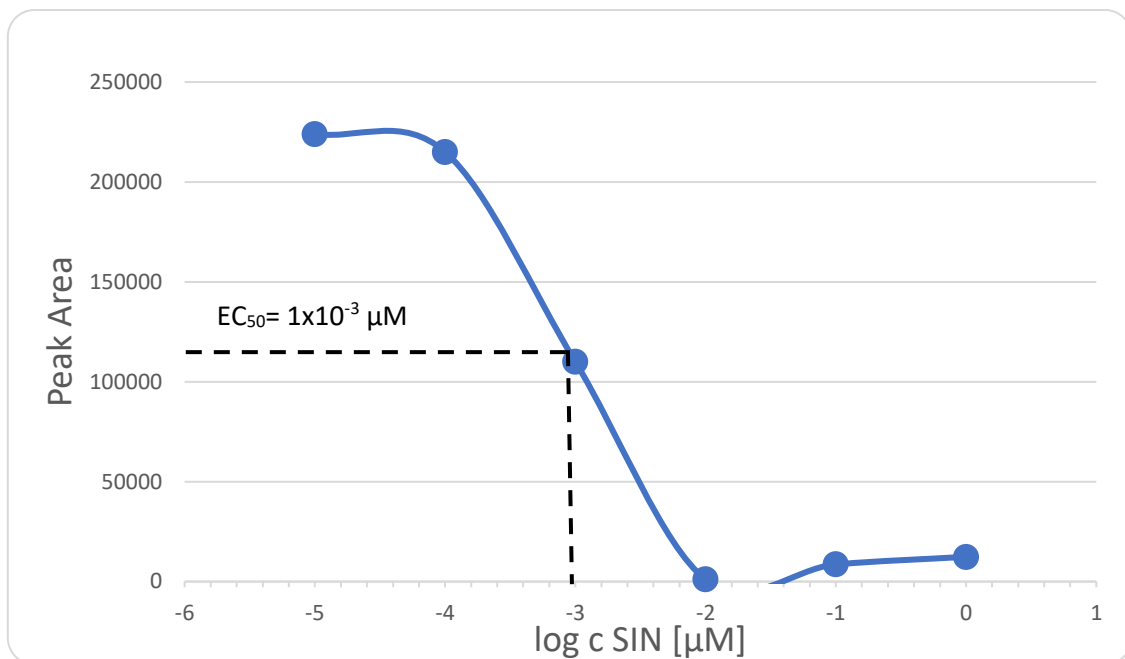
Z grafu je patrné, že nejvyšší aktivitu vykazuje samotná podjednotka E1. Aktivita 0,5 µM komplexu E1-E12 je 3,5krát nižší, ale stále dostatečně vysoká. Naopak, 0,1 µM koncentrace komplexu je příliš nízká, aby byla efektivní. Kontrola bez RNA vykazuje pozitivní MTase aktivitu, což naznačuje, že i bez RNA dochází k drobné methylaci složek reakce. Inhibiční reakce ukazují, že koncentrace 1 µM SIN je dostatečná k úplné inhibici substrátu.

5.3.3 EC₅₀

Pro určení poloviční maximální účinné koncentrace SIN byla připravena deseti násobná ředící řada. Rozsah koncentrací SIN byl od 1×10^{-5} µM do 1 µM při použití 0,5 µM E. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 17 a zobrazeny na obrázku 21.

Tabulka 17: Hodnoty odezvy pro měření EC₅₀. × = hodnota nebyla započtena kvůli vysoké odchylce.

Reakce	Peak Area	\bar{x}
10⁻⁵	188000 ×	224000
	236000	
	212000	
10⁻⁴	203000	215000
	218000	
	223000	
10⁻³	110000	110000
	108000	
	113000	
10⁻²	12000	1040
	9480	
	9610	
10⁻¹	8250	8580
	8860	
	8610	
1	13000	12400
	11200	
	13100	



Obrázek 22: Graf EC₅₀ pro SIN. Horizontální osa označuje koncentraci SIN v dekadickém logaritmickém měřítku. Vertikální os značí enzymatickou aktivitu komplexu E1-E12 v jednotkách obsahu ploch pod křivkou („Peak Area“).

Z grafu je patrné, že EC₅₀ SIN pro 0,5 μM komplex E1-E12 z MPXV je $1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$

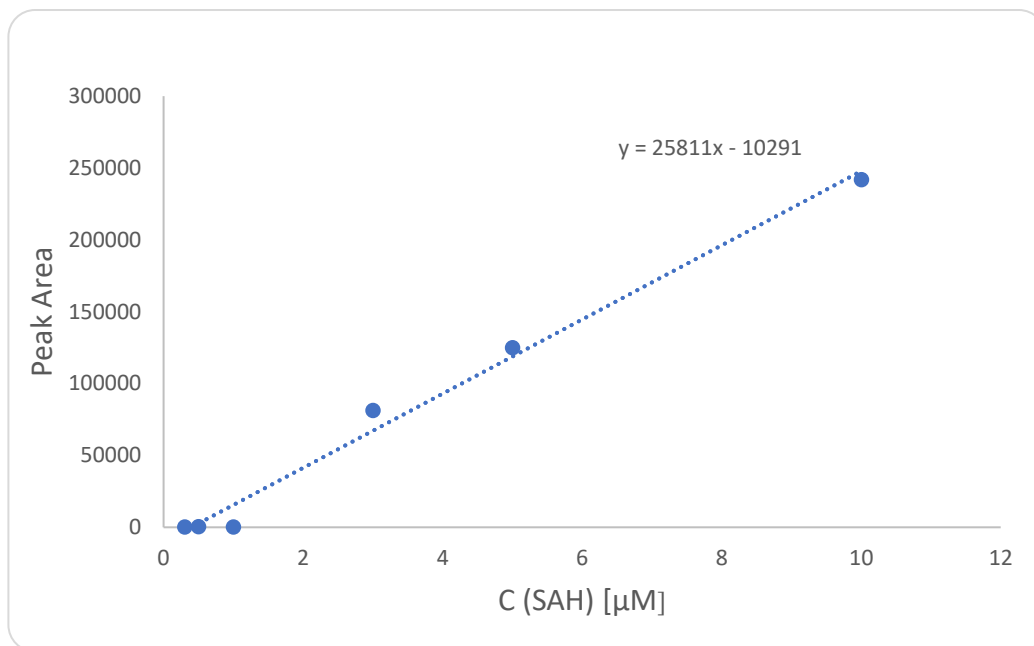
5.3.4 Kontrola E1 podjednotky

Jelikož samostatná podjednotka E1 vykazovala značnou aktivitu, bylo třeba ověřit, zda aktivitu MTase domény ovlivňují další faktory jako napr. přítomnost substrátů dílčích spřažených reakcí (TPase a GTase). Pro tento účel byla vytvořena kontrola bez GTP, RNA a také s přidavkem 1 μM SIN. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 19 a na obrázku 24.

Na toto měření byl vytvořen samostatný kalibrační graf s kalibrační křivkou. Naměřené odezvy signálu jsou uvedeny v tabulce 18 a vizualizovány v obrázku 23.

Tabulka 18: Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku.

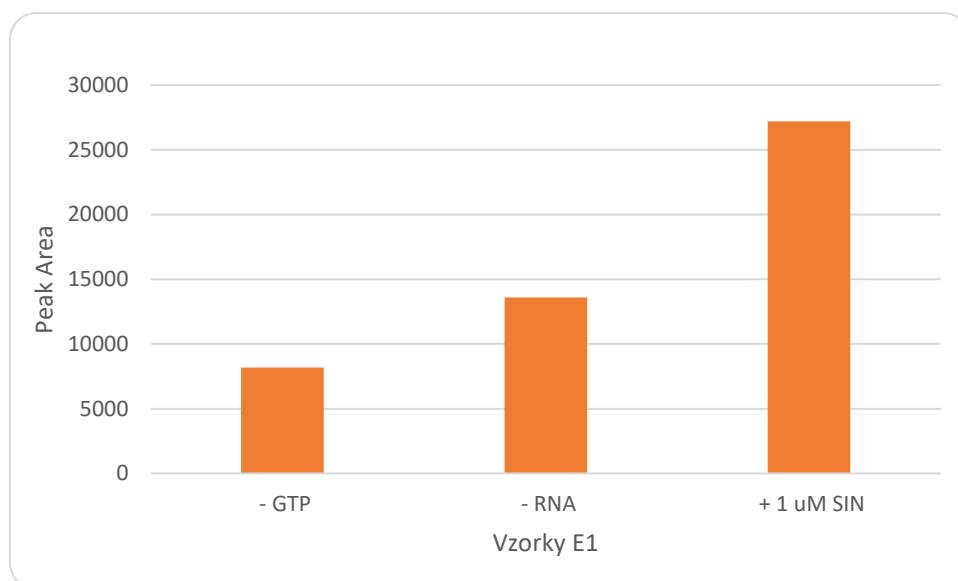
Koncentrace SAH [μM]	Peak Area	\bar{x}
0,3	195	249
	517	
	303	
0,5	407	402
	438	
	361	
1	217	268
	328	
	259	
3	80700	81300
	82900	
	80300	
5	127000	125000
	122000	
	127000	
10	233000	242000
	252000	
	241000	



Obrázek 23: Kalibrační graf s příslušnou kalibrační křivkou pro SAH. „Peak Area“ představuje obsah plochy pod křivkou.

Tabulka 19: Naměřené hodnoty pro kontrolu proteinu E1.

Reakce	Peak Area	\bar{x}	c (SAH) [μM]
-GTP	8280	8130	≈ 0
	8260		
	8000		
-RNA	13400	13600	0,13
	13900		
	13600		
+1 μM SIN	27100	27200	0,66
	27400		
	26900		



Obrázek 24: Grafické znázornění aktivity podjednotky E1. Vertikální osa představuje enzymatickou aktivitu proteinu E1. „Peak Area“ = obsah vrcholu pod křivkou. Koncentrace E1 představovala 0,5 μM , SAM 25 μM , GTP 400 μM . Symbol „-“ v horizontální části značí, že daná reakce neobsahovala příslušnou složku napr.: - GTP reakce neobsahovala substrát GTP.

Z měření podjednotky E1 je patrné, že její aktivita je vyšší než u komplexu E1-E12. Tento výsledek se projevil i ve všech kontrolách. Je tedy možné odhadnout, že E1 bude schopná methylovat nejen pozici N-7 v guanosinu (GTP), ale také samotnou RNA.

6 Diskuse

Cílem této práce bylo biochemicky charakterizovat čepičkující enzym z viru opičích neštovic. Tento enzym se skládá z podjednotky E1, která obsahuje všechny tři katalytické domény potřebné pro tvorbu cap-0. Od N-konce jsou za sebou řazeny domény TPase, GTPase a MTase. TPase a GTPase nevyžadují pro svou správnou funkci další enzymy nebo kofaktory, což však neplatí pro MTase doménu, jejíž aktivita je stimulována podjednotkou E12. V rámci naší práce jsme se zaměřili na zkoumání MTase domény (Chen et al. 2024).

Pro tento účel bylo nezbytné připravit dimerní komplex E1-E12. Tato část práce přinesla největší výzvu, protože exprese podjednotky E1 byla obtížná. Jak již bylo zmíněno, příprava vektorů nebyla součástí této práce, a tyto vektory byly připraveny doktorem Bouřou a doktorkou Landovou. Prvním testovaným vektorem byl E1-E12_pSUMO. Byly zkoušeny různé transformační a expresní podmínky, avšak výsledky ukázaly neúplnou syntézu E1 a nízký výtěžek E12. Tento plazmid sloužil jako základ pro klonování dalších plazmidů.

Dalšími testovanými plazmidy byly E1_pKUMO a E12_pKUMO. U prvního zmiňovaného plazmidu byl výsledek obdobný jako u předešlého vektoru, tedy neúplná syntéza E1. Naopak E12 se exprimoval ve vyšší míře z plazmidu, který obsahoval samostatně gen pro E12 (E12_pKUMO), než z plazmidu, který obsahoval oba geny, E1 i E12 (E1-E12_pSUMO). Plazmid E12_pKUMO byl proto v této práci použit pro syntézu proteinu E12. Klonování a exprese proteinu ve vektoru pET-24 byly úspěšné, avšak problémem byla nevyhovující rozpustnost proteinu. Po těchto zjištěních bylo rozhodnuto opustit expresi E1 v bakteriích *E. coli* a přejít k expresi v hmyzích buňkách Sf9.

Výhodou exprese v hmyzích buňkách je jejich schopnost provádět posttranslační modifikace a správně sbalit protein (Usami et al. 2010). Nicméně, tento přístup je časově náročný, vyžaduje uskladnění hmyzích buněk a je finančně nákladný na přípravu rekombinantních proteinů. Gen nesoucí E1 byl klonován do vektoru pACEBac spolu s MBP na N-konci. Tento vektor byl následně transformován do bakterií DH10Bac. Z vybraných 6 kolonií byl izolován bacmid. Po transfekci do hmyzích buněk Sf9 a zaznamenání výrazné fluorescence bylo nezbytné zkontrolovat míru exprese požadovaného genu. K tomu účelu byl proveden expresní test, jehož výsledky jsou uvedeny v obrázku 11. Na základě těchto výsledků jsme byli schopni připravit dostatečné množství rekombinantního proteinu E1.

Izolace a purifikace obou proteinů probíhala odlišně. Podjednotka E12 byla po lýzi buněk navázaná přes histidinovou kotvu na Ni-NTA resin. Následně byla provedena dialýza se

štěpením SUMO proteinu (s histidinovou kotvou) a reverzní afinitní chromatografie. Vzorek však nedosahoval požadované čistoty, a proto byl podroben gelové permeační chromatografii (obr. 8). Po této chromatografii byly spojeny vybrané frakce a koncentrace proteinu byla upravena na 75,63 μM . Táto koncentrace byla zvolena z důvodu výhodnějšího uskladnění vzorky.

Izolace proteinu E1 probíhala na amylosovém nosiči. Tento resin byl přidán k buněčnému lyzátu. Po eluci v plastové koloně s fritou a kontrole SDS-PAGE (obr. 13) nebylo vzorku proteinu E1 nutné dále purifikovat. Kvůli ztrátám během purifikačních metod jsme se rozhodli neštěpit MBP. Enzymatická aktivita proteinu nebyla ovlivněna přítomností MBP značky, což bylo potvrzeno doktorkou Chalupskou. Koncentrace proteinu E1 byla zvolena na 77,75 μM z důvodu snadnějšího smíchaní v správném poměru se vzorkem proteinu E12. Vzorky E1 a E12 byly smíchané v poměru 1:1,5 (nadbytek E12) a finální koncentrace komplexu byla upravena na 58,26 μM . Táto vysoká koncentrace byla zvolena s ohledem na požadavky hmotnostního analyzátoru. Při přípravě vzorek pro aktivitní eseje bylo ze zásobního vzorku odebíráno množství v jednotkách mikrolitrů. To zaručilo, aby se nepoškodili části tohoto přístroje, které by mohlo nastat při vyšších koncentracích složek, které jsou přítomny v pufrech, hlavně NaCl.

Enzymatická aktivita N7-MTase domény podjednotky E1 byla testována in vitro aktivitními eseji, kde se sledovalo množství vzniklého SAH. Tento produkt vzniká proměnou SAM, který je donorem methylové skupiny. Methylace čepičky je posledním krokem v procesu, a proto byly do reakcí zahrnuty všechny složky potřebné pro tvorbu cap 0 (35-merní RNA, GTP, SAM).

Koncentrace enzymu 0,5 μM byla zvolena kvůli její dostatečné odezvě a vysokým nákladům na přípravu enzymu. Všechny reakce byly zastaveny přidáním kyseliny mravenčí, která denaturuje proteiny. Kvantifikace SAH v jednotlivých vzorcích probíhala na hmotnostním spektrometru s kvadrupólovým analyzátozem v MRM režimu.

Optimální koncentrace složek reakce je klíčová pro správné měření aktivity komplexu E1-E12. Z tohoto důvodu byly provedeny tři optimalizační experimenty pro tři hlavní substráty účastníci se reakce. U každé reakce byla měněna koncentrace jednoho substrátu, zatímco koncentrace ostatních dvou složek zůstaly konstantní. Jako kontrola byla zvolena také reakce bez enzymu. Tímto způsobem jsme určili optimální koncentrace 35-merní RNA, GTP a SAM.

Při optimalizaci vstupního množství RNA (obr. 16) se ukázalo, že aktivita enzymu prudce narůstá a následně s rostoucí koncentrací RNA pomalu klesá. Optimální koncentrace RNA se pohybovala v rozmezí 15-30 μM . Zajímavé je, že kontrola bez GTP vykazovala

vysokou aktivitu, která byla téměř identická při koncentraci 45 μM RNA. To naznačuje, že vazebné místo pro GpppN-RNA nemusí být specifické a dochází také k 2'-O-methylaci RNA. Tento závěr je podporován výsledky optimalizace GTP, kde aktivita zůstává téměř konstantní i při 0 μM GTP a jen velmi mírně se mění s koncentrací až 500 μM GTP. Maximální aktivita byla pozorována při koncentraci 250 μM GTP. Abychom předešli snížené aktivitě kvůli vyčerpání substrátu, byla zvolena koncentrace vyšší než 250 μM , konkrétně 400 μM GTP. Kontrola bez RNA ukazuje pomalý nárůst aktivity, přičemž výrazný skok nastává při 1000 μM GTP. To naznačuje, že E1 může methylovat také volnou GTP.

Poslední optimalizovanou složkou byl SAM. V tomto grafu (obr. 18) je vidět, že aktivita enzymu lineárně roste do koncentrace 30 μM SAM, poté nabírá tvar hyperboly. Maximální enzymatická aktivita byla dosažena při 60 μM SAM, kdy jsou všechna aktivní místa enzymu obsazena substrátem a reakce se řídí kinetikou nultého řádu. Pro naši práci jsme zvolili koncentraci 25 μM SAM, která je v polovině maximální enzymatické aktivity. Kontrola bez přídavku enzymu ukázala pouze nepatrné zvyšování aktivity, což je způsobeno vyšší koncentrací SAM a šumem v měření.

Při měření enzymatické aktivity (obr. 21) byly zahrnuty kontroly bez RNA a také samotná podjednotka E1. Byla odzkoušena i nižší koncentrace (0,1 μM) komplexu E1-E12. U koncentrace 0,5 μM E byla za hodinu při laboratorní teplotě (25 $^{\circ}\text{C}$) z 25 μM SAM proměněna pouze 0,98 μM . Enzymatická aktivita za těchto podmínek nebyla vysoká; vyšších hodnot bychom dosáhli při inkubaci při 37 $^{\circ}\text{C}$. Nicméně, při této teplotě by mohly být výsledky zkreslené, protože enzymatická inhibice SIN by nemusela probíhat správně.

Zjistili jsme, že koncentrace 0,5 μM enzymu je hraniční a při nižší koncentraci enzymatická reakce neprobíhá. Kontrola bez RNA potvrdila částečnou methylaci GTP, přičemž z 25 μM SAM se proměnilo pouze 0,23 μM . U podjednotky E1 byl zaznamenán překvapivý výsledek: ve všech triplikátech byly pozorovány vysoké koncentrace SAH. To naznačuje, že aktivita E1 je 3,5x vyšší než u komplexu E1-E12, přičemž se proměnilo až 3,7 μM SAM.

Naším hlavním cílem je hledání nových inhibitorů pro virové methyltransferázy. V této souvislosti jsme testovali inhibici čepičkujícího enzymu z MPXV nespecifickým inhibitorem MTase, sinefunginem (SIN). Byly zvoleny koncentrace 1 μM a 20 μM této látky. Inhibice byla významná nejen při vyšší koncentraci, ale i při 1 μM SIN, což vedlo k rozhodnutí dále prozkoumat efektivní dávku (EC_{50}).

Pro určení EC_{50} byla vytvořena desítková ředící řada v rozsahu 1×10^{-5} až 1 μM SIN. Inhibice dosáhla téměř minima. Z grafu (obr. 21) byla odvozena EC_{50} přibližně 1×10^{-3} μM pro 0,5 μM komplex E1-E12. Tato nízká koncentrace indikuje vysokou potenci inhibitoru.

V poslední části jsme se zaměřili na testování aktivity samotné podjednotky E1. Všechny vzorky byly kontrolní, zahrnující reakce bez GTP, bez RNA nebo s přídatkem 1 μM SIN. Z hodnot kalibrační křivky (tab. 18) a rovnice (obr. 23) nebylo možné definitivně určit finální koncentraci proměněného SAM. Podle naměřených hodnot (tab. 19) a porovnání s hodnotami v tabulce 18 je vidět, že SAM byl spotřebovaný ve všech reakcích. Avšak podle příslušné rovnice neprobíhala reakce pouze u kontroly bez GTP. U reakcí bez přídatku RNA a s 1 μM přídatkem SIN je pozorována zvýšená aktivita i přes hodnoty kalibrační křivky (Obr. 23). Podle rovnice se v reakci bez RNA proměnilo 0,13 μM SAM, což představuje 0,5 % z původního množství. Skutečnou spotřebu SAM lze pouze odhadovat, ale tento výsledek naznačuje metylaci volné GTP podjednotkou E1, jelikož se v dané reakci nenachází RNA jako další možný substrát. Měřením methylované GTP ve vzorkách na hmotnostním spektrometru bychom dokázali určit, zda se SAM skutečně spotřeboval na metylaci volné GTP. Doposud nejsou zaznamenána žádná studie, které by podpořili nebo vyvrátili tuto myšlenku. Při reakci s 1 μM SIN byla viditelná dvakrát vyšší aktivita než u reakce bez RNA. Navzdory přítomnosti inhibitoru, který při stejných podmínkách plně inhiboval komplex E1-E12, zde vidíme významnou aktivitu. Podle rovnice se proměnilo 0,66 μM SAM, což představuje 2,5 % z původního množství, avšak skutečná koncentrace SAH se může pohybovat pod 3 μM dle hodnot z tabulky 18. Pro potvrzení skutečných naměřených hodnot SAH by bylo potřeba zopakovat měření s novými připravenými vzorky pro stanovení kalibrační křivky a s užším rozsahem do 3 μM . Kontrola s 0,5 μM E1 a její původní měření potvrzují, že podjednotka E1 je sama o sobě aktivní.

Čepičkující enzymy z MPXV a VACV vykazují vysokou míru homologie, což vedlo k očekávání, že výsledky této práce budou podobné těm, které byly získány pro VACV, jakožto nejvíce prozkoumaného čepičkujícího enzymu. Nicméně, výsledky ukazují, že i přes téměř identickou katalytickou podjednotku (E1/D1) existují významné rozdíly. Podle Peña et al. (2007) je MTase aktivita D1 přibližně 40-50krát nižší než v komplexu s D1-D12. Naopak, naše výsledky ukazují, že samostatná podjednotka E1 je 3,5krát aktivnější než v komplexu E1-E12. To naznačuje, že E12 může mít spíše regulační roli ve virové replikaci než stimulovat MTase aktivitu. Podjednotka E1, která se jen málo liší od D1, vykazuje vyšší MTase aktivitu a nemusí být tolik stimulována. Naopak, vyšší aktivita E1 může znamenat, že E12 reguluje vznik cap-0. Heterodimér E1-E12 se pravděpodobně účastní regulace transkripce podobně jako komplex D1-D12. Pro hlubší pochopení tohoto mechanismu a rolí E1 a E12 by bylo nezbytné zkoumat jejich vliv ve viru jako celku.

7 Závěr

- **Cíle práce:** Všechny cíle této práce byly úspěšně splněny, včetně charakterizace jak dimerního komplexu E1-E12, tak i samotné podjednotky E1.
- **Příprava a purifikace proteinů:** Podjednotka E12 byla úspěšně připravena v expresním systému bakterií *E. coli* (E12_pKUMO). Komplikace spojené s přípravou velké podjednotky byly vyřešeny použitím hmyzích buněk z linie Sf9, kde byla dosažena značná exprese. Oba proteiny byly purifikovány afinitní chromatografií, přičemž pro E12 byla použita také gelová permeační chromatografie.
- **Studium enzymatické aktivity:** Pro studium *in vitro* MTase aktivity byly nejprve provedeny optimalizační reakce pro RNA, GTP a SAM. Míra aktivity komplexu E1-E12 byla změřena pomocí aktivních a inhibičních esejí. Byla rovněž identifikována substrátová nespecifičnost MTase domény. Stanovili jsme EC_{50} pro sinefungin a ověřili aktivitu podjednotky E1. Míra aktivity byla měřena pomocí hmotnostního spektrometru s kvadrupólovým analyzátozem v MRM režimu.
- **Význam výsledků:** Výsledky této práce ukázaly odchylky v čepičkujícím enzymu pozůstávajícího z proteinového komplexu E1-E12 MPXV oproti jiným virům z rodu Orthopoxviridae. Studium MTase domény proteinu E1 ukázal odlišnost v enzymatické aktivitě od homologních enzymů téhož typu. Tato skutečnost může napomoci v budoucím vývoji léku pro MPXV. Poznatky z této práce mohou přispět k dalšímu výzkumu a lepšímu pochopení virových mechanismů, které mají globální význam.

8 Seznam použité literatury

1. Ajmera, K., Goyal, L., Pandit, T., Pandit, R., *Monkeypox – An emerging pandemic*. ID Cases, 2022. **29**, ISSN: 2214-2509.
2. McCollum, M.A., Damon, I.K., *Human Monkeypox*. Clinical Infectious Diseases, 2014. **58**(2), ISSN: 1058-4838.
3. Basil, A., et al., *Genesis of Monkeypox*. Journal of Pure and Applied Microbiology 2022. **16**(suppl 1), ISSN: 3192-3197.
4. Dou, Y.-M., Yuan, H., Tian, H.-W., *Monkeypox virus: past and present*. World Journal of Pediatrics, 2023. **19**(3), ISSN: 1867-0687.
5. Silhan, J., et al., *Discovery and structural characterization of monkeypox virus methyltransferase VP39 inhibitors reveal similarities to SARS-CoV-2 nsp14 methyltransferase*. Nature Communications, 2023. **14**(1), ISSN: 2041-1723.
6. Ornelas, M.Y., et al., *Characterization, Directed Evolution, and Targeting of DNA Virus-Encoded RNA Capping Enzymes Using Phenotypic Yeast Platforms*. ACS Chemical Biology, 2023. **18**(8), ISSN: 1554-8929.
7. Kasprzyk, R., Jemielity, J., *Enzymatic Assays to Explore Viral mRNA Capping Machinery - Kasprzyk - 2021 - ChemBioChem - Wiley Online Library*. ChemBioChem, 2021. **22**(23), ISSN: 1439-7633.
8. Wang, D.-P., et al., *Crystal structure of mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase E12 subunit from monkeypox virus and discovery of its inhibitors*. International Journal of Biological Macromolecules, 2023. **253**(8), ISSN: 0141-8130.
9. Alakunle, E., Moens, U., Nchinda, G., Okeke, M.I., *Monkeypox Virus in Nigeria: Infection Biology, Epidemiology, and Evolution*. Viruses, 2020. **12**(11), ISSN: 1999-4915.

10. Likos, A.M., et al. *A tale of two clades: monkeypox viruses*. Microbiology Society, 2005. **86**(10), ISSN: 1465-2080.
11. Sale, T.A., Melski, J.W., Stratman, E.J., *Monkeypox: An epidemiologic and clinical comparison of African and US disease*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2006. **55**(3), ISSN: 1097-6787.
12. Karagoz, A., et al., *Monkeypox (mpox) virus: Classification, origin, transmission, genome organization, antiviral drugs, and molecular diagnosis*. Journal of Infection and Public Health, 2023. **16**(4), ISSN: 1876-0341.
13. Patiño, L.H., et al., *Phylogenetic landscape of Monkeypox Virus (MPV) during the early outbreak in New York City, 2022*. Emerging Microbes & Infections, 2023. **12**(1), ISSN: 2222-1751.
14. Zahmatyar, M., et al., *Human monkeypox: history, presentations, transmission, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention*. Frontiers in Medicine, 2023. **10**, ISSN: 2296-858X.
15. Venkatesan, P., *Monkeypox transmission—what we know so far*. The Lancet Respiratory Medicine, 2022. **10**(11), ISSN: 2213-2600.
16. Falendysz, E.A., et al., *Characterization of Monkeypox virus infection in African rope squirrels (*Funisciurus* sp.)*. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2017. **11**(8), ISSN: 1935-2735.
17. Plowright, R.K., et al., *Pathways to zoonotic spillover*. Nature Reviews Microbiology, 2017. **15**(8), ISSN: 1740-1534.
18. Riopelle, C.T., Munster, V.J., Port, J.R., *Atypical and Unique Transmission of Monkeypox Virus during the 2022 Outbreak: An Overview of the Current State of Knowledge*. Viruses, 2022. **14**(9), ISSN: 1999-4915.

19. Patauner, F., Gallo, R., Durante-Mangoni, E., *Monkeypox infection: An update for the practicing physician*. European Journal of Internal Medicine, 2022. **104**, ISSN: 0953-6205.
20. Qiu, Z.-Y., et al., *How to recognize and respond to monkeypox 2022 outbreak in non-endemic countries: a narrative review*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2022. **26**(22), ISSN: 8620-8630.
21. Aziz, A.A., Saleem, M., Wallach, S.L., Shah, S.M., *Evaluation of Monkeypox as an Unrecognized Sexually Transmitted Disease: A Rare Case of Monkeypox Infection with HIV and Syphilis Coinfection*. Cureus, 2023. **15**(7), ISSN: 2168-8184.
22. Farahat, R.A., et al., *Human monkeypox disease (MPX)*. Le Infezioni in Medicina, 2022. **30**(3), ISSN: 2532-8689.
23. Okyay, R.A., et al., *Another Epidemic in the Shadow of Covid 19 Pandemic: A Review of Monkeypox*. Eurasian Journal of Medicine and Oncology, 2022. **6**(2), ISSN: 2587-196X.
24. Stanford, M.M., McFadden, G., Karupiah, G., Chaudri, G., *Immunopathogenesis of poxvirus infections: forecasting the impending storm*. Immunology & Cell Biology, 2007. **85**(2), ISSN: 1440-1711.
25. Johnston, J.B., McFadden, G., *Poxvirus Immunomodulatory Strategies: Current Perspectives*. Journal of Virology, 2003. **77**(11), ISSN: 1098-5514.
26. Kumar, N., Acharya, A., Gendelman, H.E., Byrareddy, S.N., *The 2022 outbreak and the pathobiology of the monkeypox virus*. Journal of Autoimmunity, 2022. **131**, ISSN: 1095-9157.
27. Moss, B., *Poxvirus DNA Replication*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013. **5**(9), ISSN: 1943-0264.

28. Townsley, A.C., Moss, B., *Two Distinct Low-pH Steps Promote Entry of Vaccinia Virus*. Journal of Virology, 2007. **81**(16), ISSN: 1098-5514.
29. Schmidt, F.I., Bleck, C.K.E., Mercer, J., *Poxvirus host cell entry*. Current opinion in Virology, 2012. **2**(1), ISSN: 1879-6257.
30. Liu, L., Cooper, T., Howley, P.M., Hayball, J.D., *From Crescent to Mature Virion: Vaccinia Virus Assembly and Maturation*. Viruses, 2014. **6**(10), ISSN: 1999-4915.
31. Chen, N., et al., *Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin*. Virology, 2005. **340**(1), ISSN: 0042-6822.
32. Liszewski, M.K., et al., *Structure and Regulatory Profile of the Monkeypox Inhibitor of Complement: Comparison to Homologs in Vaccinia and Variola and Evidence for Dimer Formation I*. The Journal of Immunology, 2006. **176**(6), ISSN: 0022-1767.
33. Laliberte, J.P., Moss, B., *Lipid Membranes in Poxvirus Replication*. Viruses, 2010. **2**(4), ISSN: 1999-4915.
34. Herrero-Martínez, E., Roberts, K.L., Hollinshead, M., Smith, G.L., *Vaccinia virus intracellular enveloped virions move to the cell periphery on microtubules in the absence of the A36R protein*. Journal of General Virology, 2005. **86**(11), ISSN: 1465-2099.
35. Katsafanas, G.C., Moss, B., *Colocalization of Transcription and Translation within Cytoplasmic Poxvirus Factories Coordinates Viral Expression and Subjugates Host Functions*. Cell Host & Microbe, 2007. **2**(4), ISSN: 1931-3128.
36. Yang, Z., et al., *Expression Profiling of the Intermediate and Late Stages of Poxvirus Replication*. Journal of Virology, 2011. **85**(19), ISSN: 1096-0341.
37. Resch, W., et al., *Protein composition of the vaccinia virus mature virion*. Virology, 2007. **358**(1), ISSN: 1098-5514.

38. Marraha, F., et al., *Monkeypox 2022 Outbreak: How Alarming Is the Situation? Epidemiological and Clinical Review*. Clinics and Practics, 2023. **13**(1), ISSN: 2039-7283.
39. Gaurner, J., Rio, C., Malani, P., *Monkeypox in 2022—What Clinicians Need to Know*. JAMA, 2022. **328**(2), ISSN: 2574-3805.
40. Weaver, J.R., Isaacs, S.N., *Monkeypox virus and insights into its immunomodulatory proteins*. Immunological Reviews, 2008. **225**(1), ISSN: 1600-065X.
41. Ferdous, J., et al., *A review on monkeypox virus outbreak: New challenge for world*. ealth Science Reports, 2022. **6**(1), ISSN: 2398-8835.
42. Chaudari, S., et al., *The 2022 Monkeypox Epidemic and What Has Led to the Current State of the Disease in the US: A Systematic Review*. Cureus, 2023. **15**(1), ISSN: 2168-8184.
43. Damon, I.K., *Status of human monkeypox: clinical disease, epidemiology and research*. Vaccine, 2011. **29**, ISSN: 0264-410X.
44. Aldhaeefi M., et al., *2022 human monkeypox outbreak: Clinical review and management guidance*. American Journal of Health-System Pharmacy, 2022. **80**(2), ISSN: 1535-2900.
45. Aregger, M., Cowling, V.H., *Regulation of mRNA capping in the cell cycle*. RNA Biology, 2016. **14**(1), ISSN: 1555-8584.
46. Furuichi, Y., Furuichi, A.J., *Viral and cellular mRNA capping: Past and prospects*. Advances in Virus Research, 2000. **55**, ISSN: 0065-3527.
47. Ramanathan, A., Robb, G.B., Chan, S.-H., *mRNA capping: biological functions and applications*. Nucleic Acids Research, 2016. **44**(19), ISSN: 1362-4962.

48. Furuichi, Y., *Discovery of m⁷G-cap in eukaryotic mRNAs*. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 2015. **91**(8), ISSN: 1349-2896.
49. Muttach, F., Muthmann, N., Rentmeister, A., *Synthetic mRNA capping*. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2017. **13**(1), ISSN: 1860-5397.
50. Yamada-Okabe, T., et al., *Candida albicans gene for mRNA 5'-cap methyltransferase: identification of additional residues essential for catalysis*The GenBank accession numbers for the nucleotide sequence of CaABD1 and hMet are AB020965 and AB020966, respectively. Microbiology Society, 1999. **145**(11), ISSN: 2036-7481.
51. Devarkar, S.C., et al., *Structural basis for m⁷G recognition and 2'-O-methyl discrimination in capped RNAs by the innate immune receptor RIG-I*. PNAS, 2016. **113**(3), ISSN: 1091-6490.
52. Du, S., Liu, X., Cai, Q., *Viral-Mediated mRNA Degradation for Pathogenesis*. Biomedicines, 2018. **6**(4), ISSN: 2227-9059.
53. Hyde, J.L., Diamond, M.S., *Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2'-O-methylation*. Virology, 2015. **479-480**, ISSN: 1096-0341.
54. Decroly, E., Ferron, F., Lescar, J., Canard, B., *Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA*. Nature Reviews Microbiology, 2012. **10**(1), ISSN: 1740-1534.
55. Harwig, A., Landick, R., Berkhout, B., *The Battle of RNA Synthesis: Virus versus Host*. Viruses, 2017. **9**(10), ISSN: 1999-4915.
56. Chen, S., et al., *Viral RNA capping: Mechanisms and antiviral therapy*. Journal of Medical Virology, 2024. **96**(5), ISSN: 0146-6615.
57. Kyrieleis, O.J.P., et al., *Crystal Structure of Vaccinia Virus mRNA Capping Enzyme Provides Insights into the Mechanism and Evolution of the Capping Apparatus*. Structure, 2014. **22**(3), ISSN: 0969-2126.

58. Chen, A., et al., *Structural basis of the monkeypox virus mRNA cap N7 methyltransferase complex*. *Emerging Microbes & Infections*, 2024. **13**(1), ISSN: 2222-1751.
59. Wang, S.P., et al., *Phylogeny of mRNA capping enzymes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(18), ISSN: 1091-6490.
60. Kyrieleis, O.J.P., et al., *Crystal Structure of Vaccinia Virus mRNA Capping Enzyme Provides Insights into the Mechanism and Evolution of the Capping Apparatus*. *Structure*, 2014. **22**(3), ISSN: 0969-2126.
61. Wang, D.-P. et al., *Crystal structure of mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase E12 subunit from monkeypox virus and discovery of its inhibitors*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023. **253**(8), ISSN: 0141-8130.
62. Peña, M., Kyrieleis, O.J.P., Cusack, S., *Structural insights into the mechanism and evolution of the vaccinia virus mRNA cap N7 methyl-transferase*. *The EMBO Journal*, 2007. **26**(23), ISSN: 1460-2075.
63. Vos, J.C., Saker, M., Stunnenberg, H.G., *Vaccinia virus capping enzyme is a transcription initiation factor*. *The EMBO Journal*, 1991. **10**(9), ISSN: 1460-2075.
64. Silhan, J., et al., *Discovery and structural characterization of monkeypox virus methyltransferase VP39 inhibitors reveal similarities to SARS-CoV-2 nsp14 methyltransferase*. *Nature Communications*, 2023. **14**(2259), ISSN: 2041-1723.
65. Owolabi, A., *Kenya Detects First Mpox Case at Border*. *The Africa Daily Post*. Srpen, 1, 2024. URL: <https://theafricadaily.com/317109/health/kenya-detects-first-mpox-case-at-border/>.