

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Tereza Tomanová

Analýza protilátkové odpovědi u BK virové infekce
Analysis of antibody response during BK virus infection

Diplomová práce

Praha 2019

Školitel: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Alžběta Hejtmánková

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

V Praze, dne 29.4.2019

Tereza Tomanová

Abstrakt

BK virus je lidský polyomavirus s vysokou prevalencí v populaci. Obvykle je pro svého hostitele neškodný, komplikace působí při imunosupresi, často při transplantacích ledvin, jelikož perzistuje v epiteliálních buňkách ledvin. Existují čtyři subtypy BK viru a zdá se, že je důležité identifikovat, na jaký subtyp je dárce a příjemce ledviny pozitivní. Takové určení subtypově specifických protilátek pomocí jednoduchého testu by mohlo pomoci s eliminací komplikací po transplantaci ledvin. Při předchozím výzkumu byl vytvořen návrh ELISA testu, který by mohl sérologicky rozlišit hlavní BK virové subtypy (I a IV), ale jeho vývoj je komplikován tím, že mezi jednotlivými subtypy BK viru a protilátkami dochází ke křížové reaktivitě. Klíčem k úspěchu může být modifikace antigenu používaného pro ELISA test. Proto bylo cílem této diplomové práce zmapovat významná místa kapsidového VP1 proteinu BK viru, konkrétně ve smyčkách EF a DE, která by se mohla podílet na interakci s protilátkami. Toho bylo dosaženo cílenou mutagenezí v genu pro VP1, v oblasti EF smyčky nebo DE smyčky, kde došlo k záměně nukleotidů pro dvě povrchové aminokyseliny, ve kterých se liší sekvence subtypu I a IV. Výsledkem byl gen pro VP1 subtypu IV mutovaný tak, že sekvence v oblasti EF smyčky byla shodná se sekvencí VP1 subtypu I. Stejný postup byl proveden i pro oblast DE smyčky. Takto připravené mutanty byly použity pro produkci mutantních pseudovirionů v savčím expresním systému. Byly otestovány dva způsoby izolace pseudovirionů, z nichž nejlepší výsledky přinesla izolace v dvouvrstvém gradientu chloridu cesného, které předchází narušení buněk vytřepáváním pomocí tetrachloroethylenu. Mutantní DE pseudoviriony na ELISA testu reagovaly stejně, jako nemutované BKV IV částice. Pseudoviriony s mutací v EF smyčce téměř vůbec nereagovaly s žádnou z testovaných protilátek. Kromě ELISA testu byl otestován ještě hemaglutinačně inhibiční test. Bylo zjištěno, že při použití morčecích krvinek o koncentraci 0,5 % a při kyselém pH lze při vyšším ředění hyperimunizovaných králíčích sér odlišit reaktivitu protilátek proti subtypu I a IV. Efekt ještě umocňuje inaktivace séra pomocí neuraminidázy nebo pomocí jodistanu draselného s trypsinem. Pro rozlišení reaktivity lidských sér se hemaglutinačně inhibiční test ukázal jako nedostačující. Pro vývoj diagnostického testu a případně návrh antigenu, který by dokázal spolehlivě rozlišit jednotlivé subtypy bude potřeba další testování. I tak tento projekt představuje významný přínos pro další diagnostický vývoj sérologického průkazu subtypů BK viru.

Klíčová slova: polyomaviry, BK virus, subtypově specifické protilátky, virům podobné částice, pseudoviriony

Abstract

BK virus is a human polyomavirus which is highly prevalent in the population. The virus is usually not very dangerous to its host, but it may cause complications in immunosuppressed patients. These complications commonly appear after kidney transplantation because BK virus persists in kidney epithelial cells. There are four subtypes of BK virus and it might be clinically important to screen for the identity of subtypes in matched pairs of donors and recipients of the kidney. This determination of the subtype specific antibodies by simple test could help to manage complications after the surgery. During previous project the ELISA test that could serologically differentiate between two main BK virus subtypes (I and IV) was designed, but its development is complicated by the fact that there is a strong cross-reactivity between the BK virus subtypes and antibodies. The modification of antigen towards better specificity might be required to succeed. Consequently, the main aim of this diploma thesis was to map important spots of major capsid protein VP1 of BK virus, particularly in EF and DE loops, which could participate in binding of antibodies. This aim was addressed by targeted mutagenesis of the gene coding VP1 protein in the region of the respective loop. Nucleotides coding two surface aminoacids which differ between subtype I and IV of BK virus were changed in the EF loop region. We gained gene for VP1 protein of subtype IV which was mutated in the EF loop region in a way that the sequence of the EF loop was identical with the sequence of subtype I. The same process was applied for the DE loop region as well. Mutants prepared this way were produced in form of mutant pseudovirions in mammalian expression system. Two types of isolation protocols for pseudovirions were tested and the best results were obtained using isolation in two-layered gradient of cesium chloride with disruption of cells using tetrachloroethylene before the isolation itself. The mutant DE pseudovirions were reacting the same way as non-mutated BKV IV pseudovirions. Pseudovirions containing mutation in EF loop did not react with any of tested antibodies. Besides ELISA, hemagglutination inhibition test was used. It was found that guinea pig erythrocytes diluted to 0,5% in acidic pH enable us to distinguish subtype specific seroreactivity using rabbit hyperimmunized sera. The effect is even stronger while using neuraminidase or potassium periodate with trypsin for inactivation of the sera. Distinguishing subtype specific seroreactivity was insufficient in human sera. More experiments are surely needed for developing diagnostic test or an antigen that could distinguish between particular subtypes. Still, this project represents a meaningful contribution for further development of BK virus subtype specific serological diagnostics.

Key words: polyomaviruses, BK virus, subtype specific antibodies, virus-like particles, pseudovirions

Ráda bych poděkovala všem, bez kterých by tato práce nevznikla. Moc děkuji vedoucí mé diplomové práce doktorce Haně Španielové za trpělivost, vstřícný přístup a řadu důležitých rad a zkušeností. Děkuji magistře Alžbětě Hejtmánkové, která se mnou měla obrovskou trpělivost při zaučování v laboratoři, poskytla mi řadu materiálů a věnovala mi spoustu času. Paní docentce Forstové děkuji za přijetí do laboratoře. Také děkuji všem, kteří se podíleli na přípravě materiálů použitých v této práci a kolegům z Vidia s r.o. za poskytnutí precharakterizovaných sér. Děkuji všem kolegům z laboratoře za zpříjemnění pracovních dnů, jmenovitě především magistře Janě Váňové, která je nepostradatelná nejen pro chod laboratoře, ale i jako zdroj dobré nálady. Na závěr děkuji mojí mamince za podporu a zázemí a také Michalu Šveigrovi za podporu a pomoc při řešení technických problémů.

Obsah

Seznam obrázků

Seznam zkratk

1	Úvod	8
2	Literární přehled	10
2.1	BK virus	10
2.1.1	BKV patogeneze a rizika spojená se vznikem BKVAN	11
2.1.2	Subtypy BK viru	12
2.2	Interakce polyomavirů s protilátkami	14
2.3	Sérodiagnostika BK viru	18
2.3.1	Sérologické testy	18
2.3.2	Typy antigenů	23
3	Hypotézy a cíle	26
4	Materiál a metody	28
4.1	Materiál	28
4.1.1	Primární protilátky a séra	28
4.1.2	Sekundární protilátky	29
4.1.3	Viry a virům podobné částice	29
4.1.4	Roztoky a chemikálie	30
4.1.5	Markery molekulových vah	32
4.1.6	Komerční soupravy	34
4.1.7	Software	34
4.1.8	Přístroje	34
4.1.9	Enzymy	37
4.1.10	Primery pro PCR	37
4.1.11	Vektory	38
4.1.12	Buněčné linie	38
4.1.13	Expresní systémy	39
4.1.14	Kultivační média	40
4.1.15	Antibiotika	40
4.1.16	Bakteriální kmeny	41
4.1.17	Agarové plotny	41
4.1.18	Mikrotitrační destičky	41
4.2	Metody	42
4.2.1	Sterilizace	42
4.2.2	Příprava ddH ₂ O	42
4.2.3	Práce s bakteriálními kulturami	42
4.2.4	Práce s DNA	43
4.2.5	Práce s tkáňovými kulturami	47
4.2.6	Pasážování hmyzích buněk Sf9	48
4.2.7	Práce s proteiny	48
4.2.8	Sérologické testy	53
5	Výsledky	57
5.1	Izolace plazmidů pro produkci částic	59
5.2	Mutageneze	60
5.3	Izolace částic	66
5.4	Sérologické testování připravených částic	74
5.4.1	Hemaglutinace s VLPs	74
5.4.2	Hemaglutinace s PsVs	76
5.4.3	Hemaglutinačně inhibiční test s VLPs	77
5.4.4	ELISA	83

6	Diskuze	101
7	Závěr	110
	Literatura	112
A	Přílohy	121

Seznam obrázků

2.1	Kapsida BK viru	10
2.2	Smyčky VP1 proteinu	12
2.3	Sekvenční alignment VP1 proteinu subtypů BKV	13
2.4	Schéma ELISA testu	19
2.5	Schéma hemaglutinačně inhibičního testu	21
4.1	Marker používaný pro DNA elektroforézu	32
4.2	Marker používaný pro DNA elektroforézu	33
5.1	Smyčky EF a DE VP1 proteinu BKV	58
5.2	Zjednodušená mapa plazmidu pBKV-IV-VP1	59
5.3	Restrikční štěpení plazmidů enzymem NaeI	60
5.4	Restrikční štěpení plazmidů enzymem NaeI	61
5.5	Kontrola neštěpených plazmidů	62
5.6	Kontrola délky plazmidů s DE mutací	62
5.7	Restrikční štěpení plazmidů	63
5.8	Pokus o překlonování DE mutace	64
5.9	Colony PCR	65
5.10	Restrikční štěpení plazmidů po Colony PCR	66
5.11	Izolace VLPs	67
5.12	Fotografie VLPs I a VLPs IV	68
5.13	Fotografie PsVs izolovaných pomocí OptiCs metody	69
5.14	Membrána po Western Blottu	69
5.15	Izolace PsVs v douvrstvě gradientu CsCl	70
5.16	Izolace PsVs v douvrstvě gradientu CsCl	70
5.17	Izolace PsVs v douvrstvě gradientu CsCl	71
5.18	Izolace PsVs v douvrstvě gradientu CsCl	72
5.19	Hemaglutinace na ledu	74
5.20	Hemaglutinace v různých pH s různými krvinkami	75
5.21	Hemaglutinace v kyselém pH	76
5.22	Hemaglutinace s PsVs	77
5.23	HIA s lidskými krvinkami a králičími séry	78
5.24	HIA s morčecími krvinkami a králičími séry	79
5.25	HIA s králičími séry	80
5.26	HIA s lidskými séry (sérum M30)	80
5.27	HIA s různými způsoby inaktivace sér s VLPs I	82
5.28	HIA s různými způsoby inaktivace sér s VLPs IV	82
5.29	Titrační křivka králičích sér s antigeny VLPs I a VLPs IV	85
5.30	Titrační křivka lidských sér s antigeny VLPs I a IV	87
5.31	Testování v kyselém pH	88
5.32	Testování v zásaditém pH	89
5.33	Testování kratší inkubace antigenu se sérem	90
5.34	Testování promývacího kroku s 6M močovinou	91
5.35	Vybraná lidská séra v ředění 1:100	93
5.36	Různé ředění sekundární protilátky	93

5.37	Různé způsoby blokování	94
5.38	Titrační křivka lidských IgG	96
5.39	Stanovení množství antigenu	97
5.40	Titrační křivky vybraných lidských sér se všemi typy PsVs	98
5.41	Testování všech typů antigenů s králičími séry	99
5.42	Titrační křivky králičích sér s PsVs	99
5.43	Testování myší monoklonální protilátky proti BKV I s PsVs	100
A.1	Pentamer VP1 proteinu BKV s vyznačenými rozdílnými aminokyselina- selinami mezi subtypem I a IV v EF a DE smyčce	121
A.2	Mapa plazmidu nesoucího gen pro VP1 protein subtypu BKV IV	122
A.3	Mapa plazmidu nesoucího gen pro VP1 a VP2 proteiny subtypu BKV IV	123
A.4	Poster prezentovaný na virologické konferenci v Bratislavě v únoru 2019	124

Seznam zkratek

BKV	BK virus
BKVAN	nefropatie asociovaná s BK virem
bp	pár bazí nukleové kyseliny
BSA	hovězí sérový albumin
cPCR	PCR bakteriálních kolonií
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
GFP	zelený fluorescenční protein
GST	glutathion S-transferáza
HA	hemaglutinace
HBV	virus hepatitidy B
HIA	hemaglutinačně inhibiční test
IgG	imunoglobuliny typu G
IgM	imunoglobuliny typu M
JCV	JC virus
mAbs	monoklonální protilátky
MCPyV	lidský polyomavirus Merkelových buněk
MPyV	myší polyomavirus
NAbs	neutralizační protilátky
PsVs	pseudoviriony
rpm	rotate per minute
SV40	opičí polyomavirus
VLPs	viru podobné částice
VNT	virus-neutralizační test

1. Úvod

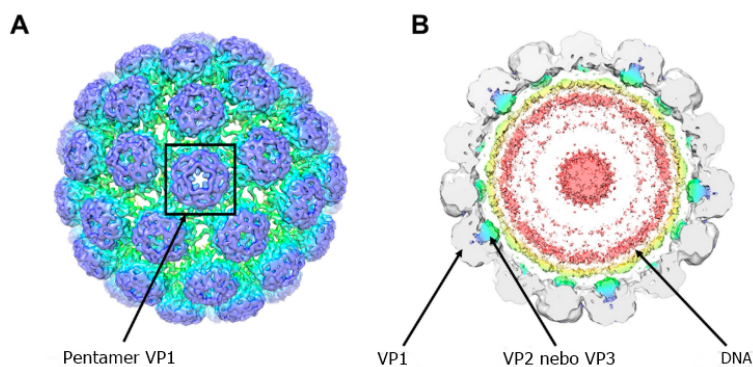
BK virus patří mezi polyomaviry, což jsou neobalené DNA viry, s genomem v podobě dvouvláknové DNA dlouhé okolo 5 000 bp. Mají ikosahedrální kapsidu složenou z majoritního kapsidového proteinu VP1 a minoritních proteinů VP2 a VP3. BK virus je lidský virus s vysokou prevalencí v populaci, který hostitele infikuje často již v dětském věku, a po obvykle bezpříznakové primární infekci následuje persistentní infekce epiteliálních buněk ledvin. Existují čtyři subtypy BK viru identifikované na základě sekvence proteinu VP1. Problémy představuje BK virus pro imunosuprimované pacienty, především po transplantacích ledvin. Za takových podmínek může docházet k reaktivaci viru a následným komplikacím například v podobě nefropatií. Tyto komplikace jsou následkem nedostatečné odpovědi neutralizačních protilátek. V současné době není k dispozici žádná léčba, jediným způsobem ochrany pacientů před rozvojem nefropatií způsobených BK virem, často vedoucím ke ztrátě štěpu, je snížení dávky imunosupresivních léčiv. S tím se ale pojí další rizika, například vznik dárcovsky specifických protilátek mířených proti štěpu a následné odmítnutí štěpu. Možné řešení představuje identifikace příjemců, kteří mají vyšší riziko vzniku nefropatie po transplantaci, případně párování dárců a příjemců již před transplantací. Pacienti s vyšším rizikem pak mohou být důkladněji monitorováni, případně jim může být upravena dávka imunosuprese přesně na míru. Průkaz přítomnosti BK viru se provádí ověřením přítomnosti virové DNA v krvi nebo moči a tímto způsobem lze odlišit i jednotlivé subtypy. Obvykle je ale množství kopií virové DNA nízké a zvyšuje se až ve chvíli, kdy je pacient imunosuprimovaný, proto je tento způsob diagnostiky nedostačující. Vhodnějším nástrojem pro určení prediktivního znaku rozvoje nefropatií po transplantaci je sérologická diagnostika. Ta prokáže, jaké protilátky a proti jakému subtypu daný pacient má. Průkaz subtypově specifických protilátek je důležitý proto, že protilátky mířené proti jednomu subtypu nejsou schopny efektivně neutralizovat infekci jiným subtypem. Nyní je hladinu subtypově specifických neutralizačních protilátek možné určit pouze pomocí virus-neutralizačního testu, který ale vzhledem k časové a technické složitosti

provedení není vhodný pro běžnou klinickou praxi. Jako skvělá alternativa se jeví metoda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), která má ale v sérodiagnostice mnoho úskalí, například křížová reaktivita jednotlivých subtypů, která ztěžuje jasnou interpretaci. Tato diplomová práce se zaměřuje na sérodiagnostiku pomocí ELISA testu. Snahou bylo odstranit limitace ELISA testu tak, aby bylo možné jednoduše a spolehlivě rozhodnout o subtypové séropozitivitě pacienta.

2. Literární přehled

2.1 BK virus

Polyomaviry jsou neobalené viry napadající hlavně savce a ptáky, s genomem v podobě dvouvláknové DNA dlouhé obvykle kolem 5 000 párů bazí. Genom chrání ikosahedrální kapsida (Obr.2.1), složená z majoritního kapsidového proteinu VP1 a minoritních kapsidových proteinů VP2 a VP3. Zástupci polyomavirů jsou například myší polyomavirus (MPyV) a opičí polyomavirus (SV40), které slouží jako modelové viry pro studium polyomavirů. Zatím bylo identifikováno 13 polyomavirů napadajících člověka, mezi nejznámější z lidských polyomavirů patří JC virus (JCV), polyomavirus Merkelových buněk (MCPyV) a BK virus (BKV) (shrnutí v Gheit et al. (2017)).



Obrázek 2.1: Kapsida BK viru

Kapsida BK viru tvořená ze 72 pentamerů VP1 proteinu. Uvnitř každého pentameru je minoritní protein VP2 nebo VP3. Upraveno podle Helle et al. (2017).

BK virus ustavuje ve svém hostiteli asymptomatickou persistentní infekci epitelálních buněk ledvin a močového traktu. K primoinfekci dochází obvykle během dětského věku (Jin, Gibson, Booth & Clewley 1993), mezi sedmým až devátým rokem života dosahuje séroprevalence svého maxima a to sice 98 % (Stolt et al. 2003). Sérorevalence je obecně v populaci velmi vysoká, podle studie provedené Šroller et al. (2014) v České republice byla séroprevalence 79,8 %.

2.1.1 BKV patogeneze a rizika spojená se vznikem BKVAN

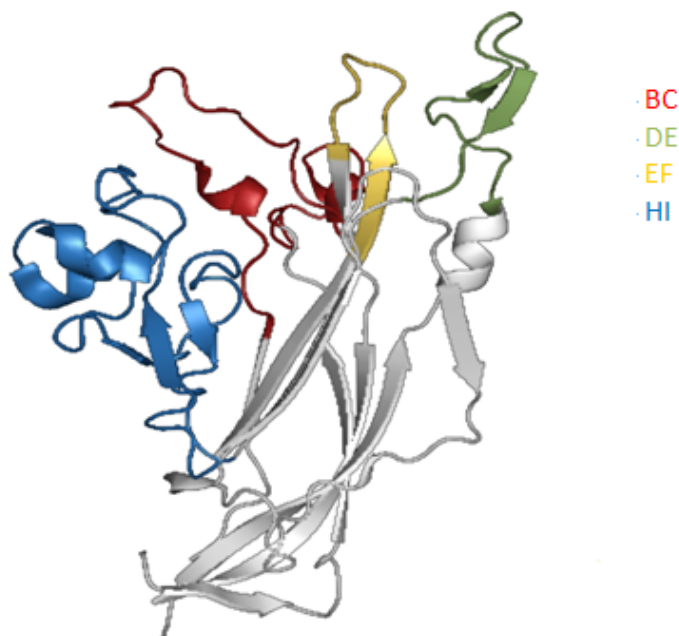
Největší riziko představuje BK virus pro imunosuprimované jedince, konkrétně pro pacienty po transplantaci ledvin. Nefropatie spojené s BK virovou infekcí jsou druhou nejčastější příčinou poškození štěpu po transplantaci. BK virémie se po transplantaci objeví u přibližně 20 % příjemců ledviny (Abend et al. 2017). Neexistuje žádná cílená léčba, jediným způsobem prevence nefropatií je včasná diagnóza, poté je možné snížit míru imunosuprese u pacientů s podezřením na probíhající BK virovou infekci (Sood et al. 2012). Snížení dávky léků podávaných na imunosupresi sice může usnadnit eliminaci BKV, ale zároveň zvyšuje riziko odmítnutí štěpu. V současné době se provádí detekce virové DNA v moči nebo v krevní plazmě, případně se zjišťuje hladina protilátek v krvi. Právě rozdíl mezi hladinou protilátek u dárce a příjemce ledviny hraje důležitou roli z hlediska vzniku a průběhu infekce po transplantaci. Předpokládá se, že určení hladiny neutralizačních protilátek u dárce i příjemce ještě před transplantací by mohlo být indikátorem následného zvýšeného rizika možných komplikací, kterým by se dalo buď zcela předcházet párováním dárců a příjemců na základě jejich neutralizačního sérostatusu, případně alespoň vytipovat páry s vysokým rizikem vývoje BK infekce a ty po transplantaci intenzivněji monitorovat, případně přijít s léčebnými strategiemi na míru přímo pro daný pár dárce a příjemce (Abend et al. 2017). Nefropatie asociovaná s BKV (BKVAN) způsobuje u příjemců ledviny dysfunkce až ztrátu štěpu, a to obvykle v prvních dvou letech po transplantaci ledviny. Za pacienty s vyšším rizikem vývoje BKVAN se označují ti, kteří mají ve krevním séru více než 10 000 kopií virového genomu/ml (Hirsch et al. (2002), Korth et al. (2019)). Riziko pro rozvoj BKVAN představuje podávání imunosupresivních léčiv při transplantaci. K vývoji BKVAN dojde u 1-10 % příjemců ledviny, hlavně během prvních dvou let po transplantaci a u více než 50 % z nich vede ke ztrátě štěpu (shrnuto v Kuypers (2012), Korth et al. (2019)). Pro příjemce je tedy v případě detekce většího počtu kopií virového genomu v krvi možnost redukce imunosuprese s cílem snížení replikace virové DNA a tím zabránění rozvoje BKVAN. Tento způsob ale není dostačující pro úplnou eliminaci BKVAN a navíc

zvyšuje riziko vzniku *de novo* dárcovsky specifických protilátek, tedy protilátek příjemce mířených proti lidským leukocytárním antigenům (HLA) endotelu štěpu. Jejich vznik je spojen s rizikem ztráty štěpu (Willicombe et al. 2012).

2.1.2 Subtypy BK viru

Kapsida BK viru je ikosahedrální a je tvořena 72 pentamery majoritního kapsidového proteinu VP1. Každý pentamer uvnitř obsahuje monomer minoritního kapsidového proteinu VP2 nebo VP3. Sekvence VP3 je shodná se sekvencí VP2, pouze je na N-konci o 119 aminokyselin kratší. VP1 protein má strukturní funkci a představuje hlavní antigen rozpoznávaný protilátkami. VP1 protein obsahuje čtyři smyčky, BC, EF, DE a HI (Obr. 2.2) (Stehle & Harrison 1996). Gen pro VP1 protein je dlouhý 1 089 bp a kóduje 362 aminokyselin (Jin, Gibson, Booth & Clewley 1993).

Smyčky VP1 proteinu



Obrázek 2.2: Smyčky VP1 proteinu

Vytvořila Alžběta Hejtmánková v programu Pymol na základě Stehle & Harrison (1996).

Předpokládá se, že s receptory interaguje hlavně BC a DE smyčka (Stehle & Harrison (1996), Caruso et al. (2003)). Na základě odlišností nukleotidové sekvence VP1 proteinu byly identifikovány čtyři genotypy BK viru (Obr. 2.3), označovány jako I, II, III a IV (ve starší literatuře se můžeme setkat s názvy BKV prototyp (nyní BKV I), BKV SB (= BKV II), BKV AS (= BKV III) a BKV IV)) (Jin, Gibson, Knowles & Clewley 1993).

```

Smyčky                                     < BC
BKV-I  MAPTKRKGECPGAAPKKPKPEVQVPKLUKGGVEVLEVKTGVD AITEVECFLNPEMGD PD
BKV-II  MAPTKRKGECPGAAPKKPKPEVQVPKLLIKGGVEVLEVKTGVD AITEVECFLNPEMGD PD
BKV-III MAPTKRKGECPGAAPKKPKPEVQVPKLLIKGGVEVLEVKTGVD AITEVECFLNPEMGD PD
BKV-IV  MAPTKRKGECPGAAPKKPKPEVQVPKLUKGGVEVLEVKTGVD AITEVECFLNPEMGD PD

Smyčky          BC                               >
BKV-I  ENLRGFS LKLSAENDFSSD SPERKMLPCYSTARIP LPNLNEDLTCGNLLMWEAVTVQTEV
BKV-II  DNLRGYS LKLAENAFDSDSPDKMLPCYSTARIP LPNLNEDLTCGNLLMWEAVTVKTEV
BKV-III DNLRGYS QJLSAENAFDSDSPDRKMLPCYSTARIP LPNLNEDLTCGNLLMWEAVTVKTEV
BKV-IV  NDLRGYS LRLTAETA FDSDSPDRKMLPCYSTARIP LPNLNEDLTCGNLLMWEAVTVKTEV

Smyčky          < DE                               >          < EF
BKV-I  IGITSM LN LHAGSQKVHEHGGGKPIQGSNFHFFAVGGDPLEMQGVL MNRYTKYPDGTITP
BKV-II  IGITSM LN LHAGSQKVHENG GGGKPVQGSNFHFFAVGGDPLEMQGVL MNRYTKYPOGTTIP
BKV-III IGITSM LN LHAGSQKVHENG GGGKPVQGSNFHFFAVGGDPLEMQGVL MNRYTKYPOGTTIP
BKV-IV  IGITSM LN LHAGSQKVHEHGGGKPIQGSNFHFFAVGGDPLEMQGVL MNRYTKYPEGTVTP

Smyčky          EF                               >
BKV-I  KNPTAQSQVMNTD HKAYLDKNNAYPVECWV PDP SRNENTRYFGTFTGGENVPPVLHVNTNT
BKV-II  KNPTAQSQVMNTD HKAYLDKNNAYPVECWIPDP SRNENTRYFGTYTGGENVPPVLHVNTNT
BKV-III KNPTAQSQVMNTD HKAYLDKNNAYPVECWIPDP SRNENTRYFGTYTGGENVPPVLHVNTNT
BKV-IV  KNPTAQSQVMNTD HKAYLDKNNAYPVECWIPDP SKNENTRYFGTYTGGENVPPVLHVNTNT

Smyčky          < HI >
BKV-I  ATTVLLDEQGVG PLCKADSLYVSAADICGLFTNSSGTQQWRGLARYFKIRLRKRSVKNPY
BKV-II  ATTVLLDEQGVG PLCKADSLYVSAADICGLFTNSSGTQQWRGLARYFKIRLRKRSVKNPY
BKV-III ATTVLLDEQGVG PLCKADSLYVSAADICGLFTNSSGTQQWRGLARYFKIRLRKRSVKNPY
BKV-IV  ATTVLLDEQGVG PLCKADSLYVSAADICGLFTNSSGTQQWRGLPRYFKIRLRKRSVKNPY

Smyčky
BKV-I  PISFLSDLINRR TQKVDGQPMYGMESQVEEVRVFDGTERLP GDDMIRYIDKQGQLQTK
BKV-II  PISFLSDLINRR TQKVDGQPMYGMESQVEEVRVFDGTEQLPGD PDMIRYIDRQGQLQTK
BKV-III PISFLSDLINRR TQKVDGQPMYGMESQVEEVRVFDGTEQLPGD PDMIRYIDRQGQLQTK
BKV-IV  PISFLSDLINRR TQKVDGQPMYGMESQVEEVRVFDGTEQLPGD PDMIRYIDRQGQLQTK

```

Obrázek 2.3: Sekvenční alignment VP1 proteinu subtypů BKV

Červeně jsou vyznačené aminokyseliny v povrchových smyčkách rozdílné mezi jednotlivými subtypy. GenBank Accession numbers - BKV-I: NC-001538, BKV-II: CAA79596.1, BKV-III: AAA46882.1 a BKV-IV: BAG84476

Obecně je v populaci nejběžnější genotyp I (60 %), druhý nejčtenější potom genotyp IV (30 %). Prevalence genotypů II a III je pod 10 %; genotyp II je většinou nacházen u pacientů po transplantaci kostní dřeně nebo krevní transfúzi, genotyp III potom u těhotných žen (Jin, Gibson, Booth & Clewley (1993), Krautkrämer et al. (2009)). Fylogenetická analýza sekvence VP1 proteinu umožnila rozdělení genotypů I a IV na subtypy Ia, Ib1, Ib2, Ic a IVa1, IVa2, IVb1,

IVb2, IVc1 a IVc2, přičemž pro evropskou a americkou populaci jsou typické subtyp IVc2 a Ib2 (Nishimoto et al. (2007), Zhong et al. (2009)). V této diplomové práci jsou pro veškeré experimenty používány zástupci nejhojněji se vyskytujících genotypů I a IV, konkrétně subtypy Ia (BKV I) a IVc2 (BKV IV), typické pro evropskou populaci.

Ve studii provedené Korth et al. (2019) zaznamenali, že se BKVAN během 2 let po transplantaci vyskytla častěji u příjemců pozitivních na subtyp II a IV (určeno pomocí PCR) než u pacientů pozitivních na subtyp I, tedy nejběžnější subtyp. Výsledky mohly být ovlivněné nižším počtem pacientů pozitivních na subtyp II a IV (dohromady bylo na BKV II a IV pozitivních 10 pacientů, z toho u 8 došlo k rozvoji BKVAN). Na subtyp I bylo pozitivních 46 pacientů a u 17 z nich došlo k rozvoji BKVAN. Subtyp III nebyl do studie zahrnut, jelikož žádný z pacientů účastnících se studie nebyl na tento subtyp pozitivní. I tak výsledky naznačují, že patogenese subtypů s menší prevalencí je závažnější, než patogenese nejčetnějšího subtypu I. Potvrzují to i výsledky experimentu *in vitro* na Vero buňkách infikovaných buď BKV I nebo BKV IV. Míra replikace virové DNA obou subtypů byla stejná, přesto se u buněk infikovaných subtypem IV projevil horší cytopatický efekt než u buněk infikovaných BKV I (Tremolada et al. 2010).

2.2 Interakce polyomavirů s protilátkami

BK virus se prostřednictvím svých kapsidových proteinů váže na buněčné receptory, což jsou gangliosidy typu b, které obsahují alfa-2,8-disialovou kyselinu. Konkrétně jako receptor pro BKV mohou sloužit gangliosidy GD3, GD2, GD1b a GT1b. Kyselina sialová je nezbytná pro přichycení BK viru na povrch buňky. (Neu et al. 2013). Po vstupu viru do buňky a primoinfekci, často asymptomatické, je ustavena persistentní infekce. Replikace viru probíhá ve snížené míře, jelikož imunitní systém je schopen udržet virovou replikaci pod kontrolou. Jakmile je imunitní systém oslaben, dojde k reaktivaci viru, začne se ve zvýšené míře replikovat a následně může dojít k rozvoji problémů způsobených virem. Proti BK viru účinkuje jak buněčná, tak i protilátková imunitní odpověď. Při transplantaci je ale funkce buněčné imunity umírněna imunopresí a proto při ní získává na

důležitosti imunitní odpověď zajištěná neutralizačními protilátkami (NAbs) (Solis et al. 2018). NAbs představují imunoglobuliny typu G (IgG) a jsou schopny neutralizovat působení viru. Jeden z nejběžnějších mechanismů neutralizace je, že se protilátky naváží na epitopy kapsidy viru, které umožňují přichycení viru na buněčný receptor. Vazba protilátek na epitopy viru blokuje interakci s buněčným receptorem a tím pádem i vstup viru do buňky (Pastrana et al. 2013). NAbs mířené proti BKV kapsidě byly poprvé zmíněny ve studii týmu Flaegstad et al. (1986), který zjistil, že titr NAbs koreluje s hemaglutinačním titrem protilátek.

Každý zmíněný subtyp vyvolává specifickou protilátkovou odpověď a tím vzniká sérotyp specifický pro daný subtyp (Pastrana et al. 2013). Takový sérotyp představují neutralizační protilátky specifické pro ten subtyp, kterým byl pacient infikován. Jelikož se ale jednotlivé subtypy mezi sebou často liší pouze v řádu jednotek aminokyselin, dochází často ke křížové reaktivitě protilátek s jednotlivými subtypy, především pak v rámci subtypů I a IV (Wunderink et al. 2019). Bylo ale zjištěno, že všechny subtypy genotypu IV patří k jednomu sérotypu, zatímco jednotlivé subtypy I představují více sérotypů. Subtyp Ic a Ib2 sice patří také ke stejnému sérotypu, ale Ib1 a Ib2, jejichž sekvence se od sebe liší jen o pět aminokyselin, představují odlišné sérotypy (Pastrana et al. 2013). Párování dárců a příjemců na základě jejich neutralizačního sérostatusu se jeví jako slibný způsob prevence potransplantačních komplikací způsobených BK virem. Důležitým markerem se jeví především sérostatus dárce. Sérostatus příjemce podle Abend et al. (2017) nemá zas tak velký vliv na potransplantační komplikace. Vysvětlením může být to, že skrz vnášený štěp se do těla příjemce orgánu dostává velké množství virových partikulí a vzhledem k tomu, že je příjemce imunosuprimovaný, jeho neutralizační protilátky nestačí efektivně zareagovat. Vysoká hladina neutralizačních protilátek znamená, že protilátky zvládnou úspěšně neutralizovat *de novo* infekci BK virem při transplantaci skrz vnášený štěp. Bylo dokázáno, že neutralizační protilátky mají významný vliv na průběh chronických virových onemocnění způsobených například virem hepatitidy C u pacientů po transplantaci jater (Fafi-Kremer et al. 2010) a proto se dá jejich velký vliv předpokládat i u infekce BK virem. Na základě titru neutralizačních protilátek a pomocí určení konkrétního sérotypu by se mohli dárci a příjemci párovat tak, aby po transplantaci

nedocházelo k *de novo* infekcím. Význam neutralizačních protilátek v souvislosti s BK virem a nefropatií po transplantaci zkoumali Solis et al. (2018) a zjistili, že příjemci ledviny s nízkými titry protilátek nebo ti příjemci, kteří měli zpožděnou odpověď neutralizačních protilátek, mají mnohem vyšší riziko vývoje BKVAN. I tato studie klade důraz na významnost neutralizačního profilu dárce a příjemce v souvislosti s konkrétním subtypem BK viru. Pokud má dárce neutralizační protilátky proti jinému subtypu než příjemce, existuje mnohem vyšší šance, že se u příjemce vyvine BKVAN, než pokud je neutralizační sérostatus dárce a příjemce stejný. Solis et al. (2018) ve své studii také stanovili titer neutralizačních protilátek vhodný pro predikci problémů u příjemce, kdy titer protilátek $4 \times \log_{10} \text{IC}_{50}$ (IC_{50} značí takové ředění vzorku, kdy došlo k 50% inhibici infekivity pseudovirionů) a nižší představuje příjemce s vyšším rizikem vývoje BKVAN. U pacientů po transplantaci, kteří byli pozitivní na BKV DNA, byla také zaznamenána častá změna subtypové specificity neutralizačních protilátek. Titer neutralizačních protilátek se u nich zvýšil proti tomu subtypu, na který byli původně pozitivní, ale zároveň i proti dalším subtypům (Solis et al. 2018). To podporuje fakt, že dochází k *de novo* infekci od dárce skrz vnášený štěp.

Nefropatie se vyskytují hlavně u pacientů s přítomností protilátek proti více subtypům zároveň. Přítomnost NAbs proti více subtypům nastane, pokud je příjemce séropozitivní na jiný subtyp, než dárce ledviny. Protilátky příjemce nejsou po vnesení štěpu schopny neutralizovat nový subtyp vnesený se štěpem, nejprve musí vzniknout subtypově specifické protilátky proti štěpem vnesenému subtypu. Vzhledem k tomu, že je pacient po transplantaci imunosuprimovaný, je proces tvorby nových specifických protilátek značně komplikovaný. A naopak, pokud pacienti s již vytvořenou imunitou proti jednomu ze subtypů BKV dostanou ledvinu od dárce, který je séropozitivní na stejný subtyp, má replikace BKV ve štěpu podobný efekt jako posilující (tzv. booster) vakcína. Booster znamená, že podpoří silnou odpověď neutralizačních protilátek (Solis et al. 2018). Tento fakt podporuje teorii o vhodnosti párování dárců a příjemců dle jejich neutralizačního sérostatusu. Jak už bylo zmíněno dříve, ze studie Abend et al. (2017) vyplývá, že především neutralizační sérostatus dárce ovlivňuje rozvoj BKVAN po transplantaci u příjemce. Solis et al. (2018) ale na základě svých dat předpokládají, že

rozvoj nefropatií v souvislosti s BK virem je závislý spíše na schopnosti příjemce rychle vytvořit dostatečný titer neutralizačních protilátek specifických na subtyp, kterým jsou příjemci *de novo* infikováni skrz vnášený štěp, případně subtyp, který je u nich imunosupresí reaktivován. Obě studie se ale shodují na významnosti neutralizačních protilátek a potenciálu určování neutralizačního sérostatusu, ať už dárce nebo příjemce, a dělení do skupin s vyšším rizikem vývoje BKVAN právě dle neutralizačního statusu. Autoři studie Wunderink et al. (2019) postulují, že shoda nebo neshoda u subtypově specifických protilátek mezi donory a příjemci štěpu nemá vliv na rozvoj BKVAN a nemá smysl podle tohoto kritéria párovat dárce a příjemce. Studie sice zahrnovala poměrně velké množství účastníků (386), ale je spoustu dalších studií, které naznačují opak (např. Pastrana et al. (2012), Pastrana et al. (2013), Abend et al. (2017) nebo Solis et al. (2018)). V této studii (Wunderink et al. 2019) byla navíc pro průkaz séropozitivity použita metoda Luminex. Limitace této metody budou podrobněji rozebrány v další kapitole, proto je zde jen krátká zmínka, že výsledek studie mohl být ovlivněn nepřesným určením sérotypu dárců a příjemců, jelikož autory používaný rekombinantní fúzní GST-VP1, který byl používaný jako antigen, může prezentovat jiné imunogenní oblasti než nativní částice a tím pádem s protilátkami interagovat zcela jinak.

Přínos sérologického testu pro subtypově specifické neutralizační protilátky vyzdvihují i testy na myších, jejichž výsledky souhlasí se zjištěním, že neutralizační protilátky jsou pro prevenci BKVAN velmi důležité. Zároveň je ve studii provedené Nিকেleit et al. (2018) zmíněno, že subtypově specifické neutralizační protilátky by mohly být použity pro terapeutické účely jako booster imunitního systému příjemce ledviny před transplantací. Použití subtypově specifických myších monoklonálních protilátek (mAbs) jako potenciální terapie a prevence BKVAN navrhuje i Randhawa et al. (2009), kdy testovali neutralizační aktivitu uměle vytvořených protilátek proti BKV. U celkem 9 mAbs z 12 zaznamenali neutralizační efekt. Stejná skupina testovala i komerčně dostupné lidské imunoglobuliny, konkrétně Privigen (IGIV) a Cytogam (CMVIG), které jsou pacientům podávány intravenózně při různých imunodeficiencích a po transplantacích. Tyto imunoglobuliny mají rizikové pacienty chránit před reaktivací viru, Cytogam konkrétně před Cytomegalovirem. Zjistili, že i tyto komerčně dostupné preparáty

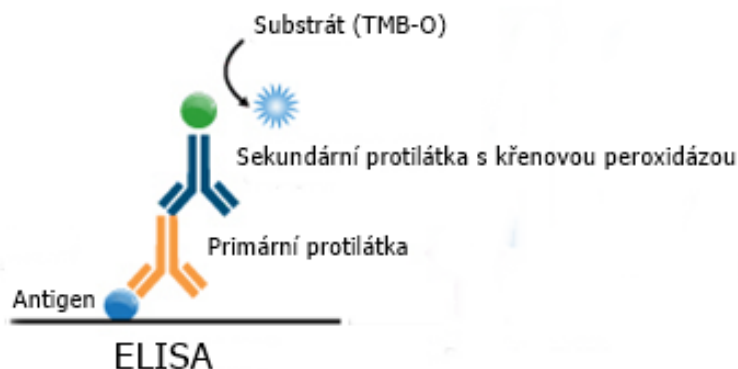
obsahují neutralizační protilátky proti všem subtypům BK viru (Randhawa et al. 2015). Jako preventivní řešení do budoucna navrhuje Pastrana et al. (2013) použití multivalentní vakcíny, která by byla schopná vyvolat protilátkovou odpověď proti všem subtypům BKV u příjemců ledviny. Pro uskutečnění je potřeba studie, která odpoví na otázku, zda vakcína založená na virům podobných částicích (VLPs) odvozených od BKV zvládne vyvolat podobnou protilátkovou odpověď i na ostatní subtypy, se kterými se očkovaný jedinec ještě nesetkal. Jedna z možných verzí takovéto vakcíny byla zatím testována pouze na myších, u kterých ale úspěšně zvládla vyvolat vznik neutralizačních protilátek (Pastrana et al. 2013).

2.3 Sérodiagnostika BK viru

2.3.1 Sérologické testy

Momentálně jediný možný způsob průkazu subtypově specifických protilátek představuje virus-neutralizační test (VNT). Byl použit pro určení neutralizačního sérostatusu dárce a příjemce i ve dříve zmíněných studiích (například Solis et al. (2018), Pastrana et al. (2012), Pastrana et al. (2013)) vyzdvihujících důležitost subtypově specifických neutralizačních protilátek. Je ale pro běžnou klinickou praxi nevhodný kvůli náročnému provedení, je totiž nutné mít k dispozici infekční virus a ten testovat v buněčných kulturách, což je náročné na vybavení, i časově (infekce trvá minimálně 24 hodin) (Wunderink et al. 2019). Proto je snaha přijít se specifickým, ale přitom prakticky jednoduše proveditelným sérologickým testem. Jako ideální řešení se jeví ELISA. ELISA je sérologická metoda, která se obvykle provádí v mikrotitrační 96-jamkové destičce. Na dno destičky se zakotví antigen, poté dochází k blokování, pak se přidává primární protilátka v podobě testovaného séra. Pak se přidá sekundární protilátka konjugovaná s enzymem, která je namířena proti primární protilátce. Poté se do reakce přidává substrát, který reaguje s enzymem navázaným na sekundární protilátce, obvykle za změny barvy. Mezi jednotlivými kroky dochází k promývání jamek a princip ELISA testu spočívá ve vázání jednotlivých složek, které vyústí v barevnou změnu reakce. V případě, že testované sérum neobsahuje protilátky mířené proti použitému an-

tigenu, všechny další přidané složky se postupně v promývacích krocích odmyjí a žádná barevná změna nenastane (Obr.2.4).



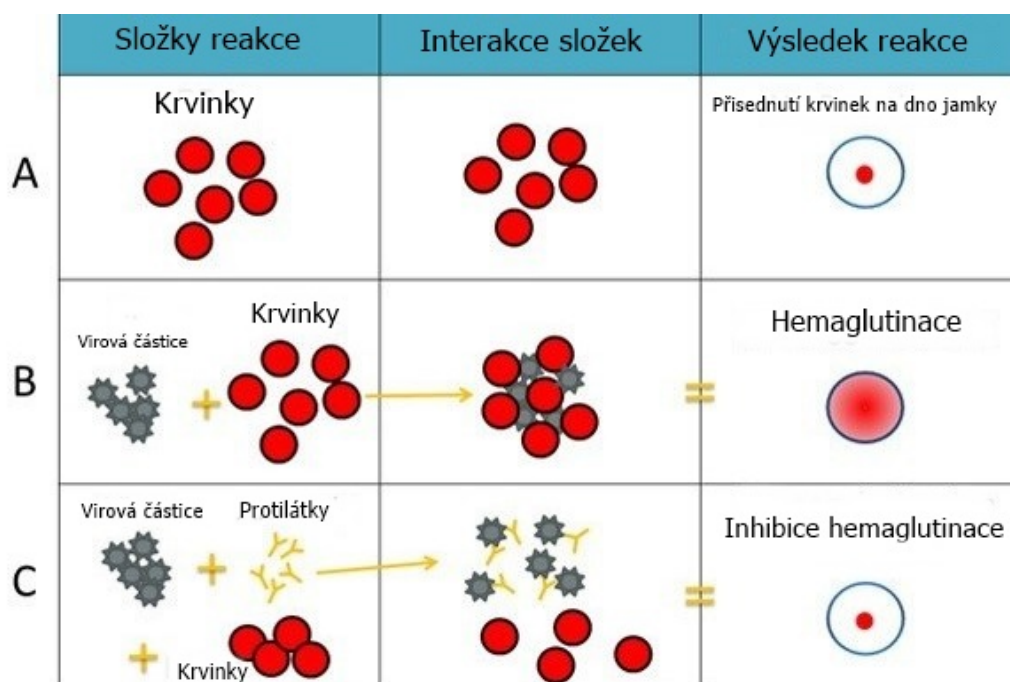
Obrázek 2.4: Schéma ELISA testu

Převzato a upraveno z bluelabservice.it

Na začátku roku 2019 přišli Wunderink et al. (2019) s novou metodou sérotypizace pomocí technologie Luminex. S pomocí bakteriálního expresního systému vytvořili rekombinantní glutathion S-transferáza-fúzní protein BKV VP1 (GST-VP1 protein), který měl celkem 6 variant, odvozených od sekvence VP1 proteinu šesti subtypů BKV. GST-VP1 protein navázaný na fluorescenční kuličky byl využit jako antigen pro Luminex IgG immunoassay. Tato metoda je velmi podobná ELISE, liší se vyhodnocováním. Luminex je vyhodnocován pomocí laserů nebo diod měřících, zda byl detekován komplex antigenu a protilátky a zároveň ověřují sílu signálu. Metoda Luminex dle autorů byla schopna určit, na jaký z testovaných subtypů je daný pacient séropozitivní. Nevýhodou může představovat použitý antigen. U GST-VP1 fúzního proteinu se předpokládá, že prezentace konformačních epitopů bude jiná než u nativní částice a tím pádem může i zcela jinak reagovat. Oproti tomu použití VLPs nebo pseudovirionů (PsVs) jako antigenu zajišťuje prezentaci epitopů jako v přirozené formě, tudíž je tento typ antigenu vhodnější. Ve studii Kamminga et al. (2018) porovnávali výsledky séroreakivity získané pomocí ELISA s využitím BKV VLPs a Luminexu s využitím GST-VP1 BKV fúzního proteinu. Hodnoty séroreakivity naměřené oběma metodami byly

podobné, autoři ale nepracovali s jednotlivými subtypy BK viru, zabývali se druhově specifickou séroreaktivitou napříč polyomaviry. I když jsou výsledky ELISA a Luminex v tomto případě srovnatelné, Luminex pro rozlišení subtypově specifické séroreaktivity nemusí stačit, to naznačuje studie Bodaghi et al. (2009), kdy při porovnávání GST-VP1 BKV a BKV VLPs pomocí ELISA testu autoři zaznamenali vyšší reaktivitu při použití intaktních VLPs jako antigenu. Poté, co byly intaktní VLPs denaturovány, došlo k poklesu měřených hodnot. Dalo by se předpokládat, že vlivem denaturace dojde k vystavení více epitopů, které mohou protilátky rozpoznávat a tím pádem by měla být hodnota navázaných protilátek vyšší než při použití intaktních částic. Výsledek této studie ukazuje opak. Možné vysvětlení je, že preferenčně vznikají protilátky proti konformačním epitopům a ne proti sekvenčním epitopům, které jsou zpřístupněny denaturací. Je také třeba zmínit, že v této studii Bodaghi et al. (2009) nebylo použito stejné množství antigenu, konkrétně 25 ng GST-VP1 BKV a 50 ng BKV VLPs. Je možné, že použití stejného množství antigenu by snížilo hodnotu navázaných protilátek na VLPs na srovnatelné hodnoty pro GST-VP1.

Tradiční způsob sérologického testování už několik desítek let představuje hemaglutinačně inhibiční test (HIA). Tato metoda využívá schopnosti některých virů, mezi které patří i BK virus (Gardner et al. 1971), vázat kyselinu sialovou na povrchu červených krvinek a tím je aglutinovat. V momentě, kdy se antigen nechá preinkubovat s testovaným sérem a toto sérum obsahuje protilátky proti antigenu, dojde ke vzniku komplexu antigen-protilátka a následně přidané krvinky už virus neaglutinuje. Výsledek se projeví jako červená tečka na dně destičky. V případě, že sérum protilátky neobsahuje, virus krvinky aglutinuje a v jamce lze vidět zřetězené krvinky ve formě růžového povlaku (Obr. 2.5).



Obrázek 2.5: Schéma hemaglutinačně inhibičního testu

Převzato a upraveno z microbeonline.com

V současnosti se HIA již moc nepoužívá a přednost dostávají sérologické metody přesněji měřitelné a jednodušší pro rutinní laboratorní provedení, jako třeba výše uvedená ELISA nebo multiplexové metody jako Luminex. Ve studii Hamilton et al. (2000) získali titry protilátek proti BKV a JCV vyšší v ELISA testu než při použití HIA. Jako antigeny byly použity přímo viriony BKV a JCV. ELISA prokázala podstatně vyšší senzitivitu než HIA. Pomocí obou metod byly získány srovnatelné výsledky ohledně BKV nebo JCV pozitivitu testovaného patientského séra, takže specifita obou testů byla téměř stejná. Vyšší senzitivita ELISA se dá vysvětlit tak, že ELISA zachytí i reaktivitu protilátek reagujících s dalšími epitopy než jen těmi, které jsou rozpoznávány při HIA. Výsledek této studie značí vyšší senzitivitu ELISA testu kontrastuje s výsledkem studie Flaegstad et al. (1986), ve které senzitivita obou testů vyšla srovnatelně. Autoři ale neporovnávali hodnoty s reaktivitou JCV, používali pouze BKV. Z praktických důvodů je upřednostňována ELISA, u HIA je nutnost zpracování čerstvé krve a kvalita krve může dramaticky ovlivnit výsledek. Ze dvou důvodů byl přesto HIA v rámci praktické části diplomové práce testován. Zprvé, Pastrana et al. (2013) ukázali, že jednotlivé subtypy BKV interagují rozdílně při hemaglutinaci s krvinkami

pocházejícími z různých zdrojů (testovány byly tyto krvinky: lidské 0+, lidské A+, ovčí, oslí, kozí, kravské, kuřecí a lamí). Obecně nejlépe s BKV hemaglutinovaly lidské krvinky obou krevních skupin, ze zvířecích hemaglutinovaly nejlépe kuřecí a lamí krvinky, přičemž kuřecí krvinky často dosahovaly stejných hodnot jako lidské. Zbytek krvinek hemaglutinoval až na výjimky podobně a výrazně méně v porovnání s lidskými krvinkami. Nabízí se tedy možnost, že by pomocí HIA mohlo docházet ke snazšímu odlišení sérotypů než pomocí ELISA. Zadrulé, HIA byl mezi experimenty zařazen na základě publikace Mäntyjärvi et al. (1972), ze které vyplývá, že hemaglutinační vlastnosti BKV se liší v závislosti na podmínkách reakce a lze tedy testovat, zda rozdíly v hemaglutinační aktivitě při změnách podmínek hemaglutinační reakce nejsou subtypově specifické. Předpokládali jsme, že hemaglutinační vlastnosti BKV-I VLPs se budou lišit od BKV-IV VLPs v závislosti na podmínkách reakce, konkrétně při různé teplotě a při různém pH.

Spolehlivou sérologickou diagnostiku komplikuje fakt, že často dochází ke křížové reaktivitě protilátek jak mezi subtypy, tak i mezi jednotlivými polyomaviry, například mezi BKV a JCV nebo MCPyV (Šroller et al. 2014). BKV VP1 sdílí sekvenční podobnost 78 % s VP1 proteinem JCV a 48 % s VP1 proteinem MCPyV (NCBI Blast). Proto se předpokládá, že by protilátky proti jednomu z virů mohly křížově reagovat s ostatními z těchto virů. Většina uměle vytvořených neutralizačních protilátek proti BKV ve studii Randhawa et al. (2009) nevykazovala křížovou reaktivitu s JCV a SV40, jedna z protilátek ale reagovala s JCV i SV40 a některé z protilátek proti JCV a SV40 reagovaly s BKV. Ke stejnému výsledku došli i Hejtmánková et al. (2019), v jejichž studii pouze jedno z testovaných sér vykazovalo vyšší reaktivitu s JCV i BKV. I když protilátky proti JC viru někdy křížově reagují s BK virem a je třeba s tímto faktem počítat, jedná se spíše o zřídka se vyskytující jev, alespoň co se ELISA testování týče (Hejtmánková et al. 2019). I u některých sér testovaných ve studii Kamminga et al. (2018) byla zaznamenána křížová reaktivita mezi JCV a BKV. Randhawa et al. (2009) postulují, že křížově reagující epitopy se nacházejí hlavně uvnitř kapsidy a jsou zpřístupněny u denaturovaných částic. V případě intaktních partikul jsou na povrchu kapsidy vystaveny především specifické epitopy. V této studii se

jednalo o identifikaci křížové reaktivity mezi jednotlivými polyomaviry, ne mezi BKV subtypy. Navíc existuje možnost koinfekce více subtypy BK viru zároveň a takový jedinec je pak séropozitivní na více subtypů najednou. Je proto těžké rozlišit, jestli reaktivita testovaného séra s antigeny zastupujícími různé subtypy značí křížovou reaktivitu nebo se jedná o sérum pacienta koinfikovaného více subtypy najednou (Pastrana et al. 2013). Přítomnost jednotlivých subtypů lze ověřit izolací DNA z krevního séra pacienta a následnou PCR amplifikací (Korth et al. 2019). Tato nesérologická metoda je sice rychlá, jednoduchá a levná, omezuje ji ale fakt, že hladina virové DNA se v krvi nad detekční limit zvedne až při *de novo* infekci nebo reaktivaci viru, pro kterou je obvykle potřeba imunoprese. Pro většinu pacientů tedy v momentě, kdy lze virovou DNA v krvi detekovat, může být již pozdě pro prevenci BKVAN. Přítomnost virové DNA určitého subtypu navíc neznamená, že má daný jedinec vytvořen dostatečný titr protilátek, proto je i z tohoto hlediska nezbytné zařadit sérologické testování.

2.3.2 Typy antigenů

Důležitost volby správného antigenu vyzdvihuje studie Bodaghi et al. (2009). Séropozitivita na BKV se měnila v závislosti na typu použitého antigenu a to tak, že antigen v podobě intaktních VLPs poskytoval vyšší hodnoty naměřených protilátek než při použití denaturovaných VLPs. Při použití GST-VP1 proteinu produkovaného v bakteriálním expresním systému pravděpodobně dochází k odlišné prezentaci imunogenních epitopů než u virové partikule. To souhlasí i s výše uvedenými poznatky o umístění některých imunogenních epitopů uvnitř kapsidy přístupných pouze po denaturaci (Randhawa et al. 2009). Pro přesné sérologické testování je ideální použití VLPs nebo PsVs, které mají v obou případech nativní konformaci a stejné rozložení imunogenních epitopů jako intaktní viriony. Zároveň nejsou náročné na přípravu a manipulaci. VLPs jsou prázdné kapsidy produkované pomocí bakulovirového expresního systému, kdy dochází k infekci hmyzích buněk rekombinantním bakulovirem nesoucím gen pro VP1 protein. VP1 protein se po infekci tvoří ve hmyzích buňkách a sám se uspořádá do pentamerů tvořících kapsidu. Pro samouspořádání VP1 proteinu do pentamerů a jejich ná-

sledné složení do kapsidy nejsou potřeba minoritní proteiny VP2 a VP3 (Salunke et al. 1986). VLPs odvozené obvykle od jediného subtypu BKV (většinou BKV I) jsou nejčastěji používané antigeny pro ELISA testy (Bogdanovic et al. (1998), Viscidi et al. (2003), Kean et al. (2009) nebo Kardas et al. (2015)). Přesto by měla být pro maximální senzitivitu testu použita kombinace antigenů odvozených od vícero subtypu zároveň, ideálně samozřejmě od všech existujících subtypů. To dokazuje výsledek studie Hejtmánková et al. (2019), ve které se ukázalo, že při použití směsi antigenů BKV I a BKV IV reagovalo 62 % vzorků sér od příjemců ledviny a 48 % vzorků sér od zdravých dospělých pouze s jedním z testovaných antigenů.

PsVs vznikají v savčím expresním systému a používají se hlavně na VNT, proto musí obsahovat minoritní kapsidové proteiny a na rozdíl od VLPs musí nést uvnitř kapsidy reportérový gen, například gen pro zelený fluorescenční protein (GFP) nebo gen pro luciferázu. Toho je dosaženo kotransfekcí buněk plazmidem nesoucím reportérový gen (Pastrana et al. (2012), Pastrana et al. (2013)). Pokud jsou takové PsVs používány jako antigen pro ELISA testy, nabízí se otázka, zda nemůže přítomnost minoritních proteinů ovlivnit výsledek testu. Například Pastrana et al. (2012) při použití PsVs složených i z minoritních kapsidových proteinů zaznamenali s těmito částicemi silnou křížovou reaktivitu protilátek s jednotlivými subtypy při použití ELISA testu. Minoritní kapsidový protein VP2 a jeho kratší izoforma VP3 se nacházejí uvnitř pentameru složeného z majoritního proteinu VP1, takže se nepředpokládalo, že by s minoritním proteinem nevystaveným na povrchu kapsidy mohla protilátka interagovat. V tomto ohledu by tedy mohla být rozhodující kvalita připravených PsVs, respektive podíl rozloženého materiálu, který by mohl být při testech přístupný pro protilátky proti VP2/3. V dostupné literatuře však nelze kvalitu použitých PsVs dohledat. O tom, že protilátky proti minoritním proteinům mohou být v testech zachyceny svědčí studie provedené u virů SV40 a JC (Corallini et al. (2012), Lagatie et al. (2014)). U jiných polyomavirů, KI a WU viru, prokázala studie Kantola et al. (2010) křížovou reaktivitu způsobenou minoritními proteiny. Ve studii se také prokázalo, že sérum obsahující IgG proti BKV nereagovalo s VP2 a VP3 proteiny KI viru a WU viru, avšak role minoritních proteinů v sérodiagnostice subtypově

specifických protilátek BKV nebyla systematicky zkoumána.

Pro účely mé diplomové práce byly PsVs připravovány bez reportérového genu. PsVs jsou navíc velmi vhodné pro genetické manipulace, právě díky způsobu jejich přípravy. Pro cílenou mutagenézi stačí zavést mutaci do sekvence genu pro VP1 protein na daném vektoru a tímto vektorem pak transfekovat buňky. Antigeny pro testování může být výhodné modifikovat. Geneticky lze upravovat i VLPs. Již v minulosti bylo provedeno velké množství experimentů zahrnujících inserci do smyček VP1 proteinu různých polyomavirů, například Kojzarová (2011) provedla substituci v oblasti DE smyčky VP1 proteinu MPyV a dokázala, že tato úprava nijak nenarušila schopnost samouspořádání se do částic ani stabilitu vznikajících VLPs. Podobně připravovali chimerické VLPs křeččího polyomaviru s vloženým epitopem i ve studii Mazeike et al. (2012) nebo ve studii Lasickienė et al. (2012). I v těchto studiích neměly provedené manipulace vliv na stabilitu nebo strukturu částic. Manipulaci s BC smyčkou v naší laboratoři prováděla Sekavová (2017). Připravila VLPs odvozené od VP1 MPyV, ale celá sekvence pro BC smyčku byla nahrazena sekvencí BC smyčky BKV I nebo BKV IV. Takto připravené struktury VP1 měly sloužit jako antigen pro ELISA a cílem experimentu bylo identifikovat subtypově specifické protilátky v sérech hyperimunizovaného králíka i v lidských sérech. V tomto případě však byla negativně ovlivněna stabilita částic (VLPs nevznikaly) a reaktivita rekombinantních struktur byla bohužel nízká, tudíž se nepodařilo odlišit subtypově specifickou séroreaktivitu.

3. Hypotézy a cíle

V diplomové práci jsem testovala dvě hypotézy:

- Pomocí HIA testu bude možné odlišit protilátky namířené proti subtypům I a IV BKV snadněji než pomocí standardního ELISA testu
- Pomocí cílené mutageneze bude možné ve VP1 proteinu identifikovat místo důležité pro specifickou interakci protilátek se subtypy BKV I a BKV IV

Dlouhodobým cílem této práce je přispět k vývoji sérologického diagnostického testu umožňujícímu spolehlivé rozlišení subtypů I a IV BKV. Práce má tři dílčí cíle.

První dílčí cíl diplomové práce navazuje na první stanovenou hypotézu:

1. Optimalizovat podmínky HIA tak, aby došlo k sérologickému odlišení subtypově specifických protilátek v kontrolních králičích sérech a precharakterizovaných lidských sérech.

Druhý dílčí cíl navazuje na druhou hypotézu:

2. Pomocí cílené mutageneze pozměnit VP1 protein subtypu IV tak, aby sekvence aminokyselin v oblasti DE a EF smyčky byla shodná se sekvencí aminokyselin subtypu I a otestovat reaktivitu těchto částic na souboru precharakterizovaných lidských a zvířecích sér. V DE smyčce se jedná o záměnu asparaginu za histidin (N139H), v EF smyčce o dvě záměny, kyseliny glutamové za kyselinu asparagovou (E175D) a valinu za isoleucin (V178I). Budou tedy připraveny dva typy částic, jedny s mutací v DE smyčce a druhé se dvěma mutacemi v EF smyčce. Modifikované částice budou testovány pomocí ELISA testu. Předpokládá se, že při zásahu významného epitopu dojde u modifikovaných částic k poklesu reaktivity s monospecifickým sérem obsahujícím protilátky proti BKV IV a případně začnou být tyto částice rozeznávány monospecifickým sérem obsahujícím protilátky proti BKV I protilátky. Nemutované částice budou mít se sérem obsahujícím protilátky proti subtypu IV vyšší reaktivitu, než mutované částice.

Na základě třetí hypotézy byl formulován třetí dílčí cíl následovně:

3. Ověřit, zda je v ELISA testu reaktivita protilátek s pseudoviriony a VLPs srovnatelná a určit, zda přítomnost minoritních proteinů reaktivitu ovlivňuje. Pro naplnění tohoto cíle budou srovnávány VLPs (složené pouze z VP1) obou subtypů s PsVs (složené pouze z VP1 proteinu nebo z VP1/VP2). Částice s VP3 použité nebyly, jelikož VP3 protein je shodný VP2, pouze je o 119 aminokyselin kratší, takže stačí otestovat částice jen s minoritním proteinem VP2. Pokud se při křížové reaktivitě v ELISA testu mohou významně uplatňovat protilátky namířené proti minoritním proteinům, očekáváme vyšší reaktivitu polyklonálního séra s částicemi obsahujícími i minoritní protein než s částicemi tvořenými jen majoritním proteinem VP1.

4. Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Primární protilátky a séra

- Králičí protilátka proti BKV I (polyklonální, ředěna 1:500, připravena Marianou Stančíkovou)
- Králičí protilátka proti BKV IV (polyklonální, Rb anti BKV IVc2, ředěna 1:5 000)
- Králičí protilátka proti VP1 SV40 (polyklonální proti SV40 VP1, Abcam ab53977, ředěna 1:1 000)
- Králičí protilátka proti VP2/3 (králičí polyklonální proti BKV VP2/3, CKT, ředěna 1:1 000)
- Myší protilátka proti BKV I VP1 (monoklonální proti VP1 BKV I, připravena Sandrou Kozmanovou, ředěna 1:5)
- Myší protilátka proti VP1 MPyV (monoklonální IgG proti MPyV VP1, ředěna 1:100)
- Cytotect®CP Biotest: Lidské IgG proti cytomegaloviru 100U/ml, ředěno 1:400
- Precharakterizovaná lidská séra (viz Tabulka 4.1)

Lidské sérum	Precharakteristika (BKV)
6030	IV pozitivní
6029	I pozitivní
6011	neprovedena
M30	negativní
3	I pozitivní
5	I,IV pozitivní
19	IV pozitivní
30	I,IV pozitivní
40	I,IV pozitivní
41	negativní

Tabulka 4.1: Precharakteristika lidských sér

Všechna lidská séra byla poskytnuta společností VIDIA s r.o. a byla precharakterizována pomocí ELISA RNDr. Kateřinou Roubalovou CSc., část z nich (séra 6030 a 6029) Alžbětou Hejtmánkovou (Sekavová 2017).

4.1.2 Sekundární protilátky

- G α Rb-Px: Kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou, Fc fragment-specifická, ředěna 1:1000 (BioRad)
- G α M-Px: Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou, Fc fragment-specifická, ředěna 1:1 000 (BioRad)
- G α Hu-Px: Kozí protilátka proti lidským imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou, Fc fragment-specifická, ředěna 1:3 000 nebo 1:6 000

4.1.3 Viry a virům podobné částice

- Rekombinantní bakulovirus produkující majoritní kapsidový protein BK viru VP1 subtypu Ia (Gardner strain, GenBank číslo: NC-001538), připraven Veronikou Hruškovou a Marianou Stančíkovou, používaný pro produkci virům podobných částic odvozených od BKV subtypu Ia (VLPs I)

- Virům podobné částice tvořené VP1 proteinem, odvozené od BKV subtypu IVc2 (VLPs IV), připravené Alžbětou Hejtmánkovou, pomocí rekombinantního bakuloviru produkujícího majoritní kapsidový protein BK viru VP1 subtypu IVc2 (A-66H strain, GenBank číslo: BAG84476)
- Virům podobné částice tvořené VP1 proteinem myšího polymovaviru (MPyV VLPs), BG strain, GenBank číslo: AF442959, připravené Jiřinou Žáčkovou Suchanovou

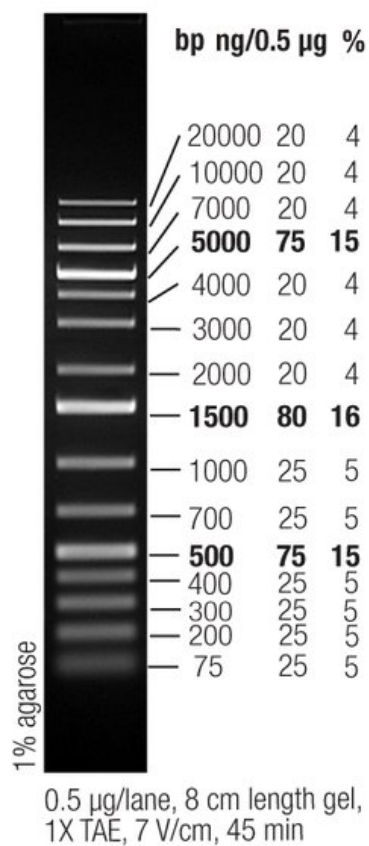
4.1.4 Roztoky a chemikálie

- 1x PBS (fosfátový pufr): 137 mM NaCl (Lachner), 2,7 mM KCl (Lachema), 10 mM Na₂HPO₄O (Penta), 1,8 mM KH₂PO₄ (Lachner), pH 7,4 upraveno pomocí HCl
- 10x Pufr B: 10 mM Tris-HCl pH 7,4 (Serva), 150 mM NaCl (Lachner), 0,01 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich)
- 1M Tris-HCl: 30,29 g Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Serva)) objem doplněn dH₂O do 250 ml, pH 7,4 upraveno pomocí HCl
- 0,5x Tris-borátový pufr (TBE): 45mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA-NaOH, pH 8,0
- Spodní gel pro SDS-PAAGE (12%): 4 ml 30% akrylamidu (Serva), 4,5 ml Tris-HCl, pH 8,8 (Sigma), 120 µl 10% SDS (w/v) (Sigma), 3,25 ml ddH₂O, 40 µl 10% (w/v) persíranu amonného (Serva), 8,5 µl TEMED (Sigma)
- Zaostrovací gel pro SDS-PAAGE (5%): 0,5 ml 30% akrylamidu (Serva), 0,375 ml Tris-HCl, pH 6,8 (Sigma), 30 µl 10% SDS (w/v) (Sigma), 2,11 ml ddH₂O, 20 µl 10% (w/v) persíranu amonného (Serva), 5 µl TEMED (Sigma)
- Running buffer: 25 mM Tris (Serva), 192 mM glycin (Sigma), 0,1% SDS (w/v), pH 8,3

- Blotting buffer: 25 mM Tris (Serva), 195 mM glycin (Sigma), 20% (v/v) methanol (Lachema), pH 8,3
- 5x Laemmliho pufr: 1,25% SDS (w/v) (Sigma), 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 25% β -merkaptoethanol (Serva), 50% (v/v) glycerol (Lachema), 0,005% bromfenolová modř (Lachema)
- Vyvolávací roztoky: Směs roztoku A a B v poměru 1:1. Roztok A: 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 (Sigma), 250 mM Luminol (Sigma), 90 mM kyselina p-kumarová (Sigma) v dH₂O. Roztok B: 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 (Sigma), 0,02% (v/v) H₂O₂ (Sigma) v dH₂O
- 2% (w/v) BSA (hovězí sérový albumin, Sigma) v PBS pro ELISA
- 0,2% (w/v) BSA v PBS pro hemaglutinaci a hemaglutinačně inhibiční test
- 5% (w/v) sušené mléko v PBS
- 10% Triton X-100 (Pierce #28314)
- 1% (w/v) agaróza (Amresco) v 0,5x TBE
- 40 % (v/v) glycerol - příprava bakteriálních konzerv
- 2% kyselina fosfowolframová (PTA), pH 7,3 - příprava sítěk pro elektronovou mikroskopii
- Ethidium bromid - vizualizace DNA po elektroforéze
- 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific) - barva pro elektroforézu
- Imperial Protein Stain (Thermo Scientific) - barvení gelu po SDS-PAAGE
- TMB-O - substrát pro ELISA, viz kapitola 4.1.6 (Vidia)
- X-Gal (Fermentas), koncentrace 20 mg/ml, přidáván na agarové plotny pro selekci bakteriálních buněk
- IPTG (Fermentas), koncentrace 20 mg/ml, přidáván na agarové plotny pro selekci bakteriálních buněk

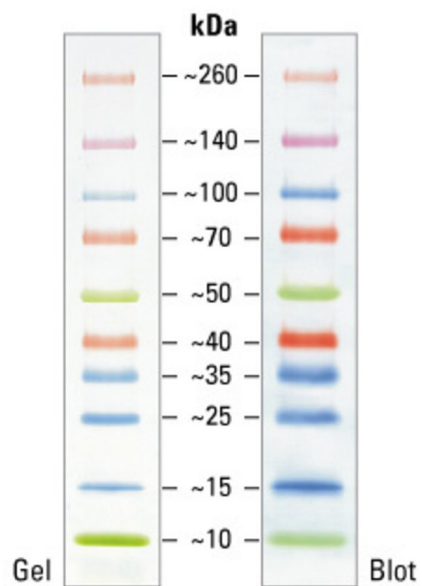
4.1.5 Markery molekulových vah

- Marker používaný pro DNA elektroforézu: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas, Obr. 4.1)



Obrázek 4.1: Marker používaný pro DNA elektroforézu

- Marker pro SDS-PAAGE: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Obr. 4.2)



Obrázek 4.2: Marker používaný pro DNA elektroforézu

4.1.6 Komerční soupravy

- Qubit® Protein Assay Kit (Invitrogen) - stanovení koncentrace proteinů
- Q5 Site Directed Mutagenesis Kit (NEB) - cílená mutageneze
- Phusion® Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Fisher Scientific) - cílená mutageneze
- GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) - izolace plazmidu z bakteriální kultury
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) - izolace plazmidu z bakteriální kultury
- JetStar 2.0 Endotoxin-free Maxiprep Kit (Genomed) - izolace plazmidu z velkého objemu bakteriální kultury
- ELISA kit (Vidia)

4.1.7 Software

- itTEM 5.1 (Olympus soft imaging solutions GmbH)
- Gen5
- NanoDrop
- PyMol
- SnapGene (GSL Biotech)
- Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems)

4.1.8 Přístroje

- Aparatura pro horizontální agarózovou elektroforézu multiSub Mini (Clever)
- Aparatura pro SDS-PAAGE (Bio-Rad, Hoefer)

- Aparatura pro Western Blot (Bio-Rad)
- Centrifuga 3K30 (Sigma)
- Centrifuga GS-15R (Beckman)
- Centrifuga Megafuge 1.0R (Heraeus Sepatech)
- Centrifuga Microfuge® (Beckman)
- CO₂ termostat (Forma Scientific)
- DeepFreeze MDF-U53V (Sanyo)
- ELISA reader (Epoch BioTek)
- Elektronový mikroskop JEOL JEM 1200EX
- Elektroporátor Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad)
- Fluorescenční mikroskop Axio Observer.A1 (Carl Zeiss)
- Konfokální mikroskop Leica TCS-sp
- Kultivační třepačka Orbital Shaker (Forma Scientific) a Orbi-Safe TS (Gallenkamp)
- Laminární box (Forma Scientific)
- Laminární box (Forma Scientific)
- Magnetická míchačka IKA® Big Squid
- Mikrocentrifuga® 16 Beckman Microfuge Centrifuge (Beckman Coulter®)
- Minicentrifuga Centrifuge C1200 (Labnet)
- Mikroskop Leica DMI1 (Leica)
- Mikrovlnná trouba (Vestel)
- NanoDrop Spectrofotometr ND-1000 (NanoDrop Technologies)
- PCR cykler Mastercycler EP gradient S (Eppendorf)

- pH metr LANGE H138 miniLab™ (Hach)
- pH metr S20 SevenEasy (Mettler Toledo)
- Qubit® fluorometr (Invitrogen)
- Refraktometr ABBE (Carl Zeiss Jena)
- Rozebírač gradientů (Beckman)
- Sonikátor Soniprep 150 (Schoeller Pharmacia Praha)
- Sonikátor QSonica (Q500)
- Termobox LBT 165 (Zanussi)
- Termobloček CH-100 (Biosan)
- Termobloček Bio TDB-100 (Biosan)
- Termostat TCH100C (Biosan)
- Termostat Labtech LIB-080M (Labtech)
- Třepačka Duomax 1030 (Heidolph)
- Třepačka Shaker 30 (Labnet)
- Ultracentrifuga Optima TM L-90K (Beckman)
- UV transluminátor (BioLum)
- UV transluminátor Electronic EAC-20 Dual Light Translluminator (Ultra Lum)
- Váhy - analytické (Ohaus)
- Váhy 440-33 (Kern)
- Vilber Fusion Fx (BioConsult Laboratories)
- Vodní lázeň (Grant Instruments)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
- Zdroj PowerPac™ Basic (BioRad)

4.1.9 Enzymy

- Trypsin (Sigma)
- Neuraminidáza z *Vibrio cholerae* (Sigma)
- Restrikční endonukleázy (NEB, Fermentas)
- Benzonáza (Sigma-Aldrich)
- RNáza A (Sigma-Aldrich)
- DNáza I (Roche)
- DreamTaq Polymeráza (Fermentas)
- Vent® DNA polymeráza (Fermentas)

4.1.10 Primery pro PCR

Všechny primery jsou připraveny firmou IDT (Integrated DNA Technologies)

- Primery po mutagenezi v EF smyčce, purifikace DSL
mut-BKV-IV-EF-Asp-Ille-Fw: 5'- ACC ATC ACA CCC AAG AAC CCA
ACC - 3', T_m 65°C
mut-BKV-IV-EF-Asp-Ille-Rv: 5'- GCC ATC GGG ATA CTT GGT GCG
ATA G - 3', T_m 63°C
- Primery pro mutagenezi v DE smyčce, purifikace DSL
mut-BKV-IV-DE-His-Fw: 5'- GGT GCA CGA GCA CGG CGG CGG - 3',
T_m 77°C
mut-BKV-IV-DE-His-Rv: 5'- TTT TGG CTT CCG GCG TGC AGA TTC
- 3', T_m 72°C
- Primery po mutagenezi v DE smyčce purifikované pomocí PAGE purifikace
mut-BKV-IV-DE-His-Fw-pur: 5'- GGT GCA CGA GCA CGG CGG CGG
- 3', T_m 70,8°C

mut-BKV-IV-DE-His-Rv-pur: 5′ TTT TGG CTT CCG GCG TGC AGA
TTC - 3′, T_m 62,5°C

- Primery pro sekvenování kapsidových proteinů BKV, purifikace DSL
EF1a - Fw 5′ TCA AGC CTC AGA CAG TGG TTC - 3′, T_m 71°C
WPRE - Rv 5′ CAT AGC GTA AAA GGA GCA ACA - 3′, T_m 67°C
SV40-ori-Fw 5′ CCT AAC TCC GCC CAG TTC C - 3′, T_m 73°C
EBV - rev: 5′ GTG GTT TGT CCA AAC TCA TC - 3′, T_m 65°C, navrženy
pomocí NEBaseChanger

4.1.11 Vektory

- pBKV-IV-VP1 - plazmid nesoucí gen pro VP1 BKV IV (Obr. A.2), použit pro produkci pseudovirionů tvořených VP1 proteinem odvozených od subtypu BKV IV (PsVs IV) a jako templát pro mutagenezi
- BKV-D - plazmid nesoucí gen pro VP1 protein BKV I (poskytnut RNDr. Martinou Salákovou, Ph.D.), použit pro produkci pseudovirionů tvořených VP1 proteinem odvozených od subtypu BKV I (PsVs I)
- pBKV-IV-VP1/2 - plazmid nesoucí gen pro VP1 a VP2 BKV IV (Obr. A.3), použit pro produkci pseudovirionů tvořených VP1 a VP2 proteinem odvozených od subtypu BKV IV (PsVs VP1/2), poskytnut RNDr. Lenkou Horníkovou, Ph.D.
- pmaxGFP - kontrolní plazmid nesoucí gen pro GFP (Amaxa)

4.1.12 Buněčné linie

- Sf9 - klonální linie hmyzích buněk izolovaných z ovárií můry *Spodoptera frugiperda* (ATCC No. CRL-1711)
- 293TT - lidské buňky, odvozené od 293T, které byly původně odvozené od HEK-293 buněk, což jsou lidské embryonální buňky ledvin.

4.1.13 Expresní systémy

- Bakulovirový expresní systém pro produkci VLPs s pomocí hmyzích Sf9 buněk: Díky Bac-to-Bac systému byly produkovány virům podobné částice tvořené VP1 proteinem BKV. Princip systému spočívá v místně specifické transpozici plazmidového vektoru do bakmidu v bakteriích. Plazmidový vektor obsahuje požadovaný gen (v tomto případě gen pro VP1 protein BKV). Bakmid je bakulovirový kyvadlový vektor obsahující kanamycinovou, tetracyklinovou a gentamicinovou rezistenci a gen pro LacZ α . V momentě, kdy dojde k úspěšné transpozici plazmidového vektoru nesoucího gen zájmu, je sekvence kódující LacZ α přerušena. To umožňuje identifikovat rekombinantní bakmidy. Když do média přidáme induktor IPTG a chromogenní substrát X-Gal, kolonie s rekombinantním bakmidem budou bílé, kolonie bez rekombinace naopak modré. Z bílých kolonií je možno vyizolovat DNA a infikovat s ní hmyzí buňky. Po infekci buněk dojde k expresi vloženého genu (zde pro VP1 protein) v buňkách a VP1 se poté sám uspořádá do VLPs. Zároveň je rekombinantní bakulovirus produkován do média, které může být opětovně využito pro další infekce.
- Savčí expresní systém pro produkci PsVs s pomocí 293TT buněk: Savčí buňky 293TT jsou odvozené z buněčné linie lidských embryonálních buněk ledvin HEK-293. Buňky HEK-293 byly imortalizovány adenovirem a po transformaci virem SV40 vznikla buněčná linie 293T. Protože 293T exprimovaly pouze malé množství velkého T antigenu SV40, byly transfekovány expresní kazetou a tak vznikla další buněčná linie 293TT. Buňky 293TT obsahují expresní kazetu s genem pro velký T antigen SV40 a navíc gen kódující rezistenci na hygromycin (<https://ccrod.cancer.gov/confluence/display/LCOTF/293TT>). Po transfekci buněk plazmidem obsahujícím požadovaný gen (v tomto případě gen pro VP1 protein) dochází k expresi tohoto genu, tvorbě proteinu VP1 a jeho samouspořádání do PsVs.

4.1.14 Kultivační média

4.1.14.1 Kultivační média pro bakterie

- LB médium (Luria-Bertani médium): 1% (w/v) pepton (Imuna), 0,5% (w/v) kvasničný extrakt (Imuna), 1% (w/v) NaCl
- SOC médium: 2% (w/v) pepton pro bakteriologii (Imuna), 0,5% (w/v) kvasničný extrakt (Imuna), 10 mM NaCl (Sigma), 2,5 mM KCl (Lachema), 20 mM glukóza (Serva), 10 mM MgCl₂ (Sigma), 10 mM MgSO₄ (Sigma)

4.1.14.2 Kultivační média pro hmyzí buňky

- Hmyzí médium bez séra: TNM-FH insect medium (Sigma)
- Hmyzí médium se sérem: TNM-FH insect medium (Sigma), 10% FBS - fetální telecí sérum (Sigma), podle potřeby 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury (viz kapitola 4.1.16)

4.1.14.3 Kultivační média pro savčí buňky

- DMEM médium bez séra: DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma), 2 mM L-glutamin (Gibco)
- DMEM médium se sérem: DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma), 2 mM L-glutamin (Gibco), 10% FBS - fetální telecí sérum (Sigma), podle potřeby 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury

4.1.15 Antibiotika

- ZeocinTM(InvivoGen), koncentrace 50 µg/ml, pro selekci bakteriálních buněk
- Ampicilin (Biomedika), koncentrace 100 µg/ml, pro selekci bakteriálních buněk
- Kanamycin (Biomedika), koncentrace 50 µg/ml, pro selekci bakteriálních buněk

- Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma, Gibco), zásobní roztok je 100x koncentrován, v 1 ml je obsaženo 10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu a 25 mg amphotericinu B

4.1.16 Bakteriální kmeny

- Top10 - elektrokompetentní kmen bakterie *Escherichia coli*, genotyp: *F - mcrA* $\delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi80lacZ\delta lacX74$ *recA1* *araD139* $\delta(ara leu) 7697$ *galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG* - připraveny Janou Váňovou
- Stellar™ (Clontech) - bakteriální kmen s vysokou účinností transformace, genotyp: *F-*, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*, $\phi80d lacZ\delta M15$, $\delta(Lacha-argF)$ *U169*, $\delta(mrr-hsdRMS - mcrBC)$, $\delta mcrA$, λ -
- NEB 5-alpha Competent *Escherichia coli*, součást komerční soustavy Q5 Site Directed Mutagenesis Kit

4.1.17 Agarové plotny

- Plotny z LB agaru (Luria-Bertani medium with agar): 1% (w/v) pepton (Imuna), 0,5% (w/v) kvasničný extrakt (Imuna), 1% (w/v) NaCl, 1,5% agar (Imuna)

4.1.18 Mikrotitrační destičky

- Multiwell Immuno Plate, Maxisrop, 96 well. M9410-1CS (Sigma-Aldrich) - klasické desky pro ELISA
- Microplate 96 well, PS, Half Area, Transparent Microcolon®, High Binding, ref: 675061 (Greiner Bio-one) - poloviční desky pro ELISA
- Mikrotitrační destička U, V400916 (Gama Group a.s.) - destičky pro HA a HIA

4.2 Metody

4.2.1 Sterilizace

Používané roztoky, špičky k pipetám a mikroskopické zkušební skleničky byly sterilizovány v autoklávu po dobu 30 minut, při 127°C, při 120 kPa. Chemické nádobí bylo po uzavření aluminiovým víčkem sterilizováno horkým vzduchem při 160°C po dobu tří hodin. Mikrobiologické hokejky, pinzety a kličky byly sterilizovány opálením v plameni po namočení v ethanolu. Laminární box byl desinfikován vysvícením UV světlem po dobu 30 minut.

4.2.2 Příprava ddH₂O

Příprava ddH₂O (PCR vody) probíhala v laminárním boxu. Sterilní stříkačkou byla nasáta demi H₂O bez iontů, poté byl na stříkačku nasazen jeden sterilní filtr o průměru 22 µm a jeden o průměru 0,45 µm. Přes tyto filtry pak byla ddH₂O rozplněna do sterilních zkumavek.

4.2.3 Práce s bakteriálními kulturami

4.2.3.1 Kultivace bakterií

Kultivace bakterií probíhala na plotnách z LB agaru v termostatu při 37°C po dobu 16 hodin, případně v tekutém médiu v třepačce po zaočkování, rovněž po dobu 16 hodin při 37°C a 250 rpm. Do média i ploten bylo přidáváno selekční antibiotikum podle toho, jaký gen pro rezistenci nesl plazmid v kultivovaných bakteriích.

4.2.3.2 Elektroporace

Kompetentní bakterie byly rozmrazeny na ledu. Reakční směs byla připravena smícháním 45 µl elektrokompetentních bakterií s 1 µl plazmidu a inkubována 1 minutu na ledu. Poté byla směs převedena do sterilní elektroporační kyvety o vzdálenosti elektrod 2 mm a osušená kyveta vložena do elektroporátoru Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad), kde byl do reakční směsi aplikován pulz 25 uF, 2,5

kV, 200 Ω o délce 4,9 ms. Ke směsi byl okamžitě přidán 1 ml SOC média a po resuspendování směs převedena do Erlenmayerovy baňky. Po inkubaci při 37°C po dobu 1 hodiny na třepačce (200 rpm) byla bakteriální kultura vyseta na agarové plotny se selekčním antibiotikem a inkubována 18 hodin ve 37°C.

4.2.3.3 Příprava bakteriálních konzerv

K suspenzi bakterií narostlých v LB médiu přes noc při 37°C byl přidán 40% (v/v) sterilní glycerol (Lachema) v takovém poměru, aby výsledná koncentrace glycerolu byla 20% (v/v). Takto připravené bakteriální konzervy byly skladovány při -80°C.

4.2.4 Práce s DNA

4.2.4.1 Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla izolována ze suspenze buněk, která byla získána očkováním. Kolonie narostlé na agarové plotně byly pomocí sterilního párátko zaočkovány do směsi LB média a Zeocinu (pro minipreparaci do 5 ml, pro maxipreparaci do 100 ml). Následovala inkubace na třepačce po dobu 16 hodin při 37°C při 200 rpm. Poté byly buňky zcentrifugovány po dobu 20 minut při 4°C, 4 000x g. Získaný pelet byl pak použit pro izolaci plazmidové DNA. Pro izolaci plazmidové DNA byly používány tři druhy komerčních souprav, JetStar Endotoxin-free Plasmid Purification Kit Maxiprep, GenElute HP Plasmid Miniprep Kit a QIAprep Spin Miniprep Kit. GenElute a QIAprep sloužily pro minipreparaci plazmidové DNA, JetStar Endotoxin-free kit sloužil pro maxipreparaci plazmidové DNA bez endotoxinů. Izolace probíhala dle pokynů výrobce dané soupravy.

4.2.4.2 Měření koncentrace DNA

Měření koncentrace DNA probíhalo pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000 dle návodu. Koncentrace byla stanovena měřením absorbance při vlnové délce 260 nm. Čistota DNA byla kontrolována pomocí poměru absorbance 260/280 a 260/230.

4.2.4.3 Sekvence DNA

Sekvenační reakce byla míchána do objemu 8 μ l tak, aby obsahovala 5 pmol příslušného primeru a 3 ng/100 bp plazmidové DNA (Tab. 4.2). Primery používané na sekvenaci: EF1a-Fw, WPRE-Rv, SV40-ori-Fw, Ebv-rev. Samotnou sekvenaci poté prováděla Laboratoř sekvenace DNA v Biocevu na přístroji MiSeq Illumina.

Pro objem reakce 8 μ l	Složky reakce
3 ng/ 100 bp	plazmidová DNA
0,5 μ l	primer (10 μ M)
	ddH ₂ O

Tabulka 4.2: Sekvenační reakce

4.2.4.4 Horizontální agarózová elektroforéza

Pro přípravu 1% (w/v) agarózového gelu pro rozdělení molekul DNA podle velikosti byl připraven povařením agarózy v 0,5x koncentrovaném Tris-borátovém pufru (TBE). Do tekutého gelu byl přidán ethidium bromid (EtBr) (Serva) tak, aby výsledná koncentrace EtBr v gelu byla 0,5 μ g/ml. Takto připravený gel byl nalit do sestavené vany se vsunutým hřebínkem pro vytvoření jamek. Gel tuhnul 30 minut při RT, poté byl přenesen do elektroforetické vany, zalit 0,5x koncentrovaným TBE a do jamek byly nanášeny vzorky smíchané s 1 μ l 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific). První jamka obsahovala 3 μ l markeru (Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas). Elektroforetické dělení probíhalo za napětí 5 V/cm obvykle 40 minut. Gel byl následně vyhodnocován pod UV transluminátorem a vyfocen.

4.2.4.5 Restrikční štěpení DNA

Pro ověření kvality a velikosti vyizolované plazmidové DNA bylo prováděno restrikční štěpení. Restrikční reakce byla namíchána dle Tab. 4.3, v případě potřeby byl přidán 1 μ l dalšího restrikčního enzymu. Reakce probíhala při 37°C po dobu 1 hodiny. Následně byly jednotlivé vzorky nanášeny na agarózovou elektroforézu pro vizualizaci.

Pro objem reakce 20 μ l	Složky reakce
1 μ g	DNA
1 μ l	restrikční enzym
2 μ l	10x pufr
	ddH ₂ O

Tabulka 4.3: Restrikční reakce

4.2.4.6 Polymerázová řetězová reakce

Pro amplifikaci genu pro VP1 protein a zároveň jako součást protokolu pro cílenou mutagenezi byla využívána polymerázová řetězová reakce (PCR). Primery byly ředěny ze zásobního 100 μ M roztoku na pracovní koncentraci 10 μ M. Reakce byla namíchána dle rozpisu v Tab.4.5 a probíhala s nastavením cyklu popsaným v Tab. 4.4.

Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1x	94°C	3 minuty
30x	94°C	40 vteřin
	X°C (dle T _m primerů)	50 vteřin
	72°C	1 minuta
1x	72°C	2 minuty

Tabulka 4.4: Nastavení PCR cyklu

Pro objem reakce 25 μ l	Složky reakce
200 ng	templátová DNA
0,5 μ l	dNTPs (10 μ M)
1 μ l	primer Fw (10 μ M)
1 μ l	primer Rv (10 μ M)
2,5 μ l	pufř
0,5 μ l	polymeráza
	ddH ₂ O

Tabulka 4.5: Složky PCR reakce

4.2.4.7 cPCR

Pro identifikaci požadovaného fragmentu v narostlých koloniích byla používána „colony“ PCR (cPCR). Narostlé kolonie byly přeneseny na novou plotnu a zároveň byla část dané kolonie převedena do 50 μ l ddH₂O. Takto připravené vzorky byly inkubovány 5 minut při 96°C a po vychladnutí byly zcentrifugovány při 14500 x g po dobu 5 minut. Poté byly 3 μ l supernatantu použity jako templát pro PCR reakci (o objemu 25 μ l).

4.2.4.8 Mutageneze

Cílená mutageneze pro zavedení mutace do genu pro VP1 v oblasti DE a EF smyčky probíhala podle protokolu ke komerční soupravě Q5 Site Directed Mutagenesis Kit (NEB). Cyklus na PCR cykleru při mutagenezi byl nastaven dle rozpisu v Tab. 4.6.

Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1x	98°C	3 minuty
25x	98°C	10 vteřin
	65°C	20 vteřin
	72°C pro DE mutaci 65°C pro EF mutaci	3,5 minuty
1x	72°C	2 minuty

Tabulka 4.6: Cyklus pro mutagenezi

4.2.5 Práce s tkáňovými kulturami

4.2.5.1 Pasážování savčích buněk 293TT

Buňky 293TT byly pěstovány v médiu DMEM se sérem a antibiotiky na Petriho miskách (PM) o průměru 10 cm. Buňky byly pěstovány v CO₂ inkubátoru s 5% atmosférou CO₂ při 37°C. Když byly buňky na misce konfluentní, bylo z PM odsáto médium a buňky byly opláchnuty 2 ml versenu. Po prokývání byl versen odsán a k buňkám byl přidán 1 ml trypsinu. Následovala inkubace po dobu 5 minut při 37°C. Po resuspendování buněk v přehřátém médiu byly buňky vysévány na nové misky o průměru 6 cm do celkového objemu 6 ml v poměru 1:8 až 1:10. Buňky byly obvykle pasážovány jednou za 3-4 dny v závislosti na jejich hustotě.

4.2.5.2 Transfekce savčích buněk 293TT

Buňky 293TT byly vždy 24 hodin před transfekcí pasážovány a vysety na PM o průměru 6 cm. Před transfekcí bylo ve zkumavce smícháno 600 µl DMEM bez séra s 6 µg plazmidové DNA a 12 µl TurboFect Transfection Reagens. Po inkubaci 20 minut při RT byla tato suspenze nakapána na vyseté buňky a po prokývání byly misky s buňkami uloženy do termostatu na 48 hodin (37°C, 5% CO₂). Zároveň byla připravena jedna miska transfekovaná plazmidem nesoucím gen pro GFP. Po 24 hodinách byla kontrolována účinnost transfekce na této kontrolní misce pomocí fluorescenčního mikroskopu. Poté následovalo sklizení transfekova-

ných buněk pomocí seškrabání buněk a centrifugace po dobu 7 minut při 650 x g. Získaný buněčný pelet byl zamražen a použit na izolaci PsVs.

4.2.6 Pasážování hmyzích buněk Sf9

Buňky Sf9 byly pěstovány v médiu TNM-FH s 10% FBS na PM o průměru 10 cm při 27°C. Když byly buňky na misce konfluentní, byly seškrabány, resuspendovány pipetou, odebrány a přeneseny na nové misky s médiem obvykle v poměru 1:4. Buňky byly obvykle pasážovány jednou za 3-4 dny v závislosti na jejich hustotě.

4.2.6.1 Infekce hmyzích buněk Sf9 rekombinantním bakulovirem

Konfluentně narostlé buňky Sf9 byly seškrabány ze tří PM o průměru 6 cm a převedeny na PM o průměru 15 cm s 5 ml bezsérového média. Po prokývání bylo médium odsáto a buňky pomocí 3 ml inokula infikovány. Následovala inkubace 1 hodinu při RT na kývačce. Po uplynutí inkubační doby bylo k buňkám přidáno médium s 10% FBS a buňky byly inkubovány při 27°C. Buňky byly sklizeny 72 hodin po infekci. Byly seškrabány do média, centrifugovány po dobu 7 minut při 650 x g. Supernatant lze použít pro další infekce jako inokulum, pelet byl promyt PBS a zamražen pro pozdější izolaci VLPs.

4.2.7 Práce s proteiny

4.2.7.1 SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAAGE)

Vzorky byly doředěny na objem 20 μ l pomocí 1x pufru B a smíchány v poměru 1:4 s 5x Laemmliho puftrem do celkového objemu 25 μ l. Pak byly vzorky povařeny po dobu 5 minut při 100°C v termobločku. Poté byly zcentrifugovány 2 minuty při 13 000 x g. Aparatura pro přípravu gelů pro SDS-PAAGE byla připravena vložení omytých skel a utěsněním. Poté byl mezi skla nalit 12% spodní gel (viz kapitola 4.1.4). Po 20 minutách, kdy spodní gel zpolymeroval, byl přidán 5% zaostřovací gel (viz kapitola 4.1.4) a vložen hřeben pro tvorbu jamek. Po dalších 20 minutách zpolymeroval i zaostřovací gel a skla s gely byla umístěna do aparatury na proteinovou elektroforézu (Hofer). Skla v aparatuře byla zalita Running puftrem (viz kapitola 4.1.4) a do jamek byl nanesen marker či vzorky.

Elektroforéza běžela po dobu 30 minut při napětí 80 V a poté po dobu 90 minut při 140 V. Poté bylo gel možné nabarvit nebo ho použít pro Western blot (viz kapitola 4.2.7.3). Barvení gelu probíhalo inkubací gelu v roztoku barvy Imperial Protein Stain tak, aby byl gel v barvě ponořen, po dobu 1 hodiny. Poté byl gel přesunut do ddH₂O na 1-2 hodiny.

4.2.7.2 Dot Blot

Vzorky (obvykle množství 1-5 μ l) byly nakapány na nitrocelulózovou membránu NC-45 (Serva). Po zaschnutí vzorků byla provedena detekce pomocí protilátek (viz kapitola 4.2.7.4)

4.2.7.3 Western Blot

Po SDS-PAAGE byly vzorky z polyakrylamidového gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu NC-45 (Serva) prostřednictvím tzv. blotovacího sendviče. Ten byl sestaven v následujícím pořadí: plastová mřížka, molitan, čtyři filtrační papíry, Whatman, polyakrylamidový gel se vzorky, nitrocelulózová membrána, Whatman, čtyři filtrační papíry, molitan a vrchní plastová mřížka. Všechny části byly v průběhu sestavování máčeny v Blotting pufru (viz kapitola 4.1.4). Sendvič byl předán do blotovací aparatury (BioRad) a následně byly proteiny přenášeny po dobu 2,5 hodiny při 250 mA. Následovala detekce pomocí protilátek (viz kapitola 4.2.7.4).

4.2.7.4 Imunologická detekce proteinů vizualizovaná pomocí chemiluminiscence

Nitrocelulózová membrána se zachycenými proteiny byla blokována půl hodiny v 5% (v/v) roztoku sušeného mléka v 1xPBS. Poté byla přidána primární protilátka ředěná v 5% (v/v) mléce a inkubována s membránou 1,5 hodiny. Membrána byla promyta 3x po dobu 10 minut v 1xPBS a následovalo přidání sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou, taktéž ředěnou v 5% (v/v) mléce. Po inkubaci byla membrána promyta 3x po dobu 10 minut v 1xPBS. Poté byla na membránu nalita směs vyvolávacích roztoků A a B a po inkubaci 30 vteřin byla

membrána ze směsi roztoků vyjmuta. Na membránu osušenou buničitou vatou byl přiložen RTG film na 5-15 vteřin. Záznam na filmu byl vyvolán postupným namáčením filmu do vývojky a ustalovače.

V případě potřeby byla chemiluminiscence membrány zhašena inkubací s 30% (v/v) H_2O_2 při 37°C po dobu 15 minut. Poté byla membrána důkladně promyta dH_2O a 1xPBS. Takto zhašená membrána byla znovu blokována v 5% (v/v) mléce a proteiny nanesené na membráně byly detekovány pomocí jiné sady protilátek.

4.2.7.5 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí fluorometru Qubit dle návodu od výrobce. Pro stanovení koncentrace byly používány roztoky ze soupravy Qubit Protein Assay kit (Invitrogen).

4.2.7.6 Izopyknická centrifugace v gradientu chloridu cesného

Pelet hmyzích buněk získaný 72 hodin po infekci byl resuspendován v 5 ml 1x pufru B. Buněčné stěny byly narušeny pomocí sonikace (3-4x 30 vteřin při 40% amplitudě s 45 vteřinovými pauzami mezi jednotlivými pulsy). Po sonikaci byly narušené buňky centrifugovány po dobu 30 minut při 4°C při 2 600 x g. Získaný supernatant byl převeden do ultracentrifugačních zkumavek a doplněn pufrům B do 8 g. K obsahu kyvety bylo přidáno 3,65 g chloridu cesného a obsah byl promíchán. Po promíchání se vzorek převrstvil parafínovým olejem Bayol F, zkumavky se vzorky byly umístěny do ultracentrifugačních kyvet, vyváženy proti sobě pomocí parafínového oleje a umístěny do rotoru SW41. Následovala centrifugace po dobu 20 hodin při 18°C a 151 263 x g. Po centrifugaci byl vzorek rozebrán s využitím rozebírače frakcí na zhruba 15 frakcí o objemu 0,5 ml. Pomocí refraktometru byl u každé frakce změřen refraktometrický index. Na základě hodnot refraktometrického indexu u proteinů a pomocí Dot Blotu, na kterém byla ověřena přítomnost VP1 (případně VP2 proteinu) byly frakce spojeny. Následovala dialýza do pufru B (viz kapitola 4.2.9.2), měření koncentrace proteinu (viz kapitola 4.2.7.5) a příprava elektronových sítěk (viz kapitola 4.2.9.3).

4.2.7.7 Izolace metodou OptiCs

Pelet savčích buněk získaný 48 hodin po transfekci byl resuspendován v 1,2 objemu peletu DPBS obohacené o 9,5mM MgCl₂. Po resuspendování byla přidána neuraminidáza na koncentraci 2 U/ml. Inkubace s neuraminidázou probíhala 30 minut při 37°C. Následovalo přidání 1/20 objemu 10% Tritonu X-100, 0,1% benzozóny a 1/40 objemu 1M síranu amonného o pH 9. Takto připravená suspenze byla inkubována po dobu 2 hodin při 37°C, během inkubace byla několikrát jemně promíchána převrácením zkumavky. Po inkubaci byl lyzát umístěn na led. Po uplynutí 5 minut bylo k lyzátu přidáno 0,17 objemu 5M NaCl (tak, aby výsledná koncentrace byla 850 mM) a směs se inkubovala 10 minut, stále na ledu. Po inkubaci byla směs centrifugována při 5000x g, při 4°C po dobu 5 minut. Získaný supernatant byl převeden do silikonovaných mikrocentrifugačních zkumavek a pelet byl resuspendován v 2x objemu pufru B a centrifugován při 4°C, 5 000x g po dobu 5 minut. Získaný supernatant byl přidán k předchozímu supernatantu v silikonované zkumavce a společně byly centrifugovány opět po dobu 5 minut při 4°C, 10 000x g. Supernatant byl poté připraven k ultracentrifugaci v gradientu cesium chloridu po dobu 20 hodin v rotoru SW41, 151 263 x g, 18°C. Příprava gradientu CsCl a následné rozebírání frakcí, dialýza a ověřování přítomnosti proteinu probíhalo dle protokolu (viz 4.2.7.6).

4.2.7.8 Izolace v dvouvrstvém gradientu chloridu cesného

Pelet savčích buněk získaný 48 hodin po transfekci byl resuspendován v 5 ml 1x pufru B. Buněčná stěna byla narušena přidáním 5 ml tetrachloroethylenu (TCE). Směs TCE, pufru B a vzorku byla promíchána důkladným protřepáním zkumavky. Následovala centrifugace při 650 x g a 18°C po dobu 40 minut. Vznikly dvě fáze, vodná fáze byla odebrána a znovu centrifugována (650 x g, 18°C, 10 minut). Mezitím byl připraven gradient CsCl. Do ultracentrifugační zkumavky bylo přidáno 2,5 ml CsCl o koncentraci 1,4 g/ml. Nad něj bylo opatrně navrstveno 2,5 ml CsCl o koncentraci 1,25 g/ml tak, aby se jednotlivé fáze nepromíchaly. Poté se do kyvety přidal vzorek v podobě vodné fáze získané centrifugací a následně byla zkumavka doplněna 1x pufrem B až po okraj. Mezi každou fází by měl být

rozpoznatelný předěl. Zkumavky se vzorky byly přesunuty do ultracentrifugačních kyvet, vyváženy proti sobě pomocí 1x pufru B a centrifugovány při 151 270 x g, 18°C po dobu 3 hodin v rotoru SW41. Rozebírání frakcí po centrifugaci, dialýza a ověřování přítomnosti proteinu probíhalo dle protokolu (viz 4.2.7.6). Tento postup byl inspirován protokolem používaným ve virologické laboratoři doktora Parkera (Cardiff University, UK) pro izolaci rekombinantních adenovirů.

4.2.7.9 Zakoncentrování VLPs centrifugací přes sacharózový polštář

Vzorek VLPs pod dialýze byl přenesen do ultracentrifugační kyvety a podvrstven 1,5 cm vrstvou 10% (w/w) sacharózy (Serva). Kyvety byly vyváženy proti sobě pomocí pufru B a centrifugovány v ultracentrifuze po dobu 3 hodin, při 4°C a 151 263 x g v rotoru SW41. Poté byl supernatant odsán a pelet byl při 4°C přes noc rozplaven v pufru B.

4.2.7.10 Dialýza

Jednotlivé frakce vzorků obsahující virové částice byly přeneseny do dialyzačního střeva (Serva). Dialyzační střevo byla připravena povařením v dH₂O po dobu 10 minut. Jednotlivé frakce byly v dialyzačním střevě odděleny svorkou. Takto připravená střevo se vzorky byla vložena do 1,5 litru 1x koncentrovaného pufru B. Po 30 minutách byl pufr B vyměněn za čerstvý a poté byly vzorky dialyzovány proti pufru B přes noc při 4°C pro zbavení se chloridu cesného po izolaci.

4.2.7.11 Elektronová mikroskopie

Pro přípravu mikroskopických sítěk byly nanесeny kapky v následujícím pořadí: jedna kapka 5 µl virové suspenze, dvě kapky 100 µl ddH₂O 50 µl, dvě kapky 2% kyseliny fosfowolframové, pH 7,3. Mikroskopické měděné sítky potažené parlodionovou pouhlikovanou membránou byly inkubovány s vzorkem virových částic 10 minut, poté na každé kapce vody 30 vteřin a následně na každé kapce kyseliny fosfowolframové 1 minutu. Po inkubaci byla ze sítky přebytečná tekutina odsáta filtračním papírem a sítky se nechaly doschnout při pokojové teplotě. Vzorky na sítkách byly vizualizovány pod elektronovým mikroskopem JEOL JEM 1200EX

za asistence magistry Alžběty Hejtmánkové.

4.2.8 Sérologické testy

Pro ověření séropozitivity testovaných sér byla využívána metoda ELISA a he-maglutinačně inhibiční test.

4.2.8.1 ELISA

Nejprve byly na 96-jamkovou mikrotitrační destičku byly přes noc ve 4°C kotve-ny částice VLPs nebo PsVs ředěné v 1% PBS (obvykle 50 ng/well). Po ukotvení částic byly jamky dvakrát promyty 1% PBS a následně bylo přidáno 200 μ l/well 5% (w/v) sušeného mléka v PBS. Následovalo blokování přes noc při 4°C. Po blokování byl obsah jamek odsán, dvakrát promyt 1% PBS a do příslušných jamek byla přidána séra ředěná v 2% (w/v) BSA v PBS. Následovala inkubace 1 hodinu při RT, poté obsah jamek odsát, dvakrát promyt 1% PBS + 0,1% (v/v) Tween. Poté byla přidána sekundární protilátka ředěná v 5% (w/v) sušeném mléce v PBS a následovala inkubace 30 minut při RT. Po inkubaci byl obsah jamek čtyřikrát promyt 1% PBS a následně bylo do každé jamky přidáno 100 μ l substrátu TMB-O. Následovala inkubace po dobu 15 minut při RT ve tmě. Po inkubaci došlo k zastavení reakce se substrátem pomocí 2M H₂SO₄ (100 μ l na jamku) a vy-hodnocení pomocí ELISA readeru. Testování avidity protilátek probíhalo výše popsaným způsobem, pouze bylo přidáno ošetření 6M ureou dle Rahbari et al. (2012). Konkrétně byla deska po inkubaci se sérem promyta 1% PBS + 0,1% Tween + 6M Urea. Po inkubaci se sekundární protilátkou byly jamky promývá-ny 1% PBS bez urey. Testování rychlosti vazby protilátek probíhalo standardně, pouze byla zkrácena doba inkubace se sérem a to místo 1 hodiny na 20 minut. Testování za různých pH (pH 8,8; 7,4 a 5,6) probíhalo dle protokolu popsaného výše s tím rozdílem, že jednotlivé komponenty byly ředěny v roztocích o přísluš-ném pH a zároveň byly jamky po inkubaci promývány roztoky o příslušném pH. Výchozí ředění králíčích sér bylo obvykle 1:500 a poté dále ředěno pětkovou řadou (1:2 500, 1:12 500, 1:62 500, 1:312 500). Výchozí ředění lidských sér bylo obvykle 1:100 a poté ředěno dvojkovou řadou (1:200, 1:400, 1:800, 1:1 600).

Pro část experimentů s mutantními pseudoviriony byly použity 1/2 ELISA 96-jamkové desky, kvůli nízké reaktivitě sér na klasických deskách. Provedení ELISA na 1/2 desce bylo standardní, pouze se používal dvakrát menší objem všech přidávaných komponent. Použití 1/2 desky je vždy uvedeno u daného grafu ve výsledkové části. Pokud není uvedeno jinak, byla pro ELISA použita klasická deska.

Výsledky byly měřeny pomocí ELISA readeru při vlnové délce 450 nm. Jako pozitivní reakce byla považována taková reakce, která měla nenulovou hodnotu při měření absorbance (OD při 450 nm) po odečtení absorbance získané u adekvátní negativní kontroly (tj. jamka bez antigenu, která prošla inkubací se stejně ředěnou primární i sekundární protilátkou).

4.2.8.2 Hemaglutinačně inhibiční test

4.2.8.2.1 Stanovení hematokritu

Ze zásobního roztoku krve bylo odebráno množství 1,5 ml, které bylo dvakrát promyto v 5 ml 0,2% (w/v) BSA v PBS pomocí centrifugace při 4°C, 650 x g po dobu 4 minut. Supernatant byl vždy po centrifugaci odsát. Po druhém promyvu byl pelet krvinek resuspendován v 1 ml 0,2% (w/v) BSA v PBS a suspenze byla zatavena do hematokritické kapiláry a centrifugována 5 minut, 650 x g, 4°C. Nakonec byl určen hematokrit: procento, které krvinky tvořily v celkovém objemu. Na základě hematokritu byla pak zásobní krev naředěna na koncentraci 0,5% v 0,2% (w/v) BSA v PBS.

4.2.8.2.2 Hemaglutinace

Hemaglutinačně inhibičnímu testu (HIA) vždy předcházela hemaglutinace (HA) pro ověření funkčnosti systému a zároveň pro stanovení hemaglutinačního titru. Po úvodní optimalizaci bylo rozhodnuto, že všechny následující hemaglutinace a HIA budou probíhat v kyselém pH (5,6) při pokojové teplotě s použitím morčecích krvinek naředěných na koncentraci 0,5% v 1% PBS o určeném pH. Na 96-jamkovou mikrotitrační destičku bylo nanášeno 0,2% (w/v) BSA v PBS, 50 µl na jamku. Poté byly nanášeny částice ředěné v 1% PBS na koncentraci 0,02 mg/ml, 50 µl na první jamku a následně ředěny dvojkovou řadou. Poté bylo při-

dáváno 50 μ l na jamku morčecích krvinek ředěných na koncentraci 0,5% v 0,2% (w/v) BSA v PBS (pH 5,6). Po inkubaci při pokojové teplotě zhruba 30 minut následovalo vyhodnocení. Jako pozitivní kontrola byly používány MPyV VLPs ředěné na $c=0,02$ mg/ml. Negativní kontrola obsahovala pouze 0,2% (w/v) BSA v PBS a krvinky. Vyhodnocení probíhá vizuálně. Pokud je v dané jamce dostatečný počet virových částic, tak tyto částice váží krvinky prostřednictvím VP1 proteinu přes kyselinu sialovou a aglutinují je do shluků. To se v jamce projeví jako růžový povlak. Naopak pokud je částic málo nebo vůbec nejsou přítomné, krvinky nic neváže a sedají si na dno jamky. To se projeví jako červená tečka na dně jamky. Hemaglutinační titr byl stanoven z pořadí jamky, ve které došlo k poslední aglutinaci krvinek virovými částicemi (n).

4.2.8.2.3 HIA

Pro hemaglutinačně inhibiční test bylo nanášeno 25 μ l 0,2% (w/v) BSA v PBS na jamku. Poté byla přidávána séra v různých ředěních, 25 μ l na jamku. Následovalo přidání částic, 25 μ l na jamku o koncentraci vypočítané na základě předchozí hemaglutinace. Obvykle se jednalo o koncentraci částic 0,156 μ g/ml. Po inkubaci na kývačce při pokojové teplotě po dobu 1,5 hodiny byly přidány morčecí krvinky o koncentraci 0,5%. Následovala inkubace při pokojové teplotě a po zhruba 30 minutách bylo možno test vyhodnotit. Jako pozitivní kontrola byly používány MPyV VLPs ředěné na $c=0,02$ mg/ml. Negativní kontrola obsahovala pouze 0,2% (w/v) BSA v PBS a krvinky. Vyhodnocení probíhá vizuálně, v případě, že na dně jamky vidíme červenou tečku, znamená to, že k došlo k inhibici hemaglutinace a protilátky jsou přítomny v séru. Pokud vidíme růžové zřetězení krvinek, znamená to, že protilátky se v séru nenachází.

4.2.8.2.4 Inaktivace sér

Byly otestovány tři různé způsoby inaktivace sér. Jeden z alikvótů byl inaktivován 1 hodinu při 56°C. Do druhého byla přidána Neuraminidáza V (Sigma N2876, $c=25$ U/ml), naředěna pomocí dH₂O na koncentraci 2 U/ml. Poté byly vzorky s neuraminidázou inkubovány přes noc při teplotě 37°C a poté inaktivovány při 56°C 1 hodinu, dle protokolu od Gardner et al. (1971). Poslední alikvót

byl inaktivován následovně: K 1 objemu séra byl přidán 1 objem 0,4% trypsinu (w/v, ředěno v 1% PBS). Následovala inkubace 30 minut při 56°C, postup dle Neel et al. (1996). Po vychladnutí byly ke vzorkům přidány 3 objemy 0,01M jodistanu draselného (KIO₄). Po inkubaci 30 minut při pokojové teplotě byl KIO₄ inaktivován přidáním 3 objemů 1% glycerolu (v/v v 1% PBS). Vzorky byly poté inkubovány 1 hodinu při 4°C (Kim et al. 2012).

5. Výsledky

Cílem této práce bylo optimalizovat nové způsoby testování subtypově specifické reaktivity protilátek proti BKV a připravit nové antigeny, které by přispěly k popsání epitopů důležitých pro vazbu těchto protilátek. Pro optimalizaci sérologického testování rozlišujícího sérotypy BKV I a BKV IV pomocí hemaglutinačně inhibičního testu bylo potřeba modifikovat podmínky, při kterých testování probíhá. Pro analýzu interakcí sérových protilátek s BKV subtypy I a IV byla provedena cílená mutageneze majoritního kapsidového proteinu VP1. Vzhledem k tomu, že se v rámci předchozího projektu (Sekavová 2017) nepodařilo odhalit kritická místa interakcí ve variabilní BC smyčce VP1, zaměřila se tato práce na dvě oblasti proteinu, které nesou aminokyseliny specifické pro daný subtyp: vysoce imunogenní DE smyčka a EF smyčka. VP1 gen subtypu IV byl modifikován jen v těchto oblastech a to tak, aby na pozadí VP1 odvozeného od BKV IV subtypu byla sekvence aminokyselin v oblasti DE nebo EF smyčky byla shodná se sekvencí aminokyselin subtypu I. Po cílené mutagenezi byly připraveny dva typy částic. Jedny s mutací v DE smyčce, konkrétně se záměnou asparaginu za histidin na pozici 139 (N139H) a druhé se dvěma záměnami v EF smyčce, konkrétně záměna kyseliny glutamové za kyselinu asparagovou na pozici 175 (E175D) a záměna valinu za izoleucin (V178I) (Obr. 5.1). Reaktivita částic s mutací v EF nebo DE smyčce byla otestována pomocí ELISA s využitím precharakterizovaných lidských sér a hyperimunních králičích sér. Mutantní částice byly produkovány jako pseudoviriony (PsVs) v savčím expresním systému. Pomocí savčího expresního systému byly připraveny i PsVs tvořené nemutovaným VP1 proteinem subtypu I a subtypu IV. Tyto PsVs nenesou žádný reportérový gen, jako bývá často při produkci PsVs zvykem. Součástí projektu byla i analýza vlivu VP2 proteinu na reaktivitu protilátek. Proto byly připraveny PsVs kombinující majoritní kapsidový protein VP1 (odvozen od subtypu BKV IV) s minoritním proteinem VP2 subtypu IV. PsVs byly používány z důvodu rychlejší produkce částic pomocí savčího expresního systému, jelikož je možno savčí buňky rovnou transfekovat plazmidem nesoucím požadovaný gen. Pro produkci mutantních VLPs by bylo potřeba připravit rekombinantní bakulovirus s požadovaným genem, jehož příprava je časově

náročnější. V laboratoři však byly k dispozici VLPs tvořené VP1 proteinem subtypu BKV IV a zároveň bylo k dispozici inokulum s rekombinantním bakulovirem exprimujícím VP1 protein subtypu I. Proto byly pro porovnání reaktivity s PsVs použity dva druhy VLPs (jedny tvořené BKV I a druhé tvořené BKV IV VP1). Pomocí ELISA testu bylo testováno, zda je reaktivita protilátek s PsVs a VLPs srovnatelná.

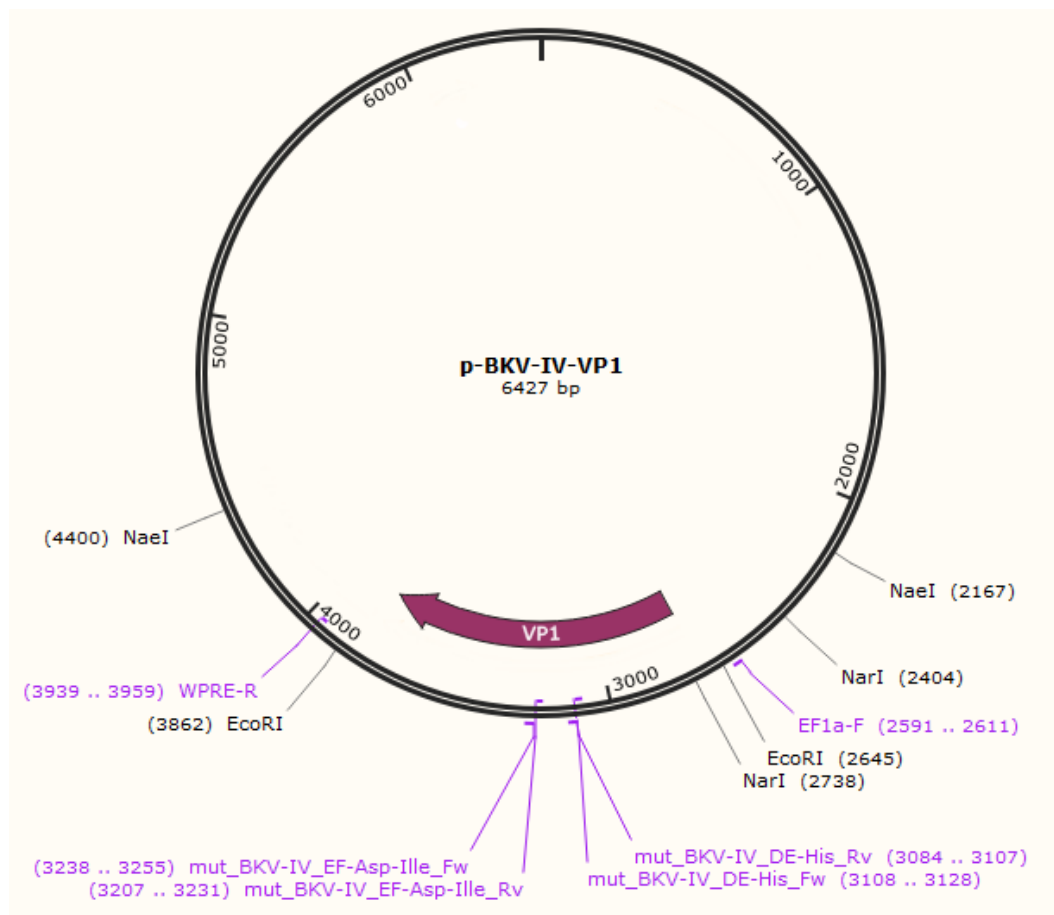
```

Smyčky      <      DE      >      <      EF
BKV-I  IGITSMLNLHAGSQKVHEHGGGKPIQGSNFHFFAVGGDPLEMQGVLMNVRTKYPDGTITP
BKV-IV IGITSMLNLHAGSQKVHEENGGGKPIQGSNFHFFAVGGDPLEMQGVLMNVRTKYPEGTVTP
          ↑
Smyčky      EF      >
BKV-I  KNPTAQSQVMNTDHKAYLDKNNAYPVECWVPDPSRNENTRYFGTFTGGENVPPVLHVTNT
BKV-IV KNPTAQSQVMNTDHKAYLDKNNAYPVECWIPDPSXNENTRYFGTYTGGENVPPVLHVTNT

```

Obrázek 5.1: Smyčky EF a DE VP1 proteinu BKV

Alignment části VP1 proteinu, červeně jsou vyznačeny rozdílné aminokyseliny pro subtyp I a IV v EF a DE smyčce. Červenými šipkami jsou označeny ty aminokyseliny, které budou u subtypu BKV IV nahrazeny pomocí mutagenese za aminokyselinu nacházející se na daném místě v sekvenci subtypu I.



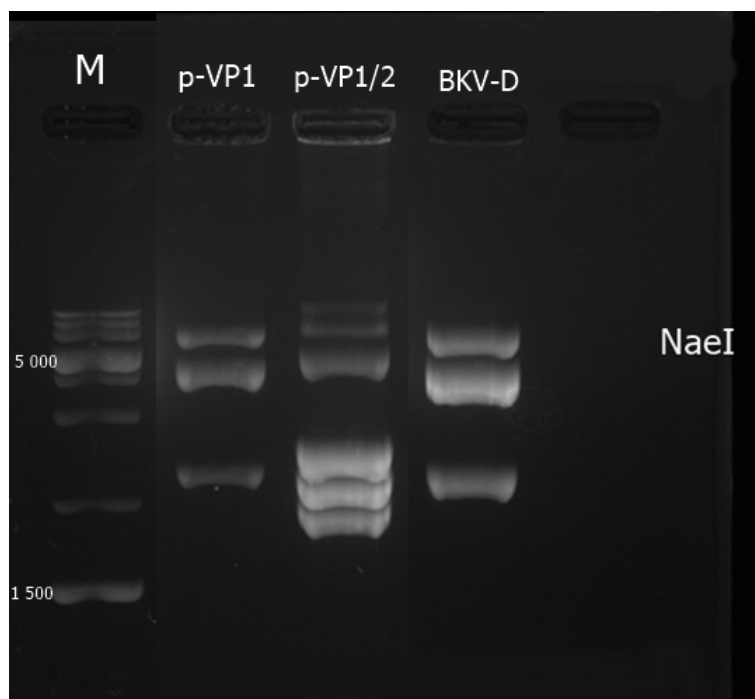
Obrázek 5.2: Zjednodušená mapa plazmidu pBKV-IV-VP1

Plazmid sloužil jako vstupní materiál pro mutagenezi a jako templát pro překlonoání. Vytvořeno v programu SnapGene.

5.1 Izolace plazmidů pro produkci částic

Pro produkci pseudovirionů a zároveň jako templát pro mutagenezi bylo potřeba vyzolovat plazmidy, jejichž identita byla následně ověřena restričním štěpením a sekvenací. Použit byl plazmid nesoucí gen pro majoritní kapsidový protein VP1 subtypu BKV IV (pBKV-IV-VP1, Obr. 5.2), plazmid nesoucí geny pro VP1 a minoritní protein VP2 subtypu BKV IV (pBKV-VP1/2) a plazmid nesoucí gen pro VP1 protein subtypu BKV I (označen jako BKV-D, obdržen od RNDr. Martiny Salákové, Ph.D.). Pro mutagenezi byl jako templát využit plazmid s genem pro VP1 protein subtypu IV (p-VP1). Na obrázku 5.3 lze vidět, že fragmenty získané restričním štěpením pomocí enzymu NaeI odpovídají očekávaným fragmentům. Délka plazmidů byla v pořádku a sekvenace pomocí primerů EF1a-Fw a WPRE-

Rv potvrdila, že plazmid nese celý VP1 protein o správné sekvenci. Plazmidy tedy mohly být použity pro transfekci buněk 293TT a jako templát pro další pokusy.



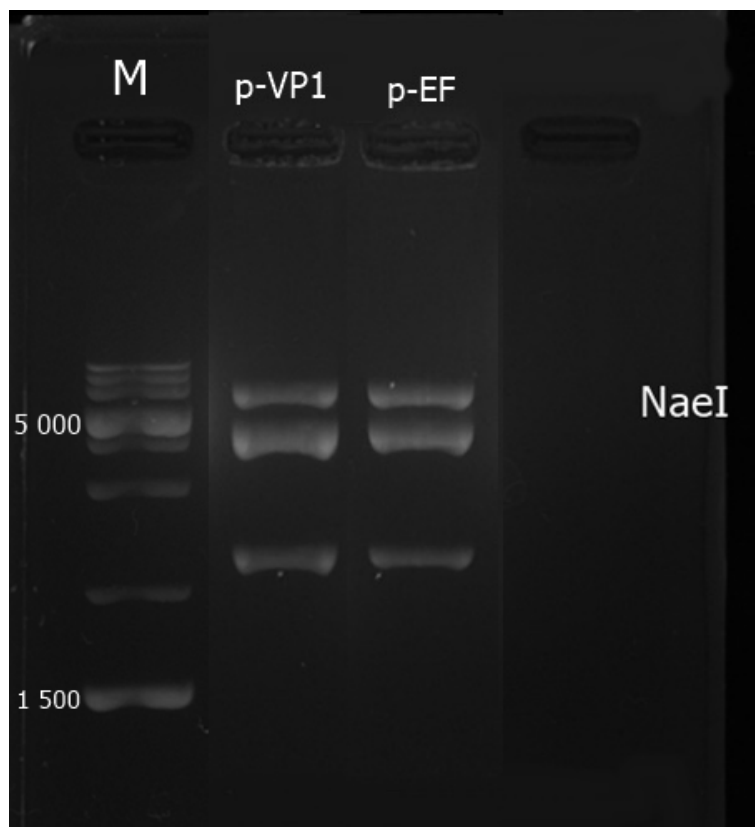
Obrázek 5.3: Restrikční štěpení plazmidů enzymem NaeI

Štěpeny byly plazmidy p-VP1 (plazmid nesoucí gen pro VP1 protein subtypu IV), p-VP1/2 (plazmid nesoucí gen pro VP1 a VP2 protein subtypu IV) a BKV-D (plazmid nesoucí gen pro VP1 protein subtypu I). Očekávané fragmenty jsou pro p-VP1 2 233 bp a 4 194 bp, pro p-VP1/2 1 999 bp, 2 233 bp a 2 514 bp. Pro plazmid BKV-D 2 247 bp a 4 195 bp.

5.2 Mutagenese

Cílem mutagenese VP1 genu bylo zavedení mutace do oblasti dvou smyček proteinu VP1 tak, aby aminokyseliny na povrchu kapsidy v dané smyčce subtypu IV byly identické se sekvencí aminokyselin subtypu I. Cílená mutagenese probíhala pomocí komerční soupravy Q5 Site Directed Mutagenesis a jako templát byl do reakce použit plazmid nesoucí gen pro VP1 protein subtypu IV. Primery byly navrženy dle pokynů výrobce a zkontrolovány pomocí software doporučeného výrobcem v návodu k soupravě. Substituce dvou aminokyselin v EF smyčce proběhla bez problémů, hned při první mutagenesi se podařilo získat plazmid odpovídající

délky (Obr. 5.4) se správnou mutací (ověřeno pomocí sekvenace a restriktivního štěpení). Zavedení substituce jedné aminokyseliny v DE smyčce bylo problematické. Docházelo buď ke vzniku zkrácených plazmidů (Obr. 5.5 a Obr.5.6), které obvykle nesly požadovanou mutaci, nebo vznikaly nezkrácené plazmidy, které ale mutaci v DE smyčce neobsahovaly (Obr.5.6).

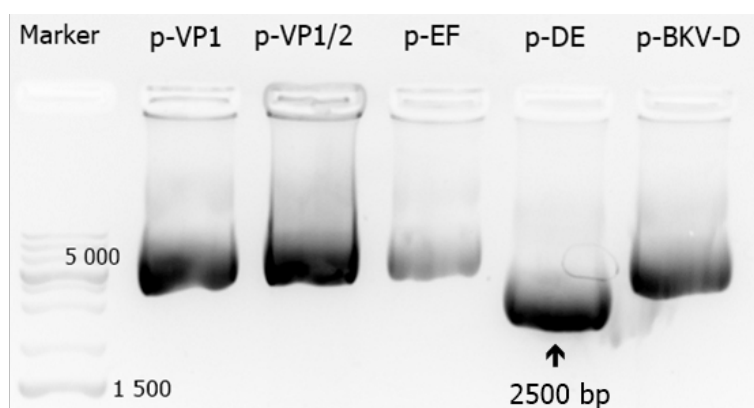


Obrázek 5.4: Restriktivní štěpení plazmidů enzymem NaeI

Štěpení plazmidů p-VP1 a p-EF (plazmid nesoucí mutaci v EF smyčce) enzymem NaeI. Očekávané fragmenty jsou 2 233 bp a 4 194 bp.

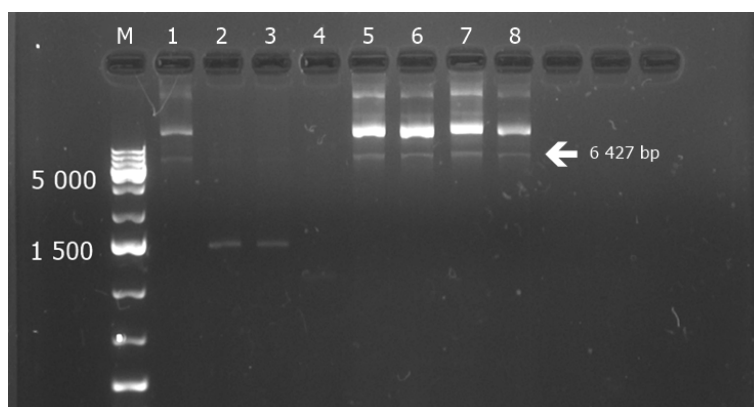
Pro detailnější analýzu zkráceného plazmidu s DE mutací bylo provedeno restriktivní štěpení s enzymem NaeI a NarI (Obr. 5.7). Na fotce gelu je patrné, že plazmid nesoucí DE mutaci je opravdu kratší a fragmenty nejsou identické jako ty pro p-BKV-IV-VP1, p-BKV-IV-EF a BKV-D, což by měly být.

Mutageneze byla několikrát neúspěšně opakována, proto jsem se chtěla pokusit překlonoval část s mutací v DE smyčce ze zkráceného plazmidu do původního plazmidu pBKV-IV-VP1. Pro překlonování bylo navrženo využití restriktivních míst enzymu EcoRI, která se v plazmidu nacházejí před a za genem VP1 (Obr.



Obrázek 5.5: Kontrola neštěpených plazmidů

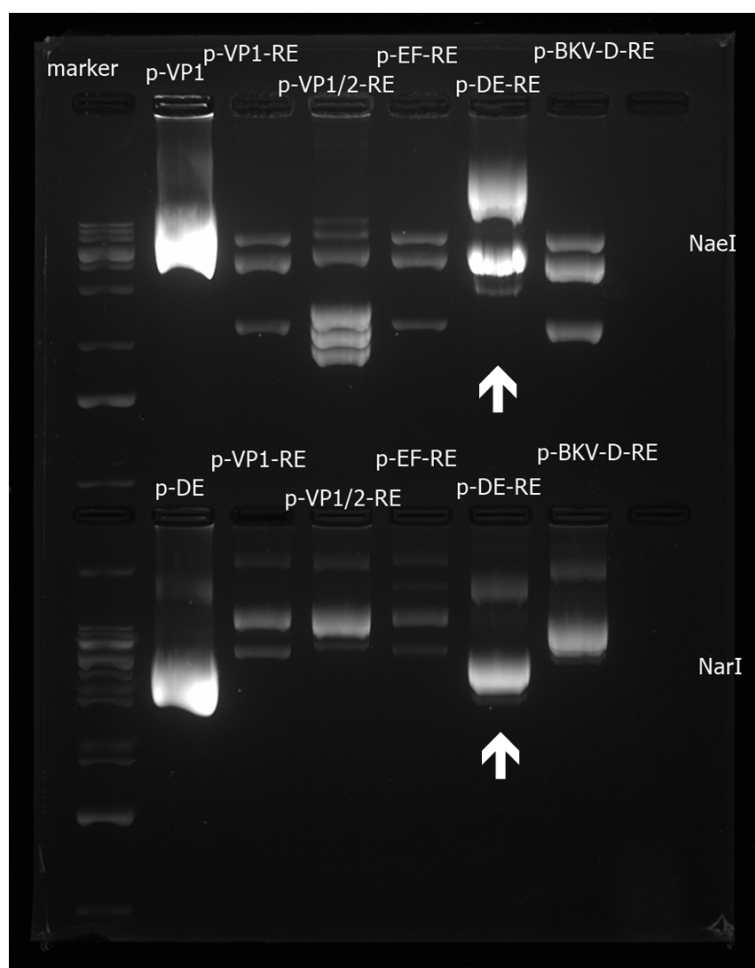
Kontrola délky neštěpených plazmidů používaných pro transfekci a následnou produkci pseudovirionů. Plazmid s mutací v DE smyčce je výrazně kratší než ostatní plazmidy.



Obrázek 5.6: Kontrola délky plazmidů s DE mutací

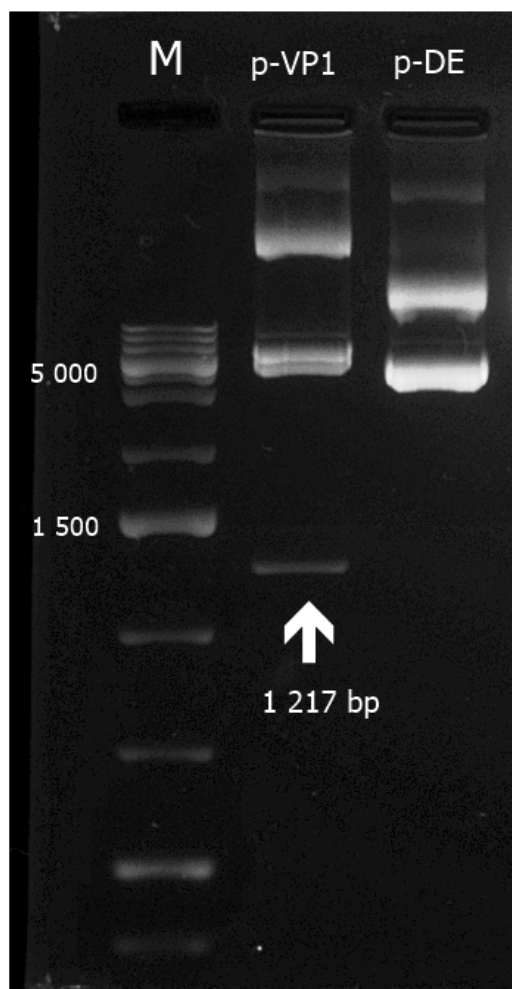
Příklad vizualizace plazmidů získaných po izolaci z 8 kolonií vzniklých po transformaci konstruktů po mutagenезi v oblasti kódující DE smyčky VP1 proteinu. Vzorky v liniích 2-3 obsahovaly zkrácenou formu plazmidu. Následná sekvenace ostatních nezkrácených vzorků prokázala, že izoláty požadovanou mutaci neobsahují.

5.2). Tímto enzymem byly štěpeny oba plazmidy, tedy zkrácený plazmid s mutací v DE smyčce a nemutovaný plazmid. Očekávaný fragment měl mít délku 1 217 párů bazí (Obr. 5.8). Tento fragment byl přítomen jen u pBKV-IV-VP1, u zkráceného plazmidu ne. To znamená, že plazmid byl zkrácen ještě před restrikním místem pro EcoRI. Jiné restrikní místo vhodné pro vyštěpení a překlonování mutovaného úseku se v plazmidu nenachází.



Obrázek 5.7: Restriční štěpení plazmidů

Na horní polovině gelu jsou plazmidy štěpené enzymem *NaeI*, na spodní polovině plazmidy štěpené enzymem *NarI*. Plazmidy štěpené daným enzymem mají v popisku koncovku *RE*, neštěpené plazmidy tuto koncovku nemají. Šipkou je označeno štěpení plazmidu s *DE* mutací, které neodpovídá očekávaným fragmentům a značí rozdílnou délku plazmidu. Očekávané fragmenty pro enzym *NaeI* s plazmidy *p-BKV-IV-VP1*, *p-BKV-IV-EF* mut. a *p-BKV-IV-DE* mut. jsou 2 233 bp a 4 194 bp. Pro plazmid *p-BKV-IV-VP1/2* byly očekávané fragmenty 1 999 bp, 2 233 bp a 2 514 bp. Pro plazmid *BKV-D* (nesoucí gen pro *VP1* subtypu *BKV I*) 2 247 bp a 4 195 bp. Očekávané fragmenty s enzymem *NarI* jsou pro jednotlivé plazmidy následující: *p-BKV-IV-VP1*, *p-BKV-IV-EF* mut. a *p-BKV-IV-DE* mut. 334 bp a 6 093 bp, *p-BKV-IV-VP1/2* 334 bp, 1 478 bp a 4 934 bp a pro *BKV-D* 348 bp a 6 094 bp.

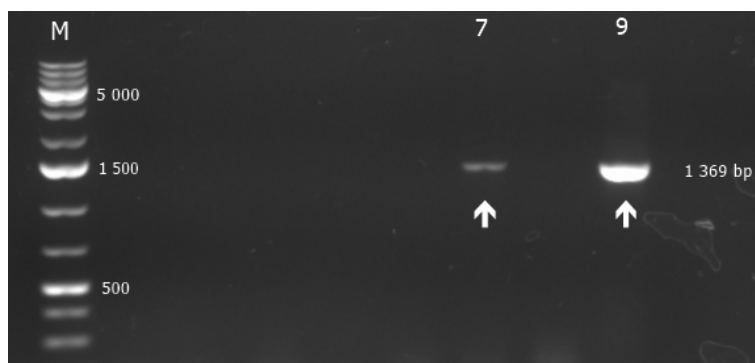


Obrázek 5.8: Pokus o překlonoání DE mutace

Pokus o překlonoání DE mutace ze zkráceného plazmidu do nemutovaného nezkráceného templátu. Oba plazmidy štěpeny EcoRI. Fragment 1 217 bp by měl být přítomný u obou plazmidů.

Po neúspěšném pokusu o překlonoání mutace v DE smyčce byly objednány nové primery, které byly přečištěné (místo původních odsolených primerů byly objednány primery přečištěné pro SDS-PAAGE). Také byla využita efektivnější metoda pro kontrolu, zda je ve vzorku přítomen amplifikovaný úsek z kolonií vzniklých po mutagenезi a to sice tzv. „Colony PCR“ (cPCR). Tato metoda umožnila kontrolu plazmidů odebraných z mnoha kolonií bez nutnosti izolace plazmidu. Pro cPCR byly jako primery použity EF1a-Fw a WPRE-Rv, které měly amplifikovat fragment v délce 1 369 párů bazí a primer EF1a-Fw nasedal do místa, které bývalo u zkrácených plazmidů obvykle deletováno (Obr. 5.2).

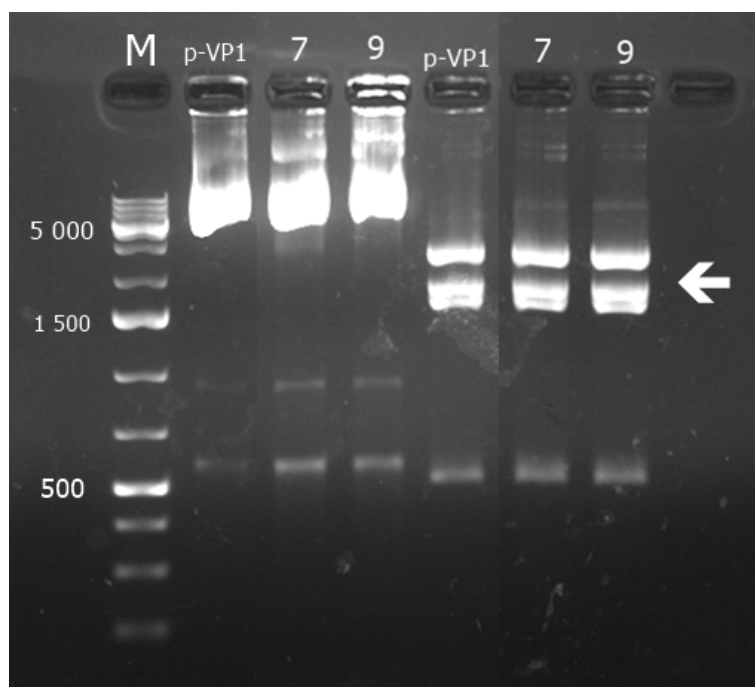
Správně dlouhý fragment se podařilo najít u plazmidů ze dvou kolonií číslo 7 a 9 (Obr. 5.9 – izoláty z kolonií číslo 7 a 9). Z těchto kolonií byl následně izolován plazmid. Dodatečné restriční štěpení potvrdilo, že oba plazmidy mají správnou délku (Obr. 5.10), a sekvenace ověřila, že plazmidy izolované z kolonií 7 a 9 nesou požadovanou mutaci v DE smyčce.



Obrázek 5.9: Colony PCR

Kolonie č.7 a 9 mají správnou délku fragmentu (1 369 bp), amplifikovaného primery EF1a-Fw + WPRE-Rv.

V momentě, kdy byly k dispozici všechny potřebné plazmidy, jsem mohla přistoupit k transfekci buněk 293TT a izolaci částic.



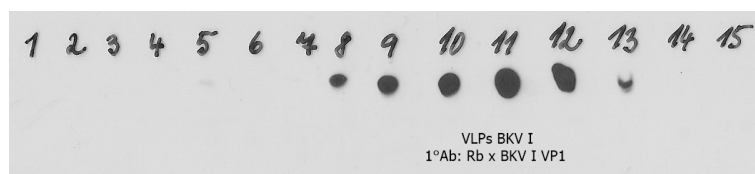
Obrázek 5.10: Restriční štěpení plazmidů po Colony PCR

Restriční štěpení plazmidů izolovaných z kolonií 7 a 9 po colony PCR. Štěpeno enzymem PstI. Očekávané fragmenty: Pro neštěpené plazmidy: 6 427 bp, štěpené PstI: 505 bp, 1 574 bp, 1 774 bp, 2 574 bp. Pro p-VP1/2: neštěpený: 6746 bp , štěpený: 505 bp, 1574 bp, 2093 bp, 2574 bp. Šipkou jsou označeny fragmenty, jejichž porovnání nás zajímalo a mají být identické. Jako kontrola slouží plazmid p-VP1.

5.3 Izolace částic

Pro přípravu antigenů pro ELISA a HIA byly produkovány dva typy částic. Virům podobné částice (VLPs) byly produkovány pomocí bakulovirového expresního systému a pseudoviriony (PsVs) pomocí savčího expresního systému. Z buněk byly částice izolovány pomocí tří metod. VLPs byly izolovány v gradientu CsCl, při kterém se pro lýzi buněk používala sonikace (viz metody, kapitola 4.2.7.6). Touto metodou byly izolovány VLPs tvořené VP1 proteinem BKV I (Obr. 5.12). VLPs tvořené proteinem VP1 BKV IV (Obr. 5.12) byly v laboratoři již k dispozici (izolovány Alžbětou Hejtmánkovou). Vzhledem k tomu, že tyto částice byly izolovány protokolem zahrnujícím sonikaci, izolovala jsem VLPs I stejným protokolem, aby výsledky sérologického testování s těmito dvěma antigeny byly srovn-

natelné. Izolace PsVs odvozených od BKV nebyla v laboratoři zavedena a proto bylo vyzkoušeno několik izolačních postupů. Publikovaný protokol dle Buck et al. (2004) využívá pro purifikaci OptiPrep™ (60% (w/v) roztok iodixanolu ve vodě), který podle našich zkušeností nelze efektivně odstranit z preparací a snižuje vazbu částic na ELISA desky (Kojzarová, nepublikované výsledky). Proto jsem se rozhodla modifikovat tento postup podle již vyzkoušeného přístupu a využila tzv. OptiCs protokol (Sekavová 2017) nebo vyzkoušet izolaci v dvouvrstevném gradientu CsCl, u které přecházela centrifugaci lýze buněk pomocí tetrachloroethyleny (viz metody, kapitola 4.2.9). Při OptiCs metodě jsou buňky lyzovány Tritonem-X 100 v kombinaci s neuraminidázou, síranem amonným a benzonázou (viz metody, kapitola 4.2.8). Pro ověření přítomnosti proteinu VP1 ve frakcích po izolaci byl proveden DotBlot. Pro analýzu kvality vyizolovaného materiálu byly zhotoveny elektronmikroskopické snímky sloučených frakcí po dialýze do pufru B (případně Western Blot, pokud byl dostatek materiálu). Koncentrace materiálu byla změřena pomocí přístroje Qubit.



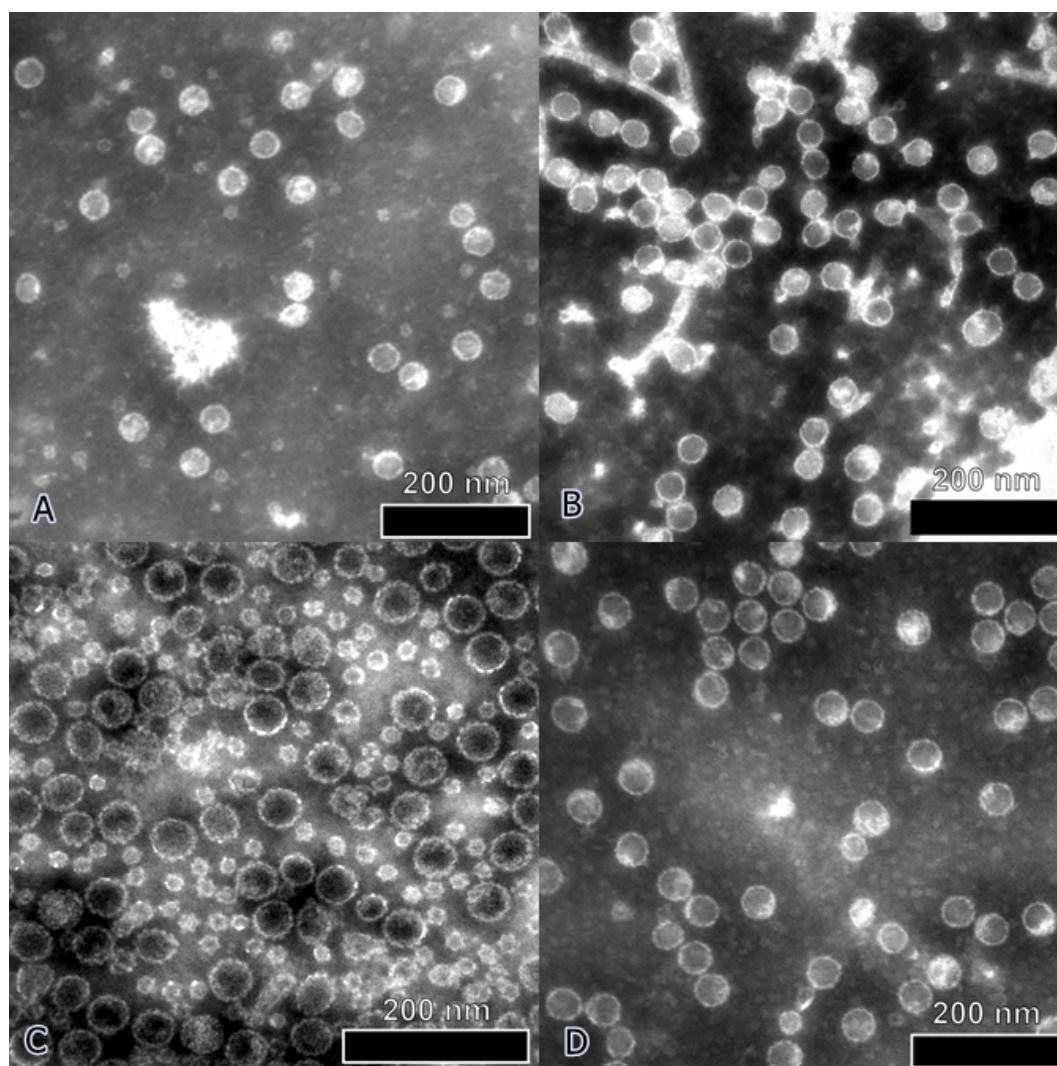
Obrázek 5.11: Izolace VLPs

DotBlot pro ověření přítomnosti proteinu VP1 ve frakcích obsahujících částice VLPs I. Použita králičí protilátka proti BKV I.

OptiCs protokol se již dříve v naší laboratoři velmi osvědčil pro izolaci BKV VLPs (Sekavová 2017). Ukázalo se, že pro BKV PsVs tento postup izolace není ideální. Na fotografiích z elektronového mikroskopu bylo nalezeno jen pár částic v řádu jednotek ve dvou vzorcích, zbytek vzorků obsahoval hlavně rozpadlý protein VP1 a pravděpodobně buněčné proteiny (Obr. 5.13).

OptiCs protokol sice nezajistil izolaci intaktních částic, ale materiálu byl dostatek, proto bylo možné provést jako kontrolu Western Blot (Obr. 5.14). Pomocí králičí protilátky proti VP1 SV40 bylo ověřeno, že VP1 protein je opravdu přítomný.

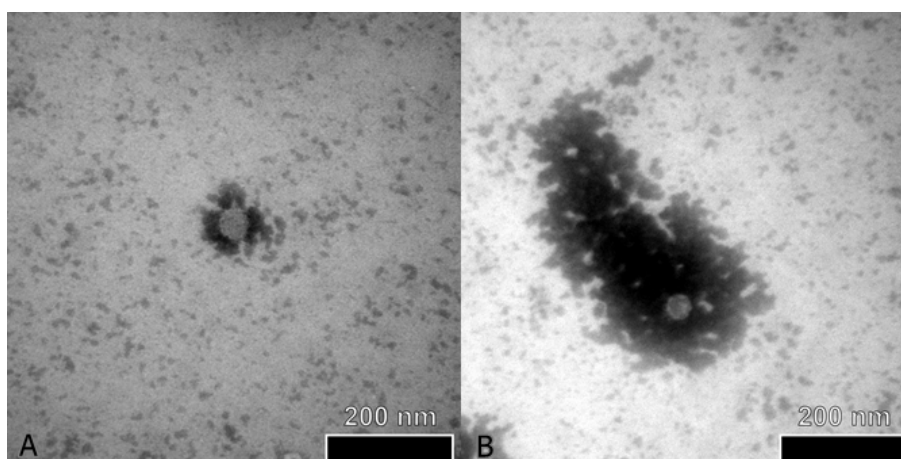
Vzhledem k neuspokojivým výsledkům izolace OptiCs byla využita izolace



Obrázek 5.12: Fotografie VLPs I a VLPs IV

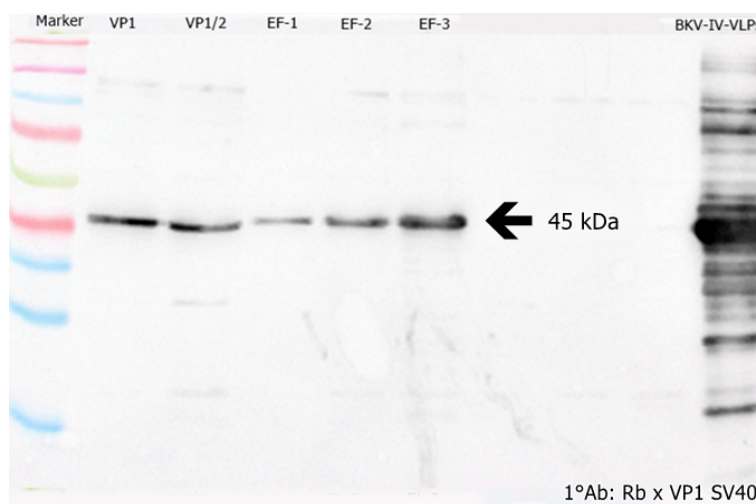
A= VLPs I, frakce č.1, produkovány pomocí bakulovirového expresního systému, izolovány v gradientu CsCl, kterému předcházela sonikace buněk. Používány na HA, HIA a optimalizaci ELISA; B= VLPs I, frakce č.2, produkovány pomocí bakulovirového expresního systému, izolovány v gradientu CsCl, kterému předcházela sonikace. Používány na závěrečné testování všech antigenů na ELISA; C= BKV IV VLPs, frakce č.3, používány na závěrečné testování všech antigenů na ELISA. Izolovány Alžbětou Hejtmánkovou; D= VLPs IV, frakce č.1, používány na HA, HIA a optimalizaci ELISA, izolovány Alžbětou Hejtmánkovou.

ve dvouvrstevném gradientu CsCl. První otestování probíhalo podle postupu uvedeném v metodách, kapitola 4.2.7.8. Po vyjmutí z centrifugy byly z kvyety pomocí



Obrázek 5.13: Fotografie PsVs izolovaných pomocí OptiCs metody

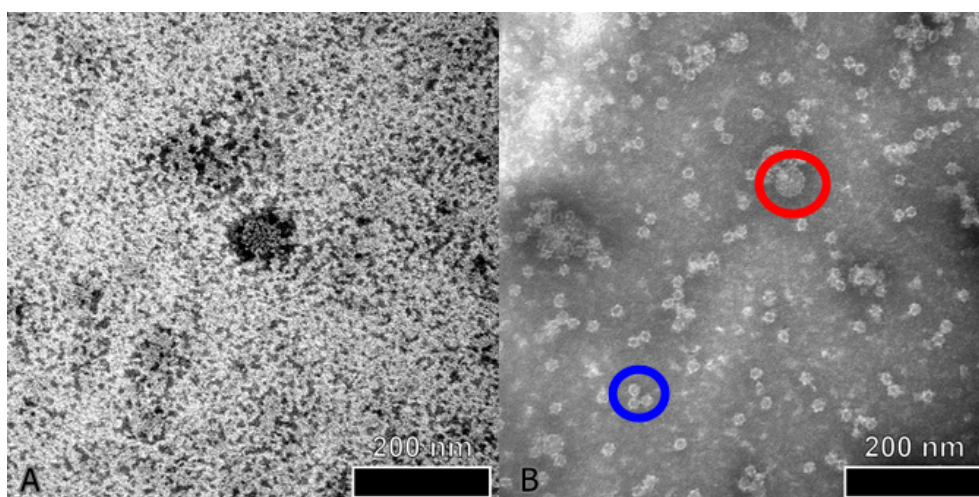
A = PsVs IV; B = PsVs s EF mutací, OptiCs izolace.



Obrázek 5.14: Membrána po Western Blottu

Western Blot po OptiCs izolaci. Použitá primární protilátka: Králíčí proti VP1 SV40. VP1 = PsVs IV, 2.frakce, VP1/2 = PsVs VP1/2, 2.frakce, EF = PsVs s mutací v EF smyčce, všechny 3 dostupné frakce. U všech testovaných vzorků by měl být signál v místě, kde marker značí velikost 45 kDa. Jako pozitivní kontrola sloužily VLPs IV.

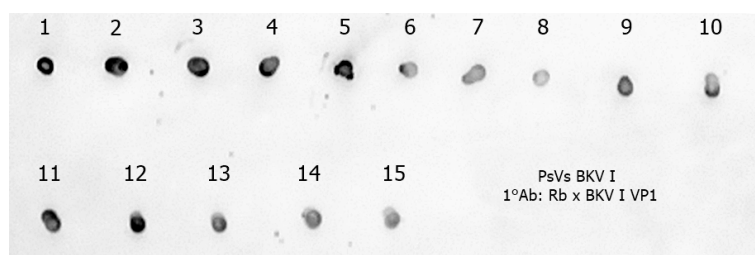
injekční stříkačky vypíchnuty a nasáty dva proužky. Vzhledem k tomu, že v dolním proužku byly přítomny hlavně malé částice (tzv. „tiny conformation“, Obr. 5.15) a tento protokol byl pro PsVs odvozené od BKV využíván vůbec poprvé, bylo pro další izolace rozhodnuto proužky nevypichovat a místo toho použít rozebírač frakcí.



Obrázek 5.15: Izolace PsVs v dvouvrstevném gradientu CsCl

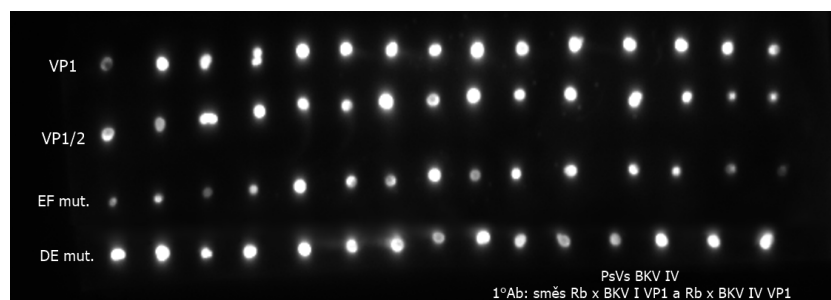
PsVs IV, produkovány savčím expresním systémem, izolovány ve dvouvrstevném gradientu CsCl, po centrifugaci vypichovány proužky. A= materiál nacházející se v horním proužku; B= materiál nacházející se v dolním proužku. Modře jsou označeny malé částice, tzv. „tiny conformation“. Červeně je označena intaktní částice obvyklé velikosti.

Další izolace v dvouvrstevném gradientu CsCl probíhala po centrifugaci dle protokolu zahrnujícího rozebrání frakcí (kapitola 4.2.7.6). Nahrazení vypichování proužků rozebráním na frakce umožnilo zachytit kromě malých částic v „tiny“ konformaci i klasické velké intaktní částice (Obr. 5.18). Přítomnost VP1 proteinu byla ověřena pomocí DotBlotu (Obr. 5.16 a Obr. 5.17).



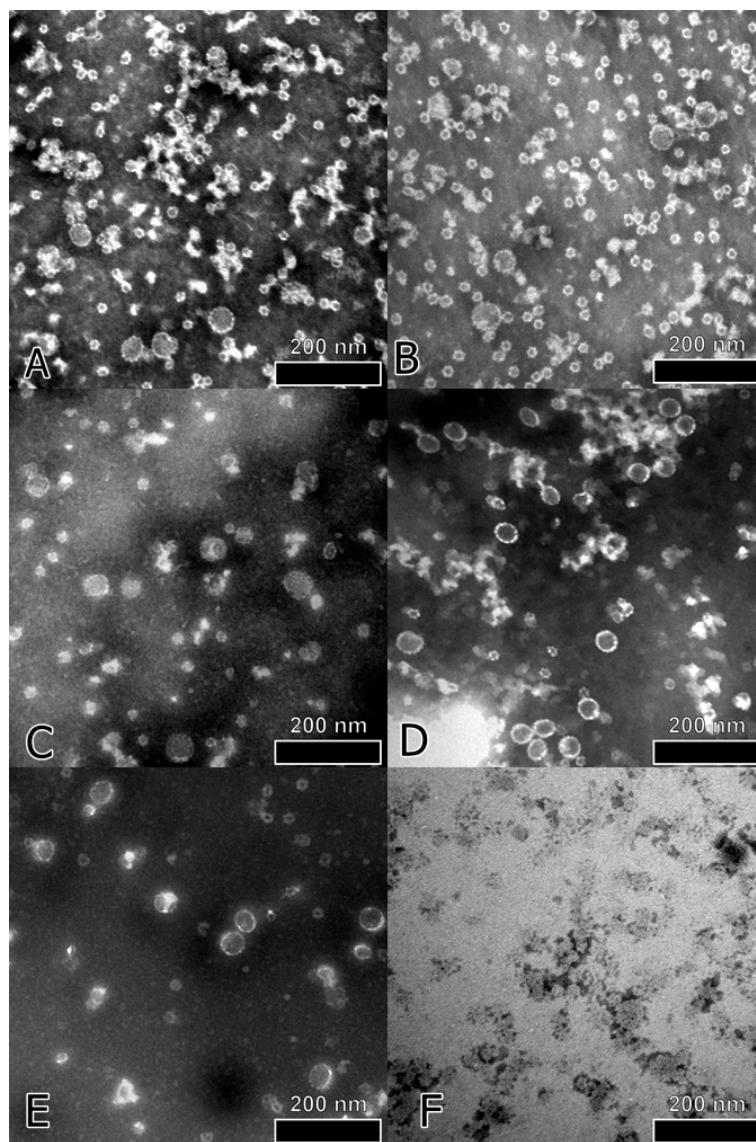
Obrázek 5.16: Izolace PsVs v dvouvrstevném gradientu CsCl

Ověření přítomnosti proteinu VP1 ve frakcích po izolaci PsVs I. Jako primární protilátka byla použita králičí proti BKV I, ředěna 1:500.



Obrázek 5.17: Izolace PsVs v douvrstvě gradientu CsCl

Ověření přítomnosti proteinu VP1 ve frakcích po izolaci PsVs IV obsahující VP1 a VP1/2 protein a po izolaci mutantních částic. Jako primární protilátka byla použita směs králíčích proti BKV I (ředěna 1:1 500) a BKV IV (ředěna 1:5 000), smíchaný v poměru 1:1.



Obrázek 5.18: Izolace PsVs v douvrstvěném gradientu CsCl

A=PsVs IV VP1; B= PsVs IV VP1/2; C= PsVs I VP1; D= PsVs s mutací v EF smyčce E= PsVs s mutací v DE smyčce, ředěné 1:10; F= PsVs s mutací v DE smyčce, neředěné.

Protože na fotce neředitelného vzorku obsahujícího PsVs s mutací v DE smyčce bylo příliš mnoho materiálu a nebylo možno dobře identifikovat částice, byl vzorek naředěn 1:10 (Obr. 5.18, fotky E a F).

Izolace v dvouvrstevném gradientu CsCl se pro BKV PsVs osvědčila, bohužel jsou ale výtěžky nižší, než při OptiCs izolaci. Proto nebylo možné provést Western Blot, jelikož bylo přednější využít materiál pro testování na ELISA.

Typ částic	Typ izolace	Výtěžek	Kvalita	Typ buněk
VLPs I	Sonikace + CsCl gradient	500 µg	intaktní částice	Sf9
VLPs IV	Sonikace + CsCl gradient	468 µg	intaktní částice	Sf9
PsVs I	Tetrachloroethylen + dvouvrstvý CsCl gradient	187 µg	intaktní částice + „tiny conformation“	293TT
PsVs IV	Tetrachloroethylen + dvouvrstvý CsCl gradient	162 µg	intaktní částice + „tiny conformation“	293TT
PsVs IV VP1/2	Tetrachloroethylen + dvouvrstvý CsCl gradient	207 µg	intaktní částice + „tiny conformation“	293TT
PsVs EF	Tetrachloroethylen + dvouvrstvý CsCl gradient	172 µg	intaktní částice + „tiny conformation“	293TT
PsVs DE	Tetrachloroethylen + dvouvrstvý CsCl gradient	330 µg	intaktní částice + „tiny conformation“	293TT

Tabulka 5.1: Přehled používaných antigenů

Podarilo se připravit několik typů částic odvozených od BKV. Prvním typem jsou částice VLPs I produkované v bakulovirovém expresním systému. V savčím expresním systému bylo připraveno několik typů PsVs: nemutované PsVs I a PsVs IV, PsVs IV tvořené kombinací majoritního a minoritního kapsidového proteinu VP1/2 a dva typy mutovaných PsVs - PsVs s mutací v EF smyčce a PsVs s mutací v DE smyčce. Přehled používaných částic je shrnut v tabulce č. 5.1.

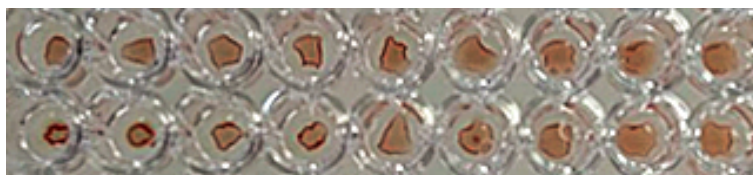
5.4 Sérologické testování připravených částic

Získané částice (Tabulka 5.1) byly otestovány pomocí třech sérologických testů: hemaglutinace (HA), hemaglutinačně inhibičního testu (HIA) a ELISA. Pro větší přehlednost byla zvolena prezentace výsledků HA a HIA pomocí schémat.

Použití metody HIA pro stanovení subtypově specifické séropozitivity bylo zařazeno především na základě literatury (Mäntyjärvi et al. 1972). V této studii se výsledky HIA měnily v závislosti na podmínkách, ve kterých test probíhal (různé teploty, různé hodnoty pH). Použití HIA pro subtypově specifické testování BKV navíc nelze v literatuře dohledat. Proto nás zajímalo, zda budou subtypy BKV I a BKV IV reagovat specificky s kontrolními králíčími séry při různém pH a různé teplotě. Pro srovnání reaktivity VLPs a PsVs byla využita metoda ELISA. Zároveň byly pomocí ELISA otestovány PsVs s mutací v EF nebo DE smyčce a také PsVs složené z kombinace majoritního i minoritního kapsidového proteinu za účelem stanovení subtypově specifické reaktivity.

5.4.1 Hemaglutinace s VLPs

Pro testování reaktivity sér s BKV VLPs pomocí HIA bylo nejprve potřeba optimalizovat provedení samotné hemaglutinace a poté i HIA. Vstupní koncentrace částic pro hemaglutinaci byla 0,02 mg/ml, dále ředěna ředící řadou s faktorem dva. Pro HIA byla používána koncentrace 0,156 µg/ml. Všechna séra používaná pro HIA byla inaktivována po dobu 1 hodiny při 56°C. Při optimalizaci hemaglutinace byly testovány dva druhy krvinek, lidské (krevní skupina 0+) a morčecí. Zároveň byly testovány různé podmínky (teplota, pH), ve kterých hemaglutinace probíhala. Hemaglutinace při teplotě 0°C se neosvědčila, krvinky v jamkách vytvářely útvary, které se nedaly vyhodnotit (Obr. 5.19).



Obrázek 5.19: Hemaglutinace na ledu

Ukázka nevyhodnotitelných útvarů tvořících se při hemaglutinaci na ledu


Ostatní hemaglutinace už probíhaly při pokojové teplotě. Při testování optimální hodnoty pH se ukázalo, že lidské krvinky hemaglutinují v neutrálním pH oba typy VLPs velmi podobně. Morčecí krvinky v neutrálním pH hemaglutinovaly lépe VLPs IV než VLPs I (Obr. 5.20). Oba typy krvinek hemaglutinovaly antigen v kyselém pH mnohem více (Obr. 5.20).

	x	2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x		
VLPs I	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	} lidské krvinky	} pH 7,1
VLPs IV	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		
VLPs I	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	} morčecí krvinky	
VLPs IV	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		
VLPs I	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	} lidské krvinky	} pH 5,6
VLPs IV	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		
VLPs I	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	} morčecí krvinky	
VLPs IV	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		
<p style="text-align: center;">● - částice hemaglutinují ● - částice nehemaglutinují</p>													

Obrázek 5.20: Hemaglutinace v různých pH s různými krvinkami

Hemaglutinace, při které se testovaly dva typy krvinek - lidské a morčecí. Zároveň byly krvinky testovány ve dvou různých pH: 5,6 a 7,1. V tabulce se v řadách střídají použité antigeny VLPs I a VLPs IV, ve sloupcích je ředění antigenu. Vstupní koncentrace antigenu byla 0,02 mg/ml a dále ředěna ředící řadou s faktorem 2.

Jelikož se v kyselém pH nepodařilo dojít k ředění částic, kde by k hemaglutinaci nedocházelo, byly připraveny samostatné desky pro každý typ krvinek, již jen v kyselém pH a s vyšším ředěním částic ($c=0,156 \mu\text{g/ml}$, Obr. 5.21). V kyselém pH lidské krvinky hemaglutinovaly lépe VLPs IV než VLPs I (Obr. 5.21). Morčecí krvinky se chovaly v kyselém pH podobně jako v neutrálním, tedy hemaglutinovaly lépe VLPs IV, ale rozdíl byl v kyselém pH méně patrný (Obr. 5.21).


	x	2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x	
VLPs I	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	} lidské krvinky
VLPs IV	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
VLPs I	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	} morčecí krvinky
VLPs IV	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
												

Obrázek 5.21: Hemaglutinace v kyselém pH

Hemaglutinace probíhala v kyselém pH. V tabulce se v řadách střídají použité antigeny VLPs I a VLPs IV, ve sloupcích je ředění antigenu. Horní polovina desky představuje hemaglutinaci s lidskými krvinkami, spodní polovina desky představuje hemaglutinaci s morčecími krvinkami. Vstupní koncentrace antigenu ve druhých dvou řadách byla 0,156 µg/ml a dále ředěna ředící řadou s faktorem 2.

5.4.2 Hemaglutinace s PsVs

Nastavené podmínky hemaglutinace prováděné v kyselém pH a s morčecími krvinkami byly využity i pro dalších charakterizaci pseudovirionů izolovaných v kapitole 4.2.7.8. Pro kontrolu byla provedena hemaglutinace s morčecími krvinkami v kyselém pH s pseudoviriony tvořenými majoritním kapsidovým proteinem subtypu I a IV, kombinací majoritního proteinu i s minoritním kapsidovým proteinem a i s mutantními pseudoviriony (Obr. 5.22). Pro hemaglutinaci bylo použito vždy stejné množství proteinového materiálu (0,02 mg/ml). Všechny typy PsVs hemaglutinují. Mezi subtypy byly pozorovány rozdíly v hemaglutinaci, což bylo patrné již při použití VLPs.

	x	2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x
PsVs I	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PsVs IV	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PsVs VP1/2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PsVs EF	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PsVs DE	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
											

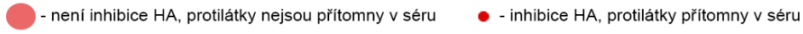
Obrázek 5.22: Hemaglutinace s PsVs

Hemaglutinace s PsVs s využitím morčecích krvinek, v kyselém pH. V řádcích se střídají různé typy antigenů, ve sloupcích je různé ředění krvinek.

5.4.3 Hemaglutinačně inhibiční test s VLPs

Pro první testování hemaglutinačně inhibičního testu bylo na základě předchozích výsledků zvoleno kyselé pH, inkubace při pokojové teplotě a vstupní koncentrace částic 0,156 µg/ml. Byly připraveny dvě desky, jedna s lidskými krvinkami (Obr. 5.23) a druhá s morčecími krvinkami (Obr. 5.24). Na obě desky byla použita hyperimunní králičí séra proti BKV I nebo proti BKV IV (viz kapitola 4.1.1), ve dvou vstupních ředěních (1:20 a 1:500). Z obrázku 5.23 je patrné, že HIA s lidskými krvinkami byl nevyhodnotitelný, jelikož pozitivní kontrola pro VLPs I nebyla pozitivní (Obr. 5.23, pozitivní kontrola označena modře). Pozitivní kontrola byly v tomto případě částice VLPs I s krvinkami, takže mělo dojít k hemaglutinaci a výsledek se měl projevit jako aglutinace krvinek (růžový povlak). Namísto toho krvinky spadly na dno jamky (vytvořily červenou tečku). To mohlo být způsobeno sníženou kvalitou krvinek po skladování.

Vzhledem k tomu, že už jsem lidské krvinky krevní skupiny 0+ neměla k dispozici, bylo testování s HIA nadále prováděno pouze s morčecími krvinkami. Hledalo se takové ředění, při kterém sérum proti BKV I není schopno inhibovat hemaglutinaci heterologního BKV IV antigenu, ale inhibuje hemaglutinaci homologního antigenu BKV I. Stejně tak se hledalo takové ředění séra proti BKV IV, které není schopno inhibovat hemaglutinaci heterologního BKV I antigenu,

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	K		
Ředění séra	20x	40x	80x	160x	320x	640x	1280x	2560x	5120x	10240x	20480x			
VPLs I	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV I 20x
VPLs I	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV IV 20x
VPLs IV	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV I 20x
VPLs IV	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV IV 20x
Ředění séra	500x	1000x	2000x	4000x	8000x	16000x	32000x	64000x	128000x	256000x	512000x			
VPLs I	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV I 500x
VPLs I	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV IV 500x
VPLs IV	•	•	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	Rb x BKV I 500x
VPLs IV	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV IV 500x
														

Obrázek 5.23: HIA s lidskými krvinkami a králičími séry

HIA se dvěma typy antigenů - VPLs I a VPLs IV o koncentraci 0,156 µg/ml. HIA probíhal v kyselém pH s použitím lidských krvinek. V řádcích se střídají antigeny VPLs I a VPLs IV reagující s králičími séry. Králičí séra byla použita proti BKV I a BKV IV, na horní polovině desky bylo vstupní ředění sér 1:20, na spodní polovině desky bylo vstupní ředění sér 1:500 (ve sloupci 1). Dále bylo sérum ředěno ředící řadou s faktorem 2 (sloupce 2-11). Sloupec označený „K“ obsahuje kontroly. Modře je označena pozitivní kontrola, což byl pouze antigen (VPLs I nebo VPLs IV) s krvinkami, v duplikátech pro oba antigeny. Kvůli tomu, že na této desce pozitivní kontrola nebyla pro VPLs I pozitivní, je deska nevyhodnotitelná. Zbytek sloupce K neoznačený modře představuje negativní kontrolu, tedy samotné krvinky bez antigenu.

ale inhibuje hemaglutinaci homologního antigenu BKV IV. Jak je patrné z obrázku 5.24, hemaglutinace přestává být inhibována v 11.jamce (ředění séra v této jamce je 1:20 480) při použití vstupního ředění 1:20 séra proti BKV I u obou antigenů. Sérum proti BKV IV přestává inhibovat hemaglutinaci v 7.jamce (ředění séra v této jamce je 1:1 280) při použití heterologního BKV I antigenu. Při použití homologního antigenu se nepodařilo dosáhnout ředění séra proti BKV IV, při kterém by k inhibici hemaglutinace nedocházelo (a to ani při ředění vstupního séra 1:500, Obr. 5.24). Pokud bylo pro experiment použito vstupní ředění sér 1:500 (Obr. 5.24), bylo možno po HIA pozorovat subtypově specifickou re-

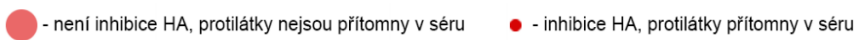
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	K		
Ředění séra	20x	40x	80x	160x	320x	640x	1280x	2560x	5120x	10240x	20480x			
VPLs I	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV I 20x	
VPLs I	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV IV 20x	
VPLs IV	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV I 20x	
VPLs IV	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV IV 20x	
Ředění séra	500x	1000x	2000x	4000x	8000x	16000x	32000x	64000x	128000x	256000x	512000x			
VPLs I	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV I 500x	
VPLs I	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV IV 500x	
VPLs IV	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV I 500x	
VPLs IV	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Rb x BKV IV 500x	

Obrázek 5.24: HIA s morčecími krvinkami a králičími séry

HIA se dvěma typy antigenů - VPLs I a VPLs IV o koncentraci 0,156 µg/ml. HIA probíhal v kyselém pH s použitím morčecích krvinek. V řádcích se střídají antigeny VPLs I a VPLs IV reagující s králičími séry. Králičí séra byla použita proti BKV I a BKV IV, na horní polovině desky bylo vstupní ředění sér 1:20, na spodní polovině desky bylo vstupní ředění sér 1:500 (ve sloupci 1). Dále bylo sérum ředěno ředící řadou s faktorem 2 (sloupce 2-11). Sloupec označený „K“ obsahuje kontroly. Modře je označena pozitivní kontrola, což byl pouze antigen (VPLs I nebo VPLs IV) s krvinkami, v duplikátech pro oba antigeny. Zbytek sloupce K neoznačený modře představuje negativní kontrolu, tedy samotné krvinky bez antigenu.

aktivitu i u séra proti BKV I (při ředění 1:500 byla inhibována hemaglutinace u homologního BKV I antigenu, ale k inhibici nedocházelo u heterologního BKV IV antigenu). HIA tedy v tomto prvotním experimentu odlišoval spolehlivě subtypově specifické protilátky pouze u séra proti BKV IV. Pro ověření byl proveden další HIA (Obr. 5.25). Vstupní ředění sér bylo 1:500 a dále ředěno ředící řadou s faktorem 5. Je patrné, že v ředěních 1:500 až 1:12 500 bylo u obou sér možno pozorovat subtypově specifickou reakci protilátek, kdy při použití králičího séra proti BKV I dochází s částicemi BKV I k inhibici hemaglutinace (to znamená, že jsou přítomny protilátky proti tomuto antigenu) a u stejného séra s částicemi BKV IV k inhibici nedochází (protilátky inhibující HA tedy přítomny nejsou).

Stejný výsledek platí i naopak, pro králičí sérum proti BKV IV.

	500x	2 500x	12 500x	62 500x	312 500x	1 562 500x	
VLPs I	•	•	•	●	●	●	} Rb x BKV I
VLPs IV	●	●	●	●	●	●	
VLPs I	●	●	●	●	●	●	} Rb x BKV IV
VLPs IV	•	•	•	•	●	●	
							

Obrázek 5.25: HIA s králičími séry

HIA probíhal v kyselém pH s morčecími krvinkami. Byly použity dva typy antigenů - VLPs I a VLPs IV, koncentrace 0,156 µg/ml. V horních dvou řadách je králičí sérum proti BKV I, ve spodních dvou řadách je králičí sérum proti BKV IV. Popisky sloupců značí ředění králičích sér.

Jelikož se HIA s morčecími krvinkami v kyselém pH s králičími séry osvědčil, dalším krokem bylo testování lidských sér. Zajímalo nás, zda je možné dosáhnout rozlišení subtypově specifické reaktivity i při ředění lidských sér, jako se to povedlo u králičích sér (Obr. 5.25).



Obrázek 5.26: HIA s lidskými séry (sérum M30)

Ukázka nevyhodnotitelných útvarů tvořících se při HIA s použitím lidských sér, které mohou značit přítomnost nespecifických inhibitorů hemaglutinace.

Při použití tepelně inaktivovaných lidských sér byly na desce patrné nevyhodnotitelné útvary krvinek na dně jamky (Obr. 5.26). To mohlo znamenat, že v séru jsou přítomny nespecifické inhibitory hemaglutinace. Může se jednat například

o sacharidy, lipoproteiny nebo mukoproteiny, které hemaglutinaci inhibují (Isaacs & Bozzo (1951), Anders et al. (1990)). Pro eliminaci těchto inhibitorů nestačí klasická inaktivace sér (1 hodina při 56°C), kterou séra již prošla, ale je třeba před samotnou inaktivací přidat neuraminidázu (Isaacs & Bozzo (1951), Gardner et al. (1971)) nebo trypsin a jodistan draselný (Hirst (1948), Neel et al. (1996) a Kim et al. (2012)). Neuraminidáza štěpí glykosidické vazby, proto je schopna ze séra odstranit různé sacharidové inhibitory hemaglutinace. Zároveň by ale mohla štěpit glykosidickou vazbu mezi kyselinou sialovou a galaktózou. Kyselina sialová slouží jako receptor pro vazbu viru na červenou krvinku a odštěpení kyseliny sialové by znehodnotilo výsledky HIA, proto se neuraminidáza přidaná do séra musí tepelně inaktivovat (viz metody, kapitola 4.2.10.2.4). Trypsin je proteáza štěpící peptidickou vazbu proteinů. Trypsin a jodistany obecně se osvědčily pro odstranění nespecifických inhibitorů hemaglutinace (Hirst 1948). Byly otestovány tři způsoby inaktivace sér, jeden zahrnoval pouze tepelnou inaktivaci (56°C, 1 hodina). Tato tepelná inaktivace sér sloužila jako kontrolní, jelikož všechna séra používaná pro HIA vždy před testováním prošla tímto způsobem inaktivace a tudíž jsme očekávali, že výsledky se budou shodovat s výsledky předchozích HIA. Druhým způsobem bylo přidání neuraminidázy do séra a třetím přidání trypsinu a jodistanu draselného (podrobně viz metody, kapitola 4.2.10.2.4). S takto inaktivovanými séry byl proveden HIA (Obr. 5.27 a Obr. 5.28). Sérum M30, které bylo odebráno miminkům zhruba v šesti měsících života, kdy ještě nemají vytvořené vlastní protilátky proti BKV a zároveň by již v séru neměly být přítomny mateřské protilátky, mělo sloužit jako negativní kontrola.

Dle výsledků na obrázcích č.5.27 a 5.28 lze vidět, že inhibitory hemaglutinace se inaktivací povedlo odstranit. Inaktivace pomocí trypsinu a jodistanu draselného navíc významně pomohla subtypově specifické reaktivitě králíčích sér již při nižším ředění (1:50 - 1:100) než pouhá tepelná inaktivace. Při tepelné inaktivaci bylo možné subtypově specifickou reaktivitu králíčího séra rozlišit až při ředění 1:2 500. Z tohoto pokusu lze odpovídající rozdíl v reaktivitě vidět pro sérum inaktivované tepelně již při ředění 1:500. Inaktivace neuraminidázou napomohla subtypově specifické reaktivitě až při vyšším ředění (1:500). U lidských sér vyhodnocení není jednoznačné, často se neshodují duplikáty a navíc lidské sérum

VLPs I	Rb x BKV I			Rb x BKV IV			6011			M30		
50x	•	•	•	•	•	●	•	•	●	•	•	●
100x	•	•	•	•	●	●	•	●	●	✕	•	●
500x	•	•	•	●	●	●	•	●	●	✕	✕	●
inaktivace	56°C	NA	KIO ₄	56°C	NA	KIO ₄	56°C	NA	KIO ₄	56°C	NA	KIO ₄

Obrázek 5.27: HIA s různými způsoby inaktivace sér s VLPs I

Celá tabulka představuje reaktivitu sér pouze s jedním antigenem, v tomto případě VLPs I. V řadách jsou tři různá ředění sér, poslední řada značí, jakým způsobem bylo sérum inaktivováno. Každé z testovaných sér bylo inaktivováno třemi způsoby (teplota (=56°C), neuraminidáza (=NA) nebo jodistan draselný a trypsin (= KIO₄). Testovala se celkem čtyři séra, dvě králičí (proti BKV I a BKV IV) a dvě lidská (6011 a M30).

VLPs IV	Rb x BKV I			Rb x BKV IV			6011			M30		
50x	•	•	●	•	•	•	•	•	●	●	●	●
100x	•	•	●	•	•	•	●	●	●	●	●	●
500x	●	●	●	•	•	•	●	●	●	●	●	●
inaktivace	56°C	NA	KIO ₄	56°C	NA	KIO ₄	56°C	NA	KIO ₄	56°C	NA	KIO ₄

Obrázek 5.28: HIA s různými způsoby inaktivace sér s VLPs IV

Celá tabulka představuje reaktivitu sér pouze s jedním antigenem, v tomto případě VLPs IV. V řadách jsou tři různá ředění sér, poslední řada značí, jakým způsobem bylo sérum inaktivováno. Každé z testovaných sér bylo inaktivováno třemi způsoby (teplota (=56°C), neuraminidáza (=NA) nebo jodistan draselný a trypsin (= KIO₄). Testovala se celkem čtyři séra, dvě králičí (proti BKV I a BKV IV) a dvě lidská (6011 a M30).

6011 bylo vybráno proto, že na ELISA vykazuje reaktivitu s oběma subtypy BKV I a IV. HIA tedy nepomohl určit, zda se jedná o subtypově specifické sérum. Sérum M30 by mělo být negativní, ale na výsledcích na obrázku 5.27 lze vidět, že v některých případech sérum vykazuje reaktivitu, což lze interpretovat tak, že může mít velký obsah inhibitorů HA, které lze inaktivovat pouze jodistanem

nebo že sérum obsahuje protilátky proti BKV I. Je možné, že optimální ředění lidských sér pro HIA se nachází někde mezi použitými ředěními 1:100 a 1:500 a pro příště by bylo vhodné otestovat více ředění lidských sér.

Závěrem lze konstatovat, že hemaglutinační experimenty ukázaly, že lze pro hemaglutinace BKV VLPs používat morčecí krev, která je lépe dostupná než krev lidská. Zároveň se podařilo ukázat, že hemaglutinace může probíhat účinněji v kyselém pH (pH 5,6), což dovoluje pro testy využívat menší množství antigenů. Nevýhodou tohoto uspořádání je, že je třeba nově standardizovat proces určování hemaglutinačního titru v laboratoři. Při testování HIA se podařilo prokázat, že tato metoda dokáže rozlišit experimentální hyperimunní králičí séra (již v ředění 1:500) na základě subtypově specifické reaktivity. Pomocí dodatečné inaktivace sér pro odstranění nespecifických inhibitorů hemaglutinace se povedlo rozlišit subtypově specifickou reaktivitu již při nižším ředění (v případě inaktivace pomocí trypsinu a jodistanu draselného to bylo u králičích sér ředění 1:50). Při testování lidských sér pomocí HIA byly výsledky obtížně vyhodnotitelné vlivem inhibitorů hemaglutinace a po odstranění těchto inhibitorů hemaglutinací nebyl z časových důvodů otestován dostatečný počet lidských sér v různých ředěních tak, aby bylo možno udělat nějaké závěry. I když je nepravděpodobné, že by se někdy HIA používal v klinické praxi, experimentálně se jedná o velmi zajímavý výsledek.

5.4.4 ELISA

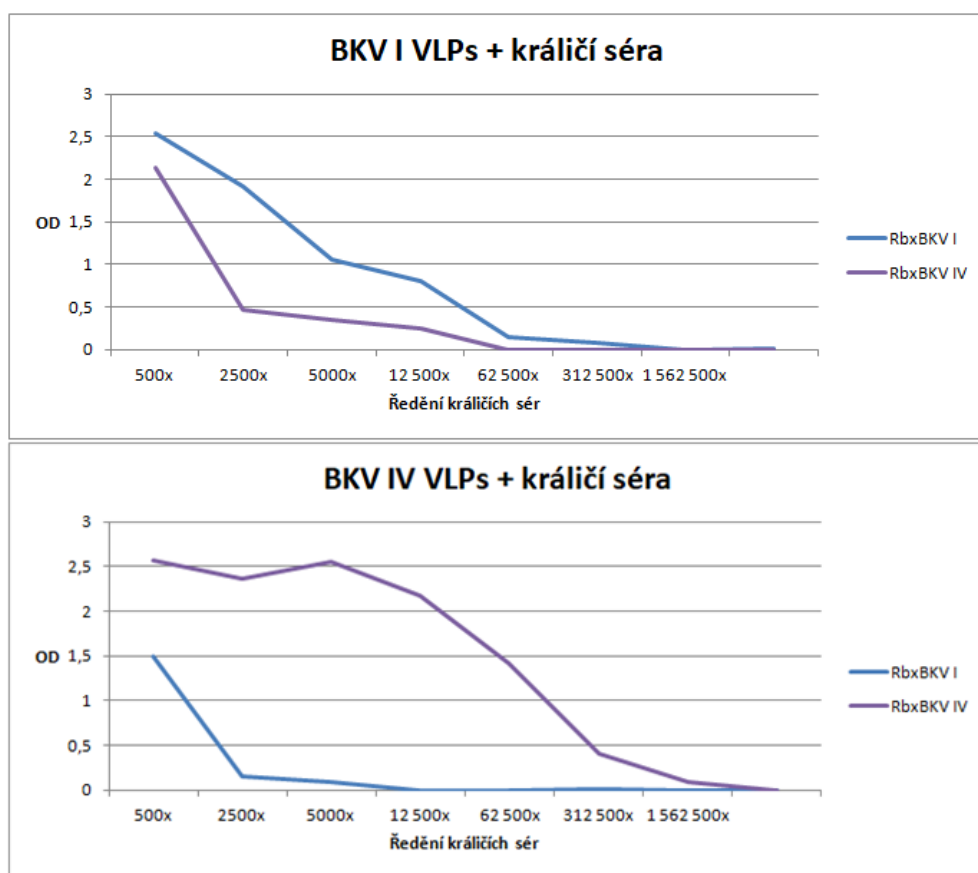
Hlavním důvodem zařazení ELISA testování bylo, že metoda ELISA je obecně velmi populární a používaná sérologická metoda. Její použití je navíc vhodné pro klinickou praxi. Doposud ale byla v BKV subtypově specifické sérologii limitována křížovou reaktivitou. Následující testování mělo za cíl zjistit, zda by nebylo možné optimalizovat podmínky ELISA tak, aby docházelo k přesnějšímu rozlišení subtypově specifické reaktivity. Byly testovány různé podmínky, při kterých ELISA probíhala (pH, kratší inkubace se sérem a promyv s močovinou) a také byly testovány mutantní PsVs. Zajímalo nás nejen srovnání reaktivity VLPs a PsVs, ale především porovnání reaktivity nemutovaných PsVs subtypu I a IV s PsVs nesoucími mutaci v DE nebo EF smyčce. Předpokládali jsme, že pokud budou

mutantní částice reagovat stejně jako nemutované PsVs IV, znamená to, že mnou mutované místo není pro subtypově specifické protilátky významné. Pokud by ale mutované částice reagovaly jinak, dá se předpokládat, že se mutací podařilo zasáhnout místo významné pro interakci se subtypově specifickou protilátkou. Také byla porovnávána reaktivita PsVs IV tvořených pouze VP1 proteinem s reaktivitou PsVs IV tvořených i minoritním proteinem VP2 za účelem zjistit, zda minoritní proteiny hrají roli při interakci s protilátkami a mohou tím pádem přispívat k subtypově specifické interakci. Jako primární protilátky byla používána hyperimunní králičí séra a precharakterizovaná lidská séra. Séra používaná na ELISA nebyla inaktivována, inaktivace sér se při ELISA nedoporučuje (Crowther 2000).

5.4.4.1 Testování ředění sér ve standardním uspořádání ELISA

- Testování ředění králičích sér

K dispozici byla kontrolní hyperimunní králičí séra (viz kapitola 4.1.1). Nejprve bylo nutné vytvořit titrační křivky králičích a lidských sér, která byla k dispozici, s antigeny VLPs I a VLPs IV. Díky titračním křivkám jsem získala představu, jak je potřeba séra ředit a zároveň jsem mohla získaná data porovnat s již dříve získanými výsledky v laboratoři (Sekavová 2017). Králičí séra reagovala dle očekávání, tedy sérum proti BKV IV reagovalo více s antigenem VLPs IV a naopak. Pro antigen VLPs I jsou rozdíly v reaktivitě s oběma séry nižší než pro VLPs IV (Obr. 5.29). Dle této titrační křivky předpokládáme, že optimální ředění králičích sér bude mezi 1:2 500 - 1:12 500.



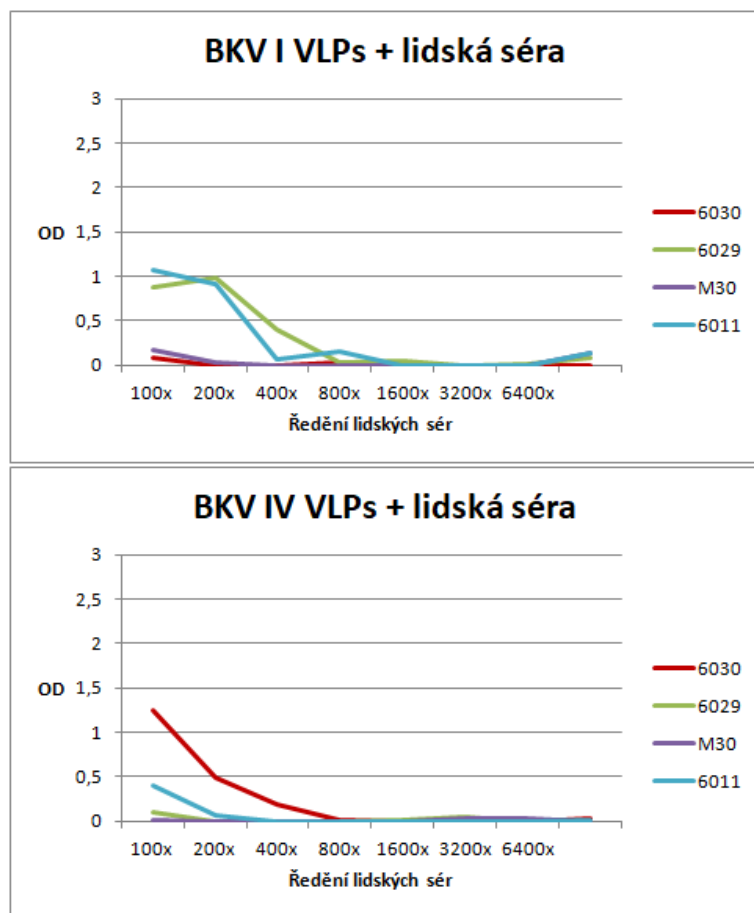
Obrázek 5.29: Titrační křivka králíčích sér s antigeny VLPs I a VLPs IV

Na horním grafu byl použit antigen VLPs I, na spodním VLPs IV. Modrá křivka představuje králíčí sérum obsahující protilátky proti BKV I, fialová křivka je králíčí sérum obsahující protilátky proti BKV IV. Vstupní ředění séra bylo 1:500, dále ředěno ředící řadou s faktorem 5.

- Testování ředění lidských sér

Titrační křivky byly připraveny i pro lidská séra. Sérum 6030 by mělo být monospecifické - BKV IV pozitivní, sérum 6029 by mělo být monospecifické - BKV I pozitivní. Sérum M30 by mělo být BKV negativní a sérum 6011 dosud nebylo charakterizováno. Hladina protilátek proti BKV u běžných lidských sér je výrazně nižší než hladina specifických protilátek u hyperimunních králíčích sér, proto bylo zvoleno ředění sér v rozmezí 1:100 až 1:6 400. Výsledky testování jsou na Obr. 5.30. Jak jsme očekávali, optimální ředění lidských sér se dle této titrační křivky jeví jako ředění mezi 1:100-1:400 ve srovnání s mnohem vyšším ředěním

hyperimunních králíčích sér (Obr. 5.29). To znamená, že pocházejí z králíka, který byl opakovaně imunizován VLPs jednoho subtypu, proto jsou titry protilátek v hyperimunním séru mnohem vyšší než v běžném lidském séru. Navíc by tato hyperimunní séra měla reagovat celkem specificky, naopak lidská séra často obsahují protilátky proti více subtypům zároveň a proto je dosažení subtypově specifické reaktivity mnohem těžší. Dvě precharakterizovaná séra 6029 a 6030 reagují dle očekávání. Sérum M30 nevykazuje žádnou reaktivitu. Sérum 6011 bylo vyhodnoceno jako BKV I/IV pozitivní (Obr. 5.30). Za pozitivní reakci při ELISA analýze byla v této práci považována taková reakce, která měla nenulovou hodnotu při měření absorbance (OD při 450 nm) po odečtení absorbance získané u adekvátní negativní kontroly (tj. jamka bez antigenu, která prošla inkubací se stejně ředěnou primární i sekundární protilátkou).



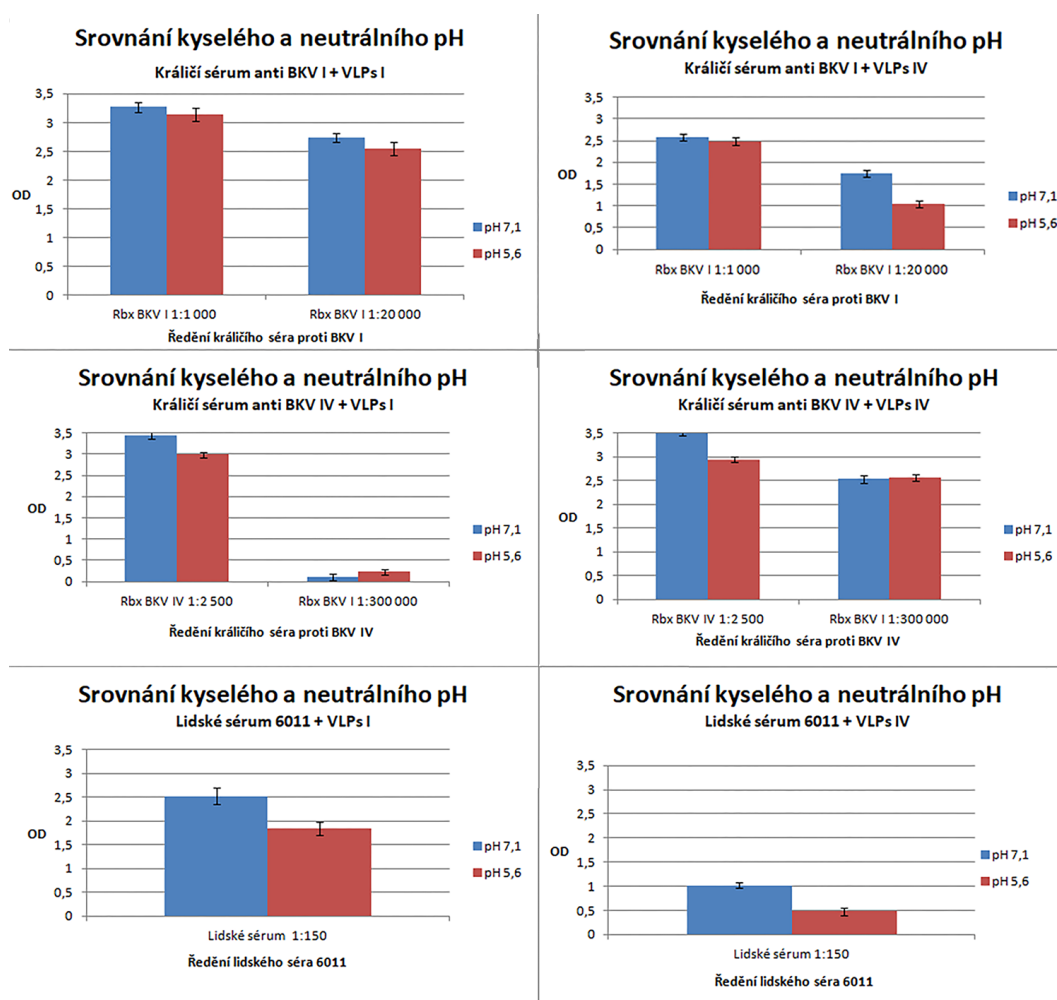
Obrázek 5.30: Titrační křivka lidských sér s antigeny VLPs I a IV

Na horním grafu byl použit antigen VLPs I, na spodním VLPs IV. Červená křivka představuje sérum 6030 obsahující protilátky proti BKV IV, zelená křivka je sérum 6029 obsahující protilátky proti BKV I, fialová křivka sérum M30, které by mělo být negativní a modrá křivka je sérum 6011, které nebylo dosud ocharakterizováno. Vstupní ředění séra bylo 1:100, dále ředěno ředící řadou s faktorem 2.

- Testování optimálního pH

Pozorování, že při hemaglutinaci dochází k rozdílné vazbě antigenů různých subtypů na morčecí krvinky v kyselém pH, nás inspirovalo k podobnému testování i na ELISA. Podobně byl takovýto přístup publikován například ve studii Kamata et al. (1996) nebo Doucet et al. (2013). Testovala jsem, zda různé hodnoty pH pomohou rozlišit subtypově specifickou séroreaktivitu. Nejprve proběhla ELISA pro srovnání neutrálního a kyselého pH. Použity byly dva typy antigenů - VLPs I a IV, a tři různá séra. Králičí sérum proti BKV I a proti BKV IV, ve dvou

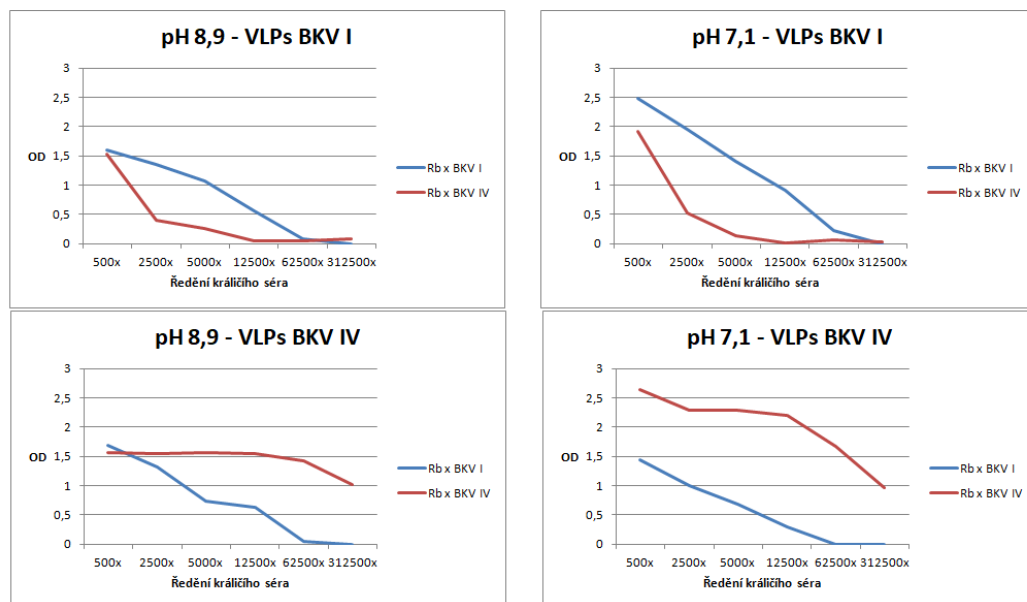
různých ředěních a lidské sérum 6011 v jednom ředění (1:150). Králičí sérum proti BKV I bylo ředěno 1:1 000 a 1:20 000. Králičí sérum proti BKV IV bylo ředěno 1:2 500 a 1:300 000. Po porovnání červeného a modrého sloupce v grafech (Obr. 5.31), jsem zjistila, že se reaktivita v kyselém pH téměř nemění, je obecně nižší než v neutrálním pH, ale subtypově specifickou reaktivitu kyselého pH nijak neovlivňuje. Modrý sloupec představuje reaktivitu v neutrálním pH a červený sloupec reaktivitu v kyselém pH. Jednotlivé grafy pak ukazují reaktivitu jednoho séra v různém ředění s jedním typem antigenu.



Obrázek 5.31: Testování v kyselém pH

Testována byla králičí séra proti BKV I a proti BKV IV. Modré sloupce představují neutrální pH, červené kyselého pH. Jeden graf vždy představuje reaktivitu jednoho konkrétního séra ve dvou ředěních (v případě lidského séra jen jedno ředění) s jedním antigenem (buď VLPs I nebo VLPs IV).

Kyselé pH 5,6 nepřineslo výrazné rozdíly oproti neutrálnímu pH. V některých případech byla reaktivita séra v kyselém pH nižší než v neutrálním (Obr. 5.31, u sér Rb x IV při ředění 1:2 500 a u séra 6011). U králíčho séra proti BKV I kyselé pH zmenšuje rozdíly mezi subtypově specifickou reaktivitou.



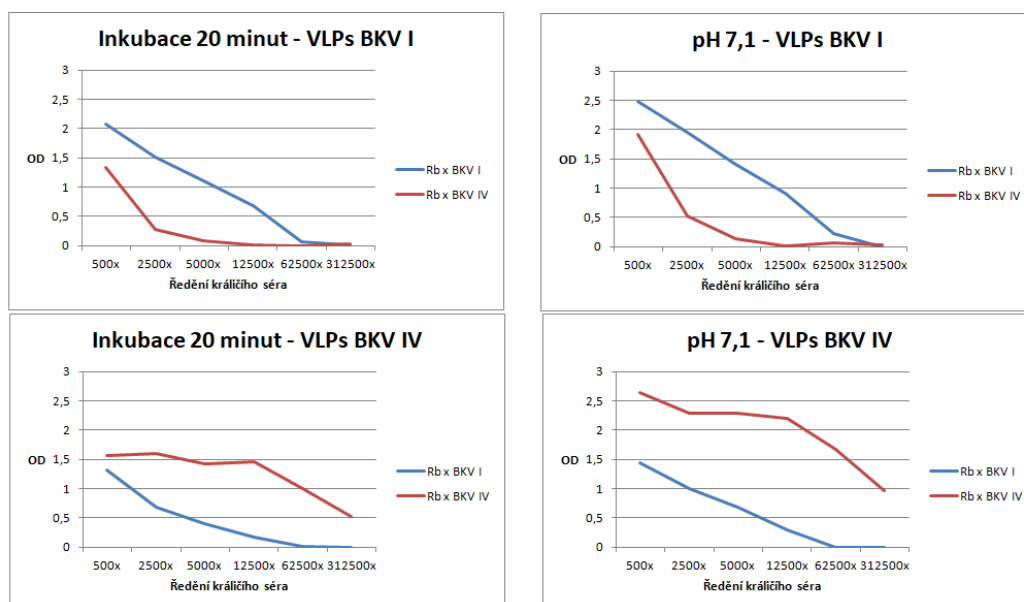
Obrázek 5.32: Testování v zásaditém pH

Testována byla králíčí séra proti BKV I a proti BKV IV. Grafy nalevo ukazují výsledky ELISA v zásaditém pH 8,9, grafy napravo ukazují výsledek při standardním provedení, v neutrálním pH 7,1. Horní grafy ukazují reaktivitu séra s antigenem VLPs I, spodní grafy ukazují reaktivitu séra s antigenem VLPs IV. Vstupní ředění séra bylo 1:500, dále byla ředěna ředící řadou s faktorem 5.

Kyselé pH 5,6 nepřineslo výrazné rozdíly oproti neutrálnímu pH. Proto bylo otestováno ještě zásadité pH 8,9. Byly připraveny titrační křivky pro králíčí séra proti BKV I a BKV IV, vstupní ředění bylo 1:500 a dále ředěno ředící řadou s faktorem 5. Titrační křivka séra získaná v zásaditém pH byla poté porovnána s titrační křivkou stejného séra se stejným antigenem získanou v neutrálním pH (Obr. 5.32). Zásadité pH 8,9 také snížilo reaktivitu séra, obecně ve všech ředěních pro obě séra, narozdíl od kyselého pH, které reaktivitu snižuje jen v některých případech. Zásadité pH také zmenšilo rozdíly v subtypově specifické reaktivitě. Proto bylo rozhodnuto pokračovat s ELISA v neutrálním pH.

- Testování doby inkubace se sérem

Byla otestována i kratší inkubace se sérem (místo 1 hodiny jen 20 minut). Hypotéza byla, že při zkrácené inkubaci se stihnou navázat pouze subtypově specifické protilátky a křížově reagující protilátky budou odmyty. Tato hypotéza se nepotvrdila, jelikož i při zkrácené inkubaci dochází ke křížové reaktivitě ve stejné míře (Obr 5.33). Byly připraveny titrační křivky pro králičí séra proti BKV I a BKV IV, vstupní ředění bylo 1:500 a dále ředěno ředící řadou s faktorem 5. Titrační křivka séra získaná po kratší inkubaci se sérem byla poté porovnána s titrační křivkou stejného séra se stejným antigenem získanou při klasické inkubaci se sérem po dobu 1 hodiny v neutrálním pH (Obr. 5.33).



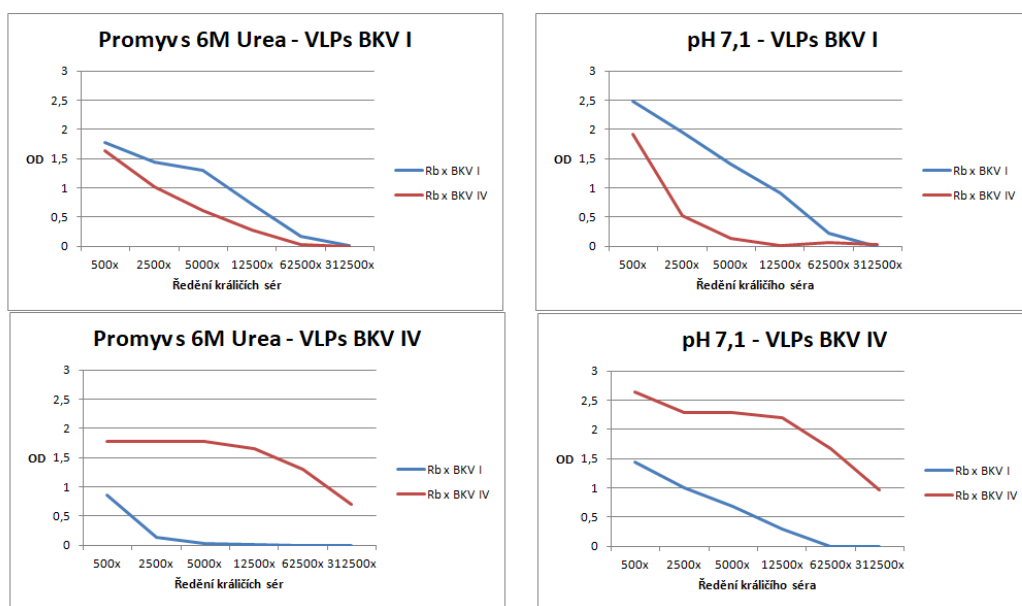
Obrázek 5.33: Testování kratší inkubace antigenu se sérem

Testována byla králičí séra proti BKV I a proti BKV IV. Grafy nalevo ukazují výsledky ELISA se zkrácenou inkubací (20 minut), grafy napravo ukazují výsledek při standardním provedení v neutrálním pH (7,1). Horní grafy ukazují reaktivitu sér s antigenem VLPs I, spodní grafy ukazují reaktivitu sér s antigenem VLPs IV. Vstupní ředění sér bylo 1:500, dále byla ředěna ředící řadou s faktorem 5.

- Testování promývacího kroku s 6M močovinou

V literatuře jsou popsány případy, kdy lze pomocí promývacího kroku s 6M močovinou (Ureou) odstranit falešně pozitivní reaktivitu (Wang et al. 2019) nebo snížit křížovou reaktivitu protilátek (Tsai et al. 2018). Proto jsem tento krok zařadila do našeho ELISA testu. Pro stanovení síly vazby protilátek byla testována

ELISA s promyvem v podobě 1xPBS s 6M Ureou. Hodnoty získané na ELISA po promyvu s Ureou byly porovnány s hodnotami získanými na ELISA při neutrálním pH. Byly připraveny titrační křivky pro králičí séra proti BKV I a BKV IV, vstupní ředění bylo 1:500 a dále ředěno ředící řadou s faktorem 5. Titrační křivka séra získaná po promyvu s Ureou byla poté porovnána s titrační křivkou stejného séra se stejným antigenem získanou v neutrálním pH bez Urea promyvu (Obr. 5.34). Promyv s Ureou nijak nepomohl při rozlišení subtypově specifické reaktivity, naopak u VLPs I tento rozdíl ještě snížil. Obě testovaná séra reagovala téměř identicky. U VLPs IV je sice rozdíl subtypově specifické reaktivity patrný, ale trend je velmi podobný tomu při testování v neutrálním pH bez Urea promyvu a navíc je reaktivita při použití Urea promyvu nižší.



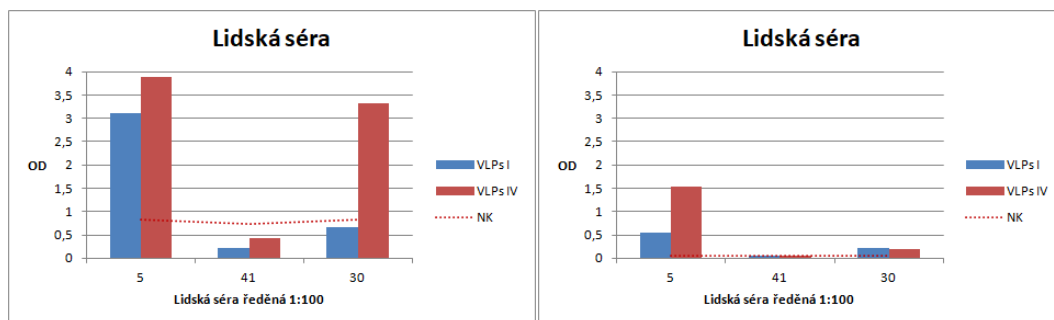
Obrázek 5.34: Testování promývacího kroku s 6M močovinou

Testována byla králičí séra proti BKV I a proti BKV IV. Grafy nalevo ukazují výsledky ELISA zahrnující promývací krok s 6M močovinou, grafy napravo ukazují výsledek při standardním provedení v neutrálním pH (7,1). Horní grafy ukazují reaktivitu sér s antigenem VLPs I, spodní grafy ukazují reaktivitu sér s antigenem VLPs IV. Vstupní ředění sér bylo 1:500, dále byla ředěna ředící řadou s faktorem 5.

5.4.4.2 Testování reaktivity různých typů antigenů

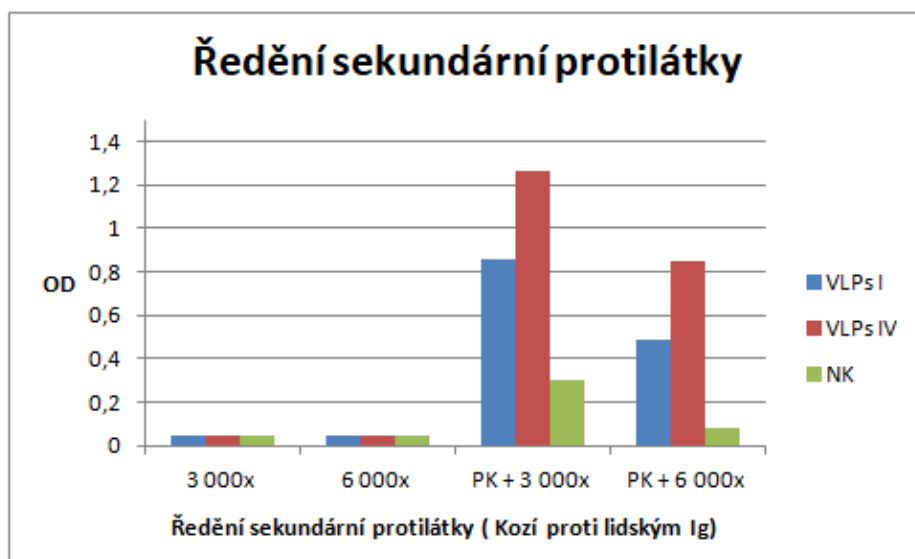
Po optimalizaci podmínek, při kterých ELISA probíhá, se přistoupilo k testování králíčích a lidských sér se všemi typy antigenů. Na základě předchozích výsledků bylo rozhodnuto, že ELISA bude probíhat v neutrálním pH a inkubace s protilátkou bude probíhat po dobu 1 hodiny. Nejprve bylo potřeba otestovat všechny dostupné antigeny s co nejvíce lidskými séry v jednom ředění. Poté mělo být na základě takového testování vybráno několik zástupců sér, aby bylo možno udělat titrační křivky těchto sér. Mezi vybranými séry měla být séra pozitivní pouze na jeden subtyp, séra reagující s oběma subtypy a séra negativní. Při pokusech s různými séry v jednom ředění (1:100), pomocí kterých jsem chtěla tato séra vybrat, se ale vyskytlo několik komplikací. První komplikace bylo vysoké pozadí (Obr. 5.35, graf vlevo). Následovala řada pokusů, které pomohly odhalit zdroj vysokého pozadí. Zdrojem vyššího pozadí (vysoká reaktivita negativní kontroly, tedy samotného PBS) může být příliš nízké ředění sekundární protilátky. V průběhu experimentů totiž došel stabilizovaný roztok předředěné sekundární protilátky (kozí proti lidským IgG) a bylo nutno sekundární protilátku znova naředit. Po otestování dvou různých ředění sekundární protilátky (původní používané ředění 1:3 000 a nové ředění 1:6 000) jsem došla k závěru, že je nutné protilátku více ředit. Ředění 1:6 000 sice mírně snižuje reaktivitu, což lze vidět při porovnání reaktivity vyššího ředění se sérem 30 oproti nižšímu ředění se sérem 30 (Obr. 5.36, sérum 30 označeno jako PK), ale také snižuje pozadí (Obr. 5.36, zelený sloupec NK).

Vyšší pozadí mohlo být způsobené i nedostatečnou blokací po kotvení antigenu na dno jamek, proto byly otestovány dva běžně využívané způsoby blokace. Doposud byl používán jako blokační roztok 2% BSA v PBS, zároveň byl ještě otestován 5% roztok sušeného mléka v PBS. Po vynesení výsledků do grafu bylo rozhodnuto pokračovat s blokací roztokem 2% BSA v PBS, protože výsledky jsou velmi podobné a míra pozadí je v obou případech téměř stejná (Obr. 5.37, zelený sloupec NK).



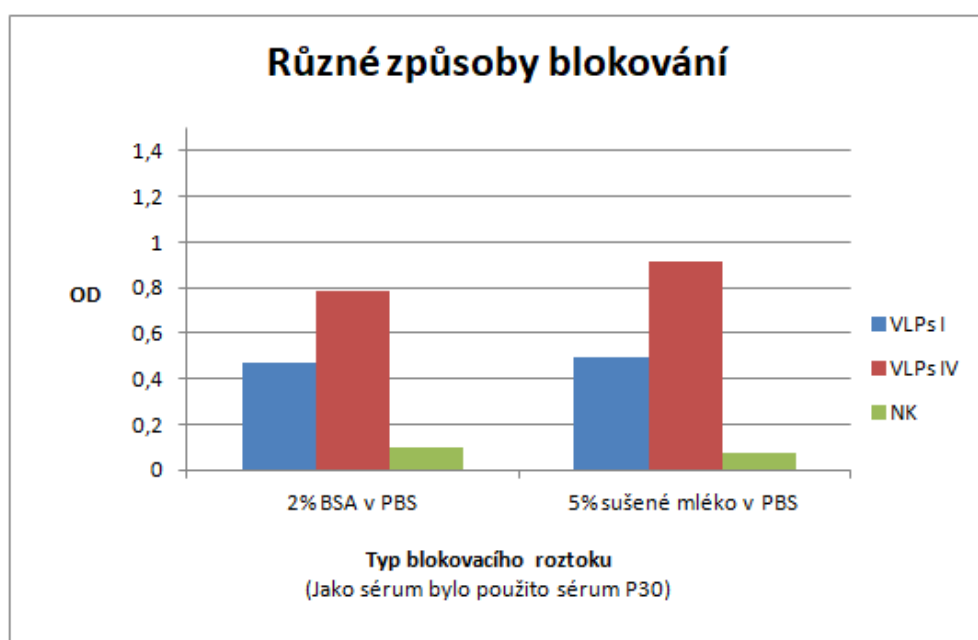
Obrázek 5.35: Vybraná lidská séra v ředění 1:100

Levý graf znázorňuje reaktivitu lidských sér s antigeny BKV VLPs I a IV při ředění sekundární protilátky 1:3 000. Pravý graf představuje změnu reaktivity po nastavení jiného ředění sekundární protilátky (1:6 000, Obr. 5.36) a otestování způsobu blokace (Obr. 5.37).



Obrázek 5.36: Různé ředění sekundární protilátky

Sekundární protilátka kozí proti lidským IgG byla testována ve dvou ředěních, 1:3 000 a 1:6 000. Jako antigeny byly testovány VLPs I, VLPs IV a jako negativní kontrola sloužilo pouze PBS bez antigenu. Jednak byla testována samotná sekundární protilátka bez primární protilátky, a poté klasická reakce s přidáním primární protilátky (v grafu označeno jako "PK"), kdy bylo jako primární protilátka přidáno sérum 30.



Obrázek 5.37: Různé způsoby blokování

Jako blokovací roztok bylo testováno 2% BSA v PBS a 5% sušené mléko v PBS.

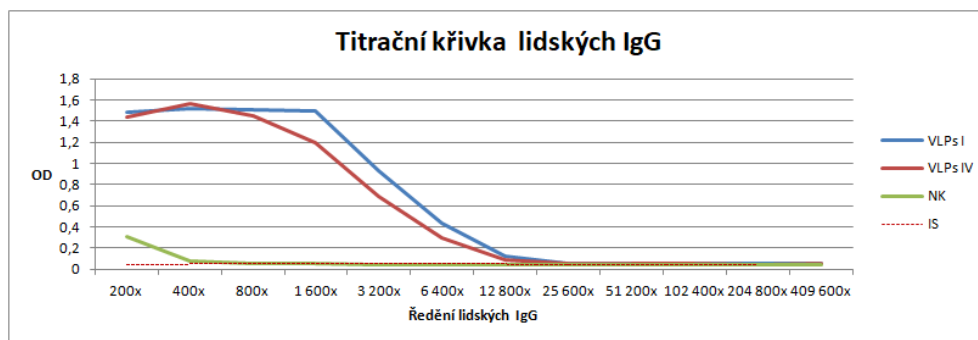
Pro testování bylo použito sérum 30, které by mělo být BKV I i BKV

IV pozitivní. Jako antigeny byly testovány VLPs I, VLPs IV a jako negativní kontrola sloužilo pouze PBS bez antigenu.

Poté, co bylo ověřeno, že použití 2% BSA v PBS jako blokačního roztoku je optimální a zároveň bylo určeno ředění sekundární protilátky 1:6 000 místo 1:3 000 byla provedena ELISA s vybranými lidskými séry. Pozadí se sice podařilo minimalizovat, ale obecně byla reaktivita velmi nízká. Graf na obrázku 5.35 porovnává výsledky reaktivity. Vlevo je graf, ve kterém jsou výsledky ELISA před změnou ředění sekundární protilátky (tedy při ředění 1:3 000), vpravo jsou výsledky s vyšším ředěním protilátky (1:6 000). Snížení reaktivity bylo při vyšším ředění protilátky očekávané, ovšem po porovnání reaktivity sér z těchto experimentů s reaktivitou sér na dřívějších ELISA (nepublikovaná data RNDr. Kateřiny Roubalové CSc.) bylo jasné, že nynější reaktivita je výrazně nižší, přestože uspořádání testu odpovídalo doporučení z předchozích testů (RNDr. Kateřiny Roubalové CSc.). Rozhodla jsem se pokračovat s 1/2 ELISA deskami (Microplate 96 well, PS, Half Area, Transparent Microcolon®, High Binding, ref: 675061 (Greiner Bio-one). Tyto desky mají speciálně upravený povrch pro lepší adsorpci. Výhodné bylo i to, že se spotřebuje o polovinu méně materiálu. Následující ELISA probíhaly všechny již na 1/2 deskách.

- Titrování kontrolních protilátek

Dostupný soubor lidských sér obsahoval séra s vysokými titry (většinou pocházela od pacientů po transplantaci) i séra s nízkými titry protilátek proti oběma sledovaným subtypům. Jako kontrolní lidské sérum jsem používala komerční IgG (Cytotect®CP Biotest: Lidské imunoglobuliny typu G proti cytomegaloviru 100U/ml). Jedná se o zakoncentrované protilátky získané ze sér řady lidí, hlavně proti cytomegaloviru, ale preparát obsahuje i další protilátky proti patogenům běžně kolujícím v populaci (tedy i proti BKV). Hladinu protilátek v tomto preparátu jsem testovala na VLPs příslušného subtypu (Obr. 5.38). Pro experimenty jsem pak následně používala nejvyšší ředění, které negenerovalo na ELISA testu pozadí (Obr. 5.38, zelená křivka NK), tedy ředění 1:400. V tomto ředění byla navíc reaktivita s oběma subtypy stejná.



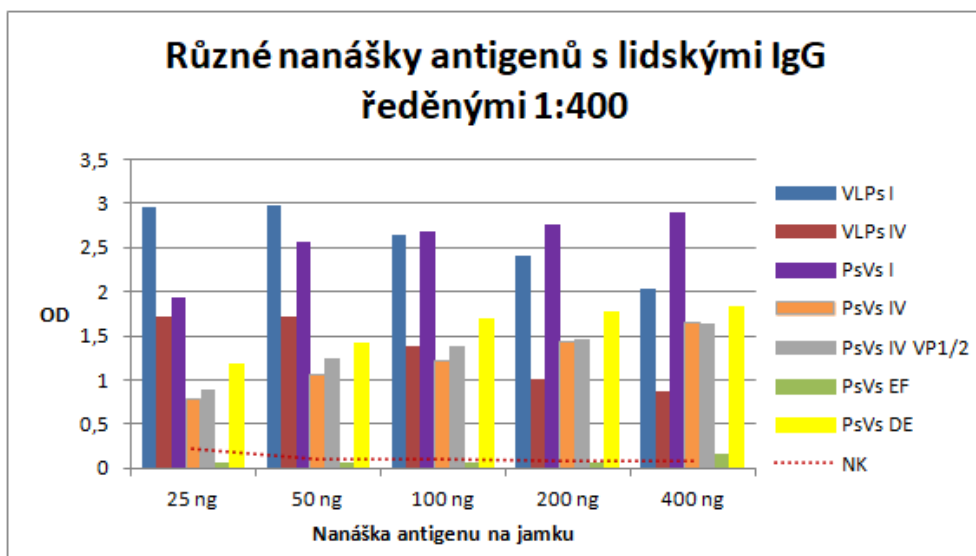
Obrázek 5.38: Titrační křivka lidských IgG

Titrační křivka komerčních lidských IgG, které byly používány jako pozitivní kontrola, pro určení správného ředění těchto IgG. Tato ELISA byla provedena na 1/2 desce. IS = interní standard, což znamená, že k antigenu byla přidána pouze sekundární protilátka (koží proti lidských IgG). Jako antigeny byly testovány VLPs I a VLPs IV, jako negativní kontrola sloužilo pouze PBS bez antigenu.

Tato ELISA probíhala na 1/2 desce.

Po ověření ředění komerčních protilátek bylo potřeba stanovit správné množství antigenu používaného pro testování na ELISA. Bylo testováno 5 různých nanášek všech dostupných antigenů na jamku (25 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng a 400 ng). Reaktivita se mírně zvyšovala spolu se zvyšujícím množstvím antigenu, ale pouze u pseudovirionů (Obr. 5.39). U VLPs reaktivita se zvyšujícím množstvím antigenu mírně klesala (Obr. 5.39). Protože se ale nejednalo o výrazné rozdíly a nemohla jsem si dovolit plýtvat antigeny, bylo rozhodnuto pokračovat se standardní nanáškou a to 50 ng na jamku. Zároveň je patrné, že VLPs mají podstatně vyšší reaktivitu než PsVs (Obr. 5.39).

Po nastavení správných podmínek mohlo dojít k ověření reaktivity precharakterizovaných lidských sér s antigeny v podobě mutantních pseudovirionů. Byla vybrána čtyři séra a pro tato séra byly vytvořeny titrační křivky se všemi dostupnými pseudoviriony (Obr. 5.40). Sérum 3 by mělo být BKV I pozitivní, což se testováním potvrdilo. Sérum 5 by mělo být BKV I a BKV IV pozitivní. Toto sérum reagovalo se všemi antigeny kromě pseudovirionů s mutací v EF smyčce. Sérum 19 by mělo být BKV IV pozitivní. PsVs I s tímto sérem nereagují, což je správně, ale opět s ním nereagují ani částice s mutací v EF smyčce. Sérum 40 by mělo být BKV IV pozitivní, ale navíc by mělo obsahovat vysoké množství křížově



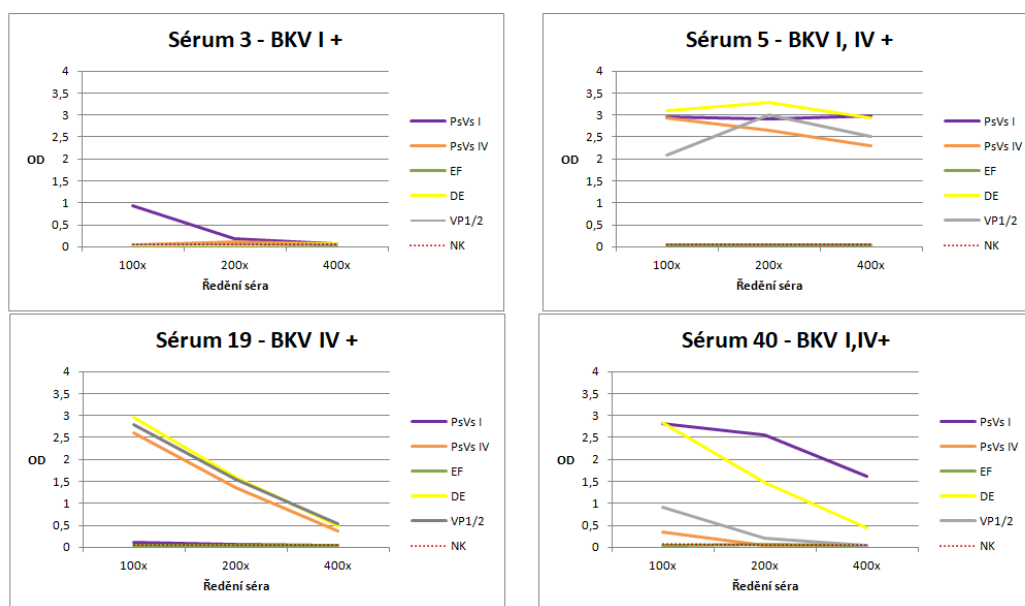
Obrázek 5.39: Stanovení množství antigenu

Testování různých nanášek antigenů. Testovány byly všechny typy antigenů, které byly k dispozici. Jako negativní kontrola sloužilo PBS bez antigenu. Jako primární protilátka sloužily komerční IgG. Tato ELISA probíhala na 1/2 desce.

reagujících protilátek proti epitopu BKV I. V tomto případě sérum 40 reagovalo nejvíce s antigenem PsVs I, poté s PsVs s DE mutací, ostatní antigeny reagovaly velice nízce a PsVs s EF mutací opět nereagovaly. Tyto výsledky naznačují, že mutace v EF smyčce pravděpodobně zasáhla místo významné pro interakci s protilátkami, jelikož takto mutované částice na ELISA vůbec nereagují. Naopak částice s mutací v DE smyčce reagují velmi podobně jako nemutované částice subtypu IV, ale ještě o něco více. To by mohlo znamenat, že částice s mutací v DE smyčce přednostně reagují s křížovými protilátkami. Reaktivita částic tvořených pouze majoritním kapsidovým proteinem VP1 se od reaktivity částic nesoucí i minoritní kapsidový protein VP2 příliš nelišila. Částice s minoritním kapsidovým proteinem PsVs VP1/2 reagovaly na ELISA vždy podobným trendem, jen trochu silněji (Obr. 5.40).

- Ověření reaktivity králíčích sér s antigeny odvozenými od mutovaných pseudovirionů

Pro dodatečné porovnání reaktivity VLPs a PsVs bylo třeba otestovat antigeny s králíčími séry (Obr. 5.41). I toto testování ukázalo, že reaktivita VLPs je obecně



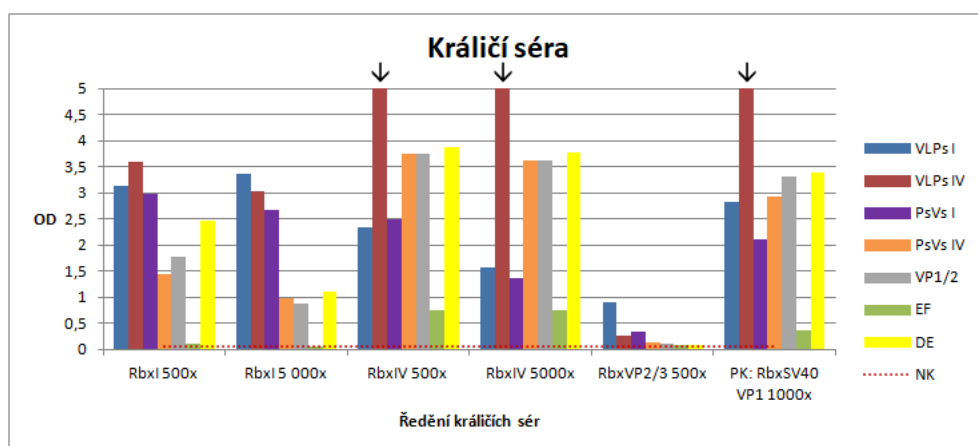
Obrázek 5.40: Titrační křivky vybraných lidských sér se všemi typy PsVs

Testovány byly všechny typy PsVs, které byly k dispozici. Jako negativní kontrola sloužilo PBS bez antigenu. Jako primární protilátka byla použita lidská séra, vstupní ředění 1:100, dále ředěno ředící řadou s faktorem 2. Sérum 3 by mělo být BKV I pozitivní, sérum 19 by mělo být BKV IV pozitivní, séra 5 a 40 by měla být pozitivní na oba subtypy. Tato ELISA probíhala na 1/2 desce.

vyšší než reaktivita PsVs se séry. Také byly připraveny titrační křivky pro králičí séra (Obr. 5.42). Všechny tyto grafy (Obr. 5.41 a Obr.5.42) potvrzují výsledky testování s lidskými séry (Obr. 5.40). PsVs s mutací v DE smyčce reagují se všemi testovanými séry z BKV IV antigenů nejvíce, částice s mutací v EF smyčce nereagují téměř vůbec.

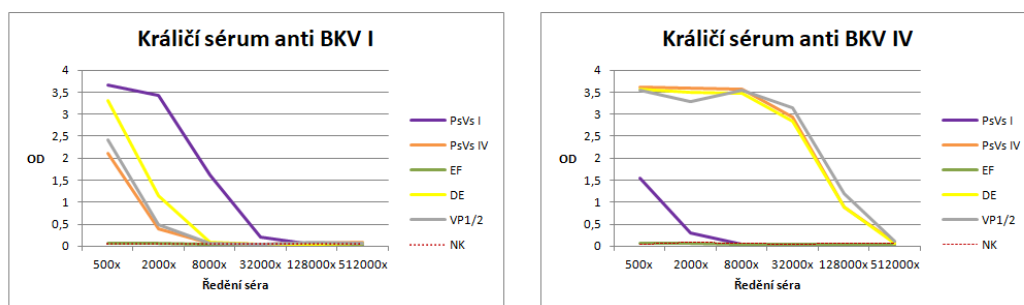
Nereaktivita částic s mutací v EF smyčce byla velmi zajímavým výsledkem, proto jsem se rozhodla toto pozorování ještě ověřit pomocí ELISA s využitím myší monoklonální protilátky proti BKV I. Zajímala mě i reaktivita této protilátky se zbylými antigeny. I tento výsledek (Obr. 5.43) potvrzuje předchozí závěry, že VL-Ps reagují více než PsVs. S myší monoklonální protilátkou proti BKV I reagovaly dle očekávání pouze antigeny subtypu I, ostatní nereagovaly vůbec.

Celé ELISA testování lze shrnout následovně. Po úvodní optimalizaci ELISA byla otestována králičí a vybraná lidská séra. VLPs vykazovaly vyšší reaktivitu



Obrázek 5.41: Testování všech typů antigenů s králičími séry

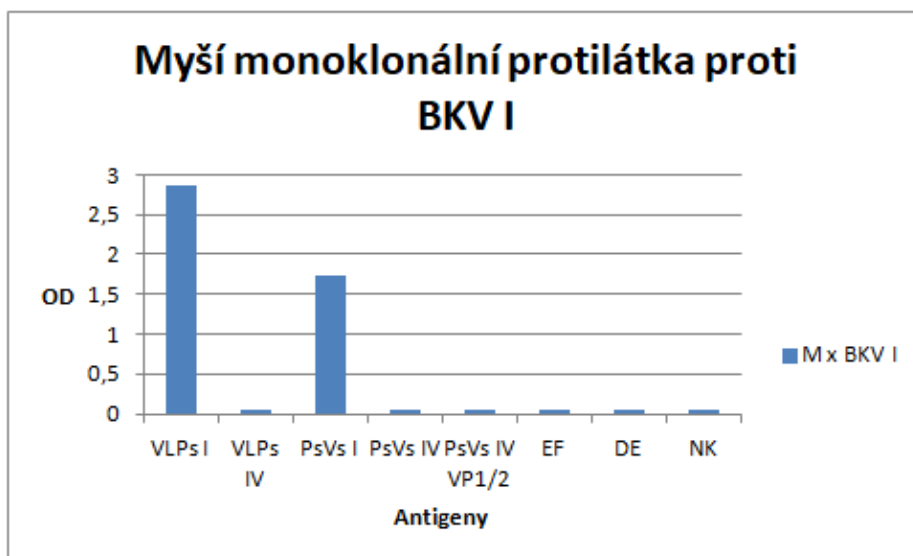
Testovány byly všechny typy antigenů, které byly k dispozici. Jako negativní kontrola sloužilo PBS bez antigenu. Jako pozitivní kontrola sloužilo sérum anti VP1 SV40. Jako primární protilátky byla použita králičí séra proti BKV I a BKV IV, vždy ve dvou ředěních, 1:500 a 1:5 000. Šipky značí, že u VLPs IV dosáhla reaktivita s těmito séry (Rb x BKV IV a Rb x SV40 VP1) příliš vysoké hodnoty, který přístroj nebyl schopný změřit. Tato ELISA probíhala na 1/2 desce.



Obrázek 5.42: Titrační křivky králičích sér s PsVs

Testovány byly všechny typy PsVs, které byly k dispozici. Jako negativní kontrola sloužilo PBS bez antigenu. Jako primární protilátky byla použita králičí séra proti BKV I (graf vlevo) a BKV IV (graf vpravo), vstupní ředění 1:500 a dále ředěno ředící řadou s faktorem 5. Tato ELISA probíhala na 1/2 desce.

než PsVs. Přítomnost minoritních proteinů v částicích nijak výrazně neovlivnila reaktivitu částic se sérem v porovnání s částicemi tvořenými pouze majoritním kapsidovým proteinem. Při testování mutantních částic bylo zjištěno, že částice s mutací v EF smyčce nereagují s žádnou z testovaných protilátek nebo sér. Mů-



Obrázek 5.43: Testování myší monoklonální protilátky proti BKV I s PsVs

Testovány byly všechny typy PsVs, které byly k dispozici. Jako negativní kontrola sloužilo PBS bez antigenu. Jako primární protilátka byla použita myší monoklonální protilátka proti BKV I, ředěná 1:5. Tato ELISA probíhala na 1/2 desce.

že to znamená, že se mutací podařilo zasáhnout místo významné pro interakci s protilátkami, tím pádem částice se změnou v tomto místě nejsou protilátkami rozpoznávány. Částice s mutací v DE smyčce reagují velice podobně jako nemutované částice subtypu IV, ale vždy o něco více. To značí, že by mohly rozeznávat hlavně křížově reagující protilátky a v budoucnu by se je dalo využít jako vysycovací antigen.

6. Diskuze

Částice odvozené od virů produkované pomocí expresních systémů slouží jako antigeny pro různé sérologické testy, ale například i pro přípravu vakcín. Tato diplomová práce využívala dva typy částic připravené pomocí dvou typů expresních systémů právě pro účely sérologického testování. Jednalo se o VLPs produkované bakulovirovým expresním systémem a PsVs produkované savčím expresním systémem.

Potenciál VLPs pro použití jako antigenu při ELISA testování BKV séropozitivity ocenila ve své diplomové práci Alžběta Sekavová (2017). Cílem její diplomové práce bylo připravit několik typů VLPs odvozených od polyomavirů, mimo jiné i VLPs odvozené od BKV subtypu I a IV a také VLPs tvořené VP1 proteinem MPyV, který má oblast BC smyčky změněnou na sekvenci BKV subtypu I nebo IV. Tyto VLPs pak byly testovány pomocí ELISA se stejným cílem jako v mé diplomové práci a to rozlišit subtypově specifickou reaktivitu. Stanovit subtypově specificky reagující protilátky se pomocí těchto VLPs nepovedlo, ale povedlo se ukázat, že VLPs jsou skvěle použitelný antigen pro ELISA, který spolehlivě určuje séropozitivitu na BKV. Zároveň byl v rámci diplomové práce Alžběty Sekavové navrhnout a optimalizován protokol pro vysycování séra pomocí heterologního antigenu. Sérum se nejprve nechá inkubovat s heterologním antigenem (například VLPs BKV IV). Tento antigen by měl vysytit křížově reagující protilátky. Po inkubaci se provede klasická ELISA, v tomto případě s antigenem v podobě VLPs BKV I, jelikož bylo sérum vysyceno antigenem VLPs BKV IV a v séru by měly zůstat pouze specifické protilátky proti BKV I. Účinnost vysycování séra heterologním antigenem před klasickým ELISA testováním byla dále potvrzena i v článku Hejtmánková et al. (2019) na precharakterizovaných sérech. Tento článek zároveň vyzdvihuje důležitost použití kombinace antigenů odvozených od různých subtypů při testování séropozitivity na BKV a to z toho důvodu, že pokud se v současnosti testuje séropozitivita na BKV, testuje se pouze na nejprevalentnější subtyp, BKV I. Takové testování je ale vzhledem k výsledkům Hejtmánková et al. (2019) i výsledkům této DP nepřesné a je potřeba zařadit i antigeny od dalších subtypů BKV.

Pro izolaci virových částic v naší laboratoři využíváme ultracentrifugaci v gradientu chloridu cesného, která zajistí purifikaci částic od buněčné debris a detergentů. Chlorid cesný může částice narušovat a způsobovat jejich nestabilitu, proto musí být po ultracentrifugaci ze vzorku odstraněn, k tomu byla využita dialýza proti pufru B. Před samotnou ultracentrifugací je ale potřeba narušit buňky, aby došlo k uvolnění částic. Při izolaci VLPs je pro narušení buněk používána sonikace. Sonikace umožňuje mechanické narušení buněk a DNA pomocí ultrazvuku. Další protokoly pro izolaci částic používané v této práci narušují buňky chemickým způsobem. Při OptiCs jsou buňky rozrušeny pomocí detergentu Triton-X-100 a degradaci DNA zajistí benzonáza. U izolace ve dvouvrstvém gradientu CsCl jsou částice z buněk uvolněny díky přidání tetrachloroethylenu a následnému protřepání. V rámci diplomové práce Alžběty Sekavové byly navíc testovány různé způsoby izolace VLPs a nejlepší byla metoda OptiCs (Sekavová 2017). Proto byla OptiCs metoda testována i pro izolaci PsVs v mé diplomové práci, pro kterou se ale příliš neosvědčila. Intaktních PsVs vyizolovaných pomocí OptiCs bylo ve vzorcích minimum a na elektronmikroskopických snímcích byl vidět hlavně rozpadlý protein VP1 (Obr. 5.13). Izolace v OptiPrepTM testována nebyla, protože podle zkušeností kolegů z laboratoře nelze roztok iodixanolu efektivně odstranit ze vzorku a snižuje vazbu částic na ELISA desky (Martina Kojzarová, nepublikované výsledky). Proto byl využit protokol, který zahrnuje narušení buněk pomocí tetrachloroethylenu a následuje izolace v dvouvrstvém gradientu chloridu cesného. Tento postup byl inspirován protokolem používaným ve virologické laboratoři doktora Parkera (Cardiff University, UK) pro izolaci rekombinantních adenovirů. Pro izolaci pseudovirionů odvozených od polyomavirů ho upravila Jana Váňová. Obvykle jsou po ultracentrifugaci ve zkumavkách vidět proužky, které se vypichují, a například pro MPyV je tento způsob dostačující pro izolaci intaktních PsVs. Pro BKV PsVs se nejlépe osvědčilo rozebrat gradient na frakce, protože vypichováním proužků byly zachyceny pouze částice v „tiny“ konformaci. Díky rozebírači frakcí byly v několika frakcích nalezeny i klasické velké intaktní částice. Klasická částice má průměr 45 nm a je tvořena 72 pentamery, malé částice (tzv. „tiny“ konformace, Obr. 5.15) mají průměr zhruba 22 nm a jsou tvořeny z 12 pentamerů VP1 proteinu (Mattern et al. 1967). Výskyt podobných polymorfismů

je při samouspořádání VP1 proteinu celkem běžný a jejich vznik se dá ovlivnit například na změnou pH nebo přidáním vápenatých iontů do média při produkci částic (Salunke et al. 1989). Mezi pentamery malých částic je jiný úhel (63°) než u běžných velkých částic, u kterých je tento úhel 25° . Větší úhel sice může zpřístupnit některé z dalších epitopů, ale zároveň může dojít k oddálení epitopů běžně rozpoznávaných protilátkami, takže se pak protilátky na malé částice nemohou vázat. To by souhlasilo s mými výsledky, kdy reaktivita PsVs byla nižší než reaktivita VLPs. Vzhledem k tomu, že ve vzorku obsahujícím PsVs byly přítomny částice dvou různých velikostí, mohly protilátky rozpoznávat pouze velké částice a to snížilo reaktivitu PsVs v porovnání s reaktivitou VLPs, které byly všechny stejně velké (45 nm). Výhodou VLPs odvozených od BK viru je poměrně snadná izolace intaktních částic, u PsVs je izolace intaktních částic složitější, ale pro účely mé diplomové práce z hlediska úspory času bylo snazší mutovanými plazmidy transfekovat savčí buněčnou linii 293TT než dlouze připravovat rekombinantní bakulovirus pro každou mutovanou variantu a poté připravovat inokulum, se kterým by pak mohly být hmyzí buňky infikovány.

Po přípravě antigenů se mohlo přistoupit k sérologickému testování těchto antigenů společně s kontrolními hyperimunními králíčími séry a souborem precharakterizovaných lidských sér. Hyperimunní králíčí séra byla získána tak, že králíci byly opakovaně imunizováni částicemi odvozenými pouze od jednoho subtypu, tvořenými jen VP1 proteinem. Proto by králíčí séra neměla obsahovat protilátky proti minoritním proteinům, které mohou být částečně zodpovědné za zkříženou reaktivitu u lidských sér a experimentálních zvířat infikovaných přímo viry. Zároveň mají králíčí séra díky imunizaci mnohem vyšší titer protilátek než lidská séra, proto je potřeba je více ředit. Vzhledem ke specificitě protilátek přítomných v králíčím séru je diagnostika jednodušší, než u lidských sér, která mohou následkem koinfekce obsahovat protilátky proti více subtypům a také mají nižší titry protilátek než hyperimunní séra. U králíčích sér se podařilo získat subtypově specifickou reaktivitu pomocí HIA při ředění 1:500. Pro lidská séra je také možné odstranit nespecifické křížově reagující protilátky dostatečným ředěním individuálních sér (Kardas et al. 2015), tento postup ale v klinické praxi není pro screeningové vyšetření protilátek použitelný.

Tradiční způsob sérologického testování už několik desítek let představuje hemaglutinačně inhibiční test. V současnosti se metoda příliš nepoužívá a přednost dostávají sérologické metody přesněji měřitelné a zároveň snazší na provedení a manipulaci s materiálem, jako třeba výše uvedená ELISA, multiplexové metody jako Luminex nebo imunofluorescence. I přesto byl HIA v rámci praktické části diplomové práce testován. HIA byl testován proto, že se masivně používal i v souvislosti s BKV v době, kdy se ještě nevěnovala subtypově specifické reaktivitě protilátek pozornost. Nás zajímalo, jestli pomocí HIA detekujeme rozdíl v reaktivitě protilátek s jednotlivými subtypy. Navíc jsme na základě studie od Hutson et al. (2003) chtěli otestovat, zda změna podmínek HA a HIA ovlivní výsledek a zda případně pomůže rozlišit subtypově specifickou reaktivitu. Testovala jsem dva druhy krvinek, lidské krvinky krevní skupiny 0+ a morčecí krvinky. Ve studii provedené Pastrana et al. (2013) byly také testovány různé typy krvinek, včetně lidských skupiny A a 0 a dalších zvířecích. Morčecí krev nebyla používána. V této studii zaznamenali rozdíly v hemaglutinaci krvinek pocházejících z různých zdrojů s různými subtypy BKV. Ve studii Mäntyjärvi et al. (1972) testovali hemaglutinaci s morčecí a lidskou (skupiny 0) krví BK virem při pH v rozmezí 5,6 - 8,6 a při čtyřech různých teplotách - 0°C, 4°C, pokojová teplota a 37°C. Zásadité pH a teplota 37°C zapříčinila, že virus krvinky téměř nehemaglutinoval a proto jsme takové podmínky z testování vyřadili. Hemaglutinace BKV s morčecími a lidskými krvinkami měla velmi podobné výsledky. V této studii ovšem vůbec nepracovali s různými subtypy BKV, jejichž existence byla objevena až o 20 let později. V této diplomové práci byla pro HA zvolena inkubace při pokojové teplotě, při inkubaci na ledu krvinky tvořily na dně jamek nevyhodnotitelné útvary (Obr. 5.19). Stejně jako ve studii Mäntyjärvi et al. (1972) měla hemaglutinace podobný vzorec při použití lidských i morčecích krvinek. Kyselé pH značně zvýšilo ředění, při kterém ještě lidské i morčecí krvinky hemaglutinují a proto bylo zvoleno jako optimální pH pro další testování. Vyšší hemaglutinační titr získaný v kyselém pH značí, že kyselé pH značně zvyšuje citlivost a to by mohlo mít pozitivní vliv na snazší určení subtypově specifické reaktivity séra při HIA. Dle zkušeností v laboratoři kyselé pH mění konformaci viru a ten se pak mnohem více váže na buňky (ústní sdělení kolegů z laboratoře).

Jako antigeny pro HA a HIA byly použity VLPs odvozené od BKV subtypu I a IV. Z výsledků hemaglutinace lze vidět, že VLPs subtypu I a IV přestávají hemaglutinovat v různých jamkách. Možné vysvětlení je, že stejně jako různé viry váží různé glykany obsahující kyselinu sialovou (Neu et al. 2011), mohou být i mezi jednotlivými subtypy BKV odlišnosti v preferenci typu receptorů s kyselinou sialovou. HIA probíhaly v kyselém pH s využitím morčecích krvinek, protože lidské později nebyly k dispozici a první HIA s lidskými krvinkami byl nevyhodnotitelný, kvůli neplatné kontrole. Při použití kontrolních králíčích sér se povedlo rozlišit subtypově specifické protilátky při ředění 1:500. Po inaktivaci séra pomocí trypsinu a jodistanu draselného se ředění, kdy lze vidět subtypově specifickou reaktivitu, snížilo na 1:50. Pro lidská séra na HIA chyběla spolehlivá negativní kontrola a výsledky byly nevyhodnotitelné. Hemaglutinace a hemaglutinačně inhibiční test jsou tradiční sérologické metody, které ale v současnosti ztrácí na oblíbenosti. Možným důvodem je právě jejich nekonzistentnost. Hodně záleží na kvalitě krvinek, což se potvrdilo i během mého diplomového projektu, kdy v jednom období krvinky z nevysvětlitelných důvodů vůbec nehemaglutinovaly. HA a HIA jsou metody citlivé k okolním podmínkám, což dokazují i provedené pokusy za různé teploty a různého pH. Změny v podmínkách zapříčinily velké rozdíly ve výsledcích. Zároveň může být i metodou nejednoznačnou pro vyhodnocování. HIA s lidskými séry se nám příliš neosvědčil, potřeboval by jistě další optimalizaci a testování a vzhledem k jejímu ústupu jsme dali přednost v současnosti mnohem používanější sérologické metodě ELISA.

Pro ELISA testování byla opět použita kontrolní králíčí séra a precharakterizovaná séra. Úvodní série testování sloužila k optimalizaci metody a byly pro ni použity jako antigeny VLPs BKV I a BKV IV. Po optimalizaci byly přidány i různé varianty pseudovirionů. Pseudoviriony jako antigen pro ELISA využívala i Pastrana et al. (2012). Tyto pseudoviriony byly složeny i z minoritních proteinů a autoři při testování pomocí ELISA zaznamenali silnou křížovou reaktivitu mezi jednotlivými subtypy. Je možné, že právě přítomnost minoritních proteinů pozitivně ovlivňuje křížovou reaktivitu. V intaktní částici jsou sice minoritní proteiny zanořené uvnitř kapsidy (Obr. 2.1), ale po vstupu viru do buňky dochází ke změnám konformace a při transportu z endozomu do endoplazmatického reti-

kula dochází k vystavení proteinu VP2 na povrch kapsidy (Nelson et al. 2013), takže se mohou tvořit protilátky proti minoritním proteinům. Proto nás zajímalo srovnání reaktivity pseudovirionů složených pouze z majoritního kapsidového proteinu s reaktivitou pseudovirionů složených i z minoritního kapsidového proteinu. Ukázalo se, že reaktivita pseudovirionů obsahujících i minoritní kapsidový protein VP2 má totožný charakter jako pseudoviriony stejného subtypu tvořené pouze VP1, ale je vždy mírně vyšší. To naznačuje, že minoritní proteiny opravdu mohou být zapojeny do interakce s protilátkami a tím pádem mírně zvyšovat křížovou reaktivitu mezi subtypy, při testování v této diplomové práci ale rozdíl reaktivity nebyl tak vysoký, aby bylo nutné ho dále brát v potaz. Kromě porovnání reaktivity pseudovirionů obsahujících minoritní protein s reaktivitou pseudovirionů bez minoritního proteinu nás zajímalo porovnání reaktivity nemutovaných částic s částicemi obsahující mutaci v DE a EF smyčce. DE a EF smyčka byly pro mutagenезi vybrány, protože sekvence HI smyčky je pro subtyp I a IV shodná (Obr. 5.1) a BC smyčka naopak obsahuje příliš velké množství rozdílných aminokyselin napříč subtypy, takže by její mutagenезe byla časově náročná. DE smyčka obsahuje pouze jednu rozdílnou aminokyselinu, která byla mutována. EF smyčka obsahuje čtyři rozdílné aminokyseliny, mutovány byly ale jen dvě z nich. Důvodem je, že další dvě aminokyseliny, které nebyly mutovány, jsou zanořeny uvnitř kapsidy a nemají šanci s protilátkami interagovat (Obr. A.1). Co se týče mutantních částic, předpokládali jsme, že pokud bude mutagenезí zasažen epitop významný pro interakci s protilátkami, dojde u takové částice k poklesu reaktivity s monospecifickým sérem, tedy sérem, které obsahuje pouze protilátky proti BKV IV. Zároveň by takové částice mohly být po mutagenезi rozpoznávány monospecifickým sérem, který obsahuje protilátky proti BKV I. Ke změně reaktivity mutantních částic opravdu došlo, ale jinak, než jsme předpokládali. Částice s mutací v DE smyčce reagovaly podobně jako nemutované částice subtypu IV, ale silněji. Zdá se, že by tyto částice mohly být použity jako vysycovací antigen pro ELISA testování, který odstraní křížově reagující protilátky a v séru pak zůstanou přítomny jen subtypově specifické protilátky. Po zavedení mutace do oblasti EF smyčky částice s touto mutací zcela přestaly reagovat s jakýmkoliv testovaným sérem nebo protilátkou. To by mohlo zname-

nat, že jedna ze dvou mutovaných aminokyselin v EF smyčce je významná pro vazbu subtypově specifických protilátek a pokud je tato aminokyselina změněna, protilátky místo nerozpoznávají a nenaváží se. Výsledek je o to zajímavější, že dvě aminokyseliny v EF smyčce, které byly pomocí mutagenese zavedeny, se běžně vyskytují v EF smyčce subtypu I. To naznačuje, že pro vazbu protilátek je klíčová kombinace mutovaného místa v EF smyčce společně s nějakým dalším místem v BC smyčce, jelikož HI smyčka je napříč subtypy identická a jedinou rozdílnou aminokyselinu v DE smyčce jsem otestovala. BC smyčka obsahuje velké množství aminokyselinových záměn (Obr. 5.1). Pomocí strukturního modelu pentameru VP1 by se ale dala vytipovat místa, která vyčnívají na povrch a mají možnost interagovat s protilátkami. V literatuře už navíc bylo identifikováno několik aminokyselin v oblasti BC smyčky, které by mohly být klíčové pro interakci s receptorem a dá se tak předpokládat, že jsou důležité i pro interakci s protilátkami. Vytipovat místa vhodná pro mutagenesi BC smyčky by se dalo i pomocí nástroje BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Například v článku Krautkrämer et al. (2009) sekvenovali autoři VP1 protein získaný ze 45 vzorků od pacientů a našli u několika vzorků různé mutace v BC smyčce. Pomocí BLAST by se daly nalézt existující kombinace aminokyselin v BC smyčce s námi zaváděnými aminokyselinami v EF smyčce a tyto kombinace by potom nebylo potřeba testovat. Fakt, že se kombinace přirozeně vyskytuje v populaci značí, že proti ní bude existovat protilátka. O významnosti některých epitopů se zmiňuje například studie Neu et al. (2013), ve které změna lysinu na pozici 68 změnila specifitu BKV k receptoru. Dále byly jako aminokyseliny významné pro interakci s receptorem identifikovány aminokyseliny na pozicích 59, 67 a 83. To potvrzuje článek od Hurdiss et al. (2018) ve kterém autoři identifikovali, že s receptorem interagují aminokyseliny na pozicích 59 a 83. To dokazuje, že tyto aminokyseliny jsou vystavené na povrchu a přístupné interakci s receptorem a tím pádem mohou tyto aminokyseliny nebo některé z aminokyselin na sousedních pozicích sloužit jako imunogenní epitopy.

Mutace v DE smyčce na stejné pozici 139 byla mimo jiné zaznamenána i ve dvou izolátech BKV DNA od pacientů po transplantaci ledvin, konkrétně v jednom vzorku z celkového počtu 45 vzorků byla zaznamenána mutace H139N u sub-

typu Ib2 a u jednoho vzorku byla nalezena mutace N139K u subtypu IV (Krautkrämer et al. 2009). Mutace, kterou jsem cíleně zaváděla byla N139H u BKV IV subtypu. Na základě programu BLAST byly porovnány sekvence mnou mutovaných proteinů se sekvencemi proteinů dostupných v databázi. Vzorek s největší shodou (sekvenován ve studii Zhong et al. (2009), dle studie se jedná o subtyp Ic2, GenBank číslo: BAG84476) obsahoval všechny tři aminokyseliny, které jsem pomocí mutagenese zaváděla. Je zajímavé, že zbytek sekvence tohoto proteinu je shodný se sekvencí VP1 BKV IV, ale autoři přesto určili, že se jedná o subtyp Ic2. Vzorek s druhou nejvyšší shodou byl sekvenován ve studii Ikegaya et al. (2006), dle studie se jedná o subtyp IV a GenBank číslo je BAF03115. Tento vzorek opět obsahoval všechny tři aminokyseliny, které byly v rámci mutagenese zaváděny, navíc se v oblasti EF smyčky na pozici 215 nacházela aminokyselina typická pro subtyp I, tedy místo lysinu zde byl arginin (Obr. 5.1). V databázi vzorků izolovaných z pacientů nebyla nalezena žádná sekvence, která by měla 100% shodu s mnou připravenými proteiny s mutací v EF nebo DE smyčce, nalezeny byly pouze sekvence s kombinací záměn v obou smyčkách. To napovídá, že se přirozeně v populaci nevyskytují subtypy BKV se substitucí pouze v DE smyčce na pozici 139 nebo pouze v EF smyčce na pozici 175 a 178, ale minimálně kombinace substitucí na všech třech pozicích. To, že by pro interakci s protilátkami mohlo být velmi významné místo 175 v EF smyčce dokazuje i článek publikovaný v březnu letošního roku (Lindner et al. 2019). Autoři článku izolovali protilátky proti BKV z pacientů a dále je analyzovali. Pro důkladnou analýzu vybrali panspecifickou protilátku, která dokáže zkříženě neutralizovat všechny hlavní subtypy BKV. Na základě analýzy pak stanovili předpokládaná místa, kam se vybraná protilátka váže. Těchto míst bylo označeno několik, pouze dvě z nich se ale liší v přítomné aminokyselině mezi jednotlivými subtypy. Jedno z nich je právě mnou mutované místo 175 v EF smyčce a druhé je místo 61 v BC smyčce. Pokud zkombinujeme výsledky této studie (Lindner et al. 2019) a výsledky této diplomové práce, je možné, že právě substituce aminokyselin na pozicích 61 a 175 v sekvenci VP1 proteinu by mohla být klíčová pro interakci s křížově reagujícími protilátkami, zatímco kombinace aminokyselin v BC, DE a EF smyčce může určovat vazbu protilátek monospecifických.

Tato diplomová práce je součástí dlouhodobého projektu, jehož cílem je přesně sérologicky odlišit subtypy BKV. Další výzkum by se měl zabírat především testováním reaktivity mutované EF smyčky s dalšími protilátkami a séry a zároveň se zaměřit na mapování BC smyčky. Dle literatury by se dala vytipovat místa v BC smyčce vhodná k mutagenезi, například lysin na pozici 68. Předpokládáme, že protilátka by se mohly vázat na nějaké místo v BC smyčce a na mnou mutované místo v EF smyčce a je potřeba tuto hypotézu otestovat. Zároveň by bylo jistě zajímavé otestovat částice s mutací v DE smyčce jako heterologní antigen pro vysycení sér před ELISA. Tento antigen by mohl vysytit křížově reagující protilátka a v séru by zůstaly přítomny jen subtypově specifické protilátka, jejichž přítomnost a identitu by potvrdila navazující ELISA. Případně by bylo možné vyzkoušet i ELISA s částicemi rozloženými na jednotlivé pentamery a otestovat, zda díky rozebrání dojde k vystavení dalších epitopů a jak se reaktivita změní v porovnání s reaktivitou intaktních částic. Tento pokus by byl jistě vhodný i vzhledem k rostoucí popularitě používání proteinu VP1 fúzovaného s glutathion S-transferázou jako antigenu pro sérologické metody, jako je již zmiňovaný Luminex. Výsledky by napověděly, zda je použití samotného VP1 proteinu nesloženého do pentamerů a částic vhodné nebo opravdu dochází k vystavení jiných epitopů a tím pádem zisku falešně pozitivních výsledků.

7. Závěr

Dlouhodobým cílem, na jehož dosažení se tato diplomová práce podílí, je přispět k vývoji sérologického diagnostického testu, který spolehlivě rozliší subtypy I a IV BKV.

Prvním dílčím cílem této diplomové práce bylo optimalizovat podmínky hemaglutinačně inhibičního testu tak, aby bylo možné odlišit subtypově specifickou reaktivitu protilátek. Používána byla kontrolní králičí séra a precharakterizovaná lidská séra. U kontrolních králičích sér se podařilo nastavit podmínky HIA, aby bylo možné odlišit subtypově specifickou reakci protilátek. U lidských sér byl sérologický průkaz pomocí HIA problematičtější. Nejprve byly otestovány různé způsoby inaktivace sér pro odstranění nespecifických inhibitorů hemaglutinace, z nichž byl nejlepší způsob pro inaktivaci séra pomocí trypsinu a jodistanu draselného. Inaktivace umožnila rozlišení subtypově specifické reaktivity již při nižším ředění u králičích sér. Vzhledem k časovým důvodům a složitosti provedení HIA není u lidských sér optimalizace testu dokončena.

V rámci plnění druhého cíle byly pro testování reaktivity pomocí ELISA připraveny různé antigeny. K dispozici byly BKV VLPs subtypu I a subtypu IV, produkované bakulovirovým expresním systémem, a také BKV PsVs subtypu I a IV, produkované savčím expresním systémem. Kromě PsVs odvozených od obou subtypů byly k dispozici ještě PsVs tvořené navíc minoritním proteinem VP2 a dvě mutanční varianty PsVs. Tyto mutanty byly získány pomocí mutagenese VP1 proteinu subtypu IV tak, aby sekvence aminokyselin v oblasti DE nebo EF smyčky byla shodná se sekvencí aminokyselin subtypu I. Soubor antigenů byl otestován pomocí ELISA testu. Při testování mutantních pseudovirionů bylo zjištěno, že částice s mutací v DE smyčce reagují podobně jako nemutované částice subtypu IV, ale jejich reaktivita je vyšší. Částice s mutací v EF smyčce nereagují s žádným z testovaných sér a protilátek. To značí, že mutovaná aminokyselina v EF smyčce je významná pro vazbu protilátek a její změna zapříčiní, že protilátky se nemohou na tento epitop vázat.

Třetí dílčí cíl se zaměřoval na zjištění, zda je v ELISA testu reaktivita protilátek s pseudoviriony a VLPs srovnatelná a na určení příspěvku přítomnosti minoritních proteinů k celkové reaktivitě protilátek s antigeny. Bylo zjištěno, že silněji interagují s protilátkami VLPs než PsVs. Porovnání reaktivity PsVs složených pouze z majoritního kapsidového proteinu s PsVs složenými i z minoritního kapsidového proteinu VP2 nepřineslo výrazné rozdíly. Reaktivita částic obsahující VP1 i VP2 protein je jen lehce vyšší než reaktivita částic bez minoritních proteinů. Byly testovány pouze částice s VP2 proteinem, jelikož VP3 protein je kratší izoforma proteinu VP2.

Literatura

- Abend, J. R., Changala, M., Sathe, A., Casey, F., Kistler, A., Chandran, S., Howard, A. & Wojciechowski, D. (2017), 'Correlation of bk virus neutralizing serostatus with the incidence of bk viremia in kidney transplant recipients', *Transplantation* **101**(6), 1495–1505.
- Anders, E. M., Hartley, C. A. & Jackson, D. C. (1990), 'Bovine and mouse serum beta inhibitors of influenza A viruses are mannose-binding lectins.', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**(12), 4485–4489.
- Bodaghi, S., Comoli, P., Bösch, R., Azzi, A., Gosert, R., Leuenberger, D., Ginevri, F. & Hirsch, H. H. (2009), 'Antibody responses to recombinant polyomavirus bk large t and vp1 proteins in young kidney transplant patients', *Journal of clinical microbiology* **47**(8), 2577–2585.
- Bogdanovic, G., Priftakis, P., Taemmeraes, B., Gustafsson, A., Flaegstad, T., Winiarski, J. & Dalianis, T. (1998), 'Primary bk virus (bkv) infection due to possible bkv transmission during bone marrow transplantation is not the major cause of hemorrhagic cystitis in transplanted children.', *Pediatric transplantation* **2**(4), 288–293.
- Buck, C. B., Pastrana, D. V., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (2004), 'Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors', *Journal of virology* **78**(2), 751–757.
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P. & Garcia, M.-I. (2003), ' $\alpha 4\beta 1$ integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level', *Journal of virology* **77**(7), 3913–3921.
- Corallini, A., Mazzoni, E., Taronna, A., Manfrini, M., Carandina, G., Guerra, G., Guaschino, R., Vaniglia, F., Magnani, C., Casali, F. et al. (2012), 'Specific antibodies reacting with simian virus 40 capsid protein mimotopes in serum samples from healthy blood donors', *Human immunology* **73**(5), 502–510.

- Crowther, J. R. (2000), *The ELISA guidebook*, Vol. 149, Springer Science & Business Media.
- Doucet, J., Zhao, A., Fu, J. & Avrameas, A. (2013), 'Development and validation of an elisa at acidic ph for the quantitative determination of il-13 in human plasma and serum', *Disease markers* **35**(5), 465–474.
- Fafi-Kremer, S., Fofana, I., Soulier, E., Carolla, P., Meuleman, P., Leroux-Roels, G., Patel, A. H., Cosset, F.-L., Pessaux, P., Doffoël, M. et al. (2010), 'Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis c virus reinfection in liver transplantation', *Journal of Experimental Medicine* **207**(9), 2019–2031.
- Flaegstad, T., Traavik, T., Christie, K. E. & Joergensen, J. (1986), 'Neutralization test for bk virus: plaque reduction detected by immunoperoxidase staining', *Journal of medical virology* **19**(3), 287–296.
- Gardner, S., Field, A., Coleman, D. & Hulme, B. (1971), 'New human papovavirus (bk) isolated from urine after renal transplantation', *The Lancet* **297**(7712), 1253–1257.
- Gheit, T., Dutta, S., Oliver, J., Robitaille, A., Hampras, S., Combes, J.-D., McKay-Chopin, S., Le Calvez-Kelm, F., Fenske, N., Cherpelis, B. et al. (2017), 'Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus', *Virology* **506**, 45–54.
- Hamilton, R., Gravell, M. & Major, E. (2000), 'Comparison of antibody titers determined by hemagglutination inhibition and enzyme immunoassay for jc virus and bk virus', *Journal of clinical microbiology* **38**(1), 105–109.
- Hejtmánková, A., Roubalová, K., Forejťová, A., Žáčková Suchanová, J., Forstová, J., Viklický, O. & Španielová, H. (2019), 'Prevalence of antibodies against bkpyv subtype i and iv in kidney transplant recipients and in the general czech population', *Journal of medical virology* .
- Helle, F., Brochot, E., Handala, L., Martin, E., Castelain, S., Francois, C. & Duverlie, G. (2017), 'Biology of the bkpyv: An update', *Viruses* **9**(11), 327.

- Hirsch, H. H., Knowles, W., Dickenmann, M., Passweg, J., Klimkait, T., Mihatsch, M. J. & Steiger, J. (2002), 'Prospective study of polyomavirus type bk replication and nephropathy in renal-transplant recipients', *New England Journal of Medicine* **347**(7), 488–496.
- Hirst, G. K. (1948), 'The nature of the virus receptors of red cells: I. evidence on the chemical nature of the virus receptors of red cells and of the existence of a closely analogous substance in normal serum', *Journal of Experimental Medicine* **87**(4), 301–314.
- Hurdiss, D. L., Frank, M., Snowden, J. S., Macdonald, A. & Ranson, N. A. (2018), 'The structure of an infectious human polyomavirus and its interactions with cellular receptors', *Structure* .
- Hutson, A. M., Atmar, R. L., Marcus, D. M. & Estes, M. K. (2003), 'Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens', *Journal of virology* **77**(1), 405–415.
- Ikegaya, H., Saukko, P. J., Tertti, R., Metsärinne, K. P., Carr, M. J., Crowley, B., Sakurada, K., Zheng, H.-Y., Kitamura, T. & Yogo, Y. (2006), 'Identification of a genomic subgroup of bk polyomavirus spread in european populations', *Journal of general virology* **87**(11), 3201–3208.
- Isaacs, A. & Bozzo, A. (1951), 'The use of v. cholerae filtrates in the destruction of non-specific inhibitor in ferret sera', *British journal of experimental pathology* **32**(4), 325.
- Jin, L., Gibson, P. E., Booth, J. C. & Clewley, J. P. (1993), 'Genomic typing of bk virus in clinical specimens by direct sequencing of polymerase chain reaction products', *Journal of medical virology* **41**(1), 11–17.
- Jin, L., Gibson, P. E., Knowles, W. A. & Clewley, J. P. (1993), 'Bk virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid vp1 epitope', *Journal of medical virology* **39**(1), 50–56.
- Kamata, N., Enomoto, A., Ishida, S., Nakamura, K., Kurisaki, J.-i. & Kaminogawa, S. (1996), 'Comparison of ph and ionic strength dependence of interactions

- between monoclonal antibodies and bovine β -lactoglobulin', *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **60**(1), 25–29.
- Kamminga, S., van der Meijden, E., Wunderink, H. F., Touzé, A., Zaaijer, H. L. & Feltkamp, M. C. (2018), 'Development and evaluation of a broad bead-based multiplex immunoassay to measure igg seroreactivity against human polyomaviruses', *Journal of clinical microbiology* **56**(4), e01566–17.
- Kantola, K., Sadeghi, M., Ewald, M. J., Weissbrich, B., Allander, T., Lindau, C., Andreasson, K., Lahtinen, A., Kumar, A., Norja, P. et al. (2010), 'Expression and serological characterization of polyomavirus wupyv and kipyv structural proteins', *Viral immunology* **23**(4), 385–393.
- Kardas, P., Leboeuf, C. & Hirsch, H. H. (2015), 'Optimizing jc and bk polyomavirus igg testing for seroepidemiology and patient counseling', *Journal of Clinical Virology* **71**, 28–33.
- Kean, J. M., Rao, S., Wang, M. & Garcea, R. L. (2009), 'Seroepidemiology of human polyomaviruses', *PLoS pathogens* **5**(3), e1000363.
- Kim, H.-R., Lee, K.-K., Kwon, Y.-K., Kang, M.-S., Moon, O.-K. & Park, C.-K. (2012), 'Comparison of serum treatments to remove nonspecific inhibitors from chicken sera for the hemagglutination inhibition test with inactivated h5n1 and h9n2 avian influenza a virus subtypes', *Journal of veterinary diagnostic investigation* **24**(5), 954–958.
- Kojzarová, M. (2011), 'Příprava chimerických vlp myšího polyomaviru nesoucích epitopy maligního melanomu'.
- Korth, J., Anastasiou, O. E., Bräsen, J. H., Brinkhoff, A., Lehmann, U., Kribben, A., Dittmer, U., Verheyen, J., Wilde, B., Ciesek, S. et al. (2019), 'The detection of bkpyv genotypes ii and iv after renal transplantation as a simple tool for risk assessment for pyvan and transplant outcome already at early stages of bkpyv reactivation', *Journal of Clinical Virology* .

- Krautkrämer, E., Klein, T. M., Sommerer, C., Schnitzler, P. & Zeier, M. (2009), 'Mutations in the bc-loop of the bkv vp1 region do not influence viral load in renal transplant patients', *Journal of medical virology* **81**(1), 75–81.
- Kuypers, D. R. (2012), 'Management of polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients', *Nature Reviews Nephrology* **8**(7), 390.
- Lagatie, O., Van Loy, T., Tritsmans, L. & Stuyver, L. J. (2014), 'Antibodies reacting with jcpyv_vp2 _167-15mer as a novel serological marker for jc polyomavirus infection', *Virology journal* **11**(1), 174.
- Lasickienė, R., Gedvilaite, A., Norkiene, M., Simanaviciene, V., Sezaite, I., Dekaminaviciute, D., Shikova, E. & Zvirbliene, A. (2012), 'The use of recombinant pseudotype virus-like particles harbouring inserted target antigen to generate antibodies against cellular marker p16ink4a', *The Scientific World Journal* **2012**.
- Lindner, J. M., Cornacchione, V., Sathe, A., Be, C., Srinivas, H., Riquet, E., Leber, X.-C., Hein, A., Wrobel, M. B., Scharenberg, M. et al. (2019), 'Human memory b cells harbor diverse cross-neutralizing antibodies against bk and jc polyomaviruses', *Immunity* **50**(3), 668–676.
- Mäntyjärvi, R. A., Arstila, P. P. & Meurman, O. H. (1972), 'Hemagglutination by bk virus, a tentative new member of the papovavirus group', *Infection and immunity* **6**(5), 824–828.
- Mattern, C. F., Takemoto, K. K. & DeLeva, A. M. (1967), 'Electron microscopic observations on multiple polyoma virus-related particles', *Virology* **32**(3), 378–392.
- Mazeike, E., Gedvilaite, A. & Blohm, U. (2012), 'Induction of insert-specific immune response in mice by hamster polyomavirus vp1 derived virus-like particles carrying lcmv gp33 ctl epitope', *Virus research* **163**(1), 2–10.
- Neel, J., Major, E., Awa, A., Glover, T., Burgess, A., Traub, R., Curfman, B. & Satoh, C. (1996), 'Hypothesis: "rogue cell"-type chromosomal damage in

- lymphocytes is associated with infection with the jc human polyoma virus and has implications for oncopenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(7), 2690–2695.
- Nelson, C. D., Carney, D. W., Derdowski, A., Lipovsky, A., Gee, G. V., O'Hara, B., Williard, P., DiMaio, D., Sello, J. K. & Atwood, W. J. (2013), 'A retrograde trafficking inhibitor of ricin and shiga-like toxins inhibits infection of cells by human and monkey polyomaviruses', *MBio* **4**(6), e00729–13.
- Neu, U., Bauer, J. & Stehle, T. (2011), 'Viruses and sialic acids: rules of engagement', *Current opinion in structural biology* **21**(5), 610–618.
- Neu, U., Stacy-ann, A. A., Blaum, B. S., Liu, Y., Frank, M., Palma, A. S., Ströh, L. J., Feizi, T., Peters, T., Atwood, W. J. et al. (2013), 'A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets bk polyomavirus', *PLoS pathogens* **9**(10), e1003688.
- Nickeleit, V., Singh, H. K. & Rivier, L. H. (2018), 'Antibodies can extenuate polyomavirus infections', *Journal of the American Society of Nephrology* **29**(5), 1577–1577.
- Nishimoto, Y., Zheng, H.-Y., Zhong, S., Ikegaya, H., Chen, Q., Sugimoto, C., Kitamura, T. & Yogo, Y. (2007), 'An asian origin for subtype iv bk virus based on phylogenetic analysis', *Journal of molecular evolution* **65**(1), 103–111.
- Pastrana, D. V., Brennan, D. C., Çuburu, N., Storch, G. A., Viscidi, R. P., Randhawa, P. S. & Buck, C. B. (2012), 'Neutralization serotyping of bk polyomavirus infection in kidney transplant recipients', *PLoS pathogens* **8**(4), e1002650.
- Pastrana, D. V., Ray, U., Magaldi, T. G., Schowalter, R. M., Çuburu, N. & Buck, C. B. (2013), 'Bk polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism', *Journal of virology* **87**(18), 10105–10113.
- Rahbari, A. H., Keshavarz, H., Shojaee, S., Mohebbali, M. & Rezaeian, M. (2012), 'Igg avidity elisa test for diagnosis of acute toxoplasmosis in humans', *The Korean journal of parasitology* **50**(2), 99.

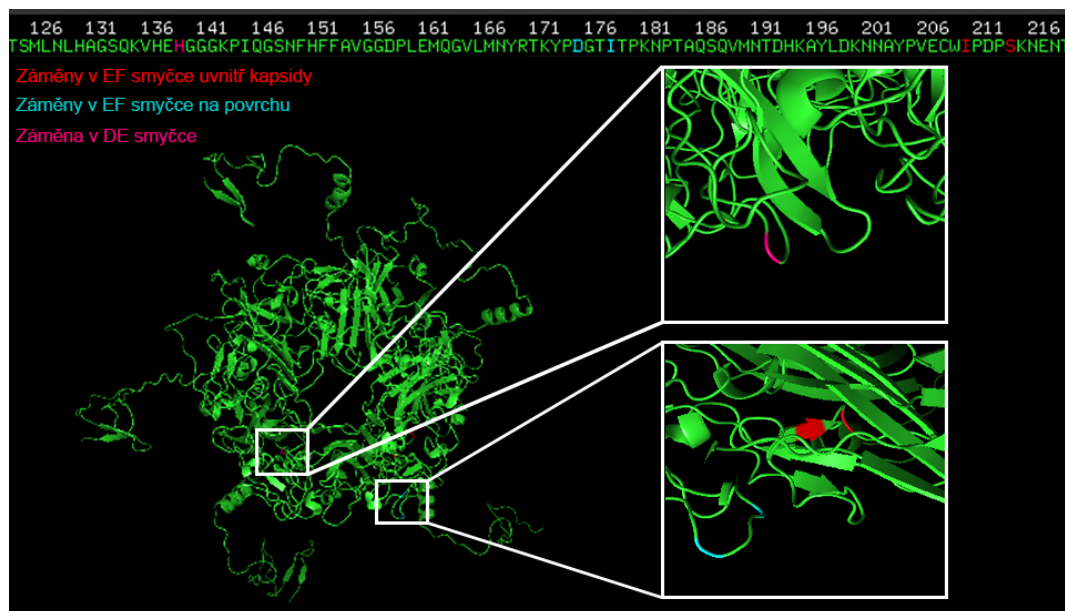
- Randhawa, P., Pastrana, D., Zeng, G., Huang, Y., Shapiro, R., Sood, P., Puttara-jappa, C., Berger, M., Hariharan, S. & Buck, C. (2015), 'Commercially available immunoglobulins contain virus neutralizing antibodies against all major genotypes of polyomavirus bk', *American Journal of Transplantation* **15**(4), 1014–1020.
- Randhawa, P., Viscidi, R., Carter, J. J., Galloway, D. A., Culp, T. D., Huang, C., Ramaswami, B. & Christensen, N. D. (2009), 'Identification of species-specific and cross-reactive epitopes in human polyomavirus capsids using monoclonal antibodies', *The Journal of general virology* **90**(Pt 3), 634.
- Salunke, D., Caspar, D. & Garcea, R. (1989), 'Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein vp1', *Biophysical journal* **56**(5), 887–900.
- Salunke, D. M., Caspar, D. L. & Garcea, R. L. (1986), 'Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein vp1', *Cell* **46**(6), 895–904.
- Sekavová, A. (2017), 'Preparation of polyomaviral nanostructures for diagnostics of bk virus infections'.
- Solis, M., Velay, A., Porcher, R., Domingo-Calap, P., Soulier, E., Joly, M., Meddeb, M., Kack-Kack, W., Moulin, B., Bahram, S. et al. (2018), 'Neutralizing antibody-mediated response and risk of bk virus-associated nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology* **29**(1), 326–334.
- Sood, P., Senanayake, S., Sujeet, K., Medipalli, R., Zhu, Y. R., Johnson, C. P. & Hariharan, S. (2012), 'Management and outcome of bk viremia in renal transplant recipients: a prospective single-center study', *Transplantation* **94**(8), 814–821.
- Šroller, V., Hamšíková, E., Ludvíková, V., Vochozková, P., Kojzarová, M., Fraiberk, M., Saláková, M., Morávková, A., Forstová, J. & Němečková, Š. (2014), 'Seroprevalence rates of bk, jcv, and mcpv polyomaviruses in the general czech republic population', *Journal of medical virology* **86**(9), 1560–1568.

- Stehle, T. & Harrison, S. C. (1996), 'Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments', *Structure* **4**(2), 183–194.
- Stolt, A., Sasnauskas, K., Koskela, P., Lehtinen, M. & Dillner, J. (2003), 'Seroprevalence of the human polyomaviruses', *Journal of General Virology* **84**(6), 1499–1504.
- Tremolada, S., Akan, S., Otte, J., Khalili, K., Ferrante, P., Chaudhury, P. R., Woodle, E. S., Trofe-Clark, J., White, M. K. & Gordon, J. (2010), 'Rare subtypes of bk virus are viable and frequently detected in renal transplant recipients with bk virus-associated nephropathy', *Virology* **404**(2), 312–318.
- Tsai, W.-Y., Youn, H. H., Tyson, J., Brites, C., Tsai, J.-J., Pedroso, C., Drexler, J. F., Balmaseda, A., Harris, E. & Wang, W.-K. (2018), 'Use of urea wash elisa to distinguish zika and dengue virus infections', *Emerging infectious diseases* **24**(7), 1355.
- Viscidi, R. P., Rollison, D. E., Viscidi, E., Clayman, B., Rubalcaba, E., Daniel, R., Major, E. O. & Shah, K. V. (2003), 'Serological cross-reactivities between antibodies to simian virus 40, bk virus, and jc virus assessed by virus-like-particle-based enzyme immunoassays', *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**(2), 278–285.
- Wang, Q., Lei, Y., Lu, X., Wang, G., Du, Q., Guo, X., Xing, Y., Zhang, G. & Wang, D. (2019), 'Urea-mediated dissociation alleviate the false-positive treponema pallidum-specific antibodies detected by elisa', *PloS one* **14**(3), e0212893.
- Willicombe, M., Brookes, P., Sergeant, R., Santos-Nunez, E., Steggar, C., Galiford, J., Mclean, A., Cook, T. H., Cairns, T., Roufosse, C. et al. (2012), 'De novo dq donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy', *Transplantation* **94**(2), 172–177.
- Wunderink, H. F., de Brouwer, C. S., van der Meijden, E., Pastrana, D. V., Kroes, A. C., Buck, C. B. & Feltkamp, M. C. (2019), 'Development and evaluation

of a bk polyomavirus serotyping assay using luminex technology', *Journal of Clinical Virology* **110**, 22–28.

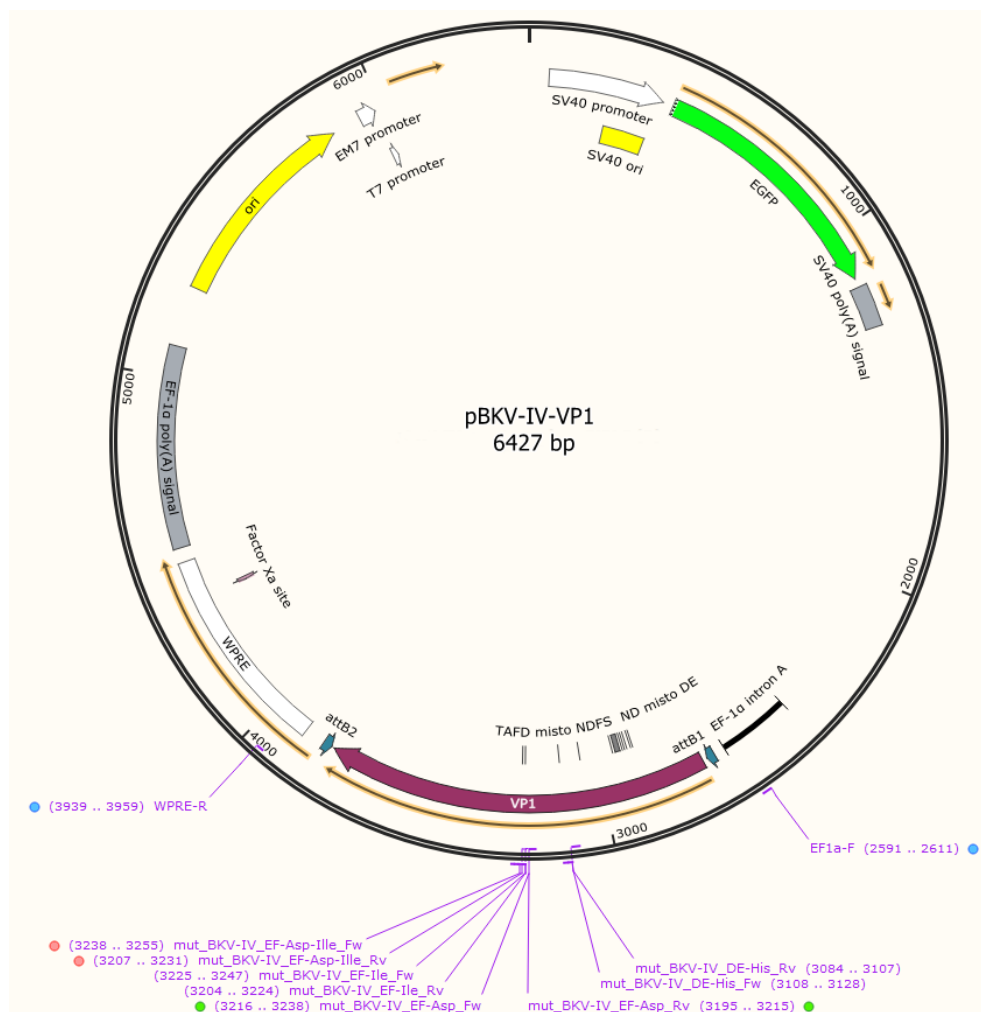
Zhong, S., Randhawa, P. S., Ikegaya, H., Chen, Q., Zheng, H.-Y., Suzuki, M., Takeuchi, T., Shibuya, A., Kitamura, T. & Yogo, Y. (2009), 'Distribution patterns of bk polyomavirus (bkv) subtypes and subgroups in american, european and asian populations suggest co-migration of bkv and the human race', *Journal of General Virology* **90**(1), 144–152.

A. Přílohy



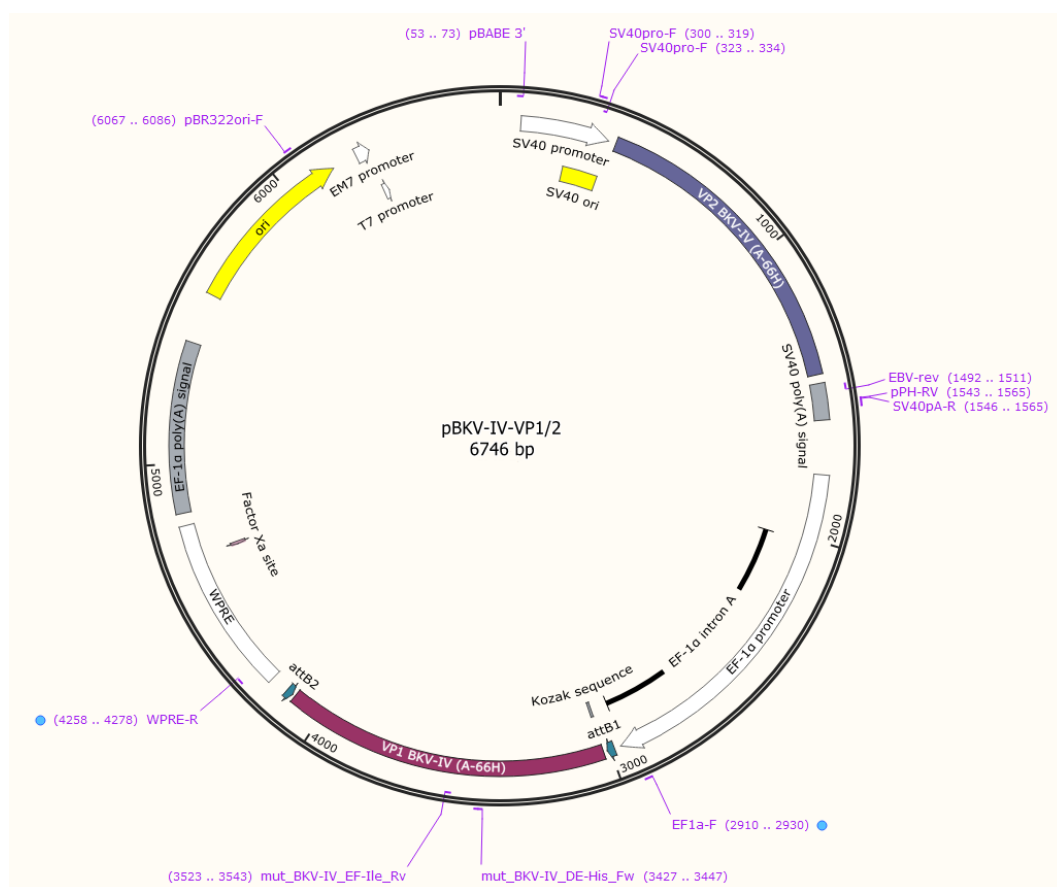
Obrázek A.1: Pentamer VP1 proteinu BKV s vyznačenými rozdílnými aminokyselinami mezi subtypem I a IV v EF a DE smyčce

Vytvořeno v programu PyMol na základě struktury VP1 BKV IV, získané pomocí TM-align.



Obrázek A.2: Mapa plazmidu nesoucího gen pro VP1 protein subtypu BKV IV

Vytvořeno v programu SnapGene



Obrázek A.3: Mapa plazmidu nesoucího gen pro VP1 a VP2 proteiny
sutyru BKV IV

Vytvořeno v programu SnapGene

Differential serological diagnostics for subtype specific BK virus infection

Tomanova Tereza (1), Hejtmankova Alzbeta (1), Roubalova Katerina (2), Spanielova Hana (1)
 1 - Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 5, Praha 2, 12844, Czech Republic
 2 - Vidia spol. s r.o., Nad Saffinou II 385, Vestec, 282 50, Czech Republic



Introduction

BK polyomavirus (BKV) is highly prevalent in human population and persists in renal epithelial cells. While the infection is usually asymptomatic, it can cause complications in immunosuppressed hosts, especially in kidney transplant patients. Infection can be reactivated during immunosuppression or develop *de novo* through infection from the graft and it remains the second most common reason for the graft failure [1]. There are four subtypes of BK virus (I-IV) with BKV-I and BKV-IV subtypes being the most prevalent [2]. Since neutralizing antibodies against one subtype do not protect the patient against other subtypes, simple serological diagnostic test that could differentiate between BKV-I and BKV-IV infection in donors and recipients could be useful for kidney transplant patient management by dividing patients into groups according to their serotype to predict recipients at high-risk and adjust their treatment.

Aim

To optimize serological testing of BKV infection to differentiate BKV subtypes.

Results

We were able to detect specific antibodies against BKV-I and BKV-IV by using guinea pig erythrocytes for hemagglutination inhibition assay (HIA) in acidic pH (pH=5.6) and sera pre-treated with trypsin and potassium periodate (Fig.1). Treatment with trypsin and potassium periodate helped to eliminate the non-specific hemagglutination inhibitors and serological diagnostics of BKV-I and BKV-IV specific antibodies in rabbit sera was possible. The treatment with neuraminidase also helped distinguish the subtypes but it was not that successful as the potassium periodate treatment. ELISA assays need further optimization, the result is similar to the results of HIA but the sera tend to cross-react more on ELISA (Fig.2). Virus like particles (VLPs) were used as an antigens for serological testing (Fig.3).

BKV-I	Rb1	Rb1V	Hu-1	Hu-2
50x	●	●	●	●
100x	●	●	●	x
500x	●	●	●	x
inactivation	56°C NA KIO ₄	56°C NA KIO ₄	56°C NA KIO ₄	56°C NA KIO ₄

BKV-IV	Rb1	Rb1V	Hu-1	Hu-2
50x	●	●	●	●
100x	●	●	●	●
500x	●	●	●	●
inactivation	56°C NA KIO ₄	56°C NA KIO ₄	56°C NA KIO ₄	56°C NA KIO ₄

● - inhibition of HA, antibodies present in sera ○ - no inhibition, no antibodies x - unclear result

Figure 1 - Hemagglutination inhibition assay schema. Each table represents reactivity of sera with different antigen (VLPs BKV-I or BKV-IV). Rb1 presents sera of a rabbit hyperimmunized with BKV-I antigen, Rb1V presents sera of a rabbit hyperimmunized with BKV-IV antigen, Hu-1 and Hu-2 are human sera. All sera were tested in three dilutions (1:50, 1:100 and 1:500). Also, we tested three types of inactivation of sera: inactivation by heat (56°C), inactivation by adding neuraminidase (NA) and inactivation using trypsin and potassium periodate (KIO₄).

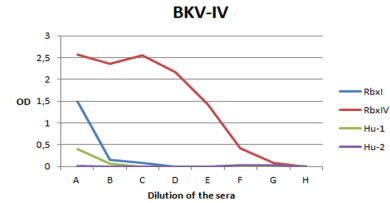
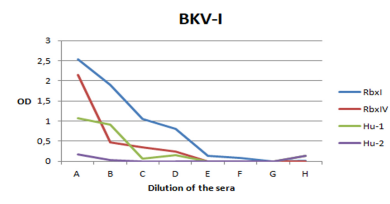


Figure 2 - ELISA. Comparison of the same sera, which were used in Fig.1 for HIA. The entry dilution of rabbit sera was 1:500 in the first well and then quinarly diluted. The entry dilution of human sera was 1:100 in first well and then it was diluted binarily.

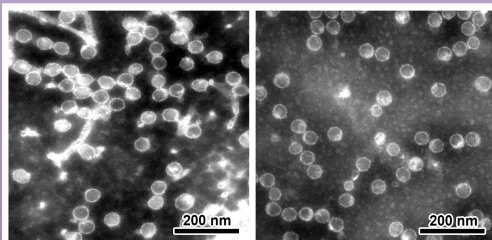


Figure 3 - Virus like particles (VLPs), BKV-I (on the right), BKV-IV (on the left) produced in baculovirus expression system.

Conclusion

We were able to detect specific antibodies against BKV-I and BKV-IV in rabbit sera by HIA using guinea pig erythrocytes in acidic pH. Detection of antibodies in human sera needs more optimization. Although HIA appears to be more specific, at least considering rabbit sera, it is inconvenient for potential use in clinical settings. ELISA is better choice for serological diagnostics in clinical use but it definitely needs further optimization for BKV subtype specific infection identification.

References
 [1] Abend, Johanna R., et al. "Correlation of BK virus neutralizing serostatus with the incidence of BK viremia in kidney transplant recipients." *Transplantation* 101.6 (2017): 1495-1505.
 [2] Pastrana, Diana V., et al. "BK polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism." *Journal of virology* (2013): JVI-01189.

Acknowledgement
 Work of TT and AH is supported by the grant SVV-260428. We thank VIDIA spol. s r.o. for the human sera they kindly provided.



Obrázek A.4: Poster prezentovaný na virologické konferenci v Bratislavě v únoru 2019