

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

**Univerzita Karlova v Praze**  
Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie



**ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE V ANALÝZE  
INTERAKCÍ POLYOMAVIROVÝCH A BUNĚČNÝCH  
STRUKTUR**

Vojtěch Žíla

V Praze 2006

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSs. (Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha)

RNDr. Jitka Štokrová, CSc. (Ústav molekulární genetiky Akademie věd České Republiky, Praha)

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením vedoucí diplomové práce.



*Na tomto místě bych rád poděkoval oběma školitelkám Doc. RNDr. Jitce Forstové a RNDr. Jitce Štokrové za odborné vedení mé práce a za neocenitelné rady, které mi během studia poskytovaly. Také děkuji RNDr. Jiřině Hánové a laborantkám za laskavou pomoc při práci s tkáňovými kulturami. A dále chci poděkovat všem studentům virologické laboratoře 006, za vytvoření příjemného pracovního prostředí.*

*Děkuji rodičům za neustálou podporu nejen při studiu ale i v životě.*

Předkládaná diplomová práce vznikla v letech 2003 - 2006 za podpory grantů Centrum „Funkční organizace buňky“ (LC545) a Centrum „Nová antivirotyka a antineoplastika“ 1M138896301 a z grantu GAČR „Studium molekulárních mechanizmů polyomavirové infekce směrované k využití umělých prázdných kapsid pro genový přenos“ 204/03/0593.

# Electron microscopy in analysis of mouse polyomavirus interactions with cellular structures.

## ABSTRACT:

The mouse polyomavirus (PyV) is a small non-enveloped tumorigenic DNA virus. Its genome encodes six gene products, three early antigens (large, middle and small T antigens) and three structural proteins (VP1, VP2 and VP3). We used electronmicroscopic approaches to analyse the ultrastructural changes of mouse fibroblasts after PyV infection and to find out cooperation of the virus with cellular components during virion assembly and release of virus progeny from the cells. In late phases of infection, we observed increase of protein synthesis, indicated by the swollen rough endoplasmic reticulum. In addition, the compact nucleoli showed transformed character of infected cells. Localization of virus progeny suggested that cell nucleoli could play a role in virion assembly. We also found giant mitochondria in the cytoplasm of infected cells that confirm the induction of initial steps of apoptosis processes. However, in the late times of infection we observed necrosis in a majority of the cells probably caused by cytotoxic effect of the PyV structural proteins, whereas apoptosis observed already in early phases, could be induced by transformation ability of T antigens or, partly by defence of the cells against infection.

Immunoelectron microscopy revealed accumulation of H1 histon around the sites of virion assembly. It proves its elimination from the mature virions. We also localized the pleiotropic transcription regulator, YY1, in the proximity of virus progeny deposits. This finding support our hypothesis of a role of YY1 in morphogenesis of the polyomavirus.

We also prepared *in vitro* system, containing PyV genome, the major capsid protein VP1, and protein YY1, to test a role of YY1 in virion assembly. Interactions were analysed by spreading method in reduction conditions to prevent VP1 pentamer assembly. For elimination of reduction agens from the reaction mixture, we constructed a recombinant plasmid for expression of VP1 gene with deletion of the last 31 C terminal amino acids, responsible for interpentameric contacts.

Besides, we made an ultrastructure analysis of mouse cells after their treatment with C35 synthetic peptide (prepared at UOCHAB). This peptide consisted of last 35 amino acids of the common C terminal part of VP2 and VP3. This sequence has similar

composition as protein transduction domains. Mammalian cells were incubated with the peptide and changes in their structure were analysed on ultrastructural level in dependence on incubation time. We have shown that peptide C35 causes damage of the cytoplasmatic membrane and induces apoptosis in short time (5-15 minutes) post adsorption. The peptide is internalised probably by both clathrin dependent and caveolae dependent endocytosis. After 30 minutes of incubation, some cells were regenerated, probably by elimination of the peptide.

**Key words:** polyomavirus, virus progeny, virion assembly, virus release, Protein Transduction Domain, entry.

**Klíčová slova:** polyomavirus, virové potomstvo, sestavování virionů, uvolnění viru, protein transdukční doména, vstup.

## OBSAH

|  |    |
|--|----|
| <b>1. ÚVOD.....</b>  | 12 |
| <b>2. LITERÁLNÍ PŘEHLED.....</b>                                     | 14 |
| 2.1. Charakteristika čeledi <i>Polyomaviridae</i> .....              | 15 |
| 2.2. Myší polyomavirus.....  | 15 |
| 2.3. Replikační cyklus myšího polyomaviru.....                       | 18 |
| 2.4. Kinetika replikačního cyklu myšího polyomaviru.....             | 21 |
| 2.5. Časné antigeny myšího polyomaviru.....                          | 22 |
| 2.5.1. Velký T antigen.....  | 22 |
| 2.5.2. Střední T antigen.....  | 22 |
| 2.5.3. Malý T antigen.....   | 23 |
| 2.6. Strukturní proteiny myšího polyomaviru.....                     | 23 |
| 2.6.1. Hlavní strukturní protein VP1.....                            | 24 |
| 2.6.2. Minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3.....                  | 25 |
| 2.7. Morfogeneze virionů.....  | 26 |
| 2.8. Protein YY1.....  | 27 |
| 2.9. Uvolnění potomstva myšího polyomaviru z infikovaných buněk..... | 28 |
| 2.10. Apoptóza a nekróza.....  | 28 |
| 2.10.1. Morfologické znaky apoptózy a nekrózy.....                   | 30 |
| 2.11. Protein transdukční domény.....                                | 31 |
| 2.11.1. Vstup PTD do buněk.....                                      | 32 |
| 2.12. Elektronová mikroskopie.....                                   | 34 |
| 2.12.1. Historie, princip a použití.....                             | 34 |
| 2.12.2. Stručná charakteristika nejběžněji používaných metod.....    | 35 |
| 2.12.2.1. Negativní barvení.....                                     | 35 |
| 2.12.2.2. Vizualizace nukleových kyselin.....                        | 36 |
| 2.12.2.3. Metoda ultratenkých řezů.....                              | 36 |
| 2.12.2.4. Imunoelektronová mikroskopie (IEM).....                    | 38 |
| <b>3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....</b>                                  | 39 |
| <b>4. MATERIÁL A METODY.....</b>                                     | 41 |
| 4.1. Použitý materiál.....   | 42 |
| 4.1.1. Organizmy a vektory.....                                      | 42 |
| 4.1.2. Primární protilátky.....                                      | 42 |
| 4.1.3. Sekundární protilátky.....                                    | 43 |
| 4.1.4. Markery molekulových vah.....                                 | 43 |
| 4.1.5. Antibiotika.....  | 44 |
| 4.1.6. Přístroje.....  | 44 |
| 4.1.7. Nejčastěji používané roztoky a média.....                     | 45 |
| 4.1.8. Zalévací média pro elektronovou mikroskopii.....              | 46 |
| 4.2. Sterilizace.....  | 46 |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3. Práce s bakteriemi.....   | 46        |
| 4.3.1. Kultivace bakterií.....   | 46        |
| 4.3.2. Příprava kompetentních buněk.....   | 46        |
| 4.3.3. Transformace elektroporací.....   | 47        |
| 4.4. Práce se savčími buňkami.....   | 47        |
| 4.4.1. Pasážování savčích buněk.....   | 47        |
| 4.4.2. Synchronizace savčích buněk před infekcí.....                                     | 48        |
| 4.4.3. Infekce savčích buněk virem.....  | 48        |
| 4.5. Práce s virem.....  | 48        |
| 4.5.1. Izolace viru z infikovaných buněk.....  | 48        |
| 4.5.2. Hemaglutinační test.....  | 50        |
| 4.5.2.1. Provedení hemaglutinačního testu.....   | 50        |
| 4.5.3. Imunofluorescenční detekce proteinů v buňkách za účelem zjištění titru inocula... | 51        |
| 4.6. Práce s DNA.....  | 51        |
| 4.6.1. Agarózová elektroforéza.....  | 51        |
| 4.6.2. Maxipreparace plazmidové DNA alkalickou metodou.....                              | 52        |
| 4.6.3. Minipreparace plazmidové DNA alkalickou metodou.....                              | 53        |
| 4.6.4. Purifikace plazmidové DNA.....  | 54        |
| 4.6.5. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz.....                                  | 54        |
| 4.6.6. Amplifikace DNA pomocí PCR.....   | 55        |
| 4.6.7. Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu kitem.....                               | 55        |
| 4.6.8. Přečištění plazmidové DNA a PCR fragmentů kitem.....                              | 56        |
| 4.6.9. Defosforylace.....  | 56        |
| 4.6.10. Ligace.....  | 56        |
| 4.7. Práce s proteiny.....   | 57        |
| 4.7.1. Imunodetekce proteinů imobilizovaných na membráně metodou Dot-blot.....           | 57        |
| 4.7.2. Interakce synteticky připraveného peptidu C35 s buňkami 3T6.....                  | 57        |
| 4.8. Příprava reakčních směsí pro sledování <i>in vitro</i> interakcí.....               | 58        |
| 4.9. Techniky elektronové mikroskopie.....   | 58        |
| 4.9.1. Negativní barvení.....  | 58        |
| 4.9.2. Zalití buněk do média LR-White a AGAR100.....                                     | 59        |
| 4.9.2.1. Zalití do média AGAR100.....  | 59        |
| 4.9.2.2. Zalití do média LR-White.....   | 59        |
| 4.9.3. Příprava ultratenkých řezů.....   | 60        |
| 4.9.4. Kontrastování ultratenkých řezů.....  | 60        |
| 4.9.5. Vizualizace nukleových kyselin technikou BAC.....                                 | 61        |
| 4.9.6. Imunoznačení na ultratenkých řezech.....  | 61        |
| 4.9.7. Metoda odkrývání antigenů.....  | 62        |
| <b>5. VÝSLEDKY.....</b>  | <b>63</b> |
| 5.1. Izolace myšího polyomaviru.....   | 64        |
| 5.2. Dynamika PyV infekce – Ultrastrukturní analýza.....                                 | 66        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.3. Interakce PyV s buněčnými proteiny – IEM.....   | 75         |
| 5.3.1. Metoda odkrývání antigenů na ultratenkých řezech.....   | 77         |
| 5.4. Interakce genomu myšího polyomaviru s proteinem VP za přítomnosti faktoru transkripčního faktoru YY1 prováděné <i>in vitro</i> .....                                | 82         |
| 5.4.1. <i>In vitro</i> interakce.....  | 82         |
| 5.4.2. Konstrukce plazmidu pET29-deltaC31VP1.....  | 88         |
| 5.5. Ultrastrukturální analýza působení syntetického peptidu C35 na buňky.....   | 91         |
| <b>6. DISKUZE.....</b>   | <b>99</b>  |
| 6.1. Dynamika infekce myšího polyomaviru.....  | 100        |
| 6.2. Interakce PyV s buněčnými proteiny.....   | 105        |
| 6.3. Interakce genomu myšího polyomaviru s proteinem VP1 za přítomnosti transkripčního faktoru YY1 prováděné <i>in vitro</i> .....                                       | 107        |
| 6.4. Ultrastrukturální analýza působení syntetického peptidu C35 obsahujícího posledních 35 aminokyselin společného C-konce minoritních proteinů VP2 a VP3 na buňky..... | 109        |
| <b>7. SOUHRN.....</b>  | <b>112</b> |
| <b>8. SEZNAM LITERATURY.....</b>   | <b>114</b> |

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|          |  |
|----------|--|
| ATP      | adenosintrifosfát  |
| BAC      | benzyl dimethyl-alkylamonium                                   |
| BEE      | benzoinethylen   |
| bp       | pár bazí   |
| kbp      | tisíc páru bazí  |
| BSA      | hovězí sérum albumin   |
| CIP      | telecí intestinální fosfatáza                                  |
| Da       | dalton   |
| DMEM     | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                             |
| DNA      | deoxyribonukleová kyselina                                     |
| dsDNA    | dvouřetězcová DNA  |
| DTT      | dithiotreitol  |
| EDTA     | kyselina ethylendiaminetetraoctová                             |
| EGTA     | kyselina ethylenglykol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraoctová |
| EM       | elektronová mikroskopie  |
| FCS      | fetální telecí sérum   |
| GA       | glutaraldehyd  |
| hod      | hodina   |
| IEM      | imunoelektronová mikroskopie                                   |
| Ig       | imunoglobulin  |
| kDa      | tisíc daltonů  |
| LT       | velký T antigen  |
| min      | minuta   |
| m.o.i    | multiplicita infekce   |
| MT       | střední T antigen  |
| Mw       | molární hmotnost   |
| mRNA     | mediátorová ribonukleová kyselina                              |
| PFA      | paraformaldehyd  |
| p.f.u.   | plaque forming unit  |
| PTD      | protein transdukční doména (Protein Transduction Domain)       |
| PyV      | myší polyomavirus  |
| RNA      | ribonukleová kyselina  |
| RNáza    | ribonukleáza   |
| rmp      | otáčky za minutu (revolutions per minute)                      |
| sec      | sekunda  |
| ST       | malý T antigen   |
| VP1      | majoritní kapsidový protein                                    |
| VP2, VP3 | minoritní kapsidové proteiny                                   |
| wt       | divoký typ (wild type)   |

# **1. ÚVOD**

Myší polyomavirus (PyV), objevený v roce 1953 (GROSS 1953), patří spolu s opičím virem 40 (SV40, simian vacuolating virus 40) mezi nejlépe prostudované zástupce čeledi *Polyomaviridae*. Oba tyto viry jsou schopny indukovat neoplastickou transformaci buněčných linií v tkáňových kulturách a též indukovat tvorbu nádorů v experimentálních zvířatech (STEWART *et al.* 1958). Struktura obou virů i organizace jejich genomů je velmi podobná. Jsou to malé neobalené viry, jejichž kapsida je složena ze tří virem kódovaných proteinů. Uvnitř kapsidy je uložena dvouvláknová genomová DNA.

Díky svým vlastnostem jsou polyomaviry využívány od roku 1970 jako modelové organizmy v molekulární biologii. Výsledky takových studií přispěly velkou měrou k poznání mechanizmu regulace buněčného cyklu, onkogeneze a objasnění funkce některých nádorových supresorů. Dále byly uplatněny při řešení otázek týkajících se replikace DNA, negativní a pozitivní regulace transkripce, organizace promotorů účastnících se této regulace a v neposlední řadě i sestavování proteinových struktur (protein assembly) (přehledně shrnuto v minireview od BENJAMIN 2001).

V poslední době je pozornost řady vědeckých pracovišť obrácena k využití polyomavirů pro účely genové terapie a imunoterapie (KRAUZEWICZ *et al.* 2000). Avšak k efektivnímu terapeutickému použití těchto virů je nutno detailně porozumět všem krokům virové infekce, které zahrnují vstup viru do buňky, jeho transport cytoplazmou do buněčného jádra, tvorbu virového potomstva a jeho uvolnění z infikované buňky. V jednotlivých krocích je nezbytné analyzovat a objasnit které buněčné kompartmenty a proteiny jsou virem využívány k produktivní infekci. I když se zdařilo osvětlit mechanismus exprese PyV genomu, některé vlastnosti časných i pozdních virových antigenů a některé interakce virových složek s buněčnými strukturami, stále neobjasněna zůstává otázka vstupu virionů do buněčného jádra, účast buněčných proteinů při sestavování kompletních virových částic a úloha buněčných složek při uvolňování virového potomstva. Rovněž funkce minoritních kapsidových proteinů VP2 a VP3 zůstává stále nedostatečně vysvětlena.

## **2. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

## **2. 1. Charakteristika čeledi *Polyomaviridae***

Tato čeleď představuje skupinu malých neobalených virů s ikosahedrální kapsidou o průměru přibližně 45 nm, uvnitř které se nachází kovalentně uzavřená dvoušroubovicová dsDNA o velikosti okolo 5 kbp v komplexu s buněčnými histony. Genomy všech třinácti v současné době známých zástupců *Polyomaviridae*, mají mnoho společných vysoce konzervovaných oblastí, které poukazují na společného předka. Hostitelské spektrum polyomavirů je široké a zahrnuje různé druhy ptáků a savců, jako jsou hlodavci, králíci a primáti včetně člověka.

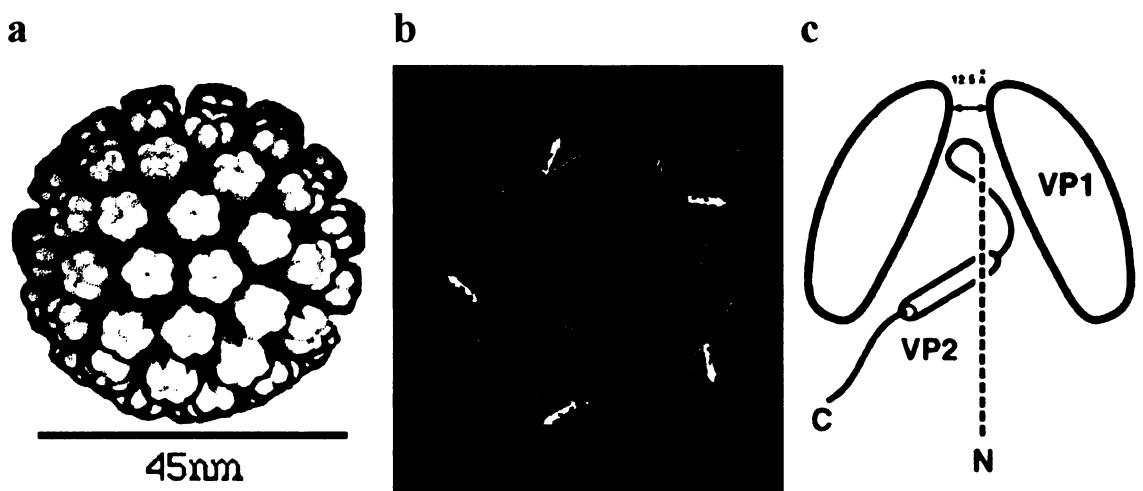
Lidské polyomaviry byly doposud popsány dva, virus JC a BK (JCV, BKV). Oba infikují člověka již v raném dětství a jejich genomy vykazují největší homologii s genomem viru SV40. JCV byl poprvé izolován z mozku pacientů trpících progresivní multifokální leukoencefalopatií (PADGETT *et al.* 1971) a BKV byl poprvé izolován z moči pacienta po transplantaci ledvin (GARDNER *et al.* 1971).

## **2. 2. Myší polyomavirus**

Myší polyomavirus má kapsidu tvořenou třemi strukturálními proteinami VP1, VP2 a VP3, uvnitř které se nachází jediná molekula dsDNA v komplexu s buněčnými histony H2A, H2B, H3 a H4. Kapsida s ikosahedrální symetrií má triangulační číslo  $T = 7$  a tvoří ji 360 molekul proteinu VP1. Protein VP1 ( $M_w = 45$  kDa) je hlavní strukturální protein myšího polyomaviru a je uspořádán do 60 hexavalentních a 12 pentavalentních pentamer (Obr. 2.1 a, b). Proteiny VP2 ( $M_w = 35$  kDa) a VP3 ( $M_w = 23$  kDa) jsou minoritní strukturální proteiny a s každým pentamerem je asociována jedna molekula proteinu VP2 nebo VP3 (BAROUCH a HARRISON 1994). Krystalografická analýza (CHEN *et al.* 1998) komplexu kapsidového proteinu VP1 a fragmentů proteinu VP2, obsahujícího C-terminální sekvenci společnou pro VP2 i VP3 ukázala, že tato sekvence zasahuje v podobě vlásenky do dutiny uvnitř pentameru, tvořeného proteinem VP1 (Obr. 2.1 c).

Izolací myšího polyomaviru z infikovaných buněk, lze získat tři druhy kapsid. Prvním typem jsou infekční virové částice obsahující jednu molekulu DNA, která je v komplexu s buněčnými histony, kromě histonu H1. Komplex DNA-histony je uspořádán podobně jako chromatin a vytváří virový minichromozom. Histon H1 se sice podílí na formování minichromozomu při morfogenezi viru SV40 (VARSHAVSKY *et al.* 1976), ale je během morfogeneze virionů patrně vytěsněn. Kromě infekčních virionů byly také izolovány prázdné kapsidy a pseudoviriony obsahující enkapsidované

fragmenty buněčné DNA. V případě, že je polyomavirus pasážován s vysokou multiplicitou, dochází k výskytu defektních genomů s delecemi, duplikacemi nebo s přestavbami v genetické informaci viru (např. zdvojený replikační počátek). Tyto defektní genome jsou také enkapsidovány, pokud je splněn velikostní limit nutný pro enkapsidaci.



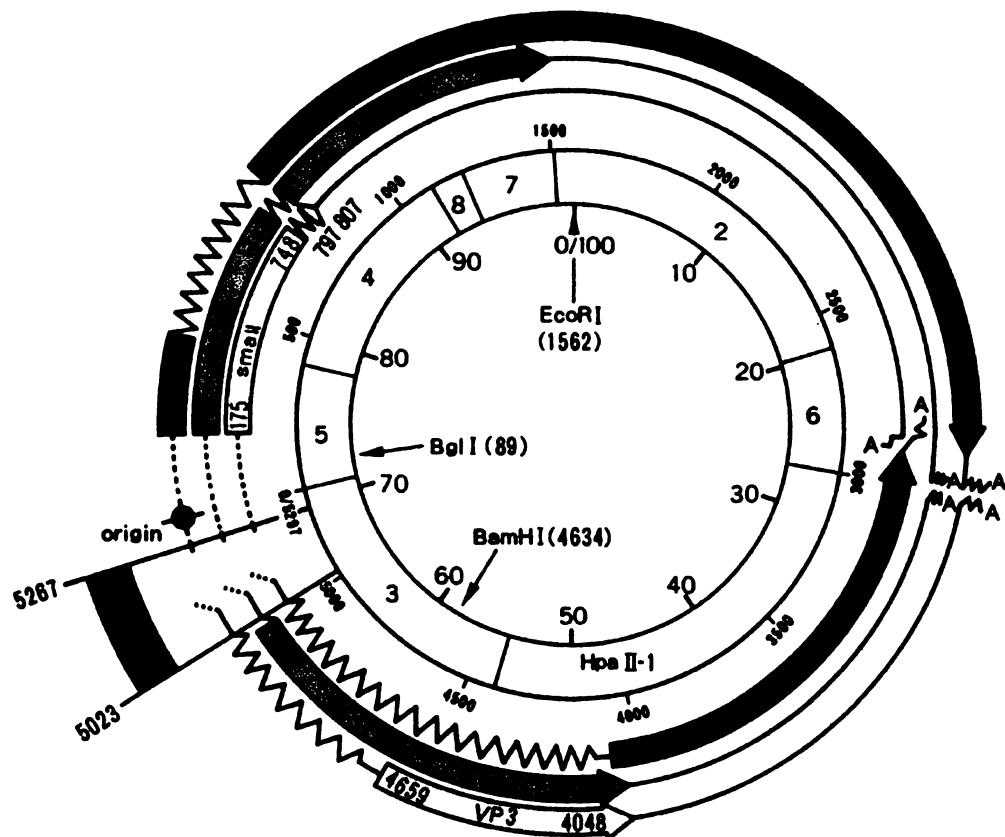
Obr. 2.1 a) Struktura kapsidy polyomaviru. Převzato od LIDDINGTON *et al.* 1991. b) Pentamer tvořený proteinem VP1. Převzato z [ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov), model byl vytvořen podle CHEN *et al.* 1998. c) Schématický nákres interakce mezi VP1 a VP2. Protein VP2 (červený) vstupuje do VP1 (černý) od báze pentameru a pokračuje do horní části kónické dutiny. V dutině se otáčí zpět a tvoří vlášku, která specificky interaguje s vnitřní plochou VP1. Převzato od CHEN *et al.* 1998.

Genom myšího polyomaviru je tvořen kruhovou dsDNA o velikosti 5295 bp (COLE 1996) a lze ho rozdělit na časnou, pozdní a regulační oblast (Obr. 2.2). Časná oblast je transkribována a translatována v časných fázích infekce a její exprese pokračuje i v pozdních fázích. Z této oblasti jsou exprimovány geny kódující 3 nestrukturální regulační proteiny myšího polyomaviru zvané T antigeny – velký T antigen ( $M_w = 100$  kDa), střední T antigen ( $M_w = 55$  kDa) a malý T antigen ( $M_w = 22$  kDa). Všechny T antigeny mají totožnou N-koncovou aminokyselinovou sekvencí „common region“ a liší se od sebe C-koncovou částí „unique region“. Při přepisu vzniká jedna prekurzorová pre-mRNA, ze které alternativním sestříhem vznikají 3 monocistronní molekuly mRNA pro jednotlivé T antigeny.

Pozdní oblast genomu obsahuje geny kódující strukturální proteiny VP1, VP2 a VP3. Molekuly mRNA pro tyto proteiny opět vznikají alternativním sestříhem z jedné pre-

mRNA. Oblasti kódující proteiny VP2 a VP3 se překrývají a celá aminokyselinová sekvence proteinu VP3 je obsažena v C-koncové části proteinu VP2. Oblast kódující N-konec proteinu VP1 se překrývá s oblastí kódující C-koncovou část VP2/VP3, ale je translatována v odlišném čtecím rámci.

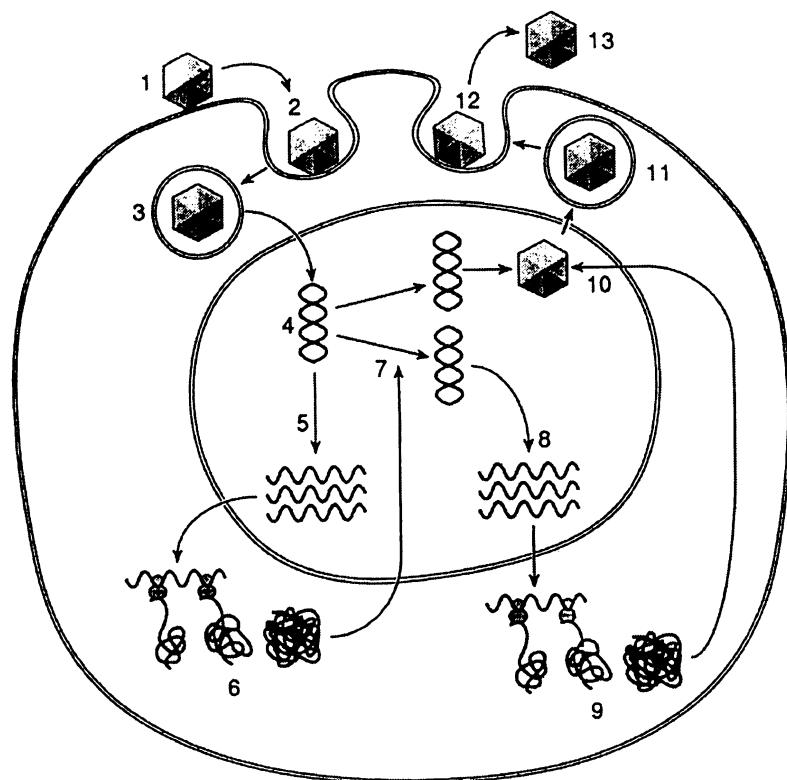
Regulační oblast se nachází mezi časnou a pozdní oblastí a je tvořena replikačním počátkem ORI spolu s promotory a enhancery nacházejícími se v blízkosti počátku. Replikační počátek je v genomu pouze jeden. Transkripce běží obousměrně z iniciačních míst blízko ORI.



Obr. 2.2 Genom myšího polyomaviru je přepisovaný z obou řetězců. Časná oblast (v horní části obrázku) a pozdní oblast (dolní část obrázku) jsou od sebe odděleny regulační oblastí obsahující replikační počátek (origin), promotory a enhancery. Vnitřní kruh na mapě genomu udává polohu restrikčních míst a střední kruh znázorňuje nukleotidovou škálu. Kódující oblasti jsou označeny barevně, zobrazeny jsou čísla nukleotidů na 5' i 3' konci příslušných mRNA a poloha intronů. Převzato od COLE 1996.

## 2. 3. Replikační cyklus myšího polyomaviru

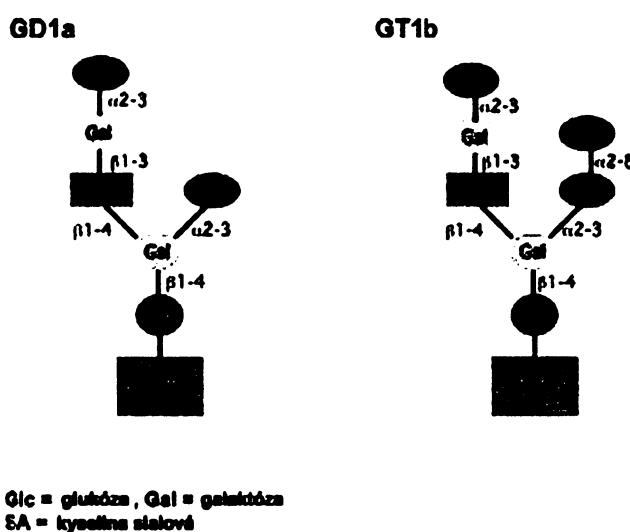
Infekce myšího polyomaviru je lytická a replikační cyklus (Obr. 2.3) můžeme rozdělit na časnou a pozdní fázi. Časná fáze zahrnuje přichycení viru k povrchu buňky, transport virionů k jádru, jejich rozbalení a vstup virové DNA do jádra. V jádře dochází k přepisu časných genů kódujících T antigeny, jejichž funkce je stimulovat buňku k přechodu do S fáze a tím také stimulovat produkci buněčných enzymů, nutných pro replikaci i virové DNA. Replikace probíhá za pomoci velkého T antiguenu a buněčných proteinů, které se normálně účastní replikace buněčné DNA. Pozdní fáze cyklu začíná replikací virové DNA a zahrnuje expresi pozdních genů kódujících strukturní proteiny, sestavování nových virionů a uvolnění potomstva z buněk.



Obr 2.3 Replikační cyklus myšího polyomaviru. Jednotlivé kroky jsou očíslovány: 1, adsorpce virionů k povrchu buňky; 2, vstup endocytózou; 3, transport k jádru; 4, rozbalení virionu a vstup DNA do jádra; 5, časná transkripce a vznik molekul mRNA pro časné antigeny; 6, translace a tvorba časných antigenů (T antigeny); 7, replikace virové DNA; 8, pozdní transkripce a vznik mRNA pro pozdní antigeny; 9, translace a produkce pozdních antigenů (kapsidové proteiny); 10, tvorba virového potomstva v jádře; 11, 12, 13, uvolnění virionů doposud neznámým mechanizmem. Převzato od ECKHART 1990.

Replikační cyklus začíná přichycením viru k buněčnému povrchu. Za přichycení je zodpovědný hlavní kapsidový protein VP1, rozeznávající kyselinu sialovou, která je součástí receptoru myšího polyomaviru (FRIED *et al.* 1981, CAHAN *et al.* 1983). Jako funkční receptory myšího polyomaviru byly identifikovány gangliosidy GD1a a GT1b (Obr. 2.4). Jedná se o glykolipidy, na kterých protein VP1 rozeznává vazebný motiv kyseliny sialové na galaktózu v polohách kys. sialová -  $\alpha$ 2,3 - galaktóza (TSAI *et al.* 2003). Tento motiv je přítomen také u glykoproteinů, ale jak ukázaly studie na krysích buňkách C6 postrádajících gangliosidy GD1a a GT1b, nevede interakce VP1 s glykoproteiny k efektivní infekci (TSAI *et al.* 2003). Nicméně bylo popsáno, že z glykoproteinů mohou při vstupu hrát určitou roli integriny, konkrétně integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, který pravděpodobně slouží jako koreceptor (CARUSO *et al.* 2003).

Glykolipidy s vazebnými místy pro myší polyomavirus byly nalezeny i na membránách endoplazmatického retikula. Tato skutečnost by mohla naznačovat, že gangliosidy hrají určitou roli i při transportu viru z plazmatické membrány k membráně ER, obdobně jako je tomu u transportu některých toxinů, např. Cholera toxin, Shiga toxin, Ricin nebo toxin LTIIb, který se váže právě na gangliosid GD1a a jeho prostřednictvím je transportován do ER (TSAI *et al.* 2003).



Obr 2.4 Struktura gangliosidů GD1a/GT1b, sloužících jako funkční receptory pro myší polyomavirus. Převzato od TSAI *et al.* 2003.

Vstup myšího polyomaviru do buněk, transport k jádru a vstup virové DNA do jádra jsou doposud ne zcela objasněné kroky infekce. Myší polyomavirus vstupuje do buněk endocytózou zprostředkovánou receptorem. Lidský JCV nebo adenoviry do buněk vstupují endocytované v klatrinových váčcích (VARGA *et al.* 1991, PHO *et al.* 2000), zatímco například SV40 do buněk vstupuje v hladkých monopinocytických váčcích odvozených od kaveol (NORKIN 1999), což jsou membránové invaginace hruškovitého tvaru o velikosti 70 až 100 nm, obsahující protein kaveolin-1 (ROTHBERG *et al.* 1992) a vznikají v mikrodoménách plazmatické membrány. Tyto mikrodomény jsou obohaceny o cholesterol a glykosfingolipidy a jsou známé jako lipidové rafty (FRA *et al.* 1995). I když funkce kaveol není zcela jasná, podílejí se na endocytóze, transcytóze, potocytóze a jsou též známé jako hlavní iniciační centra pro signalizaci uvnitř buněk (CERESA a SCHMID 2000, SIMONS a TOOMRE 2000).

U viru SV40, který využívá k transportu kaveolární dráhu, bylo ukázáno, že kaveoly uzavírající virové částice fúzují s většími endozomy bohatými na kaveolin nazvanými kaveozomy (PELKMAN 2001). Z nich potom částice putují uzavřené v tubulárních váčcích, již neobsahujících kaveolin-1, podél mikrotubulů do endoplazmatického retikula.

V myších fibroblastech NIH 3T6 a v epiteliálních buňkách NMuMG byl myší polyomavirus pozorován internalizovaný v hladkých monopinocytických váčcích, které interagovali s protilátkou proti kaveolinu-1 a rovněž byla pozorována silná kolokalizace proteinu VP1 s kaveolinem-1 na buněčné membráně a kumulace kaveolinu vyvolaná adsorpcí virových částic k buněčnému povrchu (RICHTEROVÁ *et al.* 2001). V jiné studii (GILBERT a BENJAMIN 2000) provedené na primárních buňkách myší ledvin a buňkách NIH 3T3 nebyla prokázána vůbec žádná nebo jen nepatrnná kolokalizace proteinu VP1 s kaveolinem-1 a infekce pokračovala i přes zablokování dráhy závislé na kaveolách i na klatrinu. V další studii těchto autorů (GILBERT a BENJAMIN 2004) provedené na krysích buňkách C6 bylo naopak ukázáno, že transport viru je zavislý na kaveolách a na cholesterolu. Virus zřejmě využívá dosud nedefinované dráhy, které se liší v různých buněčných typech. Patrně také může různé endocytické dráhy kombinovat.

Role cytoskeletu v transportu polyomaviru není zcela objasněna. Studie (KRAUZEWICZ *et al.* 2000) analyzující transport pseudokapsid polyomaviru do buněčného jádra ukázala, že produktivní transport viru závisí na neporušených mikrotubulech. Autoři také pozorovali, že rozrušení aktinových vláken neinhibuje infekci polyomaviru. Na druhé straně byl pozorován pohyb váčků s virovými částicemi

podél aktinových mikrofilament (RICHTEROVÁ *et al.* 2001), které, jak se ukázalo, vedou tyto částice pravděpodobně do blízkosti endoplazmatického retikula (RICHTEROVÁ *et al.* 2001). Kolokalizace kapsidového proteinu VP1 s tubulinem byla pozorována až v blízkosti buněčného jádra, v pozdějších fázích infekce. Výsledky ukazují na to, že myší polyomavirus využívá v prvních fázích infekce interakce s aktinovými a v pozdějších fázích s mikrotubulinovými komponentami cytoskeletu, nebo že existují 2 typy transportu virionů cytoplazmou, z nichž pouze jeden vede k produktivní infekci. Dále bylo ukázáno, že myší polyomavirus nevyužívá pro transport do endoplazmatického retikula dráhu, která je závislá na COPI váccích (MANNOVÁ a FORSTOVÁ 2003).

Rovněž není známo jakým mechanizmem se virová DNA nebo viriony dostávají do buněčného jádra.

## **2. 4. Kinetika replikačního cyklu myšího polyomaviru**

Replikační cyklus PyV trvá přibližně 48 hodin. Časový interval, který uplyne od přichycení polyomaviru k receptoru až po vstup virové DNA do jádra není znám, ale 3 hodiny po infekci již byl detekován signál proteinu VP1 v blízkosti jádra (RICHTEROVÁ *et al.* 2001). Studie zabývající se kinetikou infekce myšího polyomaviru (CHEN a FLUCK 2001) byla provedena na buňkách NIH 3T3 synchronizovaných v G<sub>0</sub> fázi buněčného cyklu. Jelikož k replikaci virového genomu může dojít pouze v buňkách, které jsou v S fázi buněčného cyklu, probíhala časná fáze replikačního cyklu viru během G<sub>1</sub> fáze, tedy minimálně 12 hodin, až do začátku S fáze. K časné transkripcii může pravděpodobně docházet hned po vstupu viru do jádra a jako první časný antigen se v čase 6-8 hodin po infekci objevuje velký T antigen. Pozdní fáze začíná během první S fáze buněčného cyklu, přibližně 16 hodin po infekci. Během pozdní fáze pokračuje zvyšování množství časných antigenů, dochází k amplifikaci virové DNA a k syntéze pozdních strukturních proteinů. Množství pozdních antigenů převyšuje počet časných přibližně 6 hodin po jejich prvním výskytu. K enkapsidaci virové DNA dochází ihned po syntéze prvních strukturních proteinů. Cytopatický efekt je pozorován během třetího buněčného cyklu, tedy 48 hodin po infekci, kdy také dochází k uvolňování virového potomstva z buněk.

## **2. 5. Časné antigeny myšího polyomaviru**

### **2. 5. 1. Velký T antigen**

Velký T antigen (LT) je multifunkční protein s několika enzymatickými aktivitami a schopností interagovat s mnoha buněčnými proteiny a jako jediný je vyžadován pro replikaci virové DNA. LT je postranslačně modifikován. Mezi postranslační modifikace LT patří O-glykozilace (SCHMITT a MANN 1987), acetylace (KLOCKMANN a DEPPERT 1983), adenylace, poly(ADP)-ribozilace, N-koncová acetylace (MELLOR a SMITH 1978) a fosforylace. Význam těchto modifikací není znám s výjimkou fosforylace, která slouží k regulaci enzymatických aktivit a k interakci s jinými proteiny. Z celkového množství LT je 95 % lokalizováno v jádře, kde se část vyskytuje volně v nukleoplazmě a část je asociovaná s chromatinem a jadernou matrix (STAUFENBIEL a DEPPERT 1983). Polyomavirový LT obsahuje dva jaderné lokalizační signály (RICHARDSON *et al.* 1986).

LT polyomavirů je DNA vazebný protein, který se s vysokou afinitou váže na sekvenci G(A/G)GGC a s nižší afinitou se nespecificky váže na jedno- i dvouvláknovou molekulu DNA (COLE 1996). Po navázání na sekvenci G(A/G)GGC na počátku replikace virové DNA, se uspořádá za přítomnosti ATP do hexamerů s ATP-ázovou a helikázovou aktivitou. LT má také aktivitu topoizomerázy I a může tak podporovat změny v sekundární struktuře DNA (MARTON *et al.* 1995).

LT interaguje s několika buněčnými proteiny důležitými pro replikaci DNA či transkripcí a tvoří s nimi komplexy. Interaguje například s polymerázou α (SVERDRUP *et al.* 1998), s RPA (replication A protein) (CHO *et al.* 2001), s CBP (CREB binding protein) nebo s onkosupresorem pRb (MORAN 1988). Na rozdíl od SV40 LT neinteraguje s proteinem p53 a proto není schopen nádorové transformace, ale pouze imortalizace buněk (DILWORTH 1990).

### **2. 5. 2. Střední T antigen**

Střední T antigen (MT) je kódován pouze myším polyomavirem a několika blízce příbuznými polyomaviry hlodavců. Jeho C-koncová hydrofobní doména slouží k zakotvení v buněčných membránách (CARMICHAEL *et al.* 1982) a je lokalizován především v cytoplazmatické membráně (ITO *et al.* 1977). MT je hlavním onkogenem myšího polyomaviru a jeho membránová lokalizace je nezbytná pro indukci transformace buněk (NOVAK *et al.* 1981). V cytoplazmatické membráně tvoří komplexy s c-SRC, protein fosfatázou 2A, fosfatidyl inositol-3 kinázou a Shc. Při

interakci s těmito proteiny se chová jako analog aktivovaného receptoru způsobujícího transformaci buněk. Po interakci s protein fosfatázou je aktivována c-jun kináza, ale ne c-fos promotor (MULLANE *et al.* 1998). MT také aktivuje signální kaskády (např. Ras/MAP) kaskádu, interakcí s buněčnou nereceptorovou tyrozinkinázou pp60<sup>c-src</sup> (TALMAGE *et al.* 1989). Dále asociuje s fosfolipázou Cγ-1 (SU *et al.* 1995) a 14-3-3 proteiny (PALLAS *et al.* 1994), ale tyto interakce nemají vliv na transformaci buněk tkáňových kultur.

### 2. 5. 3. Malý T antigen

Téměř celá sekvence malého T antigenu (ST) je obsažena v sekvenci MT. ST je lokalizován v jádře i v cytoplazmě (ELLMAN *et al.* 1984) a pro produktivní infekci senzitivních permisivních buněk není potřebný. V buňkách asociuje s protein fosfatázou 2A (PALLAS *et al.* 1990) a tato interakce vede patrně k aktivaci dráhy signální transdukce zahrnující protein kinázy ERK1 a MEK1 (SONTAG *et al.* 1993). Při aktivaci s protein fosfatázou 2A není aktivována c-jun kináza, ale je aktivován c-fos promotor (MULLANE *et al.* 1998).

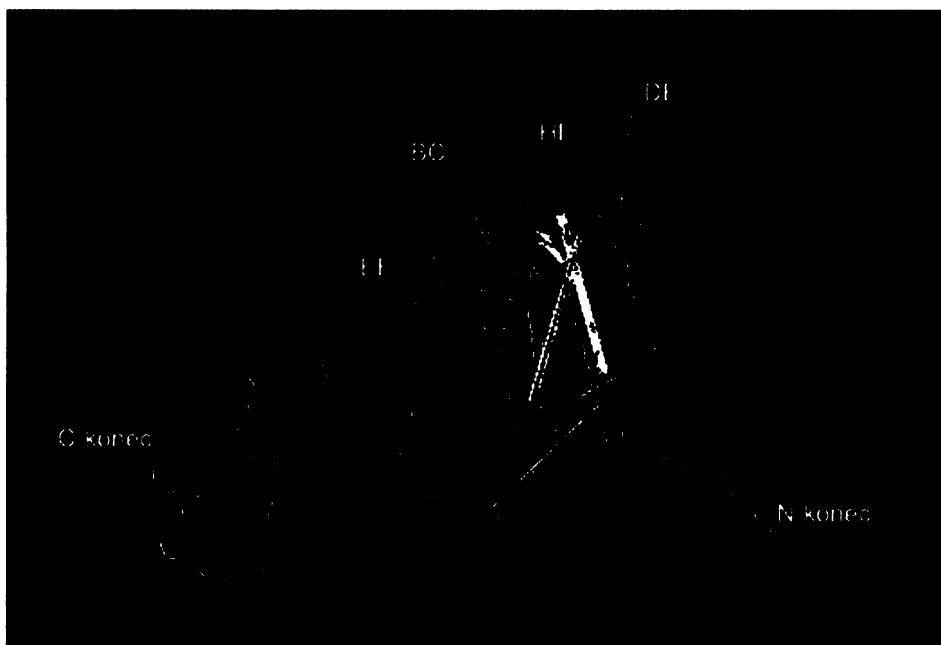
## 2. 6. Strukturní proteiny myšího polyomaviru

V pozdní fázi infekce dochází v cytoplazmě infikovaných buněk k syntéze strukturních proteinů ze tří monocistronních molekul mRNA, z 16S (sedimentační koeficient) mRNA molekuly pro VP1 a ze dvou 19S molekul mRNA pro VP2 a VP3. Přesto, že je v nukleotidové sekvenci proteinu VP2 obsažena celá sekvence proteinu VP3, dochází k syntéze VP3 nezávisle na produkci VP2, což bylo ukázáno v pokusech s mutantami postrádajícími iniciační kodon pro produkci VP2, které produkovaly stále VP3 (COLE *et al.* 1977). Syntetizované strukturní proteiny jsou z cytoplazmy transportovány do jádra, kde dochází k tvorbě virového potomstva. Díky sekvenci představující jaderný lokalizační signál se všechny tři strukturní proteiny dostávají do jader. U proteinu VP1 se tato sekvence nachází v blízkosti N-konce polypeptidového řetězce, u proteinů VP2 a VP3 se nachází v blízkosti C-konce (MORELAND a GARCEA 1991, CHANG *et al.* 1993). Proteiny jsou při infekci transportovány do jádra společně v komplexu (FORSTOVÁ *et al.* 1993, BAROUCH a HARRISON 1994) a jejich množství v jádře odpovídá jejich poměrnému zastoupení v kapsidě polyomaviru (LIN *et al.* 1984).

## 2. 6. 1. Hlavní strukturní protein VP1

Protein VP1, představující asi 80 % všech proteinů kapsidy myšího polyomaviru, je zodpovědný hlavně za rozpoznání receptoru na povrchu buněk, jehož prostřednictvím virus vstupuje do buňky (kap 2. 4.). Pokud je exprimovaný v bakulovirovém expresním systému, je schopen se formovat do prázdných virových kapsid, tzv. „virus-like particles“ (SALUNKE *et al.* 1986). Epitopy interagující s receptorem jsou součástí proteinu VP1 (STEHLE *et al.* 1994) a prázdné kapsidy tvořené pouze tímto proteinem jsou samy schopny vstupovat do buněk NIH 3T6 (FORSTOVÁ *et al.* 1995, RICHTEROVÁ *et al.* 2001). U proteinu VP1 byla také prokázána nespecifická vazebná afinita k polyomavirové DNA a tato interakce je nepochybně velmi důležitá při procesu enkapsidace virové DNA.

Krystalografická studie ukázala, že terciální strukturu VP1 lze rozdělit na tři části: Na N-koncovém „ramenu“ se nachází nespecifická vazebná doména pro DNA a jaderný lokalizační signál. DNA vazebnou doménu tvoří 5 koncových aminokyselin, které se překrývají s jaderným lokalizačním signálem. Prvních 15 aminokyselin na N-konci je orientováno dovnitř virionu, kde pravděpodobně interagují s nukleoproteinovým jádrem (CHANG *et al.* 1993). Střední část VP1 je tvořena  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -listy, které jsou propojeny šesti smyčkami: B-C, D-E, H-I, E-F, F-G a G2. Smyčky B-C, D-E a H-I jsou vystaveny na povrchu pentameru VP1 a hrají roli při rozpoznání receptoru na povrchu buněk. Smyčka E-F je součástí vazebné domény pro vápník ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (STEHLE *et al.* 1996). Vápenaté ionty, které jsou nezbytné pro stabilitu celého virionu (BRADY *et al.* 1977), se zdají být důležité pro stabilitu interakce sousedních pentamerů (LIDDINGTON *et al.* 1991) i prázdných VP1 částic (LEAVITT *et al.* 1985). Třetí C-koncová část tvoří dlouhé „rameno“ vyčnívající z pentameru, které zprostředkovává kontakt mezi sousedními pentamery (YAN *et al.* 1996).

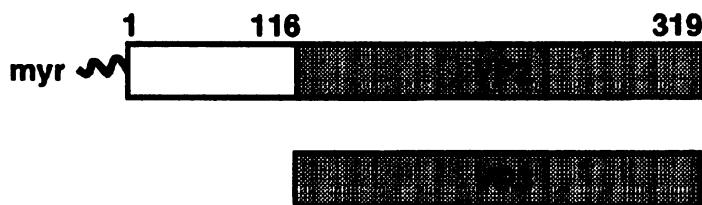


Obr. 2.5 Terciální struktura proteinu VP1. Převzato z [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov), model byl vytvořen podle STEHLE a HARRISON 1996.

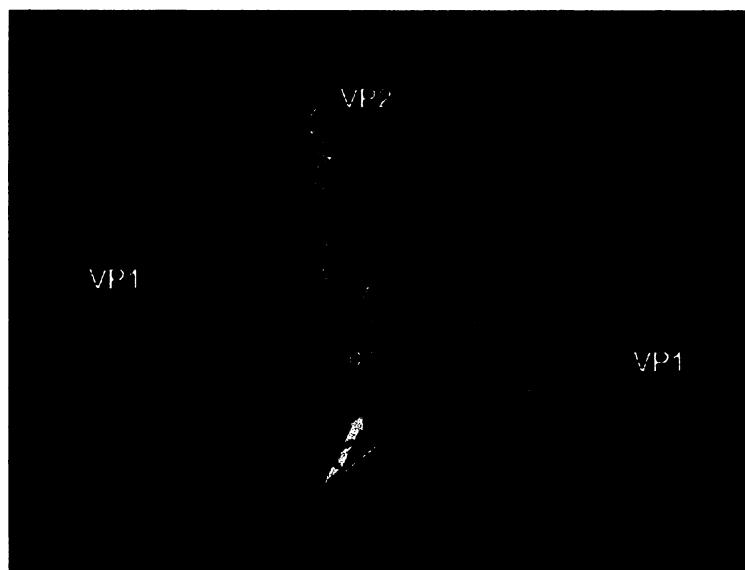
## 2. 6. 2. Minoritní strukturní proteiny VP 2 a VP 3

Dosud nebyla objevena žádná specifická funkce minoritních proteinů v životním cyklu myšího polyomaviru, ale bylo prokázáno, že na jejich přítomnosti závisí infektivita viru. Mutantní částice, které postrádaly oba minoritní proteiny vykazovaly defekty již během časných fází infekce. Infektivita mutantních virů, u kterých chybí VP3 je vyšší než mutant s chybějícím VP2 (MANNOVÁ *et al.* 2002). Unikátní N-koncová část VP2 je modifikovaná kyselinou myristylovou (STREULI a GRIFFIN 1987). Tato modifikace se zdá být důležitá pro správnou funkci proteinu VP2 a její absence se projevuje změnou interakcí VP2 se strukturami hostitelských buněk a sníženou produkcí virového potomstva (MANNOVÁ *et al.* 2002). Koexpressie proteinu VP1 a VP2 v bakulovirovém expresním systému ukázala, že protein VP2 je nezbytný pro správnou post-translační modifikaci proteinu VP1 (FORSTOVÁ *et al.* 1993). Samotná N-koncová část VP2, bez myristilové skupiny má nějakou funkci ve zprostředkování fosforylace threoninových zbytků na B-C smyčce proteinu VP1 (LI *et al.* 1995). Arteficielní částice obsahující VP2 velmi úspěšně konkurují infekčním virionům při jejich společném vstupu do hostitelský buněk, což naznačuje že by protein VP2 mohl hrát roli při vstupu polyomaviru do buněk (AN *et al.* 1999). Na C-konci obou

minoritních proteinů se nachází hydrofóbní  $\alpha$  helix a trakt bazických aminokyselin a C konec tak svou strukturou připomíná protein transdukční domény, popsané v kap. 2.11.



Obr. 2.6 Lineární zobrazení proteinů VP2 a VP3, znázorňující unikátní myristylovanou část proteinu VP2 a C-koncovou část VP2 totožnou s proteinem VP3. Převzato od CHEN *et al.* 1998.



Obr 2.7 Průřez pentamerem znázorňující interakci kapsidového proteinu VP2 s doménami proteinů VP1 uvnitř pentameru. Tyto interakce mohou hrát roli při vstupu viru do buněk. Struktura je mírně natočena C-koncem VP2 dopředu. Převzato z [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov), model byl vytvořen podle CHEN *et al.* 1998.

## 2. 7. Morfogeneze virionů

Přesný mechanizmus sestavování virionů a enkapsidace virové DNA není znám, ale předpokládá se, že formování virionů je postupný proces, kdy dochází ke kondenzaci kapsomer s virovým chromatinem. Tuto hypotézu potvrzují již starší práce, ve kterých byly izolovány nukleoproteinové komplexy z infikovaných buněk v průběhu morfogeneze. Komplexy 75S a 90S, byly identifikovány jako chromatinové struktury obsahující virovou DNA. Dále byly izolovány komplexy 200S představující nezralé

viriony a komplexy 240S odpovídající maturovaným virionům. Zatím co histony H2A, H2B, H3 a H4 se vyskytovaly ve všech izolovaných nukloproteinových komplexech, histon H1 obsahovaly pouze komplexy 90S, ve kterých se zřejmě podílí na tvorbě minichromozomu (GARCEA a BENJAMIN 1983, YUEN a CONSIGLI 1985), Histon H1 je během morfogeneze pravděpodobně vytěsněn proteinem VP1 (WINSTON *et al.* 1980). Analýza imunokomplexů kapsidových proteinů exprimovaných ve hmyzích buňkách ukázala, že imunokomplexy precipitované s protilátkou proti proteinům VP2/3, obsahovaly buněčné histony a naopak v imunoprecipitátech obsahujících větší množství VP1 se histony téměř nevyskytovaly, což by ukazovalo na to, že minoritní proteiny hrají roli v interakci s buněčnými histony (FORSTOVÁ *et al.* 1993).

Předpokládá se, že by se morfogeneze virionů mohly účastnit některé buněčné proteiny. Pro morfogenezi viru SV40, jehož DNA má ve své regulační oblasti *ses* sekvenci rozpoznávanou buněčným transkripčním faktorem Sp1, se předpokládá, že Sp1 zprostředkovává vazbu pentamerů SV40 na sekvenci *ses*, za vzniku iniciačního centra pro formování virionu (OPPENHEIM *et al.* 1992). Mezi proteiny, které by se mohly účastnit morfogeneze myšího polyomaviru patří například chaperonový protein Hsc70, jehož asociaci s proteinem VP1 v průběhu infekce ukázaly *in vitro* studie. Tato asociace by mohla zabráňovat formování kapsid v cytoplazmě, a nebo by mohla usnadňovat transport částečně zformovaných komplexů do jádra (CRIPE *et al.* 1995). Dalším kandidátem pro funkci v morfogenezi PyV by mohl být buněčný pleiotropní regulátor YY1.

## 2. 8. Protein YY1

Protein YY1 (Mw = 68 kDa) je multifunkční buněčný transkripční regulátor, který je součástí jaderné matrix (GUO *et al.* 1995) a nachází se ve všech živočišných buňkách. Může se účastnit asociace jaderné matrix se specifickými sekvencemi buněčných a virových genomů. Protein YY1 by tak mohl zprostředkovávat asociaci virových genomů s jadernou matrix. Navíc bylo zjištěno, že YY1 interaguje přímo s hlavním strukturním proteinem VP1 (PALKOVÁ *et al.* 2000b). Na C-konci se nachází motiv čtyř zinkových prstů (zinc fingers) typu Cys2-His2, které jsou zodpovědné za vazbu k DNA. První dva zinkové prsty, které se nacházejí se v oblasti bohaté na glicin představují represorovou doménu a aktivační doména se nachází na N-konci proteinu. Protein YY1 má schopnost aktivovat nebo reprimovat buněčné i virové geny (shrnutu v SHI *et al.* 1997).

Protein YY1 rozeznává v genomu myšího polyomaviru čtyři vazebná místa (DNA vazebná doména proteinu YY1 rozeznává sekvenci CCATNTT), z nichž tři jsou vysokoafinitní. Dvě se nacházejí v regulační oblasti genomu a uplatňují se při regulaci transkripce (MARTELLI *et al.* 1996), třetí se nachází v oblasti kódující VP1 a jeho účast při regulaci transkripce nebyla prokázána (GENDRON *et al.* 1996).

## **2. 9. Uvolnění potomstva myšího polyomaviru z infikovaných buněk**

Dříve se myslelo, že viry uvolňují své potomstvo destrukcí infikovaných buněk, která nastane po nahromadění virového potomstva. Komplikaci pro viry představuje apoptóza, která může eliminací infikovaných buněk významně omezit produkci virového potomstva. Mnoho živočišných virů vyvinulo strategie, pomocí kterých jsou schopné oddálit apoptózu v časných fázích infekce a v pozdních fázích ji naopak indukovat, aby došlo k uvolnění potomstva (SHEN a SHENK 1995).

U myšího polyomaviru není jasné, zda během replikačního cyklu evokuje apoptózu či nekrózu. Ve studii (AN *et al.* 2000) provedené na buňkách NIH 3T6 bylo ukázáno, že převážná většina buněk vykazovala morfologii nekrotických buněk a přibližně 10 % buněk odpovídalo svou morfologií apoptotickým buňkám. Byla také měřena aktivita kaspázy-3, která se oproti neinfikované kontrole zvýšila dvojnásobně. Pokud byly buňky infikované prázdnými rekombinantními částicemi, sestavenými pouze proteinem VP1 nebo částicemi sestavenými vsemi kapsidovými proteiny, ani v jednom případě prázdné kapsidy neindukovaly smrt buněk, což by mohlo ukazovat na to, že se při indukci neuplatňují strukturní proteiny. Na druhé straně bylo pozorováno (BOUŘA 2004 a nepublikované výsledky naší laboratoře), že syntéza jednotlivých strukturních proteinů je cytotoxická.

## **2. 10. Apoptóza a nekróza**

Apoptóza se od nekrózy či degenerativní smrti buněk výrazně liší. Jedná se o geneticky kontrolovaný proces sebezničení individuálních buněk mnohobuněčných organismů, jehož biologický význam spočívá v udržení homeostáze organizmu. Nekróza je naproti tomu nepředvídatelná událost, která je výsledkem vážného poškození buňky. Podněty, vyvolávající apoptózu lze rozdělit na fyziologické a stresové. Mechanismus apoptózy se uplatňuje při odstraňování buněčných struktur, které již nejsou potřebné pro další vývoj organizmu, při regulaci počtu buněk v tkáních nebo při vyloučení poškozených buněk z organizmu (buňky infikované virem, buňky poškozené

UV zářením či buňky nekontrolovatelně rostoucí po aktivaci onkogenu) (shrnutu v KERR a HARMON 1991).

V průběhu apoptózy se buňky se srážejí a kondenzují, dochází ke kolapsu cytoskeletu, jaderný obal se pozvolna rozpadá, DNA v jádře je štěpena na fragmenty a povrch umírajících buněk prodělává změnu, která umožní aby buňka byla co nejrychleji pohlcena (fagocytována) sousední buňkou nebo makrofágem dřív, než dojde k uvolnění buněčného obsahu do okolí (SAVILL *et al.* 1990). To je další velmi výrazný rozdíl oproti nekróze, protože představuje možnost recyklace fagocytovaných organických komponent buňkou, která je pohltila. Na druhé straně průběh nekrózy se vyznačuje zvětšováním objemu poškozených buněk, které je zakončeno jejich prasknutím a uvolněním obsahu buňky do okolí, včetně proteolytických enzymů, které mohou poškodit okolní buňky a způsobovat záněty. Apoptóza je ke svému okolí šetrná (shrnutu v KERR a HARMON 1991).

Intracelulární mašinérie, která je zodpovědná za apoptózu, se zdá být stejná ve všech živočišných buňkách. Hlavní roli v ní hrají proteázy zvané kaspázy, které svým aktivním místem obsahujícím cystein štěpí cílové proteiny vedle specifické kyseliny aspartátové. V buňkách jsou kaspázy syntetizovány jako neaktivní prekurzory a jsou aktivovány až štěpením jinými kaspázami. K aktivaci prokaspáz dochází prostřednictvím adaptorových proteinů, které jsou v komplexu s tzv. iniciátorovými prokaspázami, které mají slabou proteolytickou aktivitu, způsobující vzájemné štěpení prokaspáz v komplexu (shrnutu v LEIST a JAATTELA 2001).

Jednou z možností aktivace proteolytické kaskády může být odpověď na vnější podnět prostřednictvím receptoru na povrchu buňky. Například „killer“ lymfocyty indukují aktivaci prokaspáz prostřednictvím ligantu Fas, který sami produkují. Tento ligand váže protein Fas na receptor a jeho nahromadění způsobí agregaci vnitrobuněčných adaptorových proteinů s prokaspázami-8, které se začnou štěpit a spustí tak proteolytickou kaskádu (STRASSER *et al.* 2000).

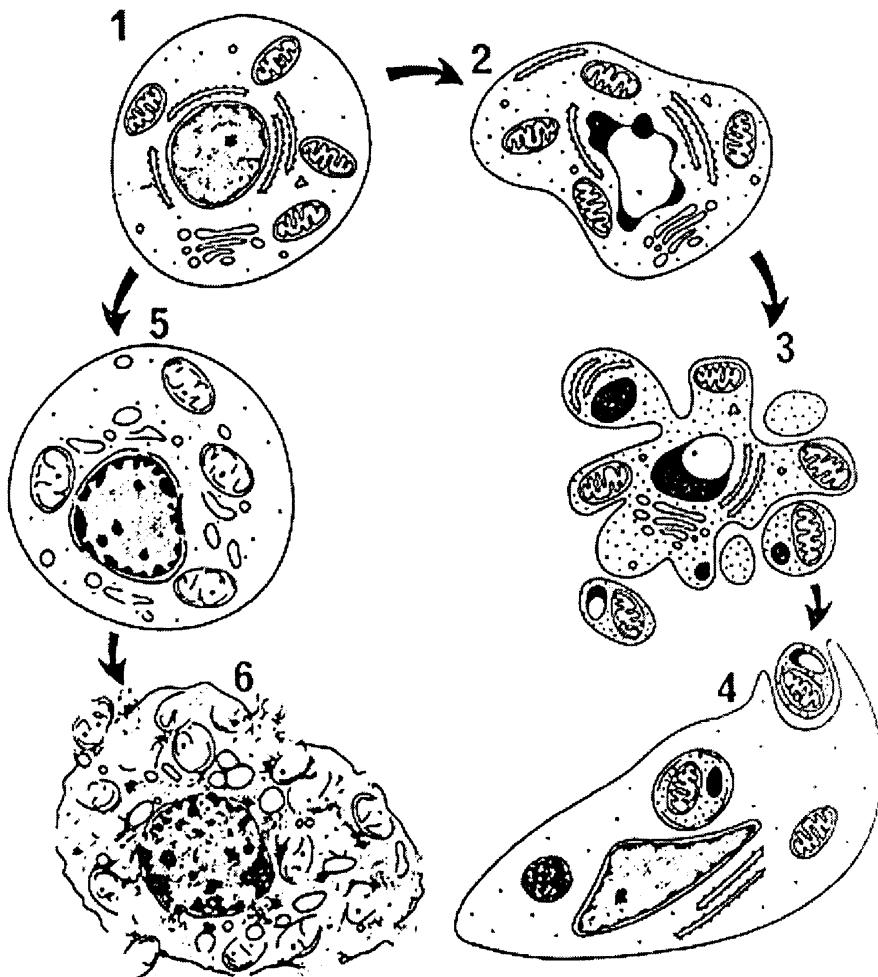
U poškozených nebo stresovaných buněk se uplatňuje jiný typ indukce apoptózy a tou je mitochondriální dráha aktivace prokaspáz. Mitochondrie obsahují několik proapoptotických proteinů (např. cytochrom C), které se díky narušené mitochondriální membráně uvolní do cytoplazmy, kde aktivují adaptorové proteiny přes než aktivují proteolytickou kaskádu. Tato dráha je využívána například při poškození buněčné DNA, kdy protein p53 aktivuje transkripci genů kódujících proteiny z rodiny Bcl-2 proteinů,

které zprostředkují pro-apoptotických proteinů z mitochondrií (ADAMS 2003, GULBINS *et al.* 2003).

## 2. 10. 1. Morfologické znaky apoptózy a nekrózy

První důkazy o dvou morfologicky odlišných typech buněčné smrti (Obr. 2.8) přinesly histochemické studie zabývající se změnami v lysozomech v jaterních buňkách při jaterní ischemii (KERR 1965). První z morfologických změn nastávajících v důsledku apoptózy, které lze pozorovat v elektronovém mikroskopu, je vznik obřích mitochondrií (dochází k uvolnění pro-apoptotických proteinů), stlačování jaderného chromatinu pod jadernou membránou a kondenzace cytoplazmy. Chromatin vytváří opticky ostře ohraničené homogenně denzní shluky a v dalších krocích kondenzace chromatinu pokračuje, doprovázena vchlipováním (blebbing) jaderné membrány. Poté často dochází k rozpadu jádra na menší fragmenty. Podobný proces vchlipování probíhá i na plazmatické membráně, která tak začíná jakoby „pučet“ a vychlípené části se začínají zaškrcovat u báze. Celý proces je zakončen rozpadem buňky na množství apoptotických tělisek ohrazených plazmatickou membránou, obsahujících na pohled neporušené organely a jaderné fragmenty. Chromatin zůstává v těliskách stále kondenzovaný. Průběh fragmentace jader i pučení není pro všechny buněčné typy stejný. Například u thymocytů je rozpad na apoptotická tělíska značně omezen, naopak v tkáních jsou po rozpadu apoptotická tělíska velice rychle pohlcena okolními buňkami a degradována v lysozomech (shrnutu v KERR a HARMON 1991).

Ultrastrukturní podoba nekrózy se velmi liší. Mezi hlavní morfologické rysy patří celková buněčná dezintegrace, zvětšování objemu organel a tvorba vakuol v cytoplazmě. Ačkoliv také dochází ke shlukování chromatinu, denzní materiál tvořící shluky není tak uniformní jako při apoptóze a okraje shluků nejsou tak jasně ohraničené. Zvětšování objemu organel může být v akutně poškozených buňkách způsobeno porušením plazmatické membrány nebo vyčerpáním zásob ATP, čímž se naruší funkce ATPázových membránových pump. Velké zvýšení permeability plazmatické membrány může souviset s aktivací fosfolipáz, které jsou s ní asociovány. Narušení integrity membrán vede k uvolnění lysosomálních enzymů, čímž se celý proces ještě urychlí. V pozdním stádiu nekrózy dochází také k vymizení jaderného chromatinu (shrnutu v KERR a HARMON 1991).



Obr. 2.8 Průběh apoptózy a nekrózy. 1, normální buňka; 2, začínající apoptóza charakteristická kondenzací chromatinu do kompaktních shluků pod jadernou membránou a kondenzací cytoplazmy doprovázené jemným ohýbáním jaderné i cytoplazmatické membrány; 3, fragmentace jádra a vchlipování buněčného povrchu završené vznikem apoptotických tělisek; 4, pohlcení apoptotických tělisek sousedními buňkami; 5, průběh nekrózy charakteristický kondenzací chromatinu do nekompaktních shluků roztroušených po celém jádře a zvětšováním objemu organel a vzniku vakuol v cytoplazmě; 6, pozdní stádium nekrózy, kdy dochází k rozpadu buňky. Převzato z KERR a HARMON 1991.

## 2. 11. Protein transdukční domény

Protein transdukční domény (PTD) jsou peptidy, které samy vstupují do buněk a mají schopnost transportovat do buněk i jiné molekuly, například nabité molekuly, lipozomy nebo enzymy. PTD můžeme rozdělit na molekuly amfipatické, na peptidy obsahující sekvence bohaté na arginin a dále existuje ještě skupina nezařazených PTD.

Amfipatické PTD jsou molekuly, které obsahují hydrofilní a hydrofobní část a můžeme je rozdělit na primární a sekundární. Primární amfipatické molekuly mají na jednom konci molekuly hydrofilní segment a na druhém konci hydrofobní segment

(CHAOLOIN *et al.* 1999). Sekundární amfipatické molekuly (Obr. 2.9) svůj amfipatický charakter získávají až po uspořádání do vyšší struktury. Mezi molekuly se sekundární amfipatií patří například  $\alpha$  helixy, které mají na jedné straně helixu hydrofilní a na druhé straně molekuly hydrofobní povrch (LANGEL *et al.* 2002).

Peptidy se sekvencemi bohatými na arginin jsou charakteristické svým kladným nábojem a přítomností guanidinových skupin (WENDER *et al.* 2000). Arginin je zodpovědný za vstup peptidu do buněk (ROTHBARD *et al.* 2000), zatím co kladný náboj ani sekundární struktura na překonání membránové bariéry buňky vliv nemají (DEROSSI *et al.* 1996). Mezi tyto peptidy patří například protein TAT, trans-aktivační transkripční aktivátor viru HIV-1 tvořený 86 aminokyselinami (BAYER *et al.* 1995) nebo penetratin, což je 16 aminokyselinový peptid odvozený z třetího  $\alpha$  helixu proteinu antennapedia Drosophily, sloužící při ontogenetickém vývoji jako homeoprotein (CZAJLIK *et al.* 2002).



Obr. 2.9 A) Schéma peptidové sekvence se sekundární amfipatií v podobě amfipatického helixu s hydrofilní (modrá) a hydrofobní (žlutá) částí. B) Struktura peptidu GLFRALLRLLRSLWRLLLRA s hydrofilní (žlutá) a hydrofobní (červená) částí. Převzato od RITTNER *et al.* 2002.

## 2. 11. 1. Vstup PTD do buněk

Výzkum z poslední doby ukázal, že většina PTD do buněk vstupuje receptorem zprostředkovanou endocytózou (KOPPELHUS *et al.* 2002) a menší část vstupuje do buněk dráhou, která je na endocytóze nezávislá (SILHOL *et al.* 2002). Mezi typické představitele PTD využívajících pro vstup endocytózu patří peptidy se sekvencemi bohatými na arginin, jako například protein TAT viru HIV-1. Tento protein pro vstup využívá endocytózu zprostředkovanou klatrinovými váčky (POTOCKY *et al.* 2003)

nebo makropinocytózu (KAPLAN *et al.* 2005), ale byl u něho pozorován i vstup endocytozou zprostředkovanou kaveolami (FITTIPALDI *et al.* 2003). Jako receptory protein TAT využívá různé povrchové molekuly, mezi které patří molekuly CD26 (GUTHEIL *et al.* 1994), CXCR4 (XIA *et al.* 2001) nebo heparan sulfátové proteoglykany (TYAGI *et al.* 2001).

Vstup nezávislý na endocytóze nebyl dosud zcela objasněn. Pravděpodobně existují alespoň tři druhy mechanizmů, které jsou využívány při přímé translokaci přes membránu. Prvním je mechanizmus invertovaných micel, při kterém se PTD naváží na membránu pomocí kladně nabitych aminokyselin, zatímco hydrofobní aminokyseliny interagují s lipidovou dvouvrstvou a dochází ke vzniku micel integrovaných do membránové dvouvrsty, pomocí kterých může PTD translokovat. Tento jev byl pozorován u penetratinu (DEROSSI *et al.* 1996). Druhým mechanizmem je tzv. kobercový model, kdy dochází k přichycení k membráně díky aminokyselinám s kladným nábojem a vlivem změny konformace v oblasti bazických aminokyselin dochází k rotaci a zanoření hydrofobních aminokyselin do lipidové dvouvrstvy (POUNY *et al.* 1992). Třetím mechanizmem je tvorba pórů v membráně, který často ho využívají amfipatické PTD, jež v lipidovém prostředí nabývají strukturu  $\alpha$  helixu (GAZIT *et al.* 1994, 1998). Amfipatické PTD se strukturou  $\beta$  listu jsou také schopné translokovat přes membránu (OEHLKE *et al.* 1997). Se vstupem do buněk přímou translokací přes membránu souvisí také cytotoxické vlastnosti PTD. U kobercového modelu je účinek cytotoxický při vyšších koncentracích peptidu a mezi koncentrací PTD, tvorbou pórů a cytotoxicitou je lineární závislost (OEHLKE *et al.* 1998). Vstup molekuly může být umožněn i změnou konformace, příkladem je penetratin, který po navázání k membráně mění svojí konformaci z „random-coil“ na  $\alpha$  helix nebo  $\beta$  list a poté úspěšně translokuje do buněk (MAGZOUB *et al.* 2000). Translokace PTD se neomezuje pouze na plazmatickou membránu, ale týká se i membrán vnitrobuněčných kompartmentů jako je Golgiho aparát či endoplazmatické retikulum. Některé práce naopak upozorňují, že by přímý vstup nezávislý na endocytóze mohl být artefakt fixace (LUNDBERG *et al.* 2003).

## **2. 12. Elektronová mikroskopie**

### **2. 12. 1. Historie, princip a použití**

První jednoduchý transmisiní mikroskop byl zkonstruován německým fyzikem Ernstem Ruskou v roce 1931. Ernst Rusko při konstrukci vycházel především z poznatků francouzského teoretického fyzika Louise de Broglie, který zformuloval základy vlnové mechaniky. Ernst Ruska se původně zabýval problematikou vysokého napětí v prostředí vakua a jevy magnetického pole ovlivňovaného silným elektrickým proudem. Výsledkem tohoto studia bylo navrhnutí elektromagnetické čočky, kterou zkonstruoval ještě s pomocí Bodo Boriese a Maxe Knolla. V první polovině 50. let byl Ernst Ruska u sestrojení vůbec prvního mikroskopu využívajícího elektronové transmisi s rozlišovací schopností 10 nm. Tento mikroskop byl E. Ruskou vyvinut laboratořích Německé společnosti Siemens, která ho poté začala vyrábět. Za práci v oblasti elektronové optiky a za objev elektronového mikroskopu získal Ernst Rusko v roce 1986 Nobelovu cenu.

Podle způsobu zobrazování můžeme elektronové mikroskopy rozdělit na transmisi a řádkovací (skenovací či rastrovací). V transmisi i rastrovacím elektronovém mikroskopu (EM) jsou světelné paprsky klasického mikroskopu nahrazeny svazkem urychlených elektronů, jehož vlnová délka jezávislá na urychlujícím napětí a sbíhavost a rozvíhavost paprsku je usměrňována elektromagnetickými čočkami (analogie s čočkami světelného mikroskopu), které tvoří kondenzory, objektiv a projektor. Elektrony jsou emitovány z katody žhavené na teplotu 2900 °K a jsou urychlovány vysokým napětím 20 – 200 kV, podle druhu preparátu. Zrychlený a usměrněný proud elektronů je veden vakuovou trubicí až k tenkému preparátu. Část elektronů prochází elektrodenzní hmotou preparátu a část se odráží. Opětovným soustředěním elektronů magnetickou čočkou dochází k vytvoření obrazu. Zatímco u transmisiho EM se na fluorescenčním stínítku detekuje zbytkový paprsek po průchodu preparátem, u rastrovacího EM jsou zpracovávány odražené elektrony od povrchu preparátu.

Vzniklý obraz je černobílý a je možné ho zaznamenávat na klasické fotografie nebo ho snímat digitální kamerou (CCD), avšak dobrou kvalitu klasických fotografií (hlavně jejich ostrost) dokáží nahradit pouze lepší modely digitálních kamer snímajících obraz s vysokým rozlišením. Drastické podmínky při pozorování (vysoké vakuum či teplota) i při přípravě preparátů (fixace, dehydratace) neumožňují pozorovat živé preparáty, ale pouze dehydratované vzorky. I přes to jsou metody elektronové mikroskopie pro

výzkum nenahraditelné, jelikož umožňují pozorovat struktury buněk a vybrané buněčné procesy s vysokou rozlišovací schopností.

Elektronový mikroskop se stal cenným nástrojem v řadě odvětví biologie a lékařství až po fyziku a technologii materiálů a našel uplatnění zejména ve virologii, kde se stal nenahraditelným diagnostickým nástrojem. Až do objevu EM viry unikaly pozornosti mikrobiologů pro jejich velmi malé rozměry (desítky až stovky nanometrů) a byly rozlišovány pouze na základě fenotypových projevů infekčních onemocnění. Prvním spatřeným virem byl v roce 1940 virus tabákové mozaiky (TMV) (STANLEY a ANDERSON 1941) v té době pozorovaný ještě neobarvený, protože metoda negativního barvení (BRENNER a HORNE 1959) nebyla tehdy známa. Během dalších deseti let bylo publikováno mnoho prací ukazujících, že i přes náročnou preparaci virů je morfologie virionů dobře zachovaná a lze podle ní identifikovat skupiny virů na základě jejich struktury. Dalším velkým přínosem pro virologii bylo použití metod imunoelektronové mikroskopie, které byly poprvé použité již při studiu TMV (STANLEY a ANDERSON 1941).

## **2. 12. 2. Stručná charakteristika nejběžněji používaných metod**

### **2. 12. 2. 1. Negativní barvení**

Metodu negativního barvení, která je časově poměrně nenáročná lze využít při vizualizaci různých proteinových struktur, virionů, bakterií, buněčných organel nebo pro vizualizaci lipoproteinů, nukleoproteinových komplexů, ale i větších biologických makromolekul jako je například hemoglobin nebo některé enzymy. Princip této techniky spočívá v kontrastování biologického materiálu, například virové suspenze přečištěné v sacharózovém gradientu, atomy těžkých kovů, které mají schopnost dislokace elektronového paprsku při jeho průchodu preparátem. Pro negativní barvení se preparát umisťuje na elektronmikroskopické síťky pokryté podložní membránou. Membrána může být uhlíková nebo kombinovaná s plastikovou (nitrocelulózová membrána zpevněná pouhým uhlíkováním). Při správném provedení dojde k pokrytí povrchu síťky a preparátu tenkou vrstvou elektrodenzního kontrastujícího barviva, avšak atomy těžkých kovů se drží mimo proteinové struktury a pouze penetrují mezi ně. Dojde tak ke vzniku negativního obrazu, kdy jsou proteinové struktury zvýrazněny na tmavém pozadí.

Před samotným barvením musí být připravena koncentrovaná směs biologického materiálu. U virové suspenze je doporučována koncentrace  $10^6$  –  $10^7$  virionů na 1 ml suspenze, u barvení proteinů je to 0,1 – 0,2 mg proteinového materiálu na 1 ml suspenze

a u barvení buněčných membrán je to 0,5 – 1,0 mg materiálu na 1 ml suspenze (HARRIS a HORNE 1991). V suspenzi by se také neměla vyskytovat sacharóza ze sacharózového gradientu, jelikož interferuje s barvivem.

Jako barvivo se nejběžněji používá draselná sůl kyseliny fosfowolframové (PTA – phosphotungstic acid), acetát uranylu nebo molybdenan amonný. Například pro barvení virových kapsomer je nevhodnější PTA (NERMUT 1982), zatím co uranyl acetát je lepší pro kontrastování membránových komponent a glykoproteinových výčnělků asociovaných s lipidovou dvouvrstvou obalených virů (NERMUT 1982). Metoda negativního barvení je vůbec nevhodnější pro vizualizaci struktury neobalených virů, jelikož nemají obal a nedochází tak k interferenci barviva s lipidovými složkami virových obalů. Při barvení nebezpečných virů musí být preparáty navíc fixovány např glutaraldehydem nebo OsO<sub>4</sub> a u zvlášť patogeních virů se musí před manipulací usmrtit patogeny fixací nebo lépe UV zářením.

### **2. 12. 2. 2. Vizualizace nukleových kyselin**

Principem této techniky je tvorba monomolekulárního filmu bazického proteinu (cytochrom C) nebo synteticky připravené látky (BAC - benzyl dimethyl-alkylamonium) na rozhraní voda – vzduch, v nichž jsou molekuly nukleových kyselin fixovány působením elektrostatických sil. Při použití cytochromu C, je hyperfáze tvořená směsí octanu amonného, cytochromu C, destilované vody a vzorku přečištěné nukleové kyseliny. Rozprostřená nukleová kyselina na vodní hladině deionizované vody se zachytí na síťku pokrytu plastikovou membránou jejím přiložením na jemný film. Obdobně se provádí vizualizace pomocí BAC, kdy je na vodní hladinu nanášena směs BAC ve formamidu se vzorkem nukleové kyseliny. Tato metoda je vhodná zvláště pro odkrytí jemných strukturálních detailů, což je dáno menší molekulovou hmotností BAC. Preparát na síťkách je kontrastován stínováním (shadow casting), nejčastěji se pro tyto účely používá slitina platiny a palladia. Techniky vizualizace nukleových kyselin jsou dobře popsány ve ŠTOKROVÁ *et al.* 1989.

### **2. 12. 2. 3. Metoda ultratenkých řezů**

Tato poměrně časově náročná metoda nám umožňuje sledovat virus na buněčné úrovni a získaná data mohou být navíc doplněna o výsledky získané imunoelektron-mikroskopickými technikami se značenými protilátkami. Pomocí této metody lze teoreticky sledovat celý infekční cyklus virů v hostitelských buňkách až po smrt

infikované buňky. Například časné fáze infekce, kdy je virus internalizován, také interakce viru s buněčnými strukturami, organizaci hostitelských buněk i organizaci jader během jednotlivých kroků infekce nebo také morfogenezi virionů a její lokalizaci během pozdní fáze infekce.

Připravený materiál, např. infikované buňky ve vybraném čase po infekci, se jsou založeny do bločku speciálního zalévacího média, ze kterého jsou po zapolymerování zhotoveny ultratenké řezy na ultramikrotomu. Řezy by měly mít optimální tloušťku (desítky nanometrů), která umožňuje průchod elektronového paprsku preparátem.

Jedním z prvních kroků přípravy ultratenkých řezů je fixace vzorků. Fixace má význam pro zachování intaktní organizace virových a buněčných struktur a slouží také jako ochrana před poměrně drastickými kroky přípravy řezů, jako je následné odvodňování v ethanolu nebo zalití do média a jeho polymerace při zvýšené teplotě. Velmi záleží na druhu použitého fixačního činidla, aby jeho vlastnosti odpovídaly povaze studovaných objektů. Mezi nejběžněji používaná fixační činidla patří paraformaldehyd (rychle penetruje, fixuje chromatin, zachovává antigeny), glutaraldehyd (pomalu penetruje, fixuje proteiny, dobře zachovává morfologii struktur), OsO<sub>4</sub> (pomalu penetruje, fixuje hl. fosfolipidy a RNA) a akrolein (používá se pro fixaci membrán rostliných buněk).

Teplota, která se obvykle používá při fixaci je 4 °C, protože je tak zabráněno pohybu buněčných struktur, který se zvyšuje se zvýšující se teplotou a dále se minimalizuje aktivita hydrolytických enzymů, které se uvolňují vlivem větší permeabilizace membrán způsobené fixací. V současné době se velmi využívají techniky kryo-elektronové mikroskopie, ve kterých se místo chemické používá fyzikální fixace zmražením vzorků, jež je mnohem šetrnější při zachování nativních podmínek a antigenicity, důležité pro imunoelektronovou mikroskopii.

Dalším nezbytným krokem přípravy je dehydratace vzorků. Dokonalé odvodnění je velmi důležité pro dobré prosycení vzorků většinou hydrofobním zalévacím médiem. Nejčastěji se pro tyto účely používá ethanol nebo aceton a dehydratace se provádí postupně v alkoholových řadách (30, 50, 70, 90, 95, 100 %), aby byla odvodnění bylo důkladné a aby nedocházelo k extrakci buněčného materiálu. Extraktu zabraňuje snížení teploty na 4 °C, ale při nízkých teplotách může docházet ke kondenzaci vody ve vzorcích, což představuje problém zejména u zalévání do epoxidových pryskyřic, které v přítomnosti vody rádně nezapolymerují.

Zalévací média můžeme rozdělit na dvě hlavní skupiny. Média akrylátová a epoxidová. Akrylátová (LR-White, Lowicryl, Unicryl) jsou do určité míry hydrofilní a

používají se hlavně pro cytochemické a imunocytochemické metody. Polymerují při UV záření za nízkých teplot (LR Gold) i při pokojové teplotě (LR-White) a nejsou tak citlivá na přítomnost vody ve vzorcích. Při zalití však nedochází k tak dobrému zachování buněčné struktury jako v případě epoxidových pryskyřic. Epoxidové média (Spur, Epon, Araldit) způsobují minimální extrakci buněčných komponent, zachovávají velice dobře morfologickou strukturu a polymerují při zvýšených teplotách, nezachovávají však antigenicitu.

Protože ultratenké řezy postrádají dostatečný kontrast, musejí se před pozorováním v elektronovém mikroskopu kontrastovat. Nejběžněji se ke kontrastování používá nasycený roztok uranyl acetátu ve vodě s následným kontrastováním v Reynoldsově roztoku – citrát olovnatý.

#### **2. 12. 2. 4. Imunoelektronová mikroskopie (IEM)**

Techniky imunoelektronové mikroskopie se používají pro detekci specifických antigenů za použití značených protilátek. Jedna z nejčastěji používaných metod je značení antigenů na ultratenkých řezech za použití primární neznačené a sekundární značené protilátky. Takto lze detektovat antigen a určit jeho přesnou lokalizaci v buňce. Aby byla zachována antigenicia musí být biologický materiál šetrně fixován například paraformaldehydem a zalit do akrylátového média (někdy na úkor zachování morfologie struktur). Sekundární protilátka je nejčastěji označena konjugovanými částicemi koloidního zlata, které jsou silně elektrodenzní a dobře pozorovatelné v elektronovém mikroskopu. Nejčastěji používané koloidní částice jsou velké 5, 10 a 15 nm. Menší částice 1 – 2 nm se používají jen ve speciálních případech a následně je nutno použít zesílení signálu stříbrem tzv. „silver enhancement“.

Efekt metod imunoelektronové mikroskopie jde zesílit pomocí metody zvané odkrývání antigenů (antigen retrieval). Při značení na ultratenkých řezech je třeba počítat s tím, že většina epitopů se nenachází na povrchu, ale uvnitř řezů. Princip této metody spočívá v narušení povrchu, například působením peroxidu vodíku či zahřáním ve vodném pufru, čímž je dosaženo odkrytí ukrytých antigenů. Pro tuto metodu je možné použít i řezy vzorků zapolymerovaných do epoxidové pryskyřice, které jsou postfixované pomocí OsO<sub>4</sub>. Na antigeny má sice osmium destruktivní vliv, ale ten může být částečně odstraněn odkrytím pomocí vodného roztoku NaIO<sub>4</sub>. Tato metoda tedy umožňuje provést značení na buňkách zapolymerovaných i do epoxidové pryskyřice, tedy s dobře zachovalou morfologií buněčných struktur (metody popsány v BRONSON 2004).

### **3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

I přes intenzivní studium je známo velmi málo o interakcích virionů či jednotlivých proteinů myšího polyomaviru s buněčnými strukturami či buněčnými proteiny během vstupu viru do buněk, dopravení jeho genetické informace k jádru a při morfogenezi virionů. V této diplomové práci jsou využity zejména metody elektronové mikroskopie, pomocí kterých jsme se snažili o analýzu strukturních změn v buňkách jako odpovědi na infekci myšího polyomaviru během morfogeneze virionů a uvolňování virového potomstva z buněk. Dále jsme se snažili vyvinout metodu pro studium interakcí virových a buněčných proteinů během pozdní fáze infekce a zkoumali jejich případnou účast při morfogenezi virionů. Zkoumali jsme dále, zda C-koncová část minoritních proteinů může hrát úlohu při vstupu myšího polyomaviru do buněk.

**Cílem diplomové práce bylo:**

1. Využít metody elektronové mikroskopie pro sledování dynamiky infekce PyV a postihnutí strukturních změn v buňkách, které v důsledku infekce nastávají.
2. Připravit a vyzkoušet metody imunoelektronové mikroskopie pro zjištění interakcí virionů myšího polyomaviru s jadernými strukturami či proteiny během pozdních fází infekce a pokusit se připravit tyto metody pro další využití v naší laboratoři.
3. Připravit podmínky pro sledování elektronovou mikroskopii *in vitro* interakce mezi polyomavirovou DNA, kapsidovým proteinem VP1 a buněčným transkripčním faktorem YY1, jedním z kandidátů na účast při sestavování virionů a zkonstruovat rekombinantní plazmid pro produkci proteinu ΔC31VP1, což je kapsidový protein VP1 zkrácený o 31 aminokyselin ze svého C-konce, tak aby tvořil pouze pentamery ale nikoli kapsidy, pro budoucí použití v *in vitro* systému.
4. Postihnout případné změny v morfologii buněk po inkubaci se syntetickým peptidem z C-konce minoritních proteinů VP2 a VP3, který má charakter protein transdukční domény.

## **4. MATERIÁL A METODY**

## **4. 1. Použitý materiál**

### **4. 1. 1. Organizmy a vektory**

Buněčná linie NIH 3T6 – buněčná linie myších fibroblastů, permisivních pro PyV (B.E. Griffin, Royal Postgraduate Medical School, London).

Buněčná linie WME – primární buněčná linie myších embryonálních buněk (linie připravená Mgr. M. Stančíkovou).

*Escherichia coli*, kmen DH5 $\alpha$  (Sambook *et al.* 1989) – supE44, deltalacU169 ( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 (ze sbírky Mikrobiologického ústavu AV ČR v Praze).

wtPyV – divoký typ myšího polyomaviru, kmen A2 (B.E. Griffin, Royal Postgraduate Medical School, London).

pMJG – bakteriální plazmid pMJ1 (2266bp) nesoucí celý genom myšího polyomaviru (5292bp). Kruhový polyomavirový genom byl otevřen v restrikčním místě EcoRI (pozice 1560 na mapě polyomavirového genomu) a vložený do restrikčního místa EcoRI na plazmidu pMJ1 (KRAUZEWICZ *et al.* 1990).

pET-29b – plazmid pro expresi v bakteriální linii BL21, obsahující Histag pro izolaci pomocí kolony s Ni<sup>++</sup> ionty. (Novagen).

### **4. 1. 2. Primární protilátky**

Anti-Histone H1: myší polyklonální protilátku namířená proti histonu H1, izotyp IgG<sub>2A</sub> (Santa Cruz Biotechnology).

Anti-Lamin A/C – myší polyklonální protilátku proti laminu, izotyp IgM (Santa Cruz Biotechnology).

Anti-LT (C1 + C4): krysí monoklonální protilátku proti společné oblasti (common region) časných antigenů myšího polyomaviru, izotyp IgG (S. Dilworth, Imperial College School of Medicine, London).

Anti-NUP 153: myší monoklonální protilátka namířená proti nukleoporinu, izotyp IgG (Santa Cruz Biotechnology).

Anti-VP1 sérum – králičí sérum namířené proti VP1 částicím izolovaným z hmyzích buněk po infekci rekombinantním bakulovirem (ředěno 100x) (Mgr. D. Liebl, vyrobeno v Ústavu molekulární genetiky AV ČR, Praha).

Anti-VP1 IgG – králičí imunoglobuliny G izolované z výše uvedeného séra, používané v různých koncentracích.

Anti-YY1 (C-20) – králičí polyklonální protilátka proti transkripčnímu faktoru YY1, izotyp IgG (Santa Cruz Biotechnology).

#### **4. 1. 3. Sekundární protilátky**

GAR G5 – kozí imunoglobuliny namířené proti králičím imunoglobulinům konjugované s částicemi koloidního zlata o průměru 5 nm (British Biocell Int.), ředěné 1:25.

GAR G10 – kozí imunoglobuliny namířené proti králičím imunoglobulinům konjugované s částicemi koloidního zlata o průměru 10 nm (British Biocell Int.), ředěné 1:25.

GAM G5 – myší imunoglobuliny namířené proti myším imunoglobulinům konjugované s částicemi koloidního zlata o průměru 5 nm (British Biocell Int.), ředěné 1:25.

Rb $\alpha$ Rat – králičí imunoglobuliny namířené proti krysím imunoglobulinům konjugované s FITC (fluorescein isothiocyanate, zelený) (Sigma), ředěná 1:400.

SwAM Px – prasečí imunoglobuliny namířené proti myším imunoglobulinům konjugované s peroxidázou (Sevac) ředěné (1:2000).

#### **4. 1. 4. Markery molekulových vah**

DNA marker molekulových vah: DNA bakteriofága  $\lambda$  (Fermentas) štěpená enzymem PstI – fragmenty o velikosti (bp): 11501\*, 5077, 4749, 4507, 2838, 2556\*, 2459, 2443,

2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247, 216, 211, 200, 164, 150, 94, 87, 72, 15. (\*) – kohezivní konce o přesahu 12 bazí fragmentů 11501 a 2556 mohou asociovat a vytvářet další fragment o velikosti 14057 bp.

#### **4. 1. 5. Antibiotika**

Kanamicin (Léčiva) – používán v konečné koncentraci 100 µg/ml

#### **4. 1. 6. Přístroje**

Centrifuga Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180

Centrifuga Megafuge 1.0R (Heraeus Sepatech)

Centrifuga Microfuge Lite Centrifuge (Beckman)

CO<sub>2</sub> termostat (Forma Scientific)

Elektronový mikroskop JEM 1200EX (JEOL) z CCD kamerou (SIS)

Elektroporátor Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad)

Fluorescenční mikroskop BX-60 (Olympus)

KnifeMaker 7800 (LKB bromma)

Kultivační přístroje (Labnet, Lab Therm)

Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5

Mikrotom Ultracut E (Reichert-Jung)

Pokovovací aparatura EPA100 (Leybold-Heraeus)

Sonikátor Bransonic 5 (Cole-Parmer Instrument Company)

Sonikátor Soniprep 150 (Schoeller Pharmacia Praha)

Sonikátor UP50H (Schoeller Pharmacia Praha)

Spektrofotometr Spekol 11 (Carl Zeiss Jena)

Termostat TCH 100 (laboratorní přístroje Praha)

Třepačky (Labnet, Lab Therm)

Ultracentrifuga L5-50B, rotory SW 28, SW 41 (Beckman)

UV transluminátor (BioLum)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

#### **4. 1. 7. Nejčastěji používané roztoky a média**

0,5 M EDTA-NaOH (pH = 8,0): 46,53 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O (dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamotetraoctové) (Roth), pH upraveno NaOH a objem byl doplněn do 250 ml.

1 M Tris-HCl: 30,29 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanu (Serva), pH bylo upraveno HCl na požadovanou hodnotu a objem byl doplněn H<sub>2</sub>O do 250 ml.

SB pufr (0,1 M NA/K Soerensen phosphate buffer) pH 7,2 – 7,4:

Roztok A: 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O

Roztok B: 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- roztoky byly před použitím smíchány v poměru 7A : 3B

PBS (Phosphate Buffered Saline): 1,37 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O

18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH bylo upraveno na 7,4 a objem byl doplněn na 1 l

Pufr B: 10 mM Tris – HCl (pH = 7,4)

150 mM NaCl

0,01 mM CaCl<sub>2</sub>

DMEM médium se sérem: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma)

10% fetální bovinní sérum (Sigma)

2 mM L – glutamin (Gibco)

podle potřeby přidat směs antibiotik pro tkáňové kultury  
(Sigma), tak aby v konečném objemu tvořila jednu setinu.

DMEM médium s 0,5 % sérem: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

(Sigma)

0,5 % fetální bovinní sérum (Sigma)

2 mM L – glutamin (Gibco)

DMEM medium bez séra: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma)  
2 mM L – glutamin (Gibco)

3 % Paraformaldehyd v PBS: 1,5 g paraformaldehydu rozpuštěno v 50 ml PBS při 60 °C

#### **4. 1. 8. Zalévací média pro elektronovou mikroskopii**

*LR White resin* (Polysciences Inc.): Nejméně 1 den před použitím byl do média přidán katalyzátor (Polysciences Inc.) v poměru 9,9 g na 500 g pryskyřice LR White a směs byla míchána přes noc při RT.

*AGAR100* (Agar Scientific Ltd.):    20 ml AGAR 100 Epoxy Resin  
    16 ml DDSA hardener  
    8 ml MNA hardener  
    1,3 ml BDMA accelerator

#### **4. 2. Sterilizace**

Roztoky, mikrozkumavky a špičky byly sterilizovány v autoklávu po dobu 30 minut, při tlaku 120 kPa a teplotě 127 °C. Plastové centrifugační zkumavky byly sterilizovány 24 hod kyselinou peroctovou a mikrobiologické kličky a hokejky zapálením po namočení v EtOH.

#### **4. 3. Práce s bakteriemi**

##### **4. 3. 1. Kultivace bakterií**

Bakterie byly kultivovány aerobně v tekutém médiu, 2,5% živný bujón č. 2 (Imuna), nebo na pevném médiu, 4% živný agar č. 2 (Imuna), v termostatu při 37 °C. Pro selekci bakterií obsahujících plazmid s rezistencí bylo do média přidáno selekční antibiotikum kanamicin (Sigma) o výsledné koncentraci 100 µg/ml.

##### **4. 3. 2. Příprava kompetentních buněk**

(DOWER *et al.* 1988)

Bakterie byly zaočkovány do 10 ml TPN média (*2 % pepton pro bakteriologii* (Imuna), *0,5 % kvasničný autolyzát*, *0,5 % NaCl*) a byly aerobně kultivovány přes noc,

při 37 °C. Ráno byla změřena optická denzita (OD) buněčné suspenze při vlnové délce  $\lambda = 560$  nm. Suspenze byla naředěna TPN médiem tak, aby její výsledná OD<sub>560</sub> v 500 ml byla rovna 0,1. Bakterie byly dále aerobně kultivovány a průběžně byla měřena OD<sub>560</sub> až do doby, kdy dosáhla hodnoty 0,5 až 0,7. Následně byla suspenze centrifugována 10 min při 4000 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R S12) při 4 °C.

Sediment byl rozsuspendován v 500 ml destilované vody (promytí suspenze) a znova centrifugován 10 min při 4000 rpm / 4 °C. Poté byly bakterie promyty 250 ml destilované vody a znova sedimentovány 10 min při 4000 rpm / 4 °C. Sediment byl rozsuspendován ve 20 ml 10 % glycerolu v demineralizované H<sub>2</sub>O, centrifugován 10 min při 4000 rpm / 4 °C (Beckman Centrifuge GS-15R) a rozsuspendován v 10 ml 10 % glycerolu. Po opětovné centrifugaci (10 min při 4000 rpm a 4 °C) byl rozsuspendován v 1 ml 10 % glycerolu. Suspenze s kompetentními buňkami byla rozplněna po 40 µl do mikrozkumavek a skladována při - 80 °C.

#### **4. 3. 3. Transformace elektroporací**

Ke 40 µl kompetentních buněk DH5α rozmražených při 0 °C, byly přidány 1 - 2 µl ligované DNA v pufru s nízkou iontovou silou (eluční pufr z „NucleoSpin Extract II“ kitu) nebo v demineralizované vodě, směs byla dobře promíchána (na ledu) a převedena do elektroporační kyvety vychlazené na 0 °C. Na elektroporátoru byly nastaveny hodnoty 25 µF, 2,5 kV a 200 Ω a dovnitř umístěna kyveta se směsí. Následně byl aplikován jeden puls po dobu 4,0 až 5,1 ms. K bakteriím byl okamžitě přidán 1 ml SOC média (*2 % pepton pro bakteriologii (Imuna); 0,5 % kvasničný autolyzát (Imuna); 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM glukóza; MgCl<sub>2</sub> a MgSO<sub>4</sub> je nutno sterilizovat odděleně a přidat do média až před použitím*), ve kterém byly bakterie kultivovány 1 hod při 37 °C na třepačce. Bakterie byly vysety na misky s pevným médiem s kanamicinem a kultivovány přes noc při 37 °C v termálním boxu.

### **4. 4. Práce se savčími buňkami**

#### **4. 4. 1. Pasážování savčích buněk**

Buňky narostlé do konfluence na miskách o průměru 6 cm byly pasážovány jednou za tři dny v poměru 1:6. Od buněk bylo nejprve odsáto DMEM médium s 10 % sérem a byly opláchnuty v 6 ml roztoku versenu v PBS (Sevac). K buňkám byl přidán 1 ml předehrátého 0,25 % trypsinu (Sigma) a buňky byly inkubovány 5 až 10 min při 37 °C,

dokud nedošlo k jejich uvolnění ode dna misky. K uvolněným buňkám bylo přidáno 6 ml DMEM média s 10 % sérem v němž byly důkladně rozsuspenzovány. Ze suspenze byl odebrán 1 ml a naředěn 5 ml DMEM média s 10 % sérem. Celkem šest naředěných odběrů bylo přeneseno do šesti nových petriho misek. Buňky byly kultivovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C.

#### **4. 4. 2. Synchronizace savčích buněk před infekcí**

(CHEN a FLUCK 2001)

Buňky 3T6 byly pasážovány do DMEM média s 10 % sérem na misky o průměru 9 nebo 6 cm. Po dosažení požadované konfluence bylo médium odsáto a nahrazeno DMEM médiem s 0,5 % sérem, ve kterém byly buňky inkubovány 24 hod při 37 °C. Buňky byly tímto způsobem synchronizovány do G<sub>0</sub> fáze buněčného cyklu.

#### **4. 4. 3. Infekce savčích buněk virem**

(TÜRLER a BEARD 1985)

Virus byl třikrát 1 min sonikován (Bransonic 5 – Cole) a naředěn do DMEM média bez séra. Synchronizovaným buňkám narostlým do 50 % (pro izolaci viru) nebo 70 % konfluence (v případě studia dynamiky infekce PyV) na miskách o průměru 9 cm nebo na mikroskopickém sklíčku ve 24 jamkové destičce, bylo odsáto médium DMEM s 0,5 % sérem. Na každou misku byl přidán 1 ml naředěného viru v DMEM médiu bez séra a na každé mikroskopické sklíčko bylo přidáno 200 µl naředěného viru v DMEM médiu bez séra a za občasného promíchání, byly buňky inkubovány 1 hod v termostatu v atmosféře CO<sub>2</sub>. Buňky byly infikovány s multiplicitou m.o.i. = 0,1 pro účely izolace viru z buněk WME nebo s multiplicitou m.o.i. = 1 za účelem zkoumání dynamiky infekce PyV v buňkách 3T6. Počátek infekce byl měřen od momentu přidání viru k buňkám. Virové inokulum bylo tvořeno viriony myšího polymaviru (izolované podle TÜRLER a BEARD 1985, kap. 4.5.1.) v pufru B.

### **4. 5. Práce s virem**

#### **4. 5. 1. Izolace viru z infikovaných buněk**

(TÜRTLER a BEARD 1985)

Infikované buňky WME (whole mouse embryo cells) narostlé na petriho miskách (průměr 9 cm) byly po dosažení cytopatického efektu 3x zmraženy při -20 °C a rozmraženy. Po posledním rozmražení byly buňky z povrchu misky uvolněny pryžovým

škrabátkem a resuspendovány v médiu, ve kterém byly inkubovány (uschované médium obsahující uvolněný virus). Suspenze buněk byla centrifugována 40 min při 4300 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R) a 4 °C. Supernatant byl odebrán a uschován při 4 °C. Sediment byl důkladně homogenizován v 10 mM Tris-HCl (pH = 7,4), na ledu pomocí skleněného pístového homogenizéru (Potter Elvehjem homogenizér). K homogenizované suspenzi byla přidána neuramidináza (Serva) v koncentraci 0,01 U/ml suspenze, dále byl přidán inhibitor proteáz aprotinin (Sigma) v koncentraci 2 µg/ml suspenze a směs byla inkubována při laboratorní teplotě přes noc na kývacím zařízení. Po centrifugaci suspenze 40 min při 4800 rpm (Beckman Centrifuge GS-15R) a 4 °C, byl supernatant odebrán a uschován při 4 °C. Sediment byl resuspendován v 10 mM Tris-HCl (pH = 9,0), suspenze inkubována 4 hod při laboratorní teplotě za občasného promíchání a znova centrifugována (viz výše). Supernatant byl opět odebrán a uschován při 4 °C.

Získané supernatanty byly spojeny a celkový objem byl ve sterilní ultracentrifugační zkumavce podvrstven asi 2,5 cm vysokým sloupcem 20 % sacharózy (w/w) (Serva) v pufru B. Centrifugace probíhala 3 hod při 25 000 rpm (Beckman SW28) a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován v minimálním objemu 10 mM Tris-HCl (pH = 7,4) nebo v pufru B.

Jak buněčný lyzát tak virové částice získané centrifugací přes sacharózový polštář, rozsuspendované v 10 mM Tris-HCl (pH = 7,4) nebo v pufru B, byly přečištěny v CsCl (Serva) gradientu (1,3 g CsCl/ml roztoku viru) ultracentrifugací 20 hod při 35 000 rpm (Beckman SW41) a 18 °C. Vzniklý gradient byl rozdělen pomocí peristaltické pumpy na frakce po 300 – 400 µl. U jednotlivých frakcí byl změřen refraktometrický index (*měl by se pohybovat v rozmezí 1,363 – 1,366; vznášivá hustota virionů ~1,33 g/cm<sup>3</sup>*) a dále byly jednotlivé frakce charakterizovány metodou dot-blot (kap. 4.7.1.) pro zjištění přítomnosti VP1 proteinu, hemaglutinačním testem (kap. 4.5.2.) a negativním barvením v elektronovém mikroskopu (kap. 4.9.1.). Na základě výsledků charakterizace byly frakce pospojovány.

Pro odstranění CsCl byly frakce dialyzovány ve sterilní dialyzační membráně (Sevapor 16 mm, regenerated celulose, průměr pórů 2,5 nm (Serva), sterilizace povářením 10 min v destilované vodě). Dialýza probíhala ve 100 – 200 násobném objemu pufru B přes noc při 4 °C za stálého míchání. V případě nízké koncentrace viru byl vzorek zahuštěn centrifugací přes sacharózový polštář (viz výše).

#### **4. 5. 2. Hemaglutinační test**

(TÜRLER a BEARD 1985)

Hemaglutinační test se používá pro zjištění přibližné koncentrace virových částic (HAU = hemagglutination units) v zásobním roztoku viru. Tento test využívá vlastnosti proteinu VP1 (ve virionech i prázdných kapsidách polyomaviru) a tou je interakce s kyselinou sialovou, součástí buněčných receptorů na povrchu erytrocytů. Důsledkem této interakce je aglutinace erytrocytů jejíž míra je dána množstvím přítomných virových částic. Aglutinace se sleduje v jamkách mikrotitrační destičky, do kterých se přidá suspenze viru s erytrocyty morčat. Na dně a na stěnách jamek, které mají tvar „U“, vytvoří aglutinující erytrocyty difúzní monovrstvu, zatím co neaglutinované erytrocyty sedimentují na dno jamek a vytvoří tam silnou, sytě červenou skvrnu. Počet hemaglutinačních jednotek viru (HAU) odpovídá nejvyššímu ředění viru, při kterém ještě erytrocyty aglutinovaly. Pomocí elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že 1 HAU odpovídá  $1 \times 10^7$  částic (infekčních i neinfekčních).

##### **4. 5. 2. 1. Provedení hemaglutinačního testu**

Čerstvá krev morčat byla centrifugována 20 min při 2600 rpm (Beckman GS-15R) a sediment byl 3x promyt v roztoku 0,2 % BSA (Sigma) v PBS (Sevac). Hematokrytem byla stanovena koncentrace erytrocytů. Sediment byl resuspendován v 1 ml 0,2 % BSA v PBS. Suspenze byla po 30 µl převedena do heparinizovaných kapilár. Po nahřátí nad plamenem byl jeden konec kapilár zatahen a kapiláry byly centrifugovány 5 min při 2500 rpm (MPW-300, se speciálním rotorem pro hematokryt). Po centrifugaci byl z kapilár odečten hematokryt, jako procentuální vyjádření výšky sloupce PBS k výšce sloupce sedimentu erytrocytů. Suspenze erytrocytů byla naředěna roztokem 0,2 % BSA v PBS, tak aby výsledná koncentrace erytrocytů byla 0,4 %. Do jamek mikrotitrační destičky tvaru „U“ bylo naneseno 50 µl 0,2 % BSA v PBS. Byla připravena sestupná řada ředění suspenze viru tak, že do první jamky (všechny jamky již obsahovaly 50 µl PBS s 0,2 % BSA) bylo přidáno 50 µl vhodně naředěné virové suspenze (5 µl suspenze a 45 µl pufru B), směs v jamce byla důkladně promíchána a 50 µl této suspenze bylo z této jamky přeneseno do jamky následující. Tento postup byl opakován až do poslední jamky, ve které jsme získali vysoké ředění. Do každé jamky bylo na konec přidáno 50 µl 0,4 % suspenze erytrocytů morčat a mikrotitrační destička byla uložena na 6 hodin do 4 °C. Po této inkubaci byl vypočítán hemaglutinační titr.

#### **4. 5. 3. Imunofluorescenční detekce proteinů v buňkách za účelem zjištění titru virového inokula**

Imunofluorescenční detekce proteinů v buňkách nám umožnuje zjistit koncentraci infekčních virionů, resp. množství PFU / ml a vypočítat titr inokula. Buňky narostlé na sklíčkách byly 42 hod po infekci (kap. 4.4.3.) opláchnuty 1 ml roztoku PBS, fixovány 30 min v 3 % paraformaldehydu v PBS a následně permeabilizovány 5 min v 0,5 % Tritonu X-100 v PBS. Po fixaci a permeabilizaci byly buňky promyty 3x 10 min roztokem PBS. Pro vysycení bylo do každé jamky přidáno 0,5 ml PBS s 0,25 % BSA a 0,25 % želatinou (Sigma) a po 30 min byl roztok odsát. Ke každému sklíčku bylo přidáno 200  $\mu$ l primární protilátky anti-LT (krysí monoklonální protilátky proti společné oblasti časných antigenů) ředěné 1:1 v PBS s 0,25 % BSA a 0,25 % želatinou. S primární protilátkou byly buňky inkubované 1 - 1,5 hod a po inkubaci byly buňky promyty 3x 10 min v PBS. Poté byla na sklíčka přidána králičí sekundární protilátky namířená proti krysím IgG (Rb $\alpha$ Rat, Sigma), ředěná 1 : 400 v PBS s 0,25 % BSA a 0,25 % želatinou. Inkubace se sekundární protilátkou probíhala 50 min a po inkubaci byly buňky promyty 3x 5 min v PBS.

Poté byla mikroskopická sklíčka vyjmota z jamek a usušena. Usušená sklíčka byla položena na cca 10  $\mu$ l kapky glycerolu umístěných na očištěných podložních mikroskopických sklíčkách. Takto připravené preparáty byly prohlíženy ve fluorescenčním mikroskopu (Olympus BX-60) s nastaveným optickým filtrem WIG a byly skladovány ve tmě při  $-20^{\circ}\text{C}$ . V mikroskopu byly spočítány pozitivní buňky a byl určen titr viru.

#### **4. 6. Práce s DNA**

##### **4. 6. 1. Agarózová elektroforéza**

(SAMBROOK *et al.* 1989)

Agarózový gel byl připraven krátkým povařením 25 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru (*45 mM kyselina boritá; 1mM EDTA-NaOH, pH = 8; 20mM Tris-HCl, pH = 8*) s 1 % agarázou (Sigma). Vychladlý gel na teplotu přibližně  $50^{\circ}\text{C}$  byl nalit do umělohmotného bločku po stranách zlepěného lepicí páskou a ke gelu bylo přidáno 12,5  $\mu$ l 1000x koncentrovaného ethidium bromidu (Serva) v H<sub>2</sub>O, který byl v ještě neutuhlém gelu dobře rozmíchán pomocí špičky. Hned poté byl do gelu umístěn hřeben a bylo vyčkáno na ztuhnutí gelu (asi 30 min při laboratorní teplotě). Po ztuhnutí gelu byla z bločku odstraněna lepicí páska a byl vyjmut hřeben. Bloček s gelem byl vložen

do elektroforetické vaničky, do které byl následně přidán 0,5x TBE pufr, tak aby hladina pufru byla lehce nad povrchem gelu, a aby se pufr dostal i do jamek vzniklých po vyjmutí hřebenu.

Ke vzorkům byla přidána bromfenolová modř (*40 % sacharóza v 0,5x TBE pufru s 0,12 % bromfenolovou modří*) v poměru 2  $\mu$ l modře na 4  $\mu$ l vzorku a vzorky byly dobře promíchány. Poté byly vzorky naneseny do jamek a byla spuštěna vlastní elektroforéza při napětí 60 - 70 V ( $5V/cm^2$ ). Elektroforéza byla ukončena při doputování bromfenolové modři do míst vzdálených asi 1 cm od opačného okraje gelu. Doba za kterou došlo k rozdělení DNA byla asi 60 min. Gel byl následně prohlížen pomocí UV transluminátoru (BioLum) a fotografován.

#### **4. 6. 2. Maxipreparace plazmidové DNA alkalickou metodou**

(BIRNBOIM a DOLY 1979)

Kultura bakterií *E. coli* byla aerobně kultivována v 500 ml živného bujónu č. 2, přes noc při 37 °C. Po kultivaci byla kultura centrifugována 10 min při 4800 rpm (Centrifuga GS-15R, rotor S4180) a sediment byl rozsuspendován ve 20 ml roztoku I. (*50 mM glukóza; 25 mM Tris-HCl, pH = 8*). Po přidání 40 ml roztoku II. (*0,2 M NaOH s 1% SDS (Sigma)*) byla suspenze opatrně promíchána otáčením zkumavky a inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo ke směsi přidáno 30 ml roztoku III. (*60 ml 5 M Kac; 11,5 ml ledové kyseliny octové; 28,5 ml H<sub>2</sub>O*) a po opatrném promíchání otáčením zkumavky byla směs inkubována 20 min na ledu. Po inkubaci následovala centrifugace 30 min při 4 °C a 4800 rpm. Supernatant byl přefiltrován přes 4 vrstvy gázy a k přefiltrovanému supernatantu bylo přidáno 0,7 objemu izopropanolu. Směs byla dobře promíchána a inkubována 10 minut při 4 °C a centrifugována 30 min při 4800 rpm, při 4 °C. Po opláchnutí 1 ml 80 % ethanolu byl sediment vysušen a rozsuspendován ve 3 ml TE pufru (*10 mM Tris-HCl, pH = 8; 1 mM EDTA-NaOH, pH = 8*).

Za účelem oddělení izolované DNA od proteinů byla použita extrakce upraveným fenolem (*redistilovaný krystalický fenol upravený saturací Tris-HCl, pH = 8 na pH = 7,8 - 8*) a upraveným chloroformem (*chloroform s isoamylalkoholem v poměru 24 : 1*). K DNA, rozsuspendované v TE pufru, byl přidán 1 objem upraveného fenolu, směs byla dobře promíchána a centrifugována 5 min na stolní centrifuze Beckman Microfuge Lite Centrifuge při 13000 rpm. Byla odebrána horní vodná fáze, ke které byl přidán 1 objem směsi upraveného fenolu a upraveného chloroformu v poměru 1:1. Po promíchání byla směs centrifugována 5 min při 13000 rpm a tento krok byl stále

opakován, dokud nevymizela mezifáze tvořená proteiny. Po vymízení mezifáze byl k odebrané horní vodné fázi přidán 1 objem upraveného chloroformu, směs byla dobře promíchána a stočena při 13000 rpm.

K odebrané horní fázi bylo následně přidáno 2,5 objemu 96 % ethanolu, vychlazeného na -20 °C, a 0,1 objemu 3 M NaAc (pH = 5,2) a tato směs byla srážena přes noc při -20 °C nebo 30 min při -78 °C. Vysrážená DNA byla sedimentována 10 min při 15300 rpm (Micracentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge, rotor F241,5) při 4 °C a rozsuspendována ve 100 µl TE pufru.

K odstranění RNA ze vzorku byla použita RNáza A (Serva) do koncentrace 1 mg/ml. Vzorek s RNázou byl inkubován 1 hod při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla směs extrahována 1 objemem upraveného fenolu, následně 1 objemem upraveného fenolu/upraveného chloroformu v poměru 1:1 a nakonec 1 objemem upraveného chloroformu (viz výše) a po přidání 0,1 objemu 3 M NaAc (pH = 5,2) a 2,5 objemu 96 % ethanolu, vychlazeného na -20 °C, byla směs inkubována 30 min při -78 °C nebo přes noc při -20 °C. Vysrážená DNA byla sedimentována 10 min při 15300 rpm a 4 °C. Získaný sediment byl resuspendován ve 100 µl TE pufru.

#### **4. 6. 3. Minipreparace plazmidové DNA alkalickou metodou**

Tato metoda je zkrácenou verzí metody z předchozí kapitoly. Jednotlivé kolonie narostlé přes noc na pevném médiu byly zaočkovány do 700 µl živného bujónu č. 2 s antibiotiky. Buňky byly kultivovány aerobně, přes noc při 37 °C.

Po kultivaci byly buňky sedimentovány 1 min při 15300 rpm (Beckman Mikrofuge R Centrifuge, F241,5) a sediment byl rozsuspendován v roztoku I. Následně bylo přidáno 250 µl čerstvě připraveného roztoku II., buňky byly šetrně promíchány, poté 200 µl roztoku III. a buňky byly opět promíchány převrácením mikrozkumavky. Směs byla centrifugována 5 min při 15300 rpm a supernatant byl odebrán. K supernatantu bylo přidáno 0,5 ml izopropanolu, směs byla dobře promíchána a inkubována 10 min při 4 °C. Precipitovaná DNA byla sedimentována 10 min při 15300 rpm, sediment promyt 1 ml 80 % ethanolu, vychlazeného na -20 °C, a vysušen při laboratorní teplotě. Sediment byl pak rozsuspendován v 15 µl TE pufru s 10 % RNázou (Serva).

#### **4. 6. 4. Purifikace plazmidové DNA**

Tento metodou bylo získáno 50 µl směsi obsahující plazmidovou DNA o vysoké čistotě a koncentraci. Bakterie *E.coli* byly zaočkovány do 5 ml LB media (*Luria-Bertani medium – 10 g peptonu pro bakteriologii, 5 g kvasničného autolyzátu a 10 g NaCl na 1 l H<sub>2</sub>O*) s antibiotiky a inkubovány aerobně přes noc při 37 °C. Bakterie byly sedimentovány 10 min na stolní centrifuze Beckman Microfuge Lite Centrifuge a pro další postup byl použit „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) podle přiloženého manuálu.

Sediment bakterií byl rozsuspendován ve 250 µl pufru P1 (resuspendační pufr) obohacený RNázou A (70 U/mg; 100 mg/ml) a následně bylo přidáno 250 µl pufru P2 (lyzační pufr) a směs byla jemně promíchána čtyřmi až šesti převráceními mikrozkumavky. Pak bylo přidáno 350 µl pufru N3 (neutralizační pufr) a směs byla opět promíchána čtyřmi až šesti převráceními mikrozkumavky. Směs byla centrifugována 10 min při 13000 rpm (Beckman Microfuge Lite) a supernatant byl navrstven na kolonku, přes kterou byl převeden centrifugací 30 – 60 sec při 13000 rpm. Kolonka byla následně promyta 0,5 ml pufru PB (vazební pufr), který byl přes kolonku centrifugován 30 – 60 sec a poté byla kolonka promyta 0,75 ml pufru PE (pufr na promytí) opštovnou centrifugací 30 – 60 sec. Vzhledem k tomu, že zbytkový ethanol z pufru PE by mohl inhibovat v budoucnu prováděné enzymatické reakce byl promývací pufr odstraněn centrifugací samotné kolonky (1 min). Pro získání plazmidové DNA bylo do kolonky napijetováno 50 µl pufru EB (eluční pufr), kolonka byla ponechána stát 1 min při laboratorní teplotě, vložena do nové mikrozkumavky a centrifugována 1 min.

#### **4. 6. 5. Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz**

(SAMBROOK *et al.* 1989)

DNA byla štěpena v restrikční směsi:

0,5 – 2 µg plazmidové DNA

1x koncentrovaný restrikční pufr (orange)

15 U restrikčního enzymu (po 2 hod bylo do směsi přidáno dalších 15 U)

demineralizovaná H<sub>2</sub>O (doplněna do konečného objemu)

Směs byla inkubována přes noc v termostatu při 37 °C.

#### **4. 6. 6. Amplifikace DNA pomocí PCR**

Byla připravena reakční směs:

5 µl 10x koncentrovaného pufru pro Pfu polymerázu

1,5 µl primeru 1 (10 µM)

1,5 µl primeru 2 (10 µM)

1 µl dNTP (10 µM)

1 µl DNA

0,5 µl Pfu DNA polymerázy

39,5 µl demineralizované H<sub>2</sub>O

Mikrozkumavka s reakční směsí byla vložena do přístroje Mini Cycler PTC-150, kde podle programu probíhala vlastní PCR reakce. Program byl nastaven následovně:

1. krok (denaturace DNA) – 3 min při 94 °C
2. krok (denaturace DNA) – 40 sec při 94 °C
3. krok (vazba primerů) – 50 sec při 55 °C
4. krok (polymerace) – 1 min při 72 °C
5. krok (polymerace) – 7 min při 72 °C

Program byl nastaven na 30 cyklů (30 opakování přednastavených pěti kroků)

#### **4. 6. 7. Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu kitem**

Izolovaná plazmidová DNA a fragmenty DNA ziskané pomocí PCR reakce byly po štěpení restrikčními enzymy (kap. 4.6.5.) rozděleny pomocí agarázové elektroforézy (kap. 4.6.1.) a následně byly pod UV transluminatorem (BioLum) z gelu vyjmuty pomocí skalpelu. Vykrojené kousky obsahující DNA byly vloženy do mikrozkumavek a pro další postup byl použit „NucleoSpin Extract II“ kit (Macherey-Nagel) podle přiloženého manuálu.

Na každých 100 mg agarázového gelu bylo do mikrozkumavky přidáno 200 µl pufru NT . Vzorek byl inkubován 5 – 10 min ve vodní lázni při 50 °C a každé 2 až 3 min průběžně vortexován. Po úplném rozpuštění gelu byl obsah mikrozkumavky převeden do kolonky, přes kterou byla směs centrifugována 1 min při 13000 rpm (Beckman Microfuge Lite) a tím byla DNA navázána na silikonovou membránku. Silikonová membránka byla promyta 600 µl pufru NT3 (*k pufru NT3 byl před použitím přidán 96 % ethanol v poměru 320 ml ethanolu na 80 ml pufru*) centrifugací 13000 rpm skrze

kolonku a následně byl centrufragací prázdné kolonky dlouhou 2 min odstraněn zbytkový ethanol z pufru NT3, který by mohl inhibovat následně prováděné enzymatické reakce. Kolonka poté byla vložena do nové mikrozkumavky a bylo doní přidáno 30 µl pufru NE (eluční pufr). S pufrem NE byla kolonka inkubována 1 min, poté byla přendána do čisté mikrozkumavky a centrifugována 1 min. Protože fragment štěpené plazmidové DNA měl velikost nad 5 kb, byl pufr NE předehřán na 70 °C (uvedeno v návodu) a po jeho přidání byla kolonka inkubována 1 min při laboratorní teplotě a potom 1 min centrifugována.

#### **4. 6. 8. Přečistění plazmidové DNA a PCR fragmentů kitem**

Směs izolované restrikčně štěpené plazmidové DNA nebo PCR fragmentu v TE pufru ( $10\text{ mM Tris-HCl, pH} = 8$ ;  $1\text{ mM EDTA-NaOH, pH} = 8$ ), nebo případně ligační směs, byla v případě potřeby doplněna do objemu 50 µl TE pufrem (minimalní objem vzorku pro použití kolonky je 50 µl) a smíchána se 2 objemy pufru NT (viz kap 4.6.7.) a zavedena do kolonky (NucleoSpin Extract II) centrifugací 1 min při 13000 rpm na stolní centrifuze (Beckman Microfuge Lite). Dále je postup stejný jako u metody v kap 4. 6. 7.

#### **4. 6. 9. Defosforylace**

K 50 µl směsi štěpené plazmidové DNA bylo přidáno 10 µl pufru (CIP) pro alkalickou fosfatázu, 38 µl demineralizované vody a 2 µl alkalické fosfatázy (CIP). Směs byla inkubována hodinu při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 10 µl směsi - 10 % SDS, 1 µl 0,5 M EDTA (pH = 8), 1 µl proteinázy K (10mg/ml) a tato směs byla inkubována 30 min při 55 °C. DNA byla následně purifikována extrakcí fenolem a chloroformem a srážena ethanolem. Po přesrážení byla rozpuštěna v TE pufru (kap. 4.6.2).

#### **4. 6. 10. Ligace**

(SAMBROOK *et al.* 1989)

Do ligační směsi bylo přidáno 200 ng linearizovaného defosforylovaného plazmidu a 200 ng PCR fragmentu. Plazmidová DNA i fragment byly štěpeny restrikčními enzymy BglII a Nde I. Dále jsme do směsi přidali takové množství 10x koncentrovaného pufru pro T4 DNA ligázu, aby ve výsledku byl pufr 1x koncentrovaný. Do směsi byla přidána T4 DNA ligáza a směs byla doplněna do požadovaného objemu demineralizovanou

$\text{H}_2\text{O}$ . Směs byla inkubována přes noc při 16 °C. Ligovaná DNA byla přečistěna (kap. 4.6.8.) a použita pro elektroporaci (kap. 4.4.3.).

#### **4. 7. Práce s proteiny**

##### **4. 7. 1. Imunodetekce proteinů imobilizovaných na membráně metodou Dot-blot (SAMBROOK *et al.* 1989)**

Vzorky obsahující protein VP1 byly nakapány (5  $\mu\text{l}$  kapky) na nitrocelulózovou membránu NC 45 (Serva) a zaschnutím bylo dosaženo jejich imobilizace. Membrána s proteiny byla vysycena inkubací 30 min v 5 % odtučněném mléce v PBS a pak inkubována 1 hod s primární protilátkou namířenou proti proteinu VP1, ředěnou v 5 % odtučněném mléce v poměru 1 : 10. Po inkubaci v primární protilátce byla membrána promyta 3x 10 min v PBS a poté následovala inkubace 30 min v sekundární protilátce SwAM/Px konjugované s peroxidázou, ředěné 1 : 2000 v 5 % odtučněném mléce. Po inkubaci byla membrána opět promyta 3x 10 min v PBS. Detekce byla provedena v temné komoře. Membrána byla ponořena do roztoku Luminolu a poté byla vložena do průhledné fólie. V průhledné fólii byla přiložena k RTG filmu (Foma) ve vyvolávací kazetě. Doba expozice byla 5 min a film byl vyvolán ve vývojce (Foma) a v ustalovači (Foma).

##### **4. 7. 2. Interakce synteticky připraveného peptidu C35 s buňkami 3T6**

Buňky 3T6 narostlé na petriho miskách o průměru 6 cm, synchronizované 20 hod inkubací v bezsérovém médiu byly opláchnuty PBS (4 °C). Na každou misku bylo přidáno 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  peptidu C35 v DMEM médiu bez séra a buňky byly s peptidem inkubovány 40 min na ledě. Po této inkubaci bylo k buňkám přidáno kompletní DMEM médium vytemperované na 37 °C. Od této chvíle byl měřen čas interakce a misky byly dány na kývačku. Po uplynutí stanovené doby byly buňky opláchnuty PBS (37 °C) a fixovány 3 % glutaraldehydem v 0,1 M kakodylátovém pufru 30 min na ledě za občasného pokývání. Dále byly buňky zpracovány a zality do pryskyřice AGAR100 podle kap. 4.9.2.1.

#### **4. 8. Příprava reakčních směsí pro sledování *in vitro* interakcí polyomavirové DNA, pentamerami tvořenými proteinem VP1 a proteinem YY1.**

Směs s prázdnými virovými kapsidami byla 10x naředěna reakčním pufrem ( $2,5\% glycerol$ ,  $2,2\text{ mM }MgCl_2$ ,  $50\text{ mM }NaCl$ ,  $10\text{ mM }KCl$ ,  $10\text{ mM}Tris-HCl$ ,  $pH=7,5$ ), do kterého byl těsně před použitím přidán DTT (10mM) a EGTA (10mM). V reakčním pufru s DTT a EGTA (v silně redukčních podmínkách) byla směs inkubována 10 min při pokojové teplotě. Disociací prázdných kapsid byly získány pentamery tvořené proteinem VP1. Po inkubaci byla připravena reakční směs:

- $6\text{ }\mu\text{l}$  5x koncentrovaného reakčního pufru
- $6,8\text{ }\mu\text{l}$  10 % glycinu (Sigma)
- příslušný molární přebytek proteinu YY1
- příslušný molární přebytek pentamer VP1
- doplněno deionizovanou, destilovanou vodou do objemu  $29,5\text{ }\mu\text{l}$

V případě vynechání proteinu YY1 nebo pentamer VP1 byl chybějící objem doplněn deionizovanou, destilovanou vodou. Reakční směs byla za stálého míchání inkubována 20 min při pokojové teplotě a poté bylo k směsi přidáno  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  roztoku naštěpené DNA (400 ng). Směs byla opět inkubována 20 min při pokojové teplotě a vzniklé nukleoproteinové komplexy vizualizovaný elektronmikroskopickou metodou rozprostírání (kap. 4.9.6.). Příprava prázdných kapsid a proteinu YY1 v diplomové práci HORNÍKOVÁ 2005.

#### **4. 9. Techniky elektronové mikroskopie**

##### **4. 9. 1. Negativní barvení**

(KALINA a POKORNÝ 1981)

Sít'ky Cu 200 MESH potažené nitrocelulózovou membránou (Parlodion) a s nanesenou vrstvou uhlíku byly hydrofilizovány aktivací vysokonapěťovým výbojem v pokovovací aparatuře (EPA100 Leybold-Heraeus) s turbomolekulární vývěvou (PT4 50/38) za vysokého vakua ( $10^{-4}\text{ Pa}$ ), neboť uhlíkový film nanesený na sít'ky je silně hydrofóbni.

Aktivovaná (hydrofilizovaná) sít'ka byla položena na  $5\text{ }\mu\text{l}$  kapku vzorku a vzorek adsorbován 5 až 10 min. Poté byla sít'ka promyta 2x 1 min na  $100\text{ }\mu\text{l}$  kapkách

redestilované H<sub>2</sub>O a obarvena 2x 1 min na 50 µl kapkách 2 % PTA (kyselina fosfowolframová) (Fluka) pH = 7,0. Přebytek barviva byl z povrchu síťky opatrně odsát okrajem filtračního papíru. Po usušení na vzduchu byl preparát vložen do elektronového mikroskopu JEM 1200 EX, pracujícím při urychlovacím napětí 60 kV.

#### **4. 9. 2. Zalití buněk do média LR-White a AGAR100**

##### **4. 9. 2. 1. Zalití do média AGAR100**

Buňky narostlé na petriho miskách o průměru 9 cm byly fixovány 3 % glutaraldehydem v 0,1 M kakodylátovém pufru na ledu po dobu 60 min na ledu. Poté byly pomocí silikonového škrabátka převedeny do mikrozkumavky a promyty 2x 5 min v 0,1 M kakodylátovém pufru. Následně byla provedena postfixace v 1 % OsO<sub>4</sub> ve veronalovém pufru (*2 % OsO<sub>4</sub> v redestilované vodě zředěný 2x koncentrovaným veronalovým pu frem v poměru 1:1*) po dobu 60 min, při 4 °C a postfixované buňky byly promyty 2x 5 min ve veronalovém pufru (low melting point) ředěném destilovanou vodou v poměru 1 : 1. Po promytí byla suspenze převedena do 3 % agarózy vytemperované na 45 °C a dobře promíchaná směs byla ponechána 15 min na ledu, aby agaróza ztuhla. Po ztuhnutí byla agaróza pomocí žiletky rozkrájena na kousky o hraně asi 2 mm, které byly dehydratovány postupnou řadou alkoholů – 30, 50, 70, 90, 95, 2x 100 % EtOH, á 15 min při pokojové teplotě. Před zalitím byly vzorky inkubovány 2x 10 min v propylenoxidu (PO) a následně byly inkubovány 15 min v roztoku PO : AGAR100 v poměru 2 : 1, 30 min v PO : AGAR100 v poměru 1 : 1, PO : AGAR100 v poměru 1 : 2 a nakonec byly inkubovány v čistém AGAR100 přes noc při 4 °C. Poté byly vzorky v agaróze byly přeneseny do želatinových kapslí naplněných pryskyřicí AGAR100, kapsle byly lehce centrifugovány, aby se vzorky dostaly na dno. Pryskařice polymerovala 48 hod při 50 °C.

##### **4. 9. 2. 2. Zalití do média LR-White**

Buňky narostlé na miskách byly fixovány 1 h při 4 °C v 3 % paraformaldehydu s 0,05 % glutaraldehydem (Fluka) v 0,1 M SB pufru. Buňky byly následně seškrábány, promyty 2x 10 min v 0,1 M SB pufru při 4 °C a převedeny do agarózy vytemperované na 35 °C. Dehydratace probíhala postupnou řadou alkoholů následovně: 30 % EtOH – 10 min, 50 % EtOH – 10 min, 70 % EtOH – 15 min, 90 % EtOH – 15 min, 96 % EtOH – 15 min.

Před zalitím byly vzorky inkubovány ve směsi LR-White (Polysciences Inc.) a 96 % EtOH v poměru 1 : 2 (20 min při 4 °C) a následně ve směsi LR-White a EtOH v poměru 2 : 1 (20 min / 4 °C). Poté byly vzorky inkubovány 1 – 2 h při 4 °C v čistém LR-White a přes noc byly vzorky inkubovány v pryskyřici LR-White s komerčním katalyzátorem (Polysciences Int.) (0,99 g na 50 ml pryskyřice) za přidání katalyzátoru BEE (benzoinethylether, Polysciences Int.) (*75 mg na 15 g LR-White*) při 4 °C. Následující den byl LR-White vyměněn za čerstvý a vzorky byly inkubovány další 4 h. Vzorky v agaróze byly poté přeneseny do želatinových kapslí naplněných čerstvou pryskyřicí LR-White a po centrifugaci vzorků na dno pryskyřice polymerovala 48 hod při -10 °C působením UV (kapsle byly od 15W výbojky vzdálené 15 cm).

#### **4. 9. 3. Příprava ultratenkých řezů**

Řezy byly krájeny pomocí skleněných nožů zhotovených ze skleněných hranolů na přístroji LKB Knife Maker 7800A. Na nožích byla pomocí stříbrné lepenky (Christine Gropl, Tulln, Austria) vytvořena lodička pro odběr řezů. Z bločků zapolymerovaného média se vzorky byly nejdříve odstraněny obal želatinové kapsle. Řezy byly krájeny na ultramikrotomu (Ultracut E, Reichel-Jung) s automatickým posunem pod úhlem nože 5°. Páska řezů o tloušťce 60 – 65 nm, byla sbírána na hladinu demineralizované vody v lodičce a poté byla přenesena na síťky Cu 200 MASH (pro preparáty zalité do AGAR100) resp. Ni 200 MASH (pro preparáty zalité do LR-White), pokryté parlondionovou membránou.

#### **4. 9. 4. Kontrastování ultratenkých řezů**

Řezy z pryskyřice AGAR100 na síťkách Cu 200 MASH byly kontrastovány 10 min na 50 µl kapkách roztoku uranyl acetátu (nasycený vodný roztok) (Fluka) v petriho misce, po promytí v redestilované H<sub>2</sub>O byly řezy kontrastovány 7 min na kapkách citrátu olovnatého (Reynoldsův roztok, citlivý na přítomnost CO<sub>2</sub>) (*Reynoldsův roztok - 1,33 g dusičnanu olovnatého, 1,76 g dihydrátu citronanu sodného v 30 ml H<sub>2</sub>O s přidanými 8 ml NaOH a vše doplněno do 50 ml destilovanou H<sub>2</sub>O*) v petriho misce za přítomnosti NaOH a opět byly promyty v redestilované H<sub>2</sub>O.

Řezy z pryskyřice LR-White na síťkách Ni 200 MASH byly kontrastovány 5 min na 50 µl kapkách uranyl acetátu, promyty v redestilované H<sub>2</sub>O, dokontrastovány 3 min na kapkách citrátu olovnatého a opět promyty v redestilované H<sub>2</sub>O.

Podle potřeby (např. pro lepší zobrazení koloidního zlata pro IEM) byly doby kontrastování v některých případech měněny. Preparáty byly pozorovány v mikroskopu Jeol 1200 EX při urychlovacím napětí 60 kV.

#### **4. 9. 5. Vizualizace nukleových kyselin technikou BAC**

(ŠTOKROVÁ *et al.* 1989)

Pouhlíkovaná síťka Cu 200 MESH s parlodionovou membránou byla aktivována 10 min na 15  $\mu\text{l}$  kapce EtBr (ethidium bromid) (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Byl namíchán roztok A: 50  $\mu\text{l}$  NaAc + 1  $\mu\text{l}$  0,2 % BAC (benzyldimethylalkylammonium chlorid) a 20  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku bylo smícháno se zkoumanou reakční směsí. Prostřednictvím podložního sklíčka, silně hydrofilizovaného v lučavce královské (75 %  $\text{HCl}$  + 25 %  $\text{HNO}_3$ ) bylo 10  $\mu\text{l}$  této směsi nanесено na hladinu deionizované, destilované vody představující hypofázi. Vzniklý film, indikovaný částicemi talku, byl zachycen na aktivovanou síťku. Síťky byly kontrastovány uranyl acetátem v 90 % ethanolu (10  $\mu\text{l}$  2 % UrAc (Fluka) + 10 ml 90 % EtOH) po dobu 30 sec a následně 10 sec sušeny v 90 % EtOH. Preparáty pak byly v pokovovací aparatuře pokoveny slitinou platiny a palladia (Pt/Pd drátek silný 0,1 mm a dlouhý 4 cm, namotaný na wolframovou vlásenku) ze vzdálenosti 7 – 12 cm pod úhlem 6 – 8 °.

#### **4. 9. 6. Imunoznačení na ultratenkých řezech**

Řezy na síťkách Ni 200 MASH s parlodionovou mebránou byly nejprve hydratovány 10 min na 100  $\mu\text{l}$  kapkách redestilované  $\text{H}_2\text{O}$  a poté byly inkubovány na 50  $\mu\text{l}$  kapkách 10 % NGS (normální kozí sérum) (Christine Gropl, Tulln, Austria) v PBS pH = 7,4 s 1 % BSA (Sigma) po dobu 30 min při pokojové teplotě (blokace aldehydických skupin pro zvýšení specificity imunoznačení). Síťky byly poté přeneseny na 15  $\mu\text{l}$  kapky primární protilátky ředěné v 0,5 % BSA + 0,1 % fish gelatine v PBS, pH = 7,4, kde byly inkubovány 2 hod při pokojové teplotě nebo 24 hod při 4 °C. Inkubace probíhala ve vlhké komůrce, aby nedocházelo k odpařování kapek s protilátkou. Po inkubaci byly síťky s řezy promyty 3x 7 min v 0,1 % BSA v PBS pH = 7,4 a poté byly přeneseny na 15  $\mu\text{l}$  kapky sekundární protilátky ředěné v 0,5 % BSA + 0,1 % fish gelatine v PBS pH = 8,2, kde byly inkubovány 2 hod při pokojové teplotě nebo 24 hod při 4 °C (opět ve vlhké komůrce). Po promytí 2x 7 min v 0,01 % BSA v PBS pH = 7,4 a následně 2x 5min v PBS pH = 7,4 byly řezy na síťkách fixovány 10 min na 50  $\mu\text{l}$  kapkách 1 %

glutaraldehydu v PBS pH = 7,4. Fixované preparáty byly promyty 2x 5 min v PBS pH = 7,4 a 2x 7 min na kapkách redestilované H<sub>2</sub>O, usušeny na vzduchu a kontrastovány 10 min na 50 µl kapkách nasyceného roztoku uranyl acetátu v destilované vodě.

#### 4. 9. 7. Metoda odkrývání antigenů

Odkrytí citrátovým pufrem, pH = 6: síťka Ni 200 MESH pokrytá nitrocelulózovou membránou (Parlodion), s řezy buněk fixovaných ve 48 hod po infekci a zopolymerovaných do pryskyřice ***LR-White***, byla ponořena do citrátového pufru (*0,1 M citrát sodný (Sigma), pH = 6*), ve kterém byla inkubována 30 min při 60 °C. Po inkubaci byla sítna opláchnuta v PBS.

Odkrytí pomocí 8 % metaperiodátu sodného: síťka Ni 200 MESH pokrytá nitrocelulózovou membránou (Parlodion), s řezy buněk fixovaných ve 48 hod po infekci a zalitých do pryskyřice ***AGAR100***, byla inkubována 1 hod na 100 µl kapkách 8 % metaperiodátu sodného (NaIO<sub>4</sub>) při pokojové teplotě. Po inkubaci byla sítna opláchnuta v PBS.

Poté následovalo imunoznačení na ultratenkých řezech (kap. 4.9.6.) s inkubací 2 hod v primární i sekundární protilátky.

## **5. VÝSLEDKY**

## 5. 1. Izolace myšího polyomaviru

Myší polyomavirus, který byl použit v našich experimentech, jsme pomnožili a izolovali z buněk WME (whole mouse embryo cells), infikovaných s multiplicitou m.o.i. = 0,1. Celkem jsme infikovali 30 petriho misek (průměr 9 cm). Deset dnů po infekci, kdy byl v kultuře pozorován výrazný cytopatický efekt byly buňky i medium sklizeny pro izolaci viru (viz metody, kap. 4.5.1.). Virus jsme purifikovali centrifugací přes sacharózový polštář a následně gradientovou centrifugací v CsCl. Gradient CsCl byl rozebrán na frakce, u kterých jsme změřili refraktometrický index (Tab. 5.1).

Tab. 5.1 Hodnoty refraktometrického indexu frakcí z CsCl gradientu. Podle naměřených hodnot byly CsCl frakce předběžně rozdeleny na **frakci F1**, **frakci F2** a **frakci F3**.

| Frakce | Refraktometrický index | Frakce | Refraktometrický index |
|--------|------------------------|--------|------------------------|
|        |                        |        | Gradient 2             |
| 1/1    | 1,378                  | 1/2    | 1,378                  |
| 2/1    | 1,378                  | 2/2    | 1,377                  |
| 3/1    | 1,374                  | 3/2    | 1,374                  |
| 4/1    | 1,371                  | 4/2    | 1,372                  |
| 5/1    | 1,369                  | 5/2    | 1,370                  |
| 6/1    | 1,368                  | 6/2    | 1,369                  |
| 7/1    | 1,360                  | 7/2    | 1,371                  |
|        |                        | 8/2    | 1,367                  |

Frakce z gradientu CsCl jsme též testovali na přítomnost strukturálního proteinu VP1 metodou dot-blot (kap 4.7.1.). Na základě hodnot refraktometrického indexu a na základě rozložení proteinu VP1 v jednotlivých frakcích jsme spojili frakce do tří vzorků F1, F2 a F3:

**Frakce F1: 1 / 1 – 7 / 1 spolu s 1 / 2 – 8 / 2**

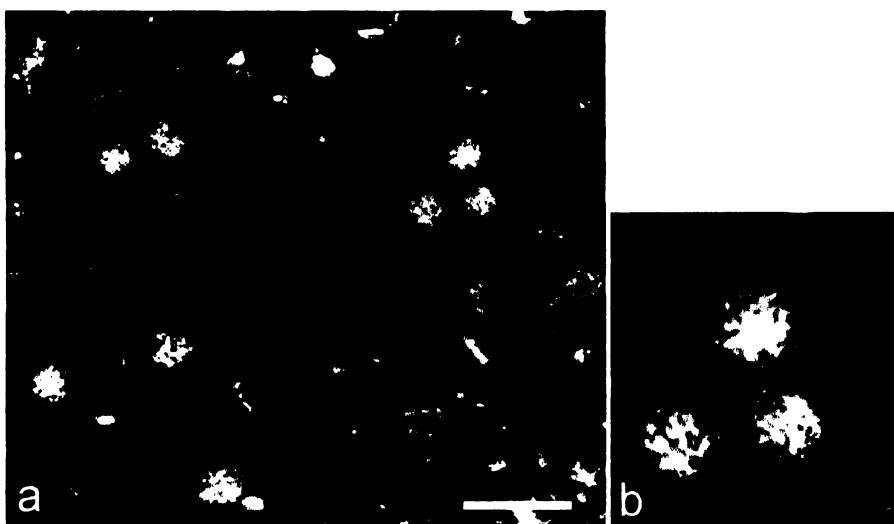
**Frakce F2: 8 / 1 – 19 / 1 spolu s 9 / 2 – 19 / 2**

**Frakce F3: 20 / 1 – 24 / 1 spolu s 20 / 2 – 26 / 2**

Dialýzou proti pufru B jsme odstranili CsCl a jednotlivé frakce jsme zahustili centrifugací přes sacharózový polštář. U frakcí jsme stanovili infekční titr (kap. 4.5.3.) a hemaglutinační jednotky (kap. 4.5.2.), jejichž hodnoty jsou uvedené v Tab. 5.2. Kvalitu virové suspenze jsme ověřili EM metodou negativního barvení (Obr. 5.1).

Tab. 5.2 Infekční titr a hemaglutinační jednotky frakcí F1, F2 a F3. U frakce F1 infekční titr neměřen.

| frakce | infekční titr<br>[pfu/ml] | hemaglutinační titr<br>[HAU] |
|--------|---------------------------|------------------------------|
| F1     | -                         | 3200                         |
| F2     | $8,5 \times 10^7$         | 50120                        |
| F3     | $2,3 \times 10^8$         | 100240                       |



Obr. 5.1 a) Viriony PyV (kmen A2) z frakce F2 zobrazené metodou negativního barvení. B) detail virionů. Úsečka: 100 nm.

## **5. 2. Dynamika PyV infekce – Ultrastrukturní analýza**

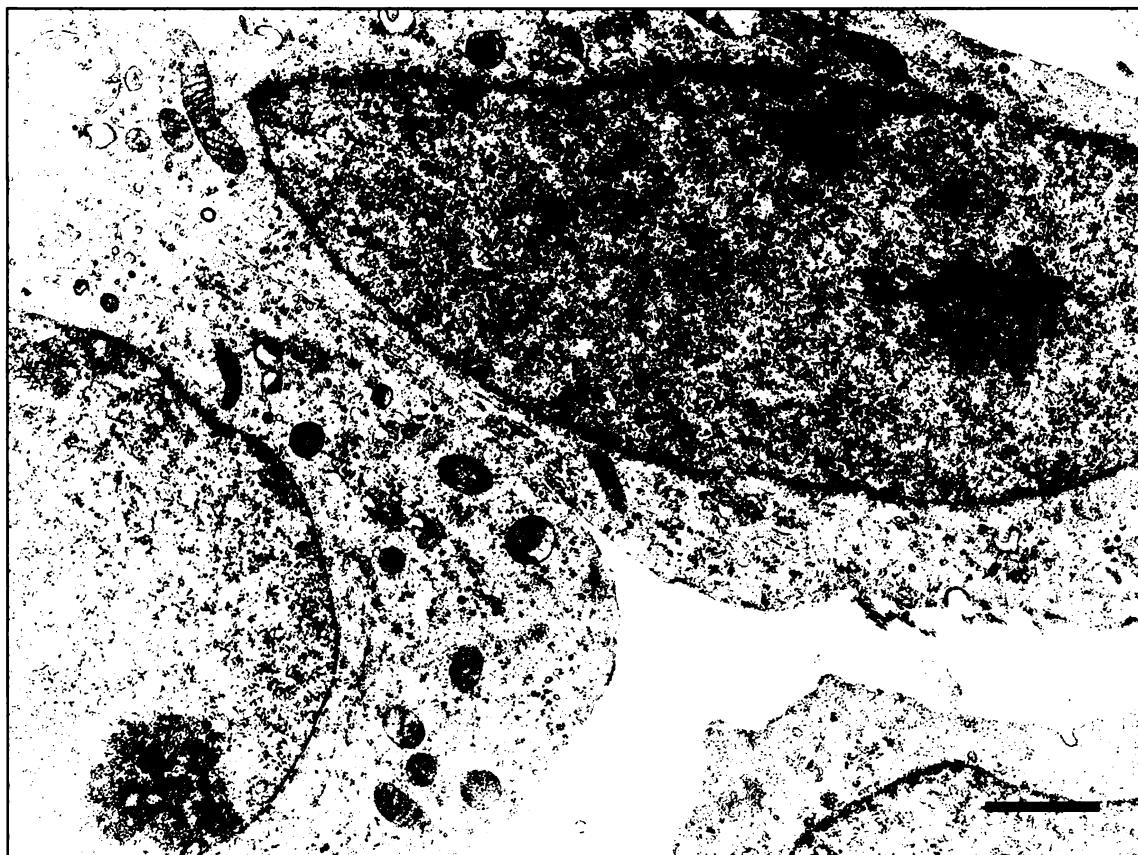
Prvním z úkolů diplomové práce bylo sledování substrukturních změn buněk v časové závislosti na době infekce. Dynamiku infekce jsme sledovali na synchronizovaných (kap. 4.4.2.) buňkách 3T6, infikovaných myším polyomavirem (kap. 4.4.3.). Infikované buňky v čase 12, 24, 36 a 48 hod po infekci a neinfikované kontrolní buňky jsme fixovali 3 % glutaraldehydem a postfixovali 1 % OsO<sub>4</sub>. Pro ultrastrukturní analýzu jsme buňky zalili do epoxidové pryskyřice AGAR 100 (kap. 4.9.2.1.).

Struktura neinfikovaných buněk a jejich organel byla dobře zachována. Buňky měly protáhlý tvar s jádry obvyklé velikosti a difúzním chromatinem. V cytoplazmě byly přítomny nezměněné organely, zejména u mitochondrií byly pozorovány zachovalé kristy. (Obr. 5.2). Dobře zachovalou strukturu dokazuje i nalezení cisteren Golgiho komplexu (Obr. 5.3). Buňky fixované v čase 12 hod po infekci se od neinfikovaných buněk příliš nelišily, také měly protáhlý tvar a jádra s difúzním chromatinem. Na plazmatické membráně některých buněk docházelo k tvorbě váčků a u řady buněk se vyskytovalo velké množství prázdných velikostně heterogenních transportních vesiklů v cytoplazmě (Obr. 5.4). Jádra několika buněk obsahovala zvětšená jadérka s nukleolonematy a kolem jader bylo pozorováno rozšířené endoplazmatické retikulum (Obr. 5.5).

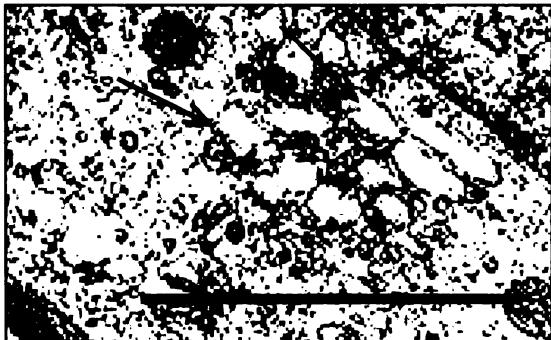
S postupující infekcí, v čase 24 hod po infekci se jadérka stále zvětšovala a začínala přecházet do více kompaktních typů (Obr. 5.6). V cytoplazmě jsme poprvé pozorovali výskyt obřích (giant) mitochondrií s narušenými kristami (Obr. 5.7) a pod jadernou membránou se již začínal shlukovat chromatin (Obr. 5.8). V čase 36 hod po infekci se téměř ve všech buňkách nacházely v různém množství nové viriony a jádra některých buněk byla již plně obsazena virovým potomstvem (Obr. 5.9). Viriony se v jádrech často nacházely v okolí jadérek (Obr. 5.10) z nichž některá svou morfologií již odpovídala kompaktnímu typu, který je typický pro nádorově transformované buňky (Obr. 5.11). Endoplazmatické retikulum některých buněk, zejména těch jež obsahovaly mnoho virionů, bylo v tomto čase po infekci velmi masivní (Obr. 5.9). Jaderná membrána se u některých buněk začínala vchlipovat a pod jadernou membránou byl pozorován chromatin v homogenně denzních shlucích typických pro apoptotické buňky (Obr. 5.12). Buňky s apoptotickou morfologií většinou virus neobsahovaly. Integrita cytoplazmy a částečně i integrita jaderné membrány byla u některých pozorovaných buněk již velmi narušená a v cytoplazmě se často vyskytovalo již silně zvětšené

(swollen) endoplazmatické retikulum a mnoho membránových útvarů i zbytků organel, na které se zachycovaly viriony již uvolněné z jádra (Obr. 5.13).

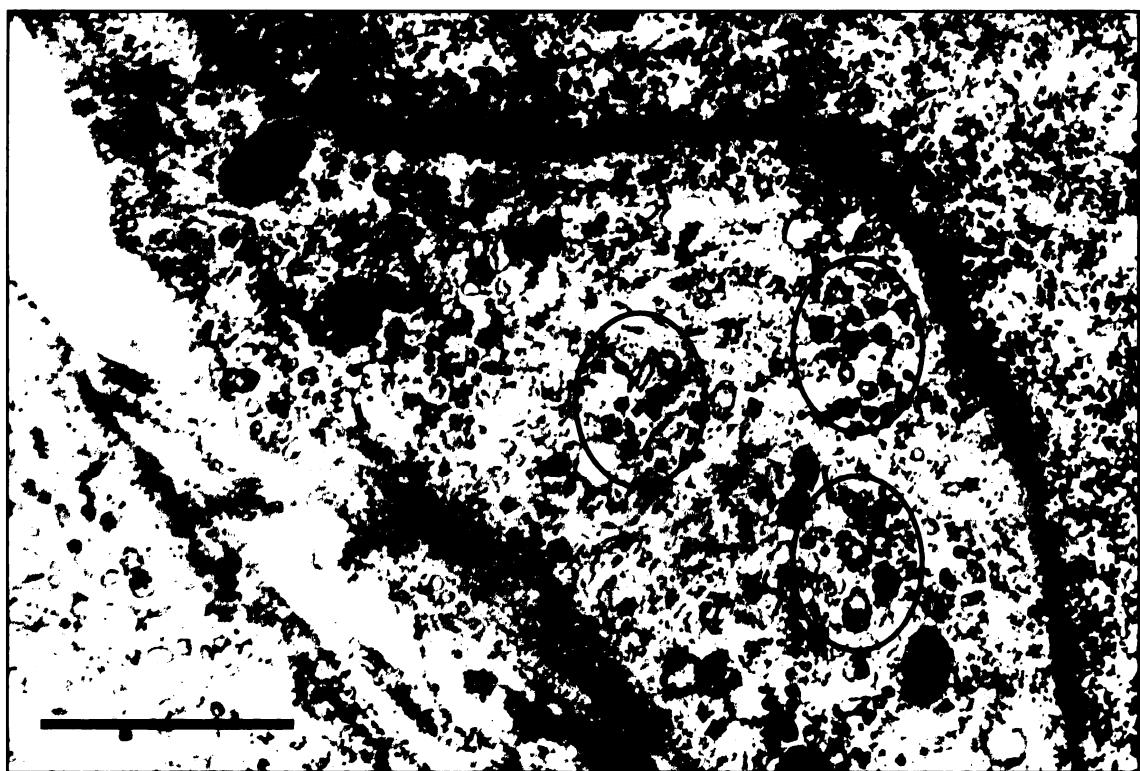
Ve 48 hod po infekci, posledním sledovaném čase, byla většina jader plná virionů a viriony byly již v poměrně vysoké míře transportovány z jádra do cytoplazmy, kde vykazovaly afinitu k membránovým strukturám (Obr. 5.13, 5.14). Viriony se velice často vázaly k narušeným dvojitým membránám mitochondrií (Obr. 5.14). Cytoplazma většiny buněk byla již značně nekrotická, vakuoalizovaná s množstvím dezintegrovaných organel a značně zvětšeným endoplazmatickým retikulem (Obr. 5.15). Jádra vykazovala u některých buněk apoptotickou avšak u jiných nekrotickou morfologii (Obr. 5.16). Jaderné membrány byly do určité míry narušené, ale překvapivě stále vykazovaly vysoký stupeň integrity (Obr. 5.13, 5.15, 5.16).



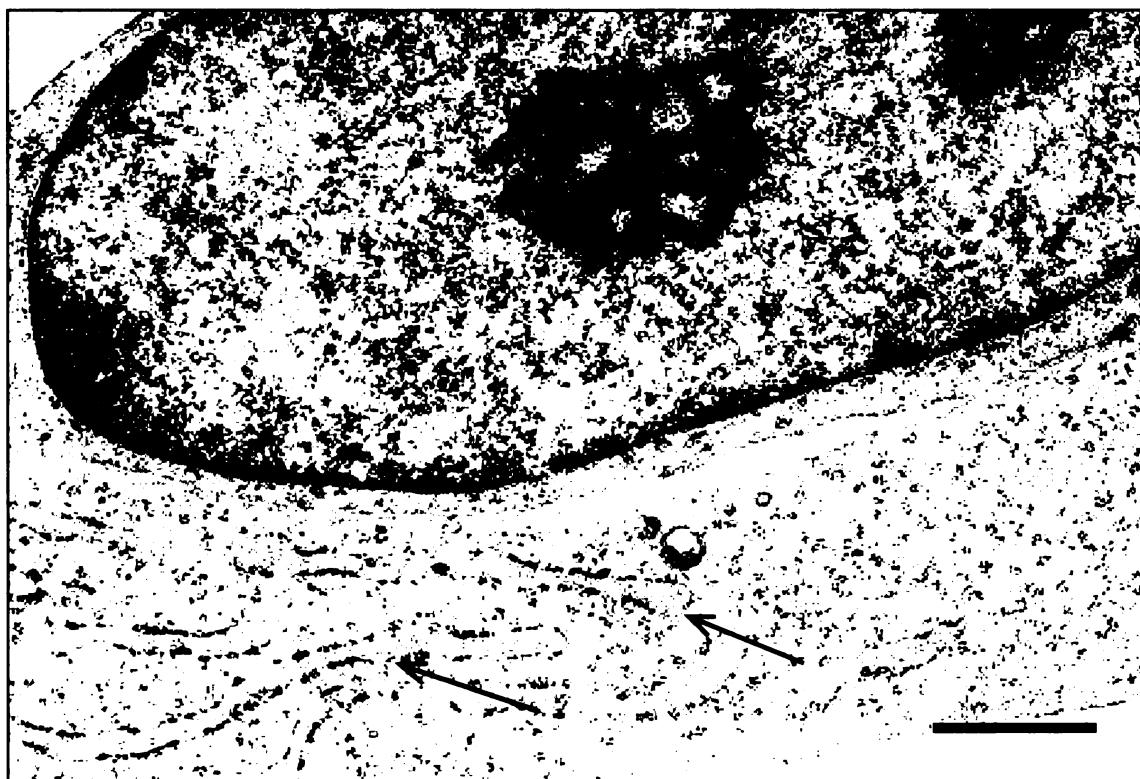
Obr. 5.2 (nahoře) Řez neinfikovanou kontrolní buňkou fixovanou 3% GA. V buňkách jsou přítomny organely s dobře zachovalou strukturou. Úsečka: 1µm.



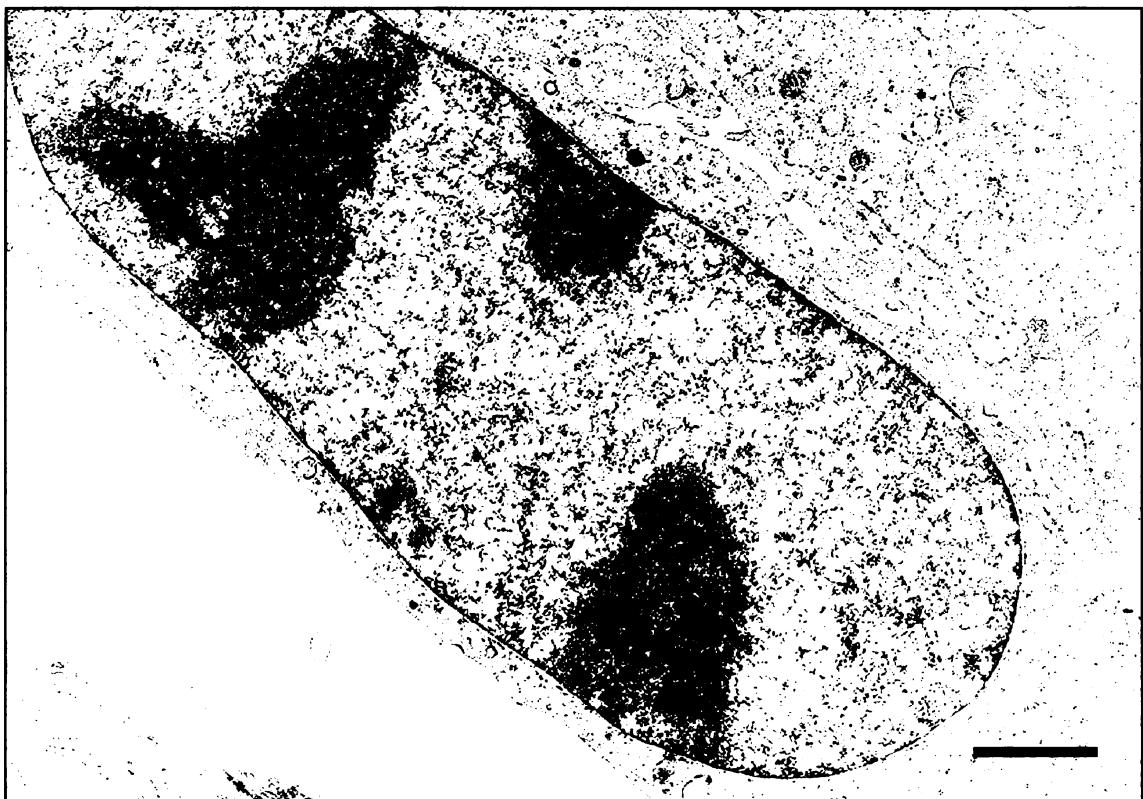
Obr. 5.3 (vlevo) Řez neinfikovanou kontrolní buňkou fixovanou 3% GA. V buňkách jsou patrný cisterny Golgiho komplexu (šipky). Úsečka: 0,5µm.



Obr. 5.4 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 12 hod po infekci. V cytoplazmě je přítomno velké množství heterogenních transportních váčků (viz červená ohraničení). Úsečka: 1 $\mu$ m.



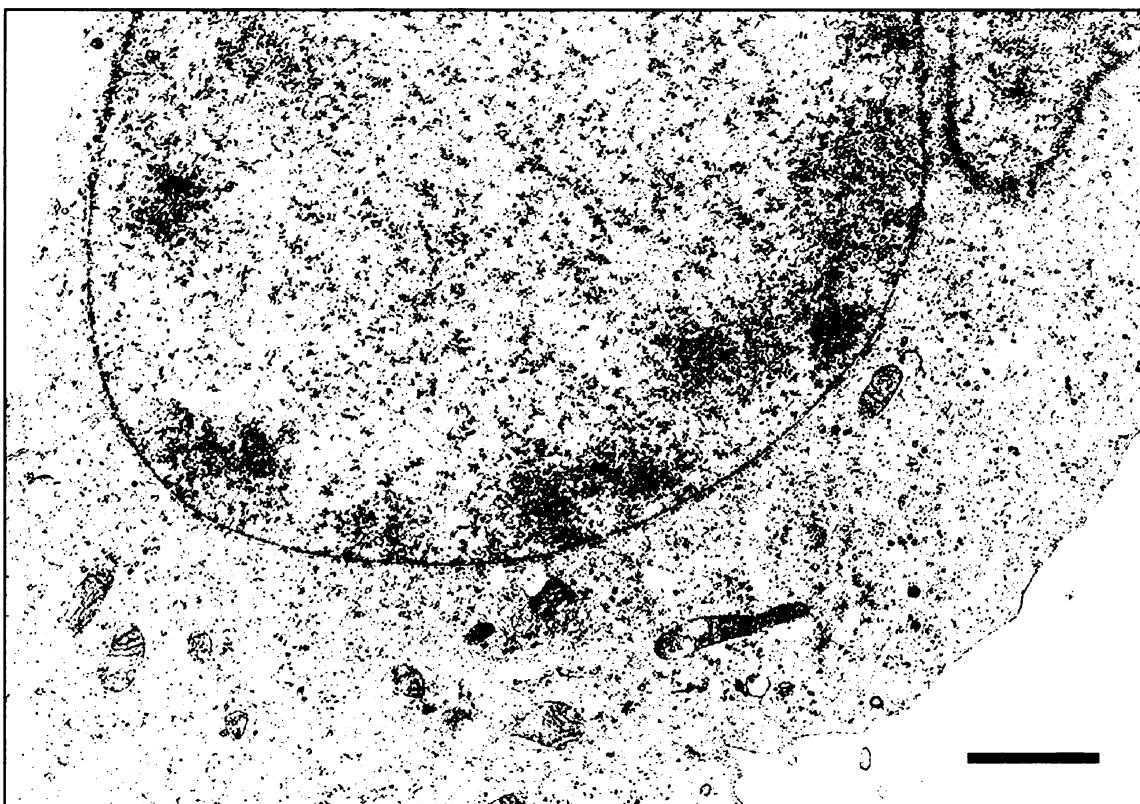
Obr. 5.5 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 12 hod po infekci. V jádře jsou patrná zvětšená jadérka s nukleolonematu a v cytoplazmě se vyskytuje zvětšené endoplazmatické retikulum (šipky). Úsečka: 1 $\mu$ m.



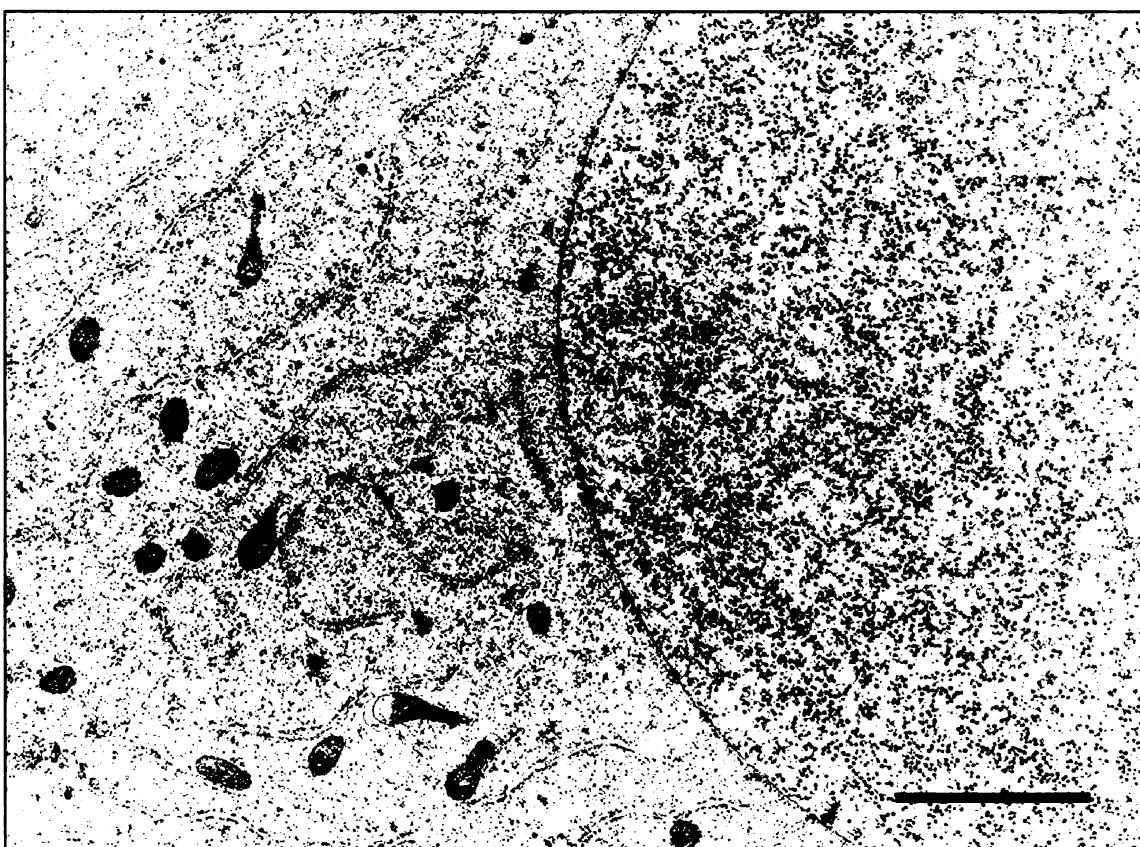
Obr. 5.6 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 24 hod po infekci. Ve zvětšeném jádře, které v řezu vyplňuje většinu buněčného obsahu jsou patrná zvětšená jadérka. Úsečka: 1μm.



Obr. 5.7 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 24 hod po infekci. V jádře je patrný nahloučený chromatin pod jadernou membránou a v cytoplazmě se nachází obří mitochondrie s narušenými kristami (šipky). Úsečka: 1μm.



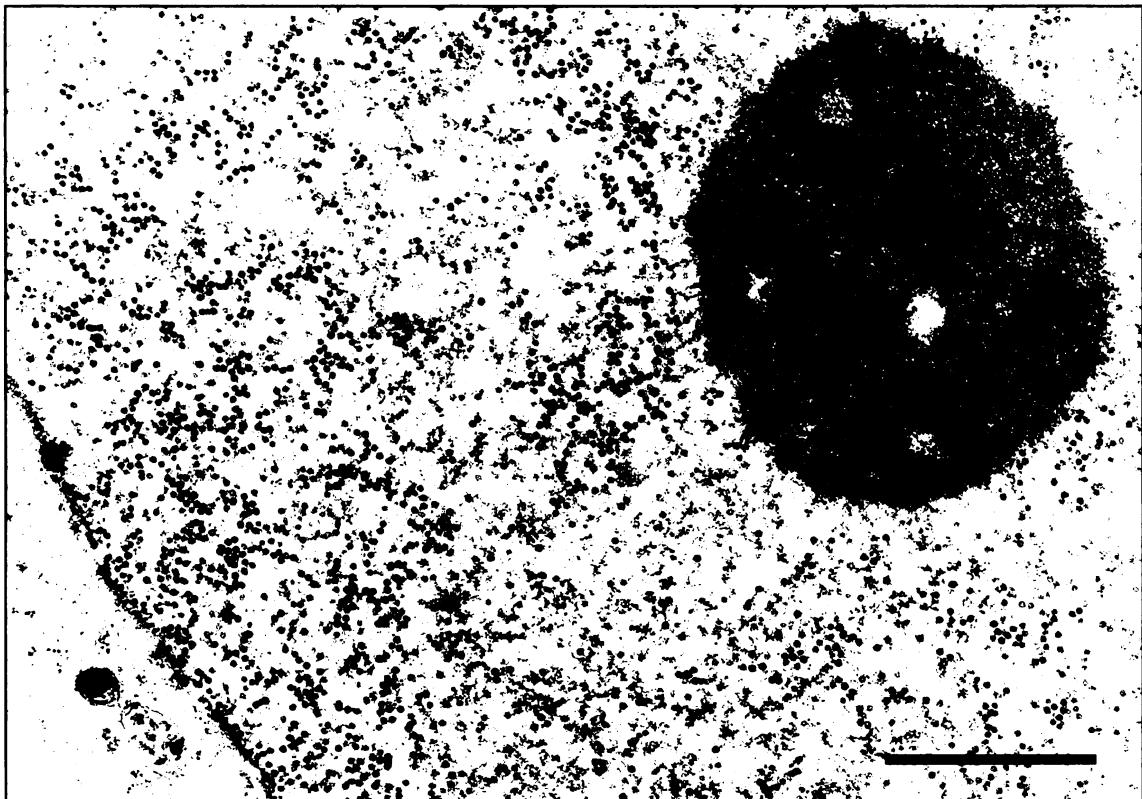
Obr. 5.8 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 24 hod po infekci. V jádře se chromatin začíná shlukovat pod jadernou membránou. Dále je vidět narušená struktura mitochondrií v cytoplazmě. Úsečka: 1 $\mu$ m.



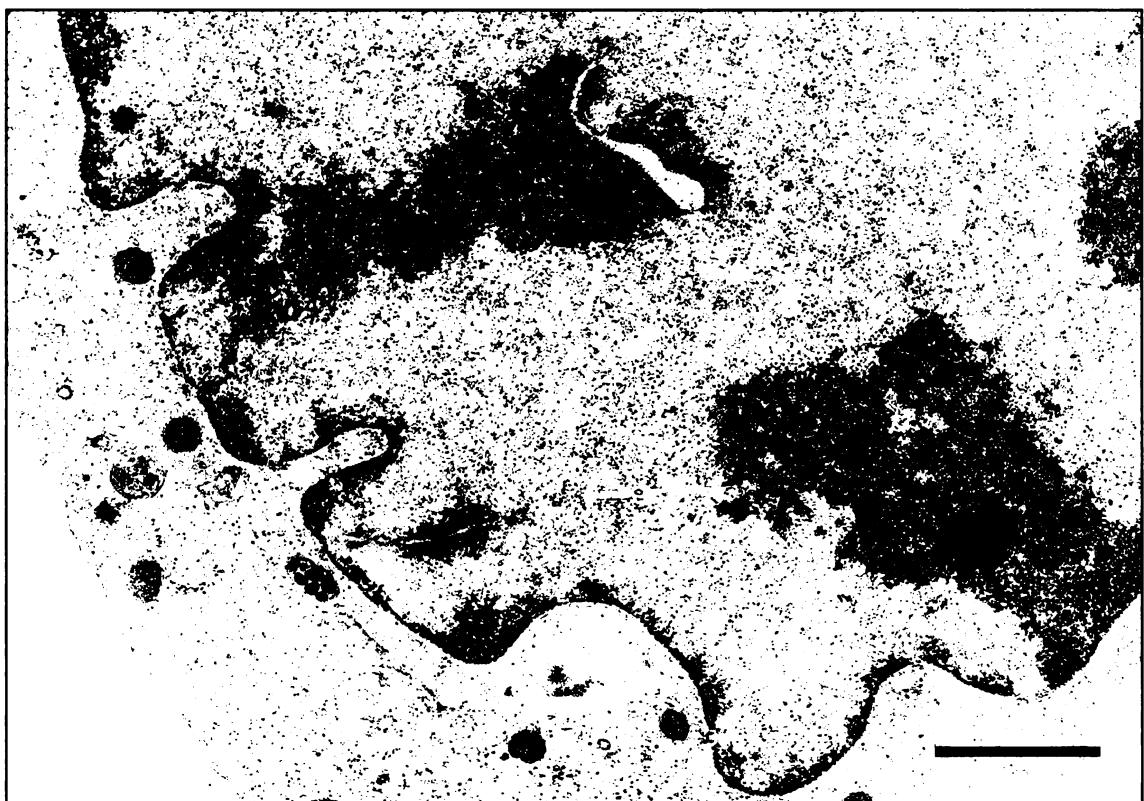
Obr 5.9 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 36 hod po infekci. Jádro je plné virového potomstva a v cytoplazmě kolem jádra se nachází velmi zvětšené endoplazmatické retikulum. Úsečka: 1 $\mu$ m.



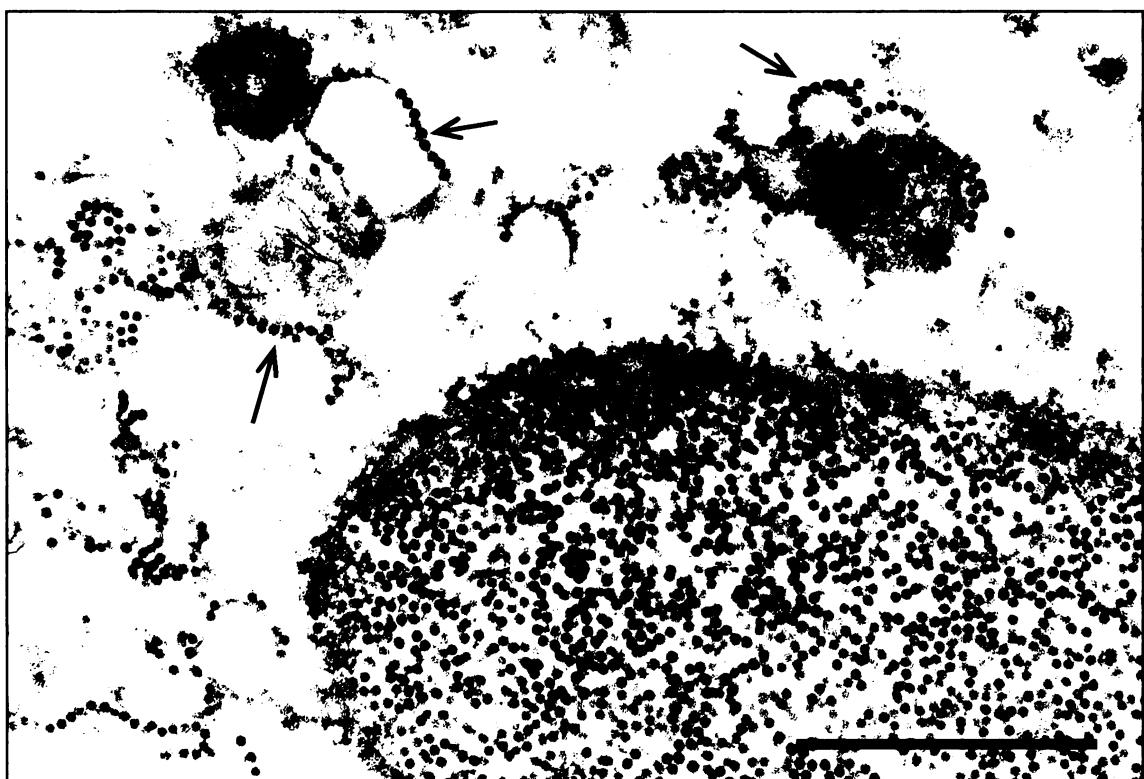
Obr. 5.10 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 36 hod po infekci. Velká část virionů se nachází v blízkosti jadérek. Úsečka: 0,5μm.



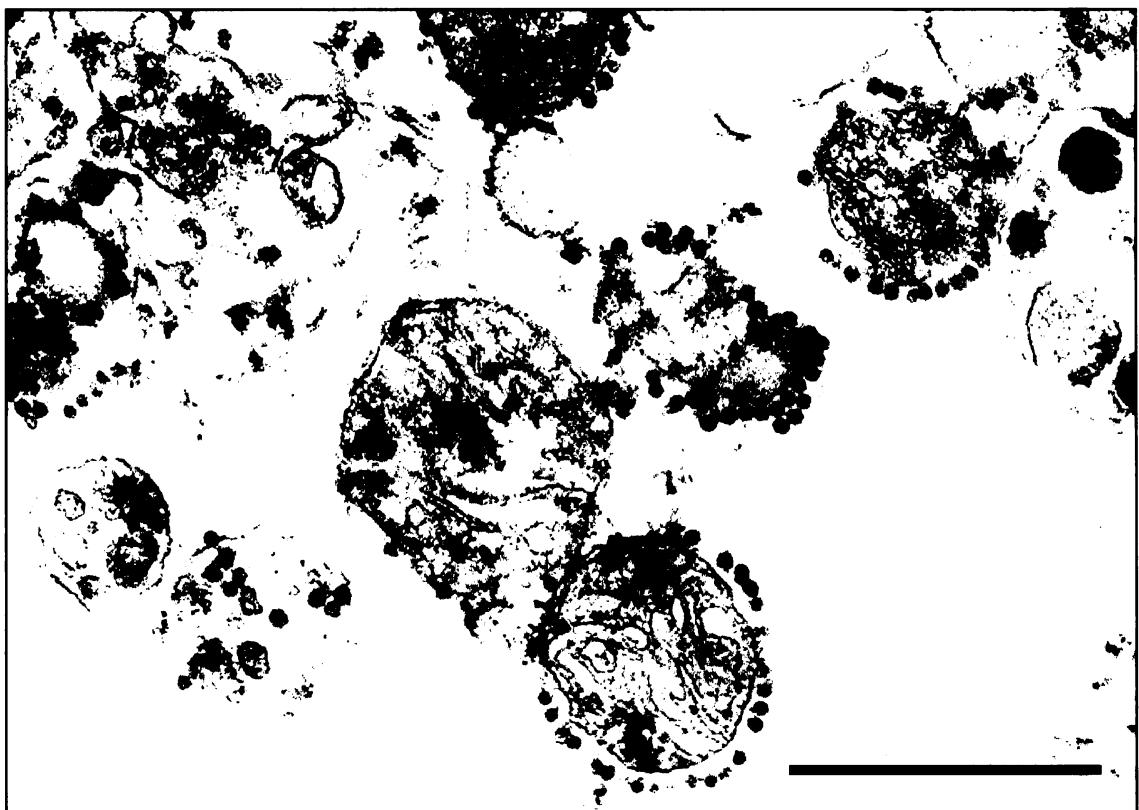
Obr. 5.11 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 36 hod po infekci. Jadérka některých buněk byla kompaktní, což je typické pro nádorově transformované buňky. Úsečka: 1μm.



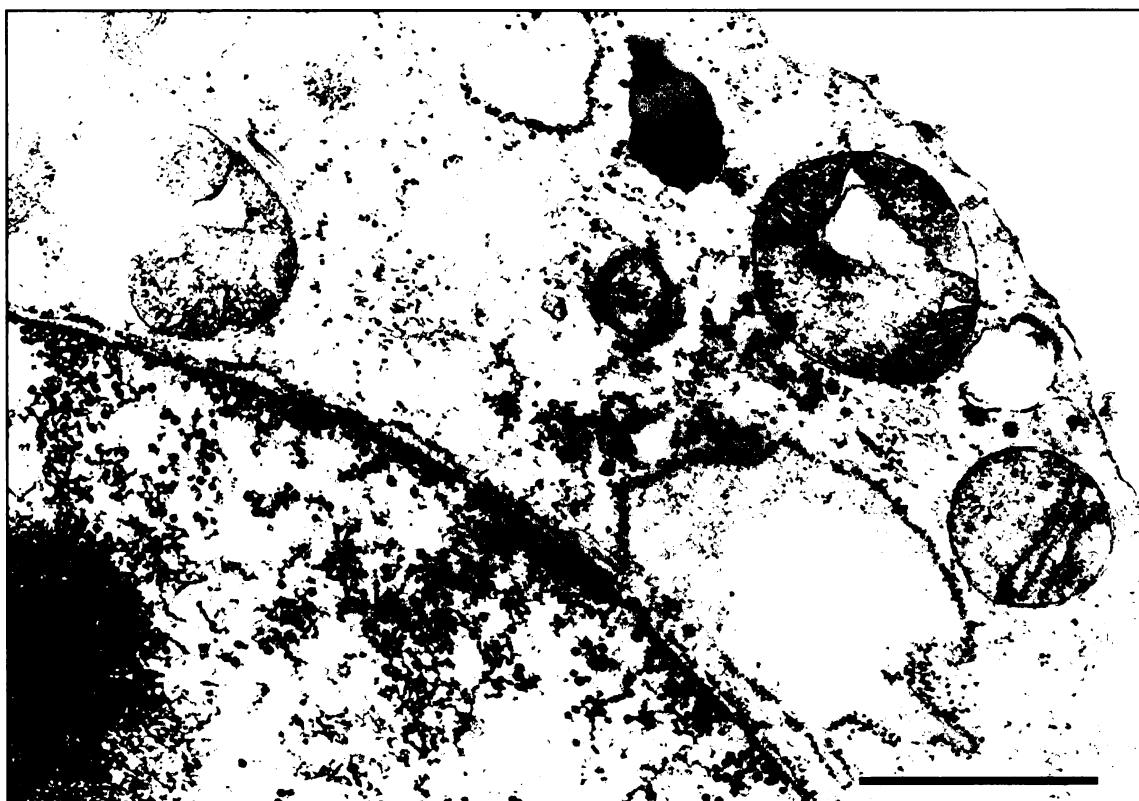
Obr. 5.12 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 36 hod po infekci. V jádře je patrný nahloučený chromatin vytvářející homogenně denzní struktury pod jadernou membránou, která se začíná vchlipovat. Úsečka: 1 μm.



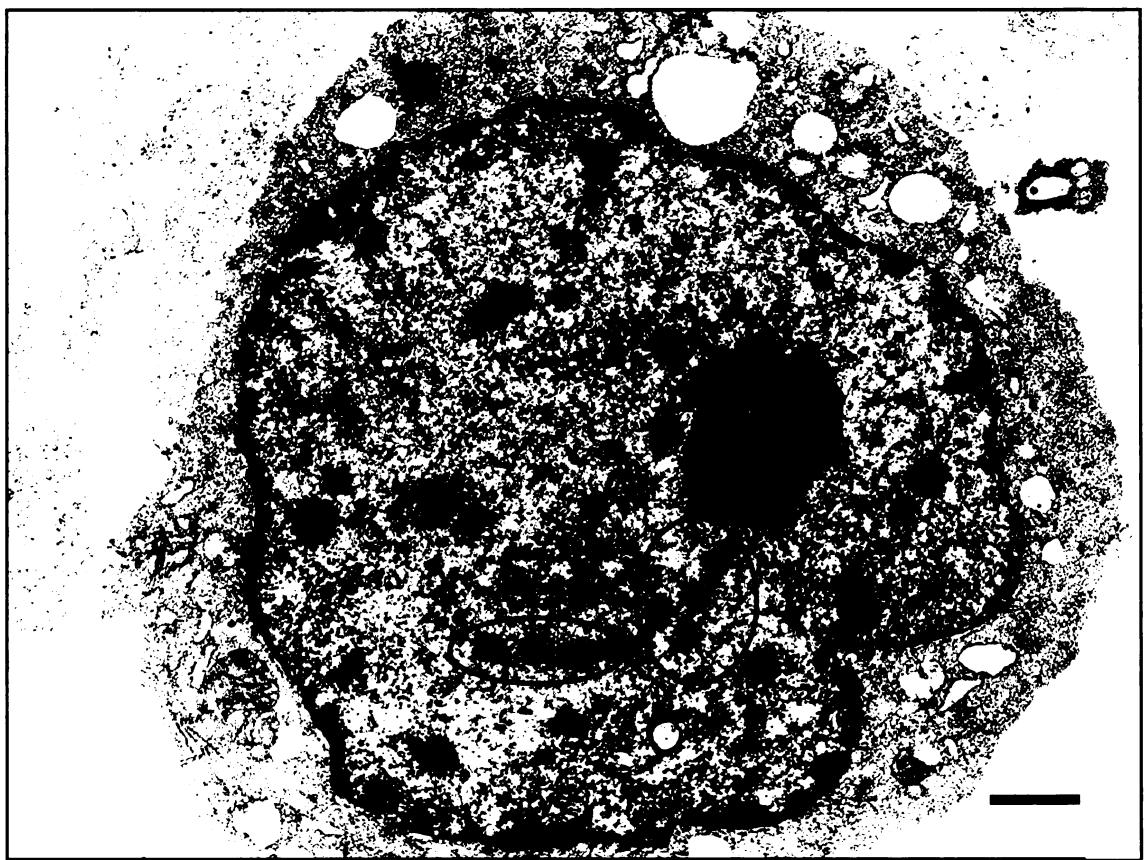
Obr. 5.13 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 48 hod po infekci. V cytoplazmě, která se již nachází v pokročilém stádiu nekrózy se uvolněné viriony vážou k membránovým strukturám a zbytkům organel (šipky). Vnější jaderná membrána je již silně narušená. Úsečka 0,5 μm.



5.14 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 48 hod po infekci. V cytoplazmě se nacházejí uvolněné viriony s afinitou i k porušeným dvojitým membránám mitochondrií. Úsečka 0,1 μm.



5.15 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 48 hod po infekci. V cytoplazmě jsou přítomny dezintegrované mitochondrie a zvětšené endoplazmatické retikulum. Jaderná membrána má stále zachovanou dvojitou vrstvu. Úsečka: 1μm



Obr 5.16 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 48 hod po infekci. Buňka obsahuje nekrotické jádro s denzími shluky chromatinu heterogenně roztroušenými po celém jeho prostoru (viz červená ohraničení). Nekrotická cytoplazma obsahuje velké množství vakuol a porušených organel. Úsečka 1  $\mu$ m.

### **5. 3. Interakce PyV s buněčnými proteiny – IEM**

Dalším cílem práce byla příprava a testování metodických přístupů imunoelektronové mikroskopie (IEM) na ultratenkých řezech k využití pro budoucí sledovaní interakcí myšího polyomaviru s buněčnými proteiny v naší laboratoři. Provedli jsme jednoduché i dvojí značení protilátkami a pokusili jsme se sledovat interakce myšího polyomaviru s vybranými jadernými proteiny v pozdních fázích infekce neboť je zatím velmi málo informací o buněčných komponentách, které jsou virem využívány v pozdních fázích infekce. Pro tyto účely jsme připravili buňky 3T6 kultivované do konfluence, které jsme nechali synchronizovat 24 hod (kap. 4.4.2.) a následně infikovali myším polyomavirem (kap. 4.4.3.). Buňky jsme fixovali 3 % paraformaldehydem s 0,05 % glutaraldehydem v 0,1 M SB pufru v příslušných časech po infekci a zapolymerovali do akrylátové pryskyřice LR-White (s uvedenou fixací určenou pro IEM) (kap 4.9.2.2.).

#### Detekce buněčného histonu H1 a kapsidového proteinu VP1:

Buněčný histon H1 a kapsidový protein VP1 jsme se pokusili detektovat dvojím značením na ultratenkých řezech buněk 3T6 fixovaných v čase 36 hod po infekci. Pro značení proteinu H1 byla použita myší primární monoklonální protilátku anti-histone H1, ředěná 1 : 20, kterou jsme označili sekundární protilátkou GAM G5, ředěnou 1 : 25. Pro značení proteinu VP1 byla použita králičí protilátku anti-VP1 IgG v optimálním ředění 1 : 20, označená sekundární protilátkou GAR G10, ředěnou v poměru 1 : 25. V obou protilátkách jsme řezy nechali inkubovat 2 hod při pokojové teplotě.

Na řezech neinfikovaných kontrolních buněk jsme v jádřech detekovali pouze histon H1 a značení bylo poměrně silné. Silného značení jsme dosáhli i v infikovaných buňkách, kde jsme v jádřech infikovaných buněk detekovali oba proteiny. Zatímco protein VP1 byl lokalizován převážně v oblastech, ve kterých se nacházely viriony, zlatý marker značící buněčný histon H1 byl nalezen spíše v jaderném chromatinu a v oblastech bez virionů (Obr. 5.17). Nespecifické značení v okolí buněk bylo zanedbatelné.

#### Detekce nukleoporinu a kapsidového proteinu VP1:

Nukleoporin (NUP), který je součástí komplexu proteinů v jaderných pórech a protein VP1 jsme se pokusili detegovat dvojím značením na ultratenkých řezech buněk 3T6 fixovaných v čase 36 hod po infekci. Pro značení nukleoporinu byla použita primární monoklonální myší protilátku anti-NUP 153, ředěná 1 : 20, označená sekundární

protilátkou GAM G5, ředěnou 1 : 25. Pro značení proteinu VP1 byla použita králičí protilátkou anti-VP1 IgG v optimálním ředění 1 : 25, označená sekundární protilátkou GAR G10, ředěnou 1 : 25.

Značení proteinu VP1 bylo silnější než značení nukleoporinu a podle očekávání nebyla pozorována žádná kolokalizace těchto proteinů. I když struktura buněk nebyla příliš dobře zachována (vlivem slabé fixace určené pro IEM analýzu buněk zapolymerovaných do pryskyřice LR-White), bylo možné v tomto čase po infekci pozorovat značení proteinu VP1 v oblastech jádra, kde se vyskytovaly viriony a velice často v okolí jadérek (Obr. 5.18). Protein NUP se podle očekávání vyskytoval v oblasti jaderné membrány, konkrétně na místech morfologicky odpovídajících zvětšeným jaderným pórům (Obr. 5.19).

#### Detekce proteinu YY1:

Protein jsme se pokusili detektovat na řezech buněk 3T6 fixovaných v časech 24, 36 a 48 hod po infekci, kdy je přítomnost virového potomstva jasně patrná. S primární i sekundární protilátkou byly řezy inkubovány 24 hod při 4 °C. Protein YY1 byl označen primární králičí polyklonální protilátkou anti-YY1 ředěnou 1 : 10, která byla označena sekundární protilátkou GAR G5, ředěnou 1 : 25. Kontrolní neinfikované buňky byly označeny stejnými protilátkami jako infikované buňky, jako negativní kontrolu, pro značení specificity značení, jsme použili řezy buněk fixovaných v časech 24, 36 a 48 hod po infekci, které jsme inkubovali pouze s pufrem pro ředění primární protilátky a následně značili sekundární protilátkou GAR G5, ředěnou 1 : 25.

Imunoznačení nebylo ve všech případech příliš výrazné a struktura buněk nebyla v důsledku slabé fixace paraformaldehydem zcela zachována. Značení proteinu YY1 v buňkách v čase 24 hod po infekci se výrazně nelišilo od značení v kontrolních neinfikovaných buňkách. Protein YY1 jsme v těchto buňkách lokalizovali po celém jádře, především v oblastech, kde se vyskytoval částečně kondenzovaný jaderný chromatin (Obr. 5.20). V čase 36 hod po infekci jsme pozorovali protein YY1 v blízkosti virového potomstva a často se značka nacházela v oblasti jadérek na jejich denzních fibrilárních komponentách (Obr. 5.21). V posledním sledovaném čase, 48 hod po infekci, byla struktura buněk velice špatně zachovalá a zlatý marker indikující protein YY1 byl pozorován v celé jaderné doméně (Obr. 5.22).

### **5. 3. 1. Metoda odkrývání antigenů na ultratenkých řezech**

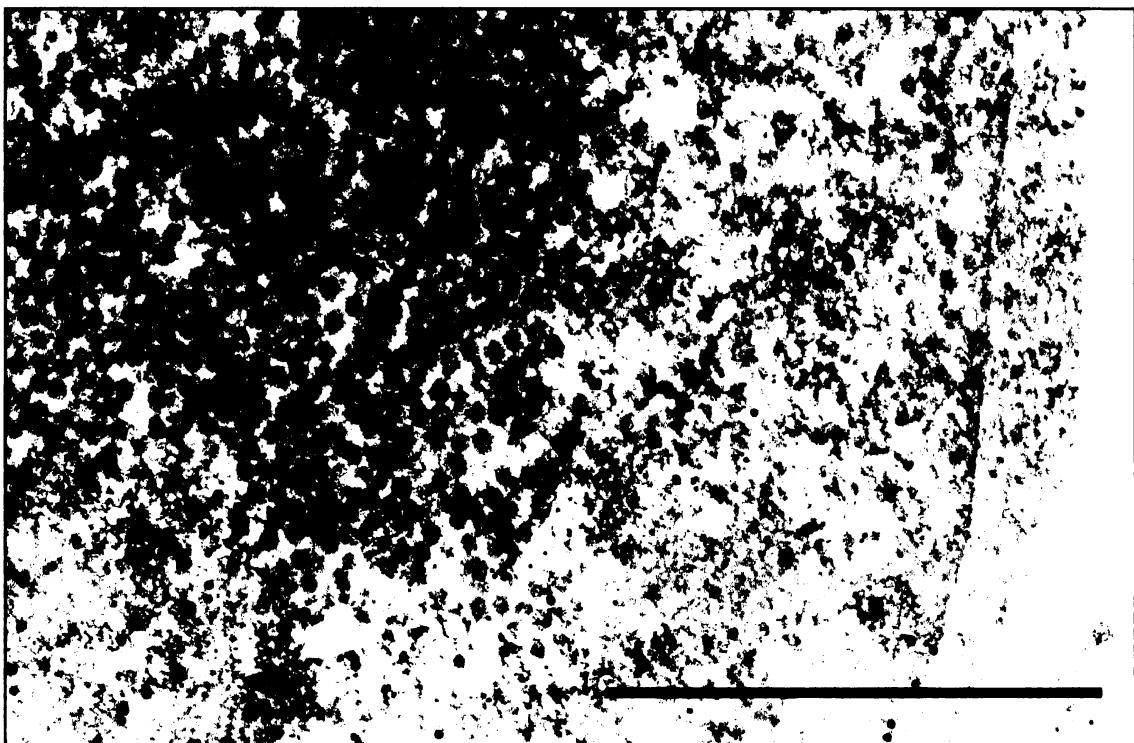
Metodu odkrývání antigenů (antigen retrieval) jsme se rozhodli vyzkoušet za účelem značení jaderného laminu na ultratenkých řezech, jelikož se nám tento protein při použití fixace a zalévacího média nepodařilo na řezech nikdy označit a dále jsme chtěli porovnat kvalitu značení při použití této metody se samotnou IEM. Na ultratenkých řezech jsme se pokusili odkrýt antigeny dvěma způsoby uvedenými v Tab. 5.3 a popsanými v metodách (kap. 4.9.7.). Byly použity řezy buněk 3T6 fixovaných ve 48 hod po infekci zapolymerovaných jak do pryskyřice AGAR100, tak i do pryskyřice LR-White (kap. 4.9.2.1., 4.9.2.2.).

Tab. 5.3 Dva přístupy použité k odkrytí antigenů podrobněji popsané v metodách kap 4.9.7.

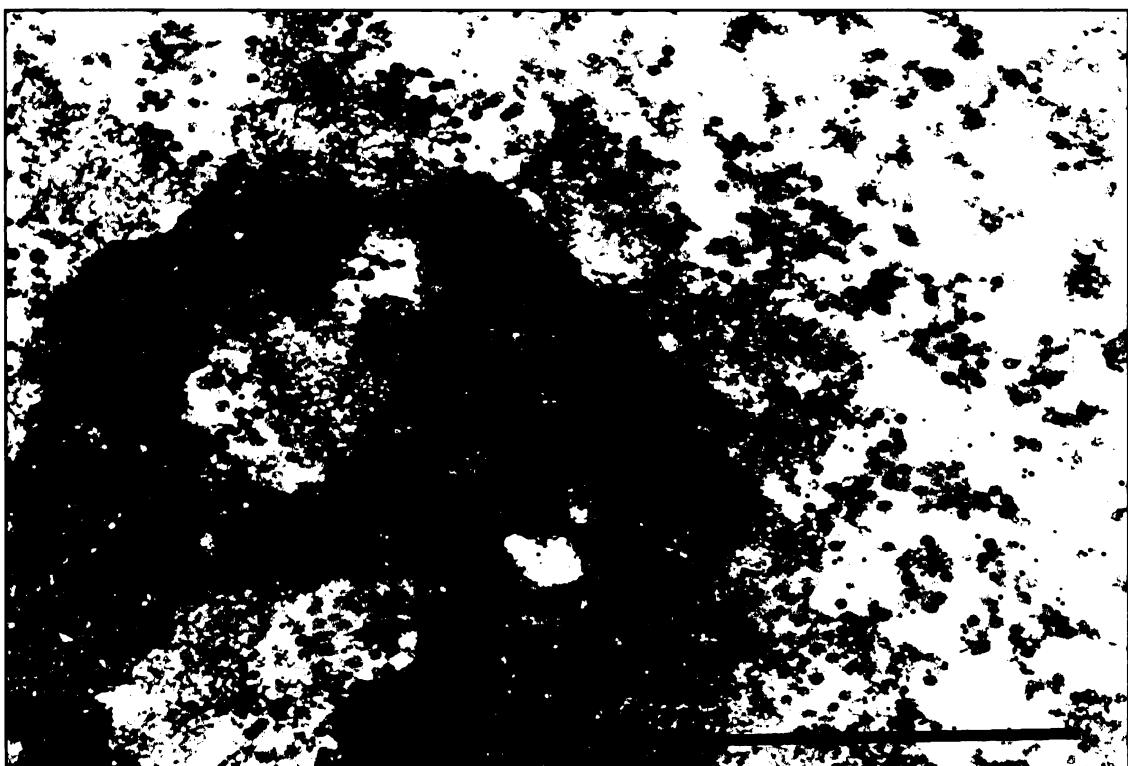
| buňky 48 h p.i. |  |
|-----------------|--|
| Médium          | způsob provedení                                       |
| LR-White        | citrátový pufr, pH 6 - 30 min při 60 °C                |
| AGAR 100        | 8% metaperiodát sodný NaIO <sub>4</sub> - 1 hod při RT |

Po odkrytí antigenů jsme použili dvojí značení, kdy jsme značili protein lamin pomocí králičí protilátky anti-Lamin A/C, ředěné 1 : 10, spolu s kapsidovým proteinem VP1, který jsme značili protilátkou anti-VP1 IgG, ředěnou 1 : 20. Jako sekundární protilátky jsme použili protilátky GAM G5 a GAR G10, ředěné 1 : 25 (kap. 4.9.7.).

Žádný z použitých přístupů pro odkrývání antigenů nevedl k úspěšnému značení laminu. Při značení řezů buněk fixovaných 3 % glutaraldehydem, zapolymerovaných v AGAR100 se po inkubaci s 8 % metaperiodátem sodným nepodařilo detektovat ani protein VP1. Při značení řezů buněk fixovaných 3 % paraformaldehydem s 0,05 % glutaraldehydem, zapolymerovaných do LR-White se po inkubaci v citrátovém pufru podařilo značit protein VP1 a značení bylo silnější než při použití IEM bez metody odkrývání antigenů (Obr. 5.23).



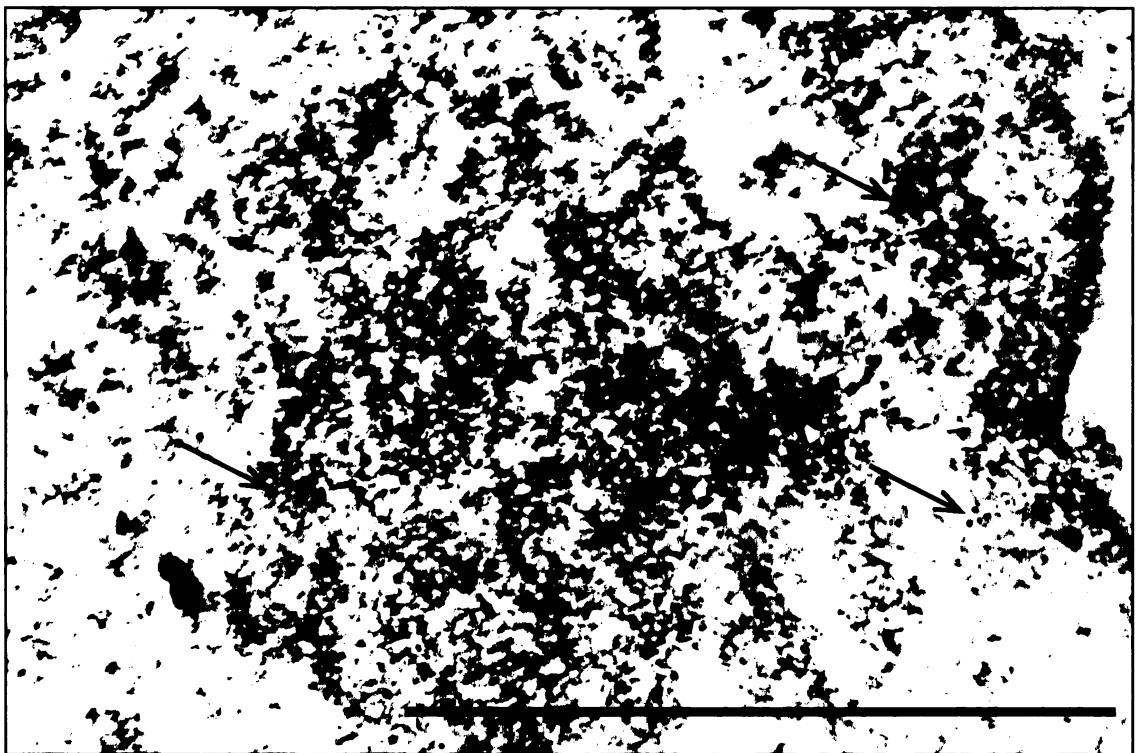
Obr. 5.17 Řez buňkou fixovanou 3% PFA a 0,05% GA v čase 36 hod po infekci, značeno anti-H1 IgG 1:20 (10 nm zlatý marker) a anti-VP1 IgG 1:20 (5 nm zlatý marker). V jádře je patrná lokalizace proteinu H1 a proteinu VP1. Zatím co protein VP1 je značen na virionech, značka proteinu H1 je spíše v okolním chromatinu. Řezy jsou kontrastovány uranylacetátem a Reynoldsovým roztokem. Úsečka 1 µm.



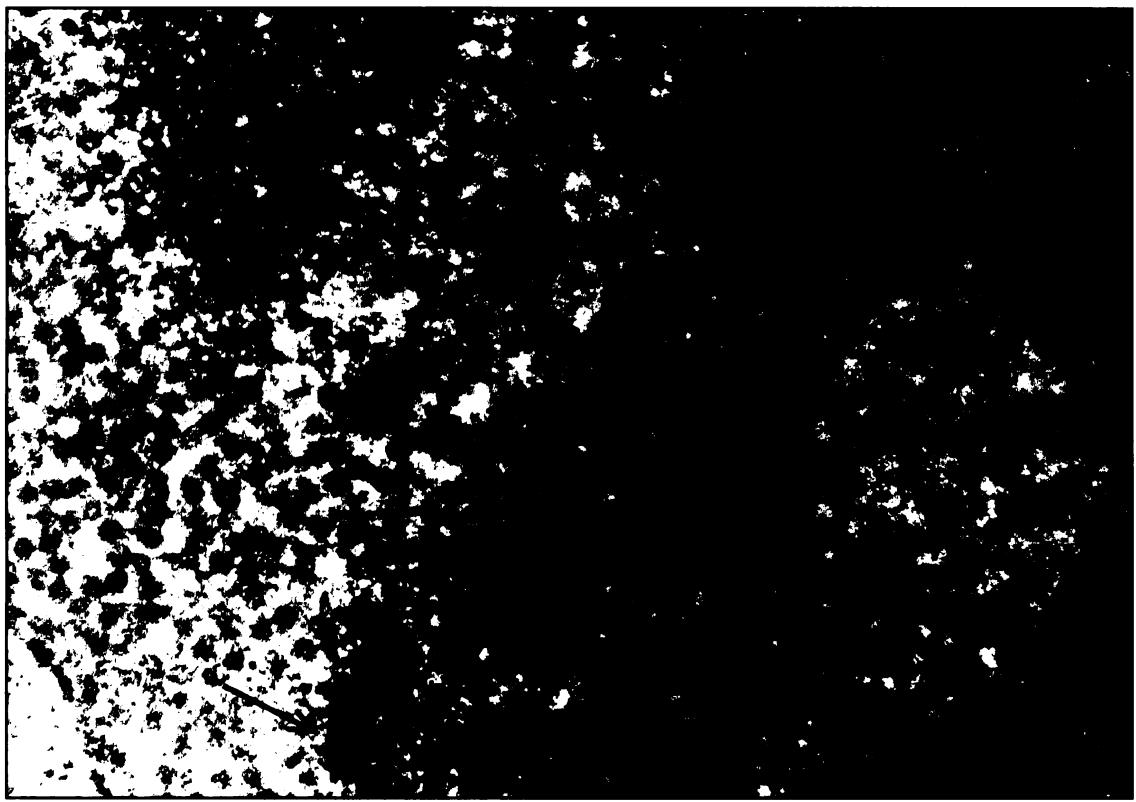
Obr. 5.18 Řez buňkou fixovanou 3% PFA a 0,05% GA v čase 36 hod po infekci, značeno anti-NUP IgG 1:20 (G 5 nm) a anti-VP1 IgG 1:20 (G 10 nm). Kolem jádrek je vidět velké množství silně značených virionů, značka nukleoporinu se zde nevyskytuje. Řezy jsou kontrastovány uranylacetátem a Reynoldsovým roztokem. Úsečka 1 µm.



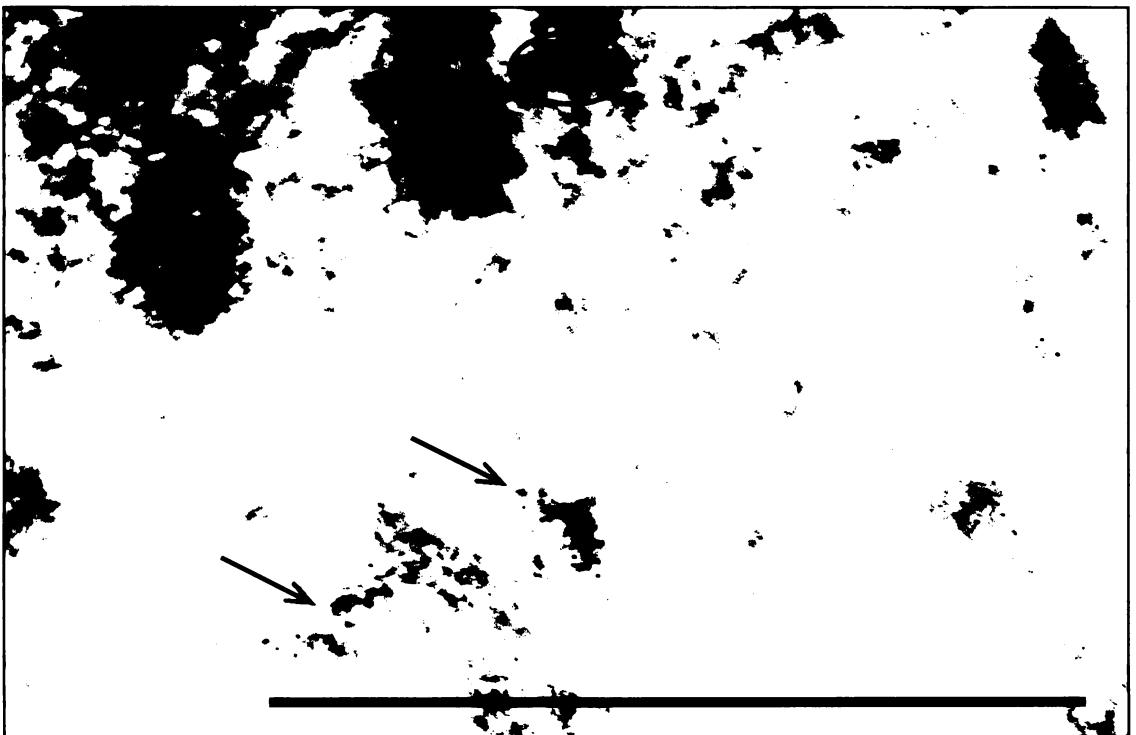
Obr. 5.19 Řez buňkou fixovanou 3% PFA a 0,05% GA v čase 36 hod po infekci, značeno anti-NUP IgG 1:20 (G 5 nm) a anti-VP1 IgG 1:20 (G 10 nm). Zatímco viriony jsou značeny hlavně v okoli jadérek, značka nukleoporinu se vyskytuje na specifických místech dvojitě membrány (viz červená ohrazení). Řezy jsou kontrastovány uranylacetátem a Reynoldsovým roztokem. Úsečka 1 µm.



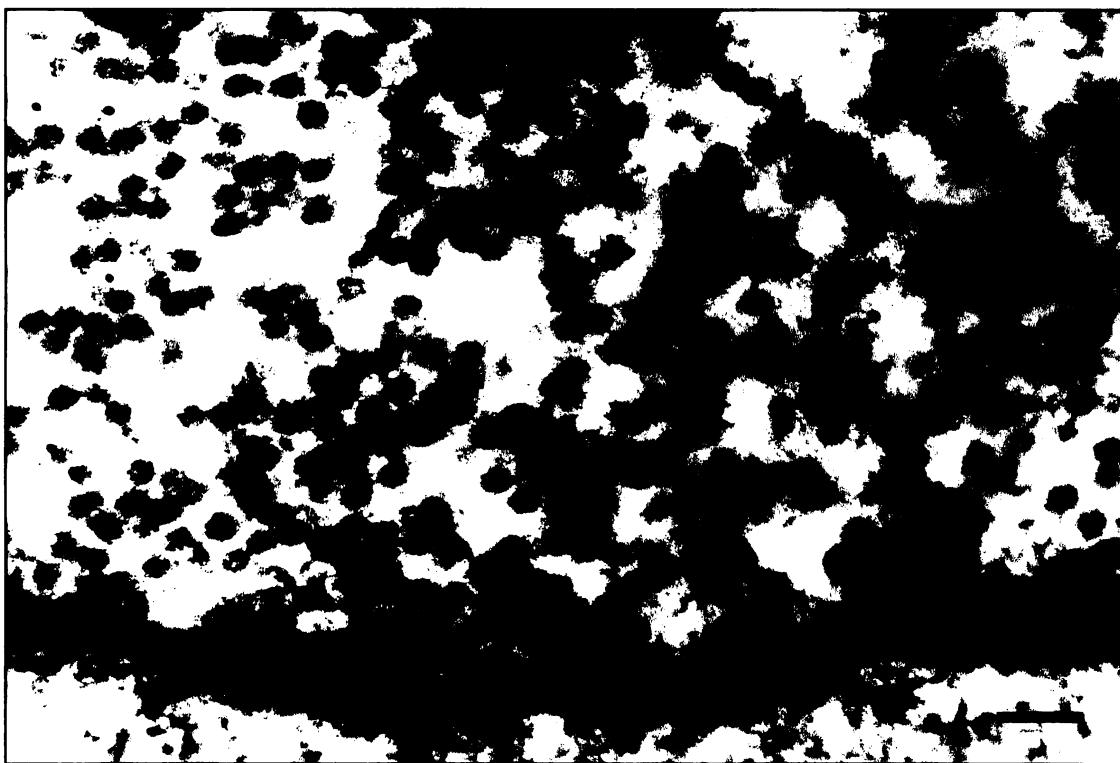
Obr. 5.20 Řez buňkou fixovanou 3% PFA a 0,05% GA v čase 24 hod po infekci, značeno anti-YY1 IgG 1:10. V jádře je patrné slabé značení proteinu YY1 zlatým markerem. Značka se vyskytuje především v chromatinu po celém jádře (šipky). Řezy jsou kontrastovány uranylacetátem. Úsečka 1 µm.



Obr. 5.21 Řez buňkou fixovanou 3% PFA a 0,05% GA v čase 36 hod po infekci, značeno anti-YY1 IgG 1:10. V jádře je patrné slabé značení proteinu YY1 zlatým markerem především na rozhraní denzích fibrilárních komponent jadérek a oblastí s virovým potomstvem (šipky). Řezy jsou kontrastovány uranylacetátem. Úsečka 100 nm.



Obr. 5.22 Řez buňkou fixovanou 3% PFA a 0,05% GA v čase 48 hod po infekci, značeno anti-YY1 IgG 1:10. V jádře je patrné velmi slabé značení proteinu YY1 zlatým markerem ve shlucích chromatinu (šipky, ohrazení). Řezy jsou kontrastovány uranylacetátem. Úsečka 1 μm.



Obr. 5.23 Řez buňkou fixovanou 3% PFA a 0,05% GA v čase 48 hod po inkubaci 30 min v citrátovém pufu při 60 °C, značeno anti-VP1 IgG 1:20. V jádře jsou patrné viriony specificky označené zlatým markerem Úsečka: 100 nm

## **5. 4. Interakce genomu myšího polyomaviru s proteinem VP1 za přítomnosti transkripčního faktoru YY1 prováděné *in vitro*.**

Za účelem studia vztahů mezi polyomavirovou DNA, proteinem VP1 a transkripčním buněčným faktorem YY1 byly sledovány jejich interakce *in vitro* v připravených reakčních směsích (kap. 4.8.). Tyto interakce byly vizualizovány EM metodou rozprostírání (spreading) nukleových kyselin za použití BAC (kap. 4.9.6.).

Materiál byl připraven Mgr. Lenkou Horníkovou. Polyomavirová DNA byla získána z plazmidu pMJG izolovaného z bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$ . PyV DNA byla z plazmidu vyštěpena restrikčním enzymem *Eco RI*, přes jehož unikátní restrikční místa byl genom do plazmidu pMJ zaklonován (KRAUZEWICZ *et al.* 1990). Štěpením byl získán polyomavirový genom (5,3 kbp) s vazebními místy pro protein YY1 vzdálenými 1860 bp + 1700 bp od obou konců molekuly a plazmid pMJ (2,3 kbp).

Protein YY1 byl získaný jako rekombinantní protein, produkovaný bakteriemi *E. coli RR*, které obsahovaly plazmid pHIS-YY1 (získaný od T. Robinson, Princeton university, New Jersey). Protein byl purifikován metodou afinitní chromatografie, což umožňovala histidinová kotva na jeho N-konci.

Pentamery proteinu VP1 byly pro tyto první pokusy získány disociací prázdných virových kapsid v redukčních podmínkách za přítomnosti dithiotreitolu (DTT), který ruší disulfidické vazby v kapsidách a v přítomnosti EGTA, jež vyvazuje ionty vápníku z virových kapsid a tím je destabilizuje. Redukční prostředí tedy bylo pro experiment nutné, abychom získaly pentamery proteinu VP1, i když mohlo ovlivňovat povahu interakcí.

Celý postup přípravy je popsán v diplomové práci HORNÍKOVÁ 2005.

### **5. 4. 1. *In vitro* interakce**

Připravili jsme 4 reakce a jednu kontrolní směs (reakce č. 1), která obsahovala pouze DNA (linearizovaný genom polyomaviru i linearizovaný plazmid pMJ). V připravených čtyřech reakcích (Tab. reakce č. 2 – 5) byly pentamery VP1, protein YY1 smíchány s DNA v různých molárních poměrech a byla zkoumána vazba proteinů k nukleové kyselině. Přehled reakcí je uveden v Tab. 5.4.

Tab. 5.4 Molární poměry jednotlivých složek v reakčních směsích.

| reakce č. | typ reakce, x = násobek molárního nadbytku |
|-----------|--|
| 1         | pouze DNA                                  |
| 2         | DNA s <b>7x YY1</b>                        |
| 3         | DNA + <b>20x VP1</b>                       |
| 4         | DNA + <b>20x VP1 a 50x YY1</b>             |
| 5         | DNA + <b>20x VP1 a 100x YY1</b>            |

### 1. Kontrola kvality DNA pro vazebné reakce *in vitro*:

Kvalitu izolované DNA jsme testovali jejím nanesením na elektronmikroskopické síťky. V preparátech jsme pozorovali linearizované molekuly DNA o dvou délkách. První kratší, velikostně odpovídá linearizovanému plazmidu pMJ (2,3 kbp) a druhá svou velikostí odpovídá polyomavirové DNA (5,3 kbp). Molekuly DNA vykazovaly vláknitou hladkou strukturu, což svědčí o jejich relaxovaném stavu a nepřítomnosti komponent, které by mohly ovlivnit její interakci se studovanými proteiny (Obr. 5.24). Koncentrace molekul byla vysoká, což nám zaručovalo dostatek materiálu pro následné *in vitro* analýzy č. 2 – 5.

### 2. Vazebná reakce DNA a proteinu YY1 v 7-násobném molárním nadbytku oproti DNA:

Při sedminásobném molárním nadbytku proteinu YY1 oproti DNA docházelo na některých molekulách DNA obou velikostí k tvorbě vlásenkových (hairpin) struktur (Obr. 5.25). Tyto struktury byly nalezeny na cca 46 % molekul, z toho 72 % vlásenek mělo délku v průměru 40 nm, delší byly pozorovány jen výjimečně.

### 3. Vazebná reakce DNA a proteinu VP1 ve formě pentamer ve 20-násobném molárním nadbytku oproti DNA:

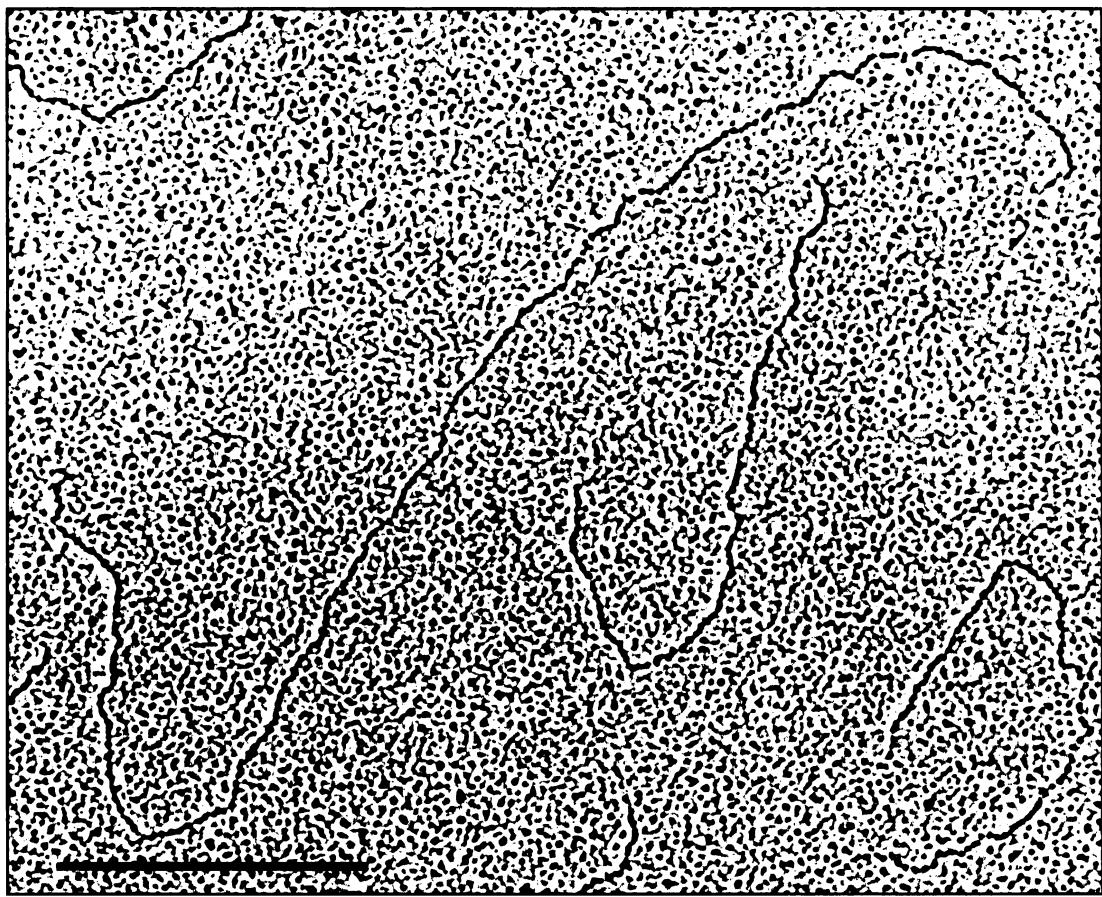
V této reakci se projevila nespecifická vazba pentamer tvořených proteinem VP1 k molekule DNA, přičemž se však protein VP1 vázal do některých míst molekuly DNA s větší účinností a pentamery v těchto místech vytvářely shluky, zatím co jiné části molekuly zůstávaly „holé“ (Obr. 5.26).

4. Vazebná reakce DNA a proteinu VP1 ve formě pentamer ve 20-násobném molárním nadbytku a proteinu YY1 v 50-násobném molárním nadbytku oproti DNA:

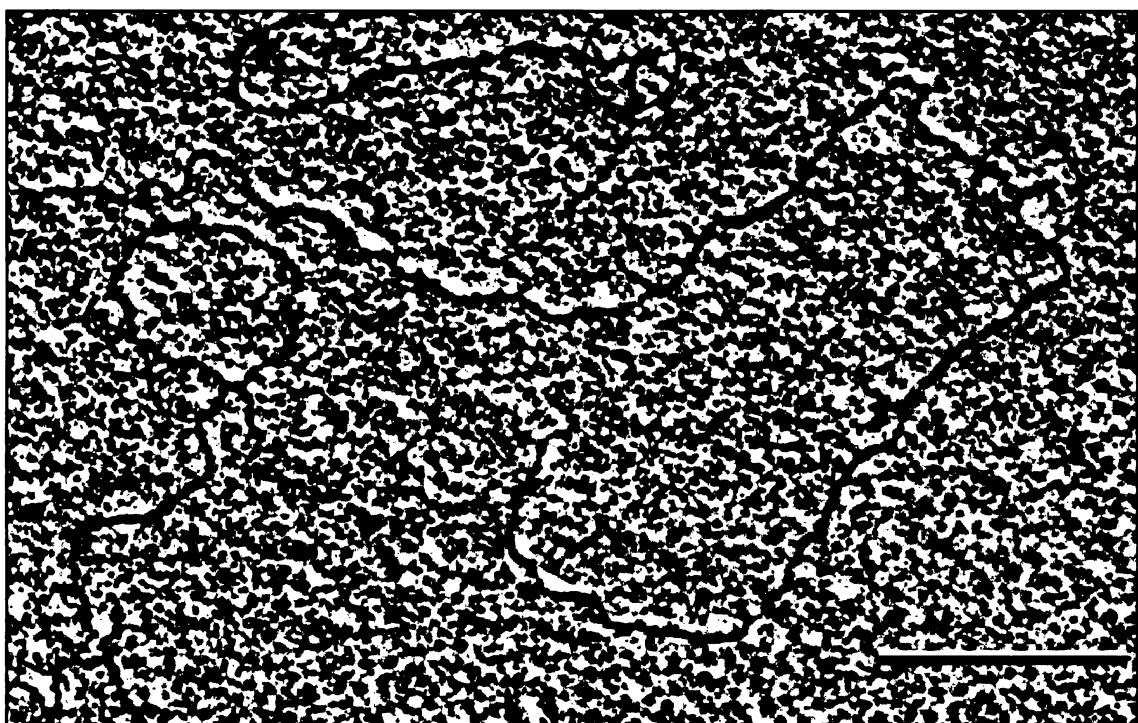
V přítomnosti obou proteinů, kdy protein VP1 byl ve 20-násobném molárním nadbytku a protein YY1 v 50-násobném molárním nadbytku oproti DNA, docházelo opět pravděpodobně k nespecifické vazbě proteinu VP1 k molekulám DNA. Proteiny a molekuly DNA spolu vytvářely obrovské agregáty, ve kterých však byly dlouhé úseky DNA bez navázaného proteinu (Obr. 5.27). Místy byly nalezeny útvary odpovídající velikostně virovým kapsidám, což naznačuje, že použité redukční prostředí nezabránil dokonale interakci jednotlivých pentamer.

5. Vazebná reakce DNA, proteinu VP1 ve formě pentamer ve 20-násobném molárním nadbytku a proteinu YY1 ve 100-násobném molárním nadbytku oproti DNA:

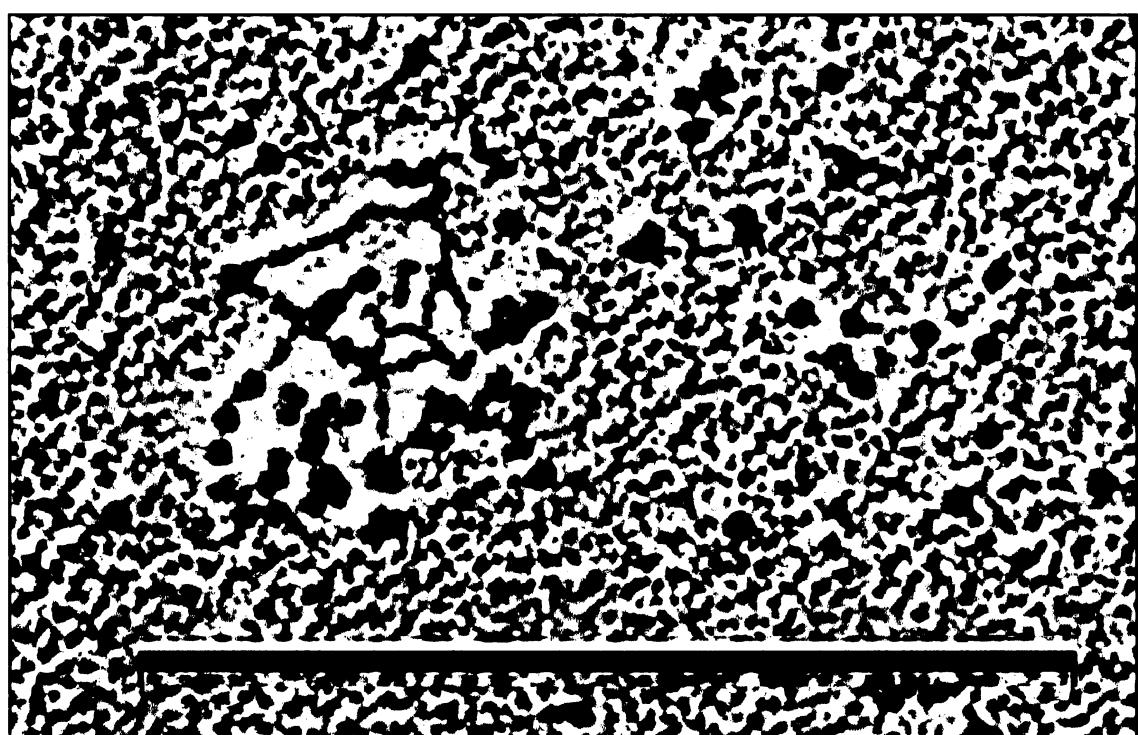
Dvojnásobné zvýšení koncentrace proteinu YY1 oproti předchozí reakci mělo vliv na velikost vznikajících aggregátů, jejichž velikost byla překvapivě mnohem menší. Protein VP1 byl opět vázán na různých místech molekul DNA, kde tvořil agregované struktury. Na některých molekulách DNA byla pozorována smyčka utvořená kolem větší elektrodenzní struktury (Obr. 5.28). I zde byla přítomna DNA, jejíž některé části neinteragovaly s proteinem.



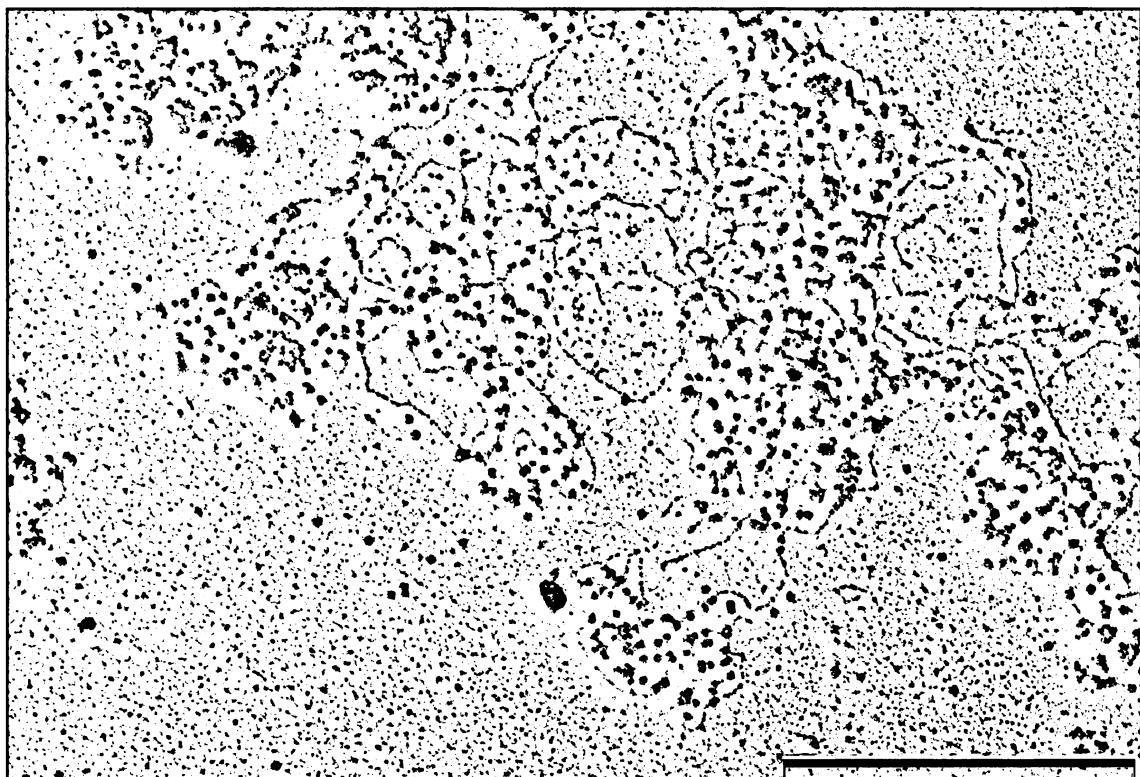
Obr. 5.24 Analýza nukleových kyselin v reakci č. 1. DNA byla vizualizována BAC technikou. Snímek ukazuje relaxované molekuly DNA dvou délek (linearizovaný plazmid pMJ - 2,3 kbp a polyomavirový genom - 5,3 kbp). Úsečka: 200 nm.



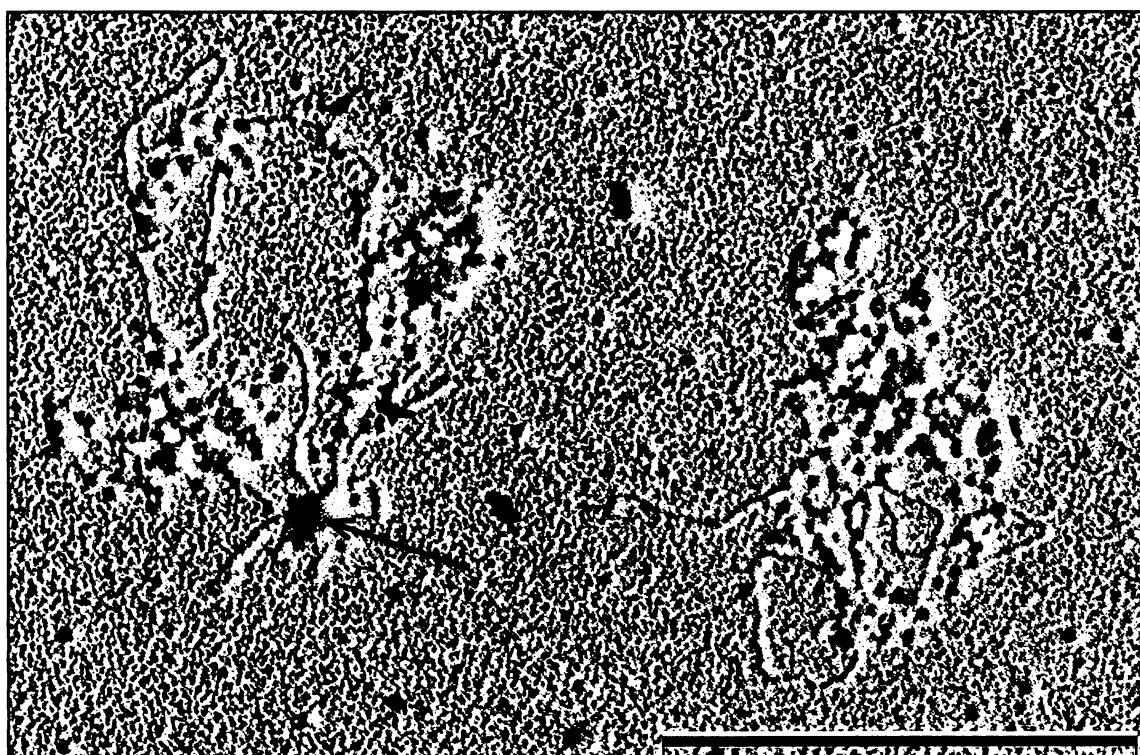
Obr. 5.25 Analýza nukleových kyselin v reakci č. 2. Reakce byla vizualizována BAC technikou, protein YY1 je 7x molárním nadbytku oproti DNA. Na snímku je patrná tvorba vlásenkových (hairpin) struktur na molekulách DNA obou dělek. Úsečka: 200 nm.



Obr. 5.26 Analýza nukleových kyselin v reakci č. 3. Reakce byla vizualizována BAC technikou, pentamery VP1 jsou ve 20x molárním nadbytku oproti DNA. Na snímku je patrná nespecifická vazba pentameru k molekule DNA. Některá místa molekuly DNA zůstávají holá. Úsečka: 200 nm.



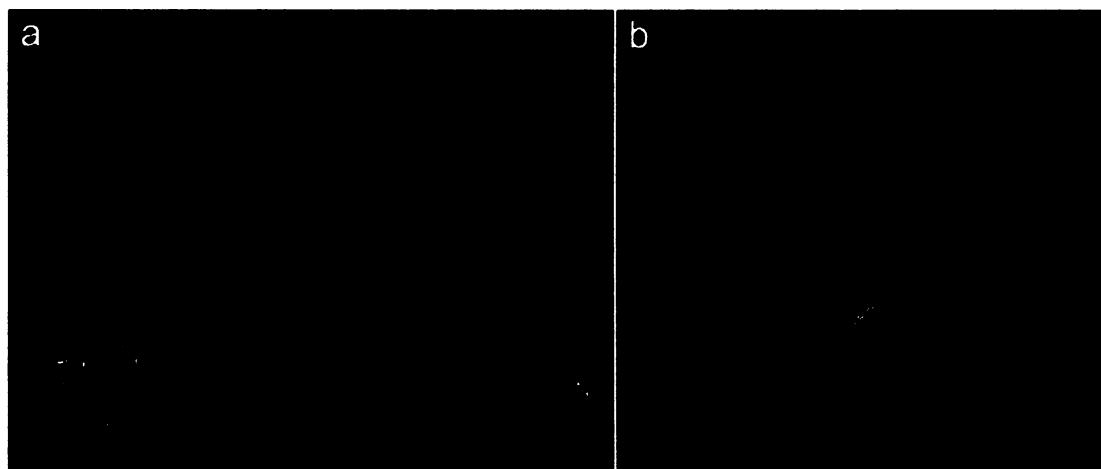
Obr. 5.27 Analýza nukleových kyselin v reakci č. 4. Reakce byla vizualizována BAC technikou, pentamery VP1 jsou ve 20x a protein YY1 v 50x molárním nadbytku oproti DNA. Na snímku je patrná tvorba ohromných agregátů molekul DNA spolu s proteinem VP1. Úsečka: 200 nm.



Obr. 5.28 Analýza nukleových kyselin v reakci č. 5. Reakce byla vizualizována BAC technikou, pentamery VP1 ve 20x a protein YY1 v 100x molárním nadbytku oproti DNA. Na snímku jsou patrné agregáty molekul DNA s proteinem VP1 o menší velikosti. Jeden z agregátů tvoří smyčku kolem elektrodezní struktury (šipka). Úsečka: 200 nm.

#### 5. 4. 2. Konstrukce plazmidu pET29–deltaC31VP1

Vzhledem k tomu, že se rozvolnění VP1 kapsid pomocí redukčního prostředí ukázalo jako nevhodné pro vazebné reakce proteinů VP1 a YY1 s virovou DNA, byla hlavním cílem této části práce konstrukce plazmidu, který by obsahoval sekvenci mutantního proteinu VP1 postrádajícího posledních 31 aminokyselin ze svého C-konce (deltaC31VP1) (Obr. 5.29 a). Po expresi tohoto proteinu v bakteriích a jeho následné izolaci by bylo možno získat pentamery neschopné utvořit prázdné kapsidy, vzhledem k tomu, že v kapsidách spolu pentamery interagují prostřednictvím flexibilních C-konců proteinů VP1 (Obr. 5.29 b). Mutantní pentamery by mohly být následně využity pro *in vitro* interakce aniž by bylo třeba použít redukční podmínky, nutné pro disociaci prázdných kapsid (viz kap. 5.5.1.).



Obr. 5.29 Terciální struktura proteinu VP1 a pentamery VP1. Barevně je odlišeno posledních 35 aminokyselin na C-konci proteinu VP1. Převzato z [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov), model vytvořen podle STEHLE a HARRISON 1996.

Plazmid pET29–deltaC31VP1 jsme získali vložením příslušného fragmentu do plazmidu pET29b před kotvu his-tag umístěnou v plazmidu, za kterou se nachází stop kodon (Obr. 5.30). Syntetizovaný protein obsahující his-tag kotvu, je možné následně izolovat metodou afinitní chromatografie. Gen deltaC31VP1 jsme amplifikovali metodou PCR (kap. 4.6.6) a jako templát jsme použili plazmid pMJG nesoucí genom PyV.

Primery použité pro amplifikaci genu deltaC31VP1 (restrikční místa v primerech jsou označena tučným písmem):

1) Primer: VP1 NdeI (Tm = 59)

TCAGACTA **CATATG** ATG GCC AAA AGA AAA AG

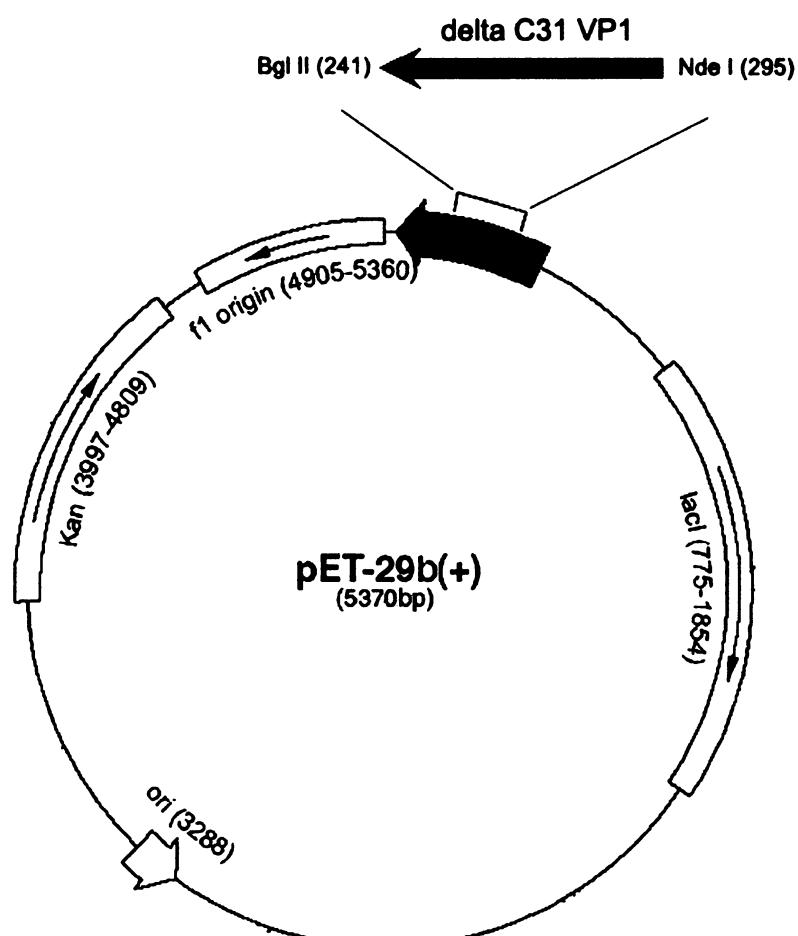
Kurzívou je označen start kodon genu deltaC31VP1

2) Primer: VP1deltaC31 BglII (Tm = 60)

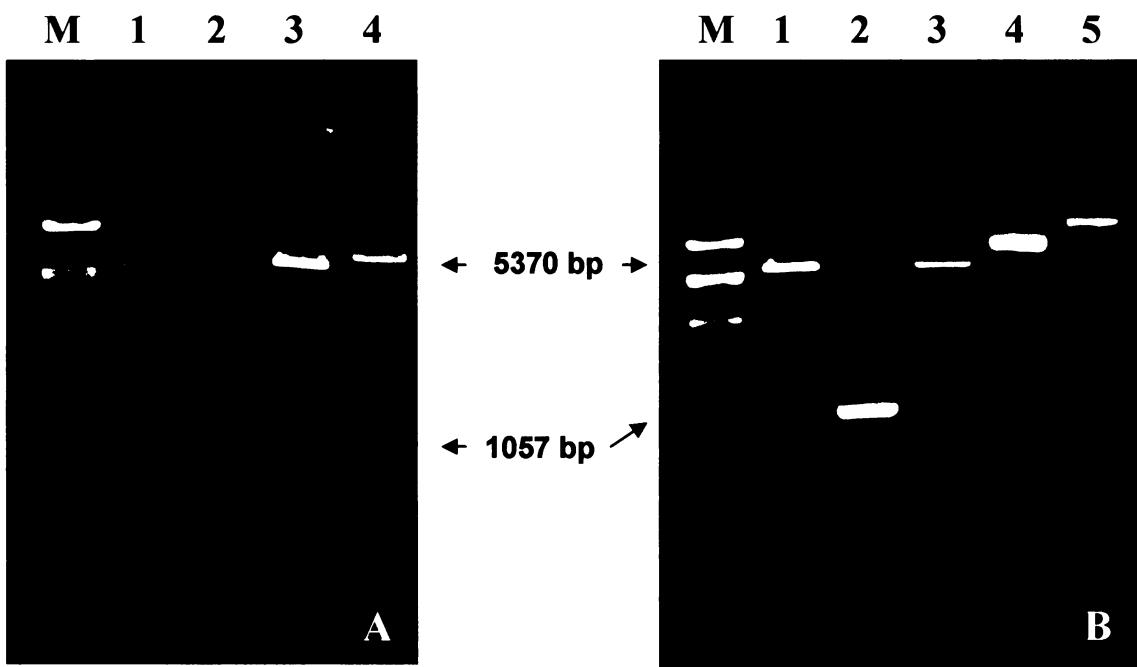
CAGAC **AG** ATC TCC TCT AAC CTC CTC TAC CTG GGT GTT C

Stop kodon se nachází na plazmidu za his-tag kotvou.

Fragment genu deltaC31VP1 amplifikovaný metodou PCR jsme štěpili restrikčními enzymy BglII a NdeI a ligovali s defosforylovaným plazmidem pET29b, štěpeným stejnými enzymy. Přečištěnou ligační směs jsme metodou elektroporace přenesli do kompetentních buněk DH5 $\alpha$  a metodou minipreparace DNA jsme nalezli pozitivní kolonie č. 7 a č. 8, obsahující plazmid deltaC31VP1. Plazmid jsme z monokolonií izolovali a restrikčním štěpením jsme ověřili přítomnost vloženého genu deltaC31VP1 (Obr. 5.31). Veškeré metody pro práci s DNA popsány v kap. 4.6.



Obr. 5.30 Schéma konstrukce plazmidu pET29b-deltaC31VP1. Detailní mapu plazmidu pET29b lze najít na <http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/docs/PROT/TB076.pdf>.



Obr. 5.31 Restrikční ověření plazmidů izolovaných z monokolonií 7 a 8 v 1% agarózovém gelu. A) Kolonie č. 7: M – marker; 1 – linearizovaný pET29b; 2 – PCR fragment deltaC31VP1 (1057bp); 3 – pozitivní kolonie č. 7 štěpeno BglII a NdeI; 4 – linearizovaný plazmid pET29b-deltaC31VP1 štěpený BglII a NdeI. B) Kolonie č. 8: M – marker; 1 – pozitivní kolonie č. 8 štěpená BglII a NdeI; 2 – PCR fragment deltaC31VP1; 3 – linearizovaný pET29b; 4 – linearizovaný pET29b-deltaC31VP1; 5 – cirkulární pET29b. Jako marker byla použita DNA bakteriofága  $\lambda$  štěpená restriktázou PstI.

Dále bude nutno ověřit produkci proteinu deltaC31VP1 v bakteriích *E.coli* BL21 obsahujících plazmid pET29b-deltaC31VP1. Pokud bude docházet k produkci proteinu, bude protein z lyzovaných bakterií izolován metodou afinitní chromatografie. Po ověření elektronovou mikroskopii bude použit v *in vitro* interakcích, které nebudou prováděny v redukčních podmínkách (viz kap. 5.5.1.).

## **5. 5. Ultrastrukturní analýza působení syntetického peptidu C35 na buňky**

Podle našeho předpokladu shodná C-koncová část minoritních strukturních proteinů VP2 a VP3, obsahující vysoce hydrofóbní oblast, má vlastnosti protein transdukční domény (PTD) a mohla by se tudíž podílet při přichycení a vstupu myšího polyomaviru do buněk nebo na druhé straně při uvolnění viru z nějakého buněčného kompartmentu. Na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR byl chemickou syntézou připraven peptid, který tvoří posledních 35 aminokyselin z C-konce minoritních proteinů VP2 a VP3. Peptid byl dobře rozpustný a obsahoval sekvenci tvořící  $\alpha$  helix i sled bazických aminokyselin (vyskytujících se na C-konci minoritních proteinů a sloužících též jako jaderný lokalizační signál NLS), a vyhovuje tak svojí sekvencí consensu amfipatické PTD (kap. 2.10).

### Aminokyselinová sekvence peptidu C35:

**PDWMLPLILGLYGDITPTWATVIEEDGPQKKKRRRL**

[     $\alpha$  helix    ]

[    NLS    ]

Naším cílem bylo provést ultrastrukturní analýzy vlivu peptidu C35 na synchronizované buňky linie 3T6. V experimentu jsme nechali interagovat peptid C35 s buňkami po dobu 5, 10, 15 a 30 min (kap. 4.7.2.) a dále jsme připravili kontrolní buňky bez interakce s peptidem. Buňky jsme fixovali 3 % glutaraldehydem a zapolymerovali do epoxidové pryskyřice AGAR100 (kap. 4.9.2.1.).

Kontrolní buňky vykazovaly morfologii neovlivněných buněk 3T6. Měly protáhlý tvar, v jejich cytoplazmě se nacházely neporušené organely a jádra normálního objemu. Uvnitř jader se nacházela nezvětšená jadérka a chromatin měl difúzní charakter (Obr. 5.32).

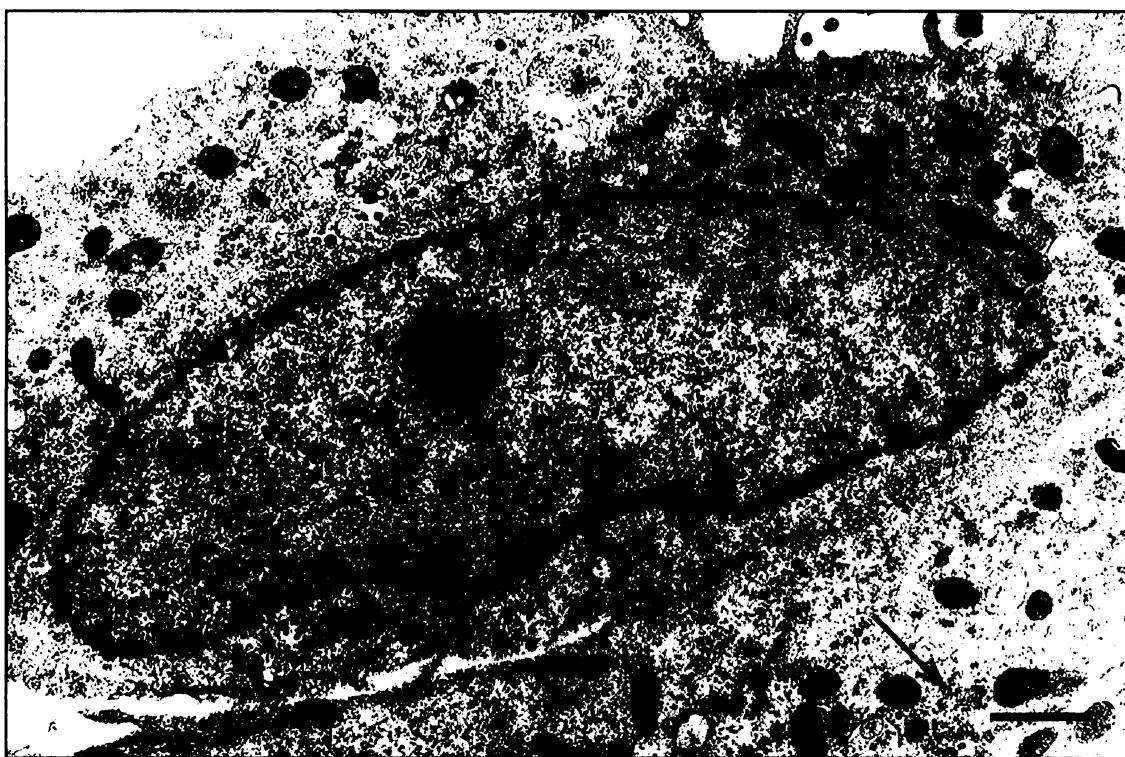
Po inkubaci s peptidem C35 po dobu 5 min, jsme pozorovali u většiny buněk značně narušenou plazmatickou membránu (Obr. 5.33). Přibližně u 50 % buněk docházelo na plazmatické membráně k tvorbě velkého množství neobalených váčků o homogenní velikosti, která činila v průměru 60 nm (Obr. 5.34). Shluky těchto váčků byly pozorovány těsně pod cytoplazmatickou membránou (Obr. 5.34). Kromě toho docházelo i k indukci tvorby klatrinových váčků (Obr. 5.35). Na rozdíl od kontrolních buněk, působením peptidu C35 byl objem jader buněk zvětšen. Mírně byla zvětšená i

jadérka (Obr. 5.36). Morfologické znaky apoptózy byly u některých buněk pozorovány již v tomto čase po interakci (Obr. 5.37).

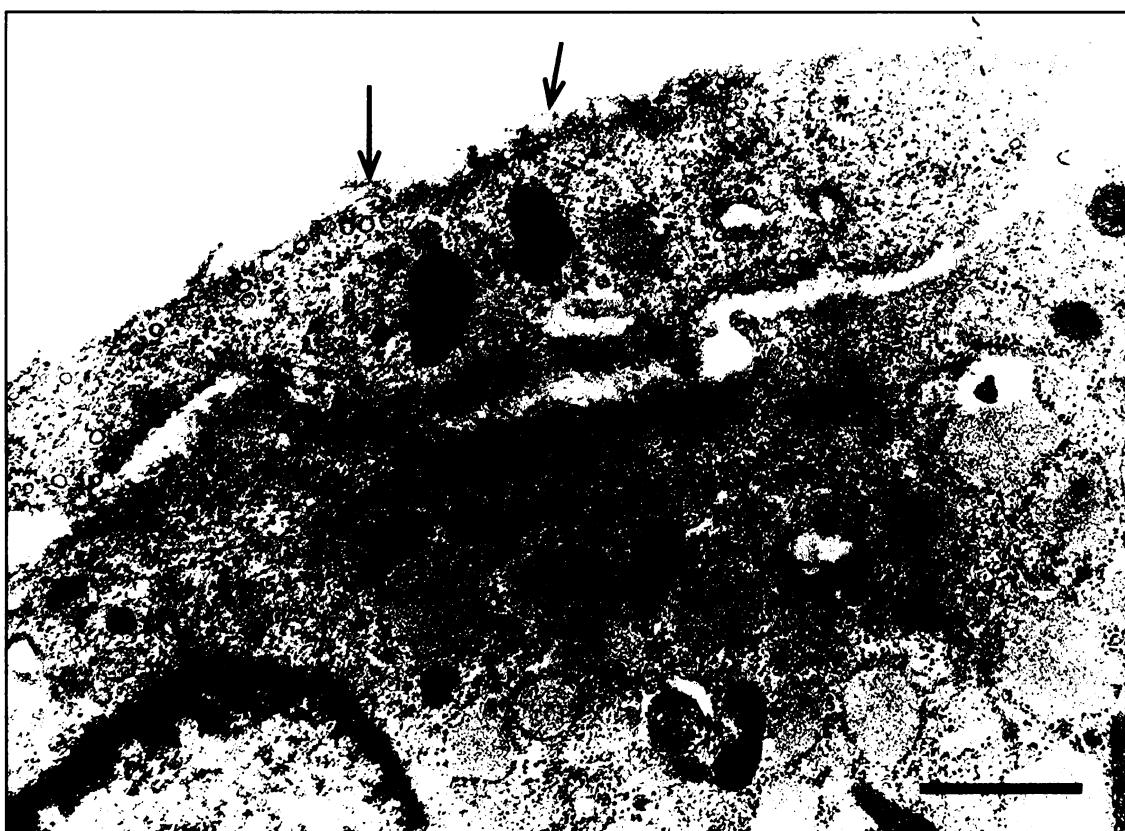
Desetiminutová inkubace s peptidem indukovala posun váčků hlouběji do cytoplazmy a v některých buňkách jsme v těsné blízkosti váčků pozorovali síť cytoskeletárních struktur, pravděpodobně mikrotubulů (Obr. 5.38). Ve většině buněk byly pozorovány také velké svazky aktinových vláken (stress fibers) v oblastech pod cytoplazmatickou membránou. Tyto aktinové svazky jsme pozorovali i v buňkách po 15-ti minutové inkubaci s peptidem (Obr. 5.41).

Také po 15 min byly nalezeny váčky hlouběji v cytoplazmě a v řadě buněk byly váčky pozorovány až pod svazky aktinových vláken. Pouze v málo buňkách jsme váčky pozorovali těsně pod plazmatickou membránou, ale začali jsme pozorovat váčky, které byly agregované kolem membránových či cytoskeletárních struktur (Obr. 5.39). Velké procento buněk v tomto čase vykazovalo zvětšené endoplazmatické retikulum a zvětšená jádra. Rovněž jadérka byla zvětšená, s morfologií typickou pro neoplastické buňky (Obr. 5.40). U mnoha buněk jsme pozorovali známky apoptózy.

Buňky po 30 min inkubace překvapivě většinou vypadaly jakoby docházelo k jejich regeneraci. Velikost jader u mnoha z nich již odpovídala kontrolním buňkám a také jadérka vykazovala normální velikost (Obr. 5.42). I když některé buňky stále jevily známky apoptózy, jejich počet se po 30 min interakce s peptidem nezvětšil. V cytoplazmě mnoha buněk jsme pozorovali velké množství neobalených váčků, které se zdaly být transportovány k buněčné membráně některou z exocytických drah (Obr. 5.42). Také endoplazmatické retikulum již většinou ztratilo svůj zvětšený charakter (Obr. 5.43).



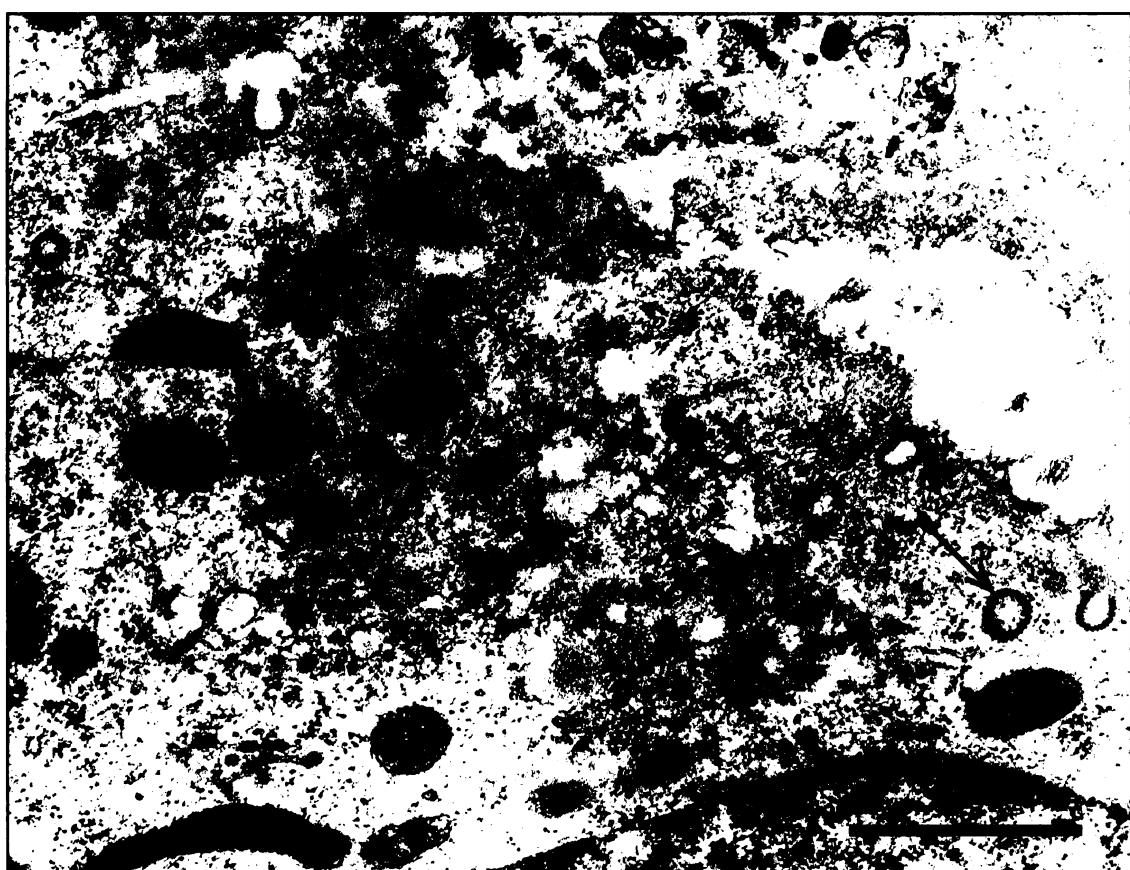
Obr. 5.32 Řez kontrolní buňkou 3T6 fixovanou 3% GA. Buňka má protažený tvar, v cytoplazmě jsou patrné dobře zachované struktury organel a malé endoplazmatické retikulum (šipka). Uvnitř normálně velkých jader jsou patrná nezvětšená jádérka a difúzní chromatin. Úsečka 1  $\mu$ m.



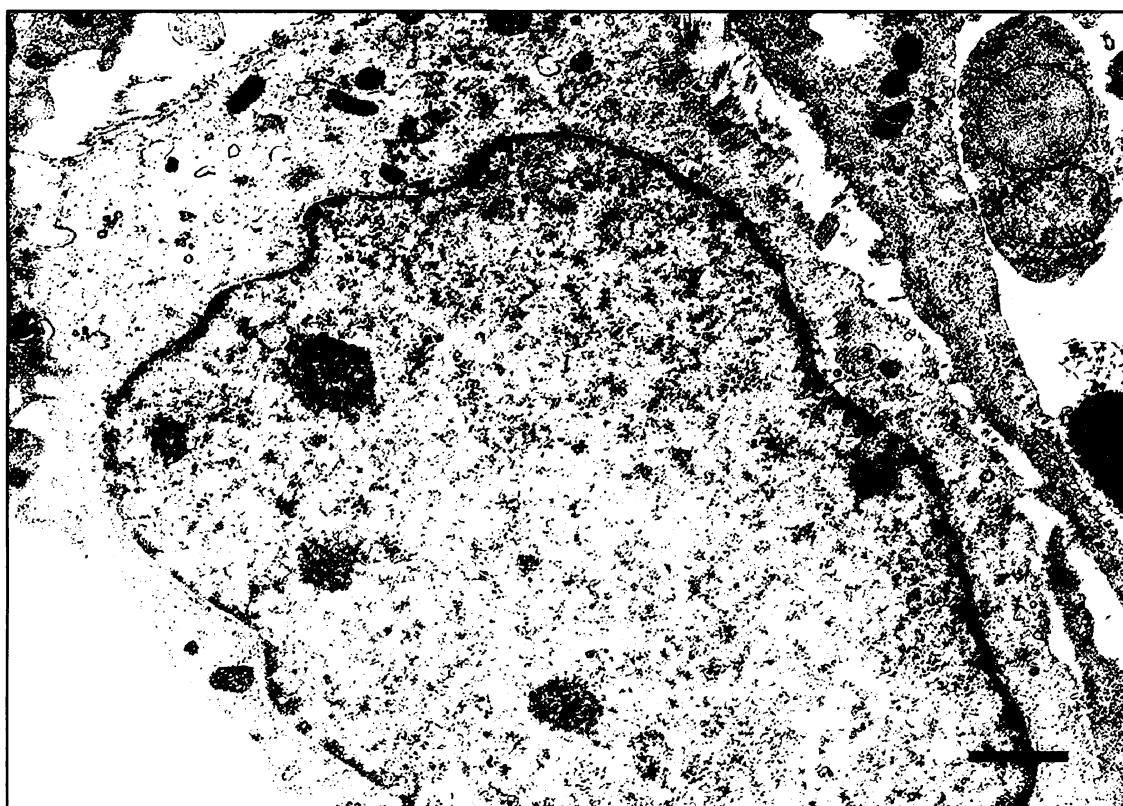
Obr. 5.33 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 5 min po interakci s peptidem C35. Pod silně narušenou plazmatickou membránou (červené šipky) je patrné velké množství neobalených váčků. V cytoplazmě je také patrné zvětšené endoplazmatické retikulum kulovitého tvaru (šipka). Úsečka: 1  $\mu$ m.



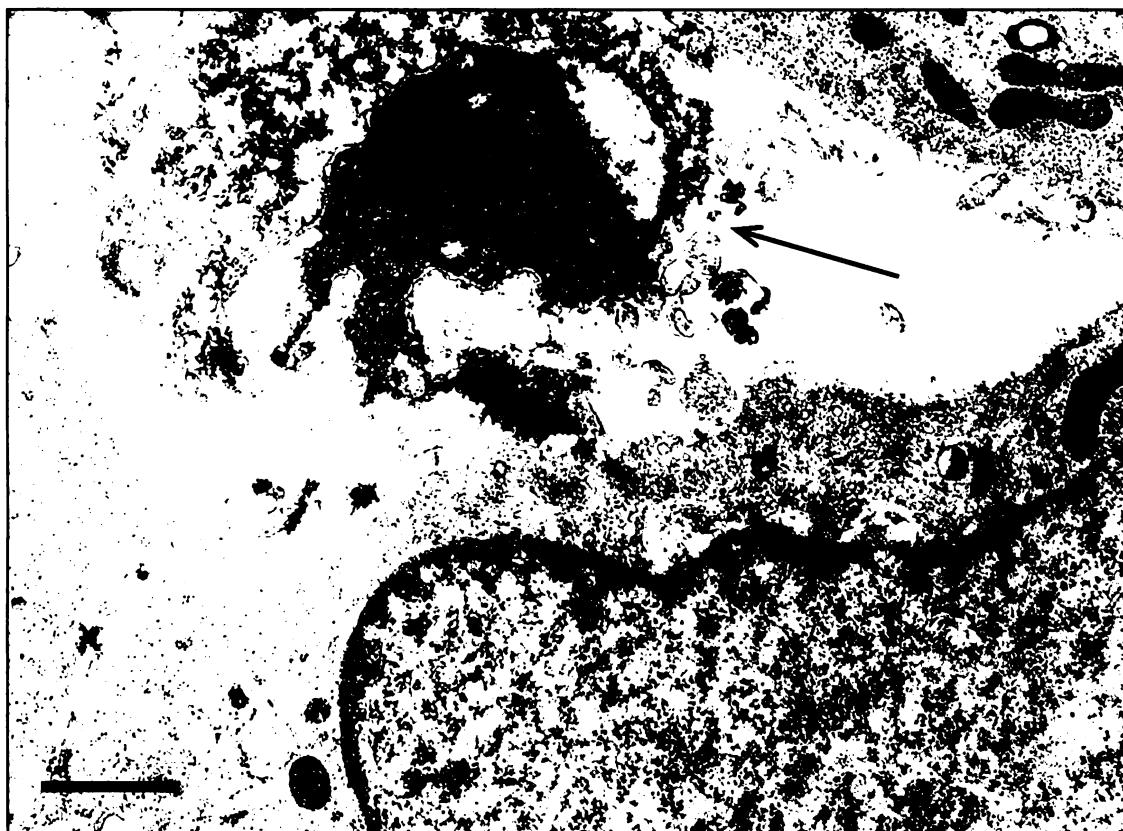
Obr. 5.34 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 5 min po interakci s peptidem C35. Detail váčků nacházejících se těsně pod narušenou plazmatickou membránou. Jejich průměrná velikost činí 60 nm. Úsečka: 1  $\mu$ m.



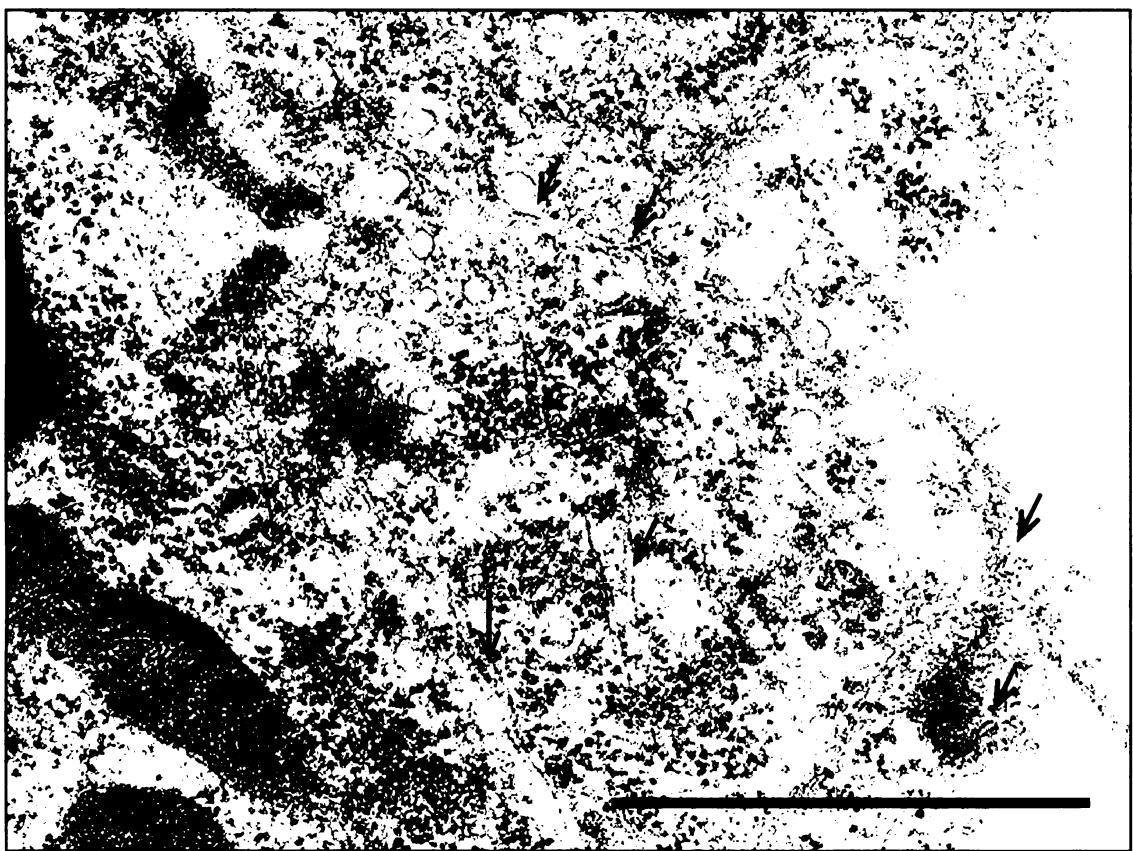
Obr. 5.35 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 5 min po interakci s peptidem C35. V některých buňkách byla patrná indukce tvorby klatrinových váčků (šipky). Úsečka 1  $\mu$ m.



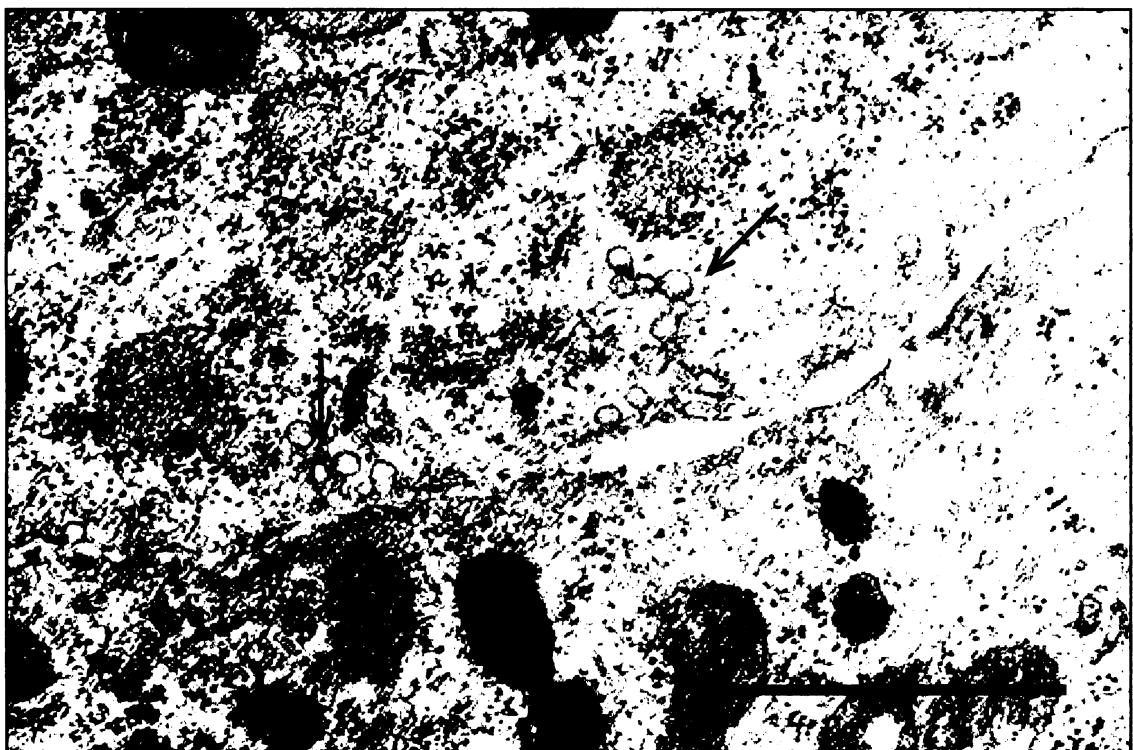
Obr. 5.36 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 5 min po interakci s peptidem C35. V buňce je patrné jádro kulovitého tvaru o zvětšeném objemu. Úsečka 1  $\mu$ m.



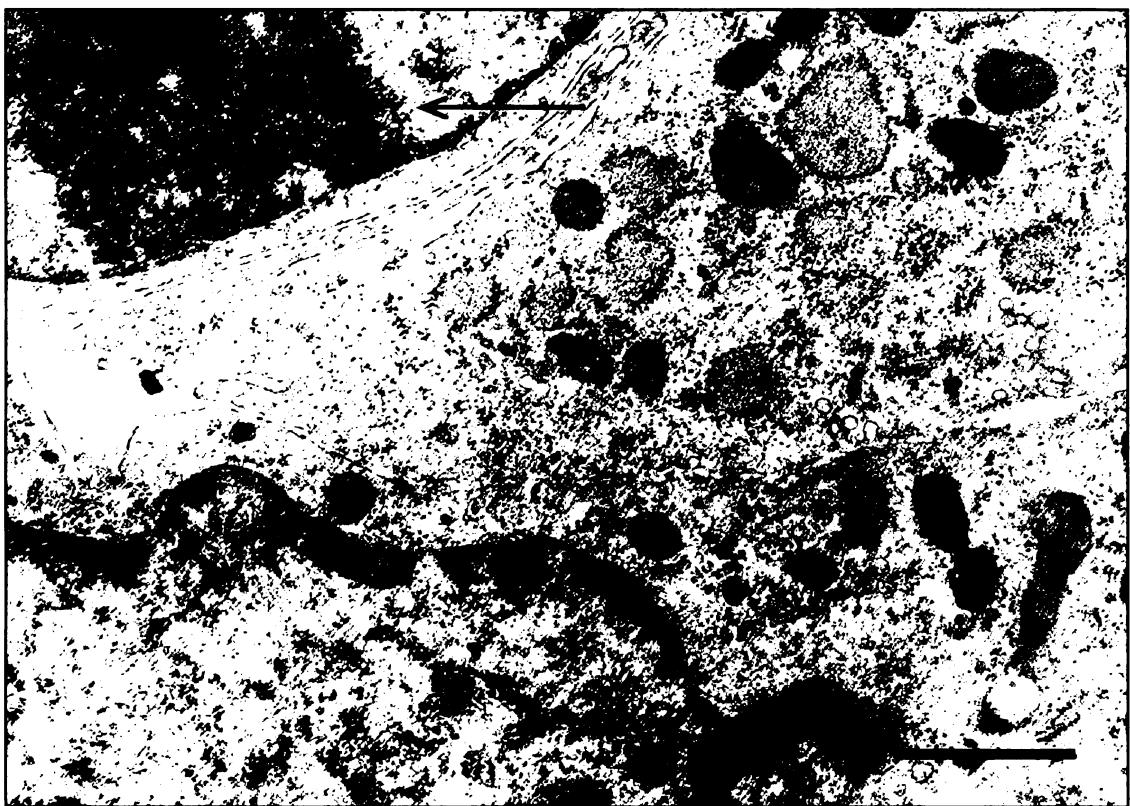
Obr. 5.37 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 5 min po interakci s peptidem C35. V některých buňkách již proběhla apoptóza (šipka). Úsečka 1  $\mu$ m.



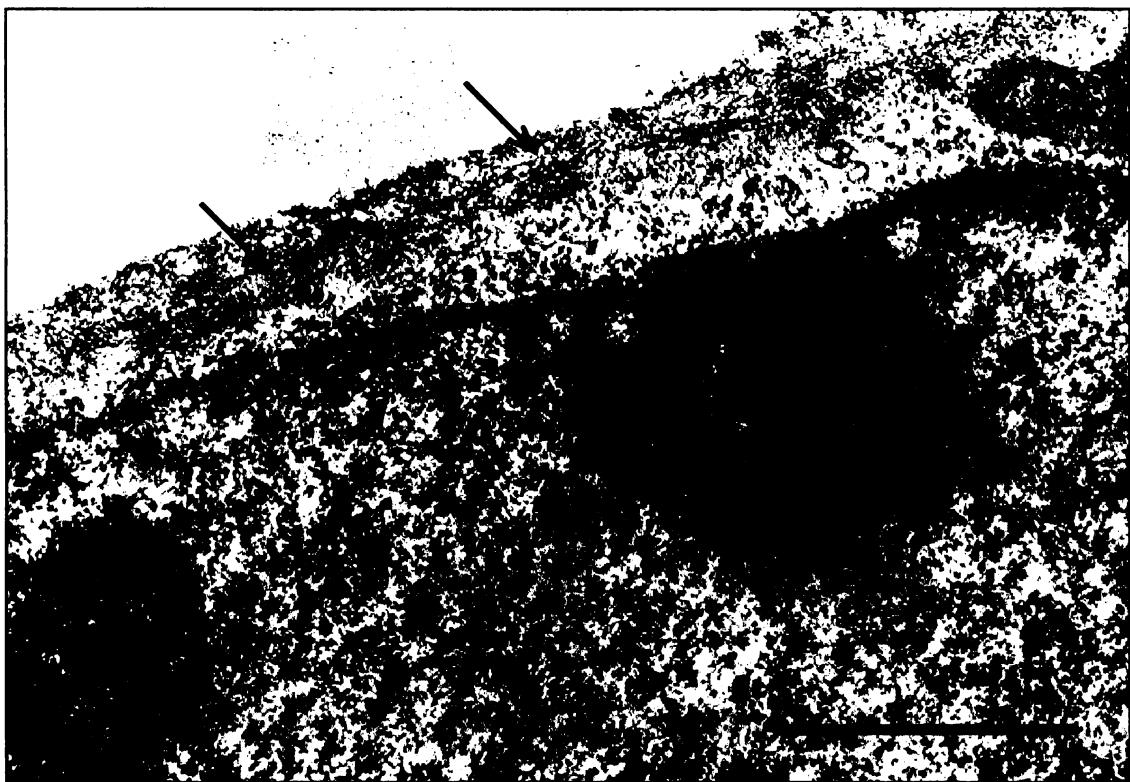
Obr. 5.38 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 10 min po interakci s peptidem C35. Hlouběji v cytoplazmě jsou patrné neobalené váčky v jejichž blízkosti se objevují pravděpodobně vlákna mikrotubulů tvořících síť (šipky). Aktinové svazky se nacházejí pod plazmatickou membránou (červené šipky). Úsečka: 1  $\mu$ m.



Obr. 5.39 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 15 min po interakci s peptidem C35. V cytoplazmě jsou patrné shluky váčků interagující s vláknitými strukturami (šipky). Úsečka 1  $\mu$ m.



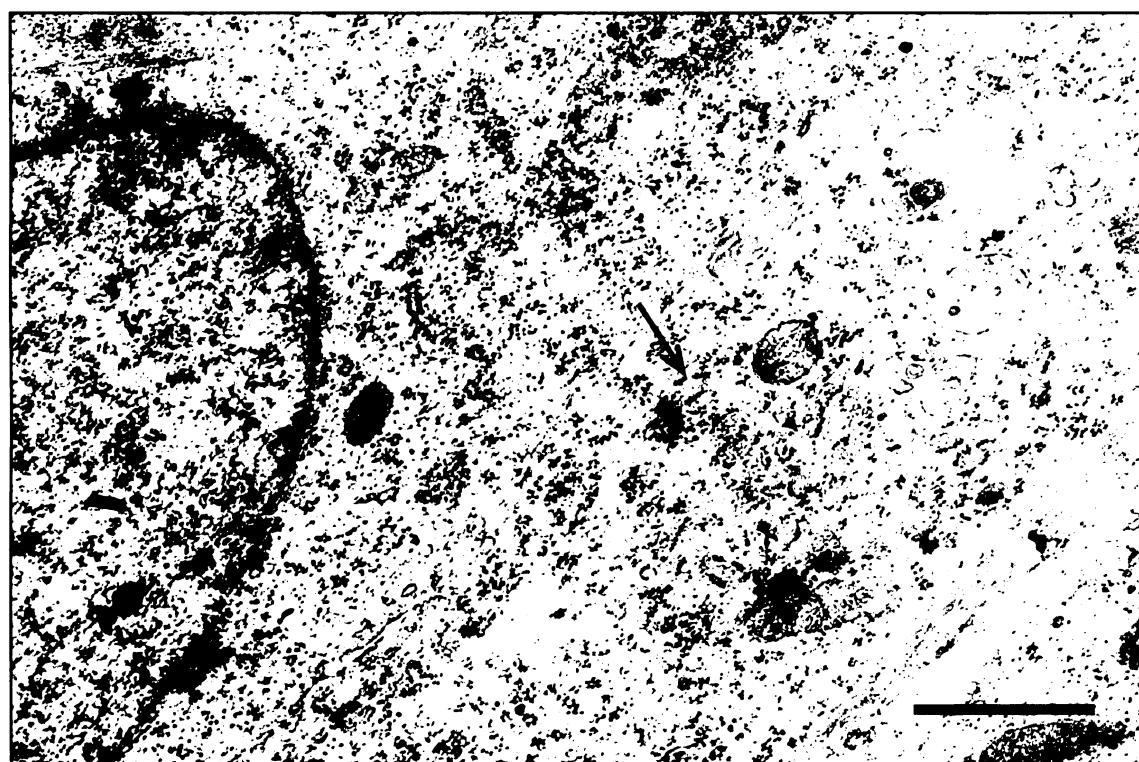
Obr. 5.40 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 15 min po interakci s peptidem C35. V cytoplazmě je patrné zvětšené endoplazmatické retikulum a v jádře zvětšená jadérka typická pro neoplastické buňky (šipka). Úsečka 1  $\mu$ m.



Obr. 5.41 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 15 min po interakci s peptidem C35. V cytoplazmě kolem jádra jsou patrné aktinové svazky mikrofilament (stress fibers) (šipky), v jádrech jsou patrná zvětšená jadérka. Plazmatická membrána je lehce narušená. Úsečka: 1  $\mu$ m.



Obr. 5.42 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 30 min po interakci s peptidem C35. V cytoplazmě je patrné jádro jehož objem i tvar odpovídá zdravým buňkám, kolem jádra je patrné již zmenšené endoplazmatické retikulum (šipka). V cytoplazmě je také patrné množství váčků, které by mohly být exocytovány (šipka). Úsečka 1 $\mu$ m.



Obr. 5.43 Řez buňkou fixovanou 3% GA v čase 30 min po interakci s peptidem C35. V cytoplazmě kolem jádra je patrné již zmenšené endoplazmatické retikulum (šipka). Úsečka 1 $\mu$ m.

## **6. DISKUZE**

## **6. 1. Dynamika infekce myšího polyomaviru**

I přes intenzivní studium myšího polyomaviru, které již přineslo mnohé poznatky o životním cyklu tohoto viru, existuje velice málo prací věnovaných vlivu infekce PyV na strukturu infikovaných buněk a morfologických změn nastávajících v důsledku probíhající infekce. Zaměřili jsme se zvláště na pozorování apoptotických a/nebo nekrotických procesů spojených s progresí polyomavirové infekce. Oba typy buněčné smrti se z morfologického hlediska projevují odlišně. V případě apoptózy dochází ke kondenzaci chromatinu a jeho migraci pod jadernou membránu. Jedním z prvních kroků apoptózy je také zvětšování mitochondrií (GULBINS *et al.* 2003). V pozdějších fázích apoptózy bývá chromatin nahloučený pod jadernou membránou v jasně ohraničených homogenně denzních shlucích a jaderná membrána se vchlipuje a předznamenává tak fragmentaci jádra. Fragmentací jádra a vznikem apoptotických tělisek je apoptóza ukončena a apoptotická tělska jsou následně fagocytována makrofágy či okolními buňkami. Ultrastrukturní znaky nekrózy jsou odlišné. Nekróza se projevuje zejména zvětšováním organel, silnou vakuolizací cytoplasmy a následnou dezintegrací buněk. I když také dochází ke shlukování chromatinu, shluky nejsou tak kompaktní jako u apoptózy a nejsou soustředěny výhradně pod jadernou membránu (KERR a HARMON 1991).

Pro elektronmikroskopickou analýzu byla použita linie myších fibroblastů NIH 3T6, permisivní pro PyV, synchronizovaných hladověním v bezsérovém médiu (24 hodin). Uvolnění z  $G_0$  fáze buněčného cyklu bylo dosaženo po adsorpci viru přidáním media se sérem. Synchronizované neinfikované buňky byly použity jako kontrola. Časy po infekci byly vybrány s ohledem na pokrytí celého intervalu lytické infekce PyV, která má dobu trvání přibližně 48 hodin (byly vybrány časy 12, 24, 36 a 48 hod p.i.). Fixativa, zalévací médium i kontrastování byly voleny tak, aby bylo dosaženo dobře zachovalé morfologie buněčných struktur. Buňky byly fixovány 3 % glutaraldehydem (silné fixativum, dobře fixuje buněčné struktury), zapolymerovány do zalévacího média AGAR100 (způsobuje minimální extrakci buněčného materiálu a dobře zachovává morfologii struktur) a řezy byly kontrastovány 10 min acetátem uranylu a 5 min Reynoldsovým roztokem (kombinace, která dostatečně silně kontrastuje buněčné struktury).

V buňkách v čase 12 hod po infekci nebyly pozorovány výrazné morfologické změny. U některých buněk byla pozorována zvětšená jadérka, a některá navíc obsahovala nukleolonemata (struktury, které se vyskytují v buňkách se silnou proliferací). Zvětšení jadérek bylo zřejmě způsobeno intenzivní transkripcí časných virových genů a časnými antigeny indukovanou proliferací buněk. Jadérka s nukleolonematy mohou být důkazem silného stimulačního efektu infekce PyV. Tento morfologický typ jadérek se v buňkách vyskytuje vlivem vysoké produkce RNA (RASKA a SMETANA 1978, WACHTLER a STAHL 1993). Pozorování nukleolonemát tedy ukazuje na zásadní vliv časných produktů PyV na tyto struktury již ve 12 hodinách po infekci. Pozorovali jsme také u řady buněk také mírné zvětšení objemu jader.

V cytoplasmě nebyly pozorovány 12 hodin po infekci výrazné změny. U některých buněk byl ve srovnání s kontrolními buňkami pozorován vysoký výskyt transportních váčků. Z našich studií pohybu virionů infikovanou buňkou ale vyplývá, že většina signálu vstupujícího viru je v perinukleárním prostoru do 3 hod po adsorpci viru. Zvýšené množství váčků by mohlo být spojeno např. s reparací cytoplazmatické membrány po intenzivní endocytóze. Také bylo pozorováno zvětšení drsného endoplazmatického retikula. Tato změna indikuje zvýšenou syntézu proteinů, zřejmě časných virových proteinů, velkého středního a malého T (tumorogenního) antigenu, ale patrně i některých buněčných proteinů. Časné proteiny totiž deregulují i transkripci buněčných genů a indukují syntézu celé řady enzymů pro replikaci DNA. Se stimulací buněk do S fáze souvisí patrně též výše uvedené zvětšení jader. Řada autorů (YEN a PARDEE 1979, FIDORRA *et al.* 1981, YANG *et al.* 1997) pozorovala signifikantní zvýšení jaderného objemu u řady různých savčích buněk během G1 fáze před vstupem do S fáze.

Zvětšená jádra infikovaných buněk oproti jádrům kontrolních, neinfikovaných buněk byla pozorována i v čase 24 hodin p.i. a v obou dalších časech. Ke změnám ve velikosti jádra by mohly přispívat též interakce strukturálního proteinu VP1 s jadernou matrix, konkrétně s laminou. Bylo popsáno, že objem jader souvisí s laminem a proteiny, které jsou s laminem asociované (YANG *et al.* 1997).

Jadérka ve 24 hodinách po infekci již neobsahovala nukleolonemata a přecházela do kompaktních typů, které byly zvláště pozorovány v čase 36 hodin po infekci. Kompaktní morfologie jadérek byla pozorována u transformovaných buněk (SUGIHARA a SUGIHARA Jr. 1976, WACHTLER a STAHL 1993). Nález

kompaktních jadérek potvrzuje tumorogenní povahu infekce myšího polyomaviru, za níž jsou zodpovědné časné produkty, zejména střední T antigen, který je hlavním virovým onkoproteinem (RASSOULZADEGAN *et al.* 1982). V infikovaných buňkách je střední T antigen lokalizován na buněčných membránách. Na cytoplazmatické membráně, v komplexu s c-SRC kinázou, proteinfosfatázou 2A a dalšími regulačními molekulami mimikuje konstitutivně aktivovaný receptor spouštějící dráhu signální transdukce.

Změny morfologie jadérek byly studovány také v práci ŠTOKROVÁ *et al.* (2002), ve které byly hmyzí buňky transfekovány rekombinantními bakuloviry nesoucími pod silným promotorem protoonkogen c-myb nebo onkogen v-myb. V hmyzích buňkách infikovaných těmito bakuloviry byly popsány 3 morfologické typy jadérek: kompaktní zvětšená jadérka, velká jadérka kruhového tvaru („ring-shape“) a jadérka s nukleolonematy. Jadérka se v závislosti na čase měnila nejprve na kompaktní zvětšená jadérka, která byla prekurzorem pro další dva morfologické typy. Je zajímavé, že při infekci polyomavirem byla jadérka s nukleolomaty a kompaktní jadérka pozorována v opačném pořadí. To může být dáno rozdílnými rysy infekcí polyomaveirem a bakuloviry i rozdílnou povahou procesů transformace.

Po 24 hodinách byly v infikovaných buňkách pozorovány také první znaky apoptózy, obří (giant) mitochondrie s porušenými kristami. I pozorované zvětšené endoplazmatické retikulum může být znakem apoptotických procesů. Zvětšování objemu mitochondrií je způsobeno zvyšením permeability mitochondriální membrány, které je následováno kolapsem transmembránového potenciálu a uvolněním pro-apoptotického cytochromu C do cytoplazmy. Vznik obřích mitochondrií může být indukován, například působením různých patogenních faktorů jako jsou volné radikály nebo změnami cytoskeletu či genové regulace (WAKABAYASHI 2002). Při aktivaci apoptózy bylo ukázáno na úzké propojení mitochondrií a endoplazmatického retikula při stresových podmínkách. Zvětšené endoplazmatické retikulum například v důsledku akumulace proteinů nesbalených nebo sbalených do nesprávné terciální struktury způsobuje aktivaci různých apoptotických druhů, prostřednictvím cytochromu C či nezávisle na cytochromu C prostřednictvím kaspázy-12, která se nachází na membráně endoplazmatického retikula (MOMOI 2004). V nedávné době byla v endoplazmatickém retikulu prokázána lokalizace pro-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2 a iniciátorových i efektorových kaspáz (YAMAMOTO *et al.* 2006).

V průběhu infekce byl také sledován charakter jaderného chromatinu. Zatímco v časných fázích infekce (12 hodin po infekci) vykazoval chromatin difúzní charakter stejně jako v kontrolních buňkách, v čase 24 hodin po infekci byl pozorován chromatin migrující do blízkosti jaderné membrány, což lze rovněž označit za počáteční fáze apoptózy. V časech 36 a 48 hodin vytvářel kondenzovaný chromatin homogenně denzní shluky pod jadernou membránou, indikující pozdní fáze apoptózy (KERR a HARMON 1991). Kondenzace chromatinu může být vysvětlena destrukcí laminů A a C (RUCHAUD *et al.* 2002). Bylo ukázáno (CHIARINI *et al.* 2002), že destrukce laminů souvisí s indukcí apoptózy, když po indukci apoptózy etoposidem docházelo k přesunu enzymu protein kinázy C $\beta$  II na vnitřní jadernou membránu a k jeho aktivaci proteolytickým štěpením. Aktivovaná protein kináza C $\beta$  II fosforylovala lamin B, který se spolu s laminy A a C stal substrátem pro štěpení kaspázami 3 a 6.

V buňkách v čase 36 hodin po infekci bylo pozorováno silně zvětšené drsné endoplazmatické retikulum, zřejmě v důsledku velké produkce strukturálních proteinů myšího polyomaviru. Takto silně zvětšená endoplazmatická retikula byla pozorována zejména v buňkách jejichž jádra byla téměř zcela vyplněna viriony virového potomstva. V buňkách jejichž jádra neobsahovala tak veliká množství virionů bylo možné sledovat akumulaci virového potomstva v blízkosti jadérek. Podle naší hypotézy by jadérka mohla nějakým způsobem napomáhat při sestavování virionů myšího polyomaviru. V jadérkách se vyskytuje řada makromolekul, u nichž nebyla prokázána funkce v procesu tvorby rRNA ribozómů. Navíc byla ukázána role jadérek jako jakýchsi dočasných úložišť při jaderném transportu regulačních molekul (OLSON *et al.* 2000, SHAW a DOONAN 2005).

V čase 36 hodin po infekci bylo možno také pozorovat změnu tvaru buněk. Infikované buňky ztrácely protáhlý tvar a byly zakulacené. Tento jev souvisí zřejmě s transformačními účinky časných virových antigenů, jejichž součástí je redukce aktinových svazků a další změny v intermediálních filamentech a tubulinovém cytoskeletu (da COSTA *et al.* 2000).

V čase 48 hodin byla jádra většiny buněk plná virionů a byl pozorován transport virionů z jádra do cytoplazmy. Jaderná membrána řady buněk byla na některých místech narušena. Cytoplazma byla v této pozdní fázi infekce silně vakualizovaná, ale jaderné membrány i přes patrné narušení stále vykazovaly vysoký stupeň integrity.

Viriony se zřejmě dostávaly do cytoplazmy v místech narušení jaderné membrány, často na vesiklech oddělených patrně z jaderné membrány. V diplomové práci P. Plevky (PLEVKA 2002) byla popsána jádra se silně narušenou membránou, ze kterých vystupovala laminová vlákna do cytoplazmy, která kolokalizovala s proteinem VP1. Je tedy možné, že transportu virionů do cytoplazmy napomáhá interakce proteinu VP1 s laminovými strukturami. Zablokování depolymerizace vlákem byla vysvětlena vazbou proteinu VP1 na tato vlákna (PLEVKA 2002). Interakce laminu s VP1 byla prokázána i *in vitro* metodou „Far Western“ (PALKOVÁ, nepublikované výsledky).

Viriony, které se uvolnily do cytoplazmy, měly afinitu k membránovým strukturám, která může být vysvětlena vazbou proteinu VP1 na membránové glykolipidy či glykoproteiny. Zajímavé bylo pozorování asociace virionů k membránám mitochondrií. V místech kde byla pozorována pouze jedna vrstva mitochondriální membrány, se vázalo velké množství virionu, zatímco na dvojitou membránu se viriony nevázaly. To by mohlo ukazovat na doposud neznámou interakci proteinu VP1 s nějakým proteinem vnitřní membrány mitochondrií.

Ve studii AN *et al.* (2000) pozorovali linii buněk 3T6 infikovaných myším polyomavirem a ukázali, že většina buněk podléhá nekróze a pouze 5 – 10 % percent buněk vykazuje znaky apoptózy. Tato zjištění jsou v souladu s naším pozorováním, kdy v čase 48 hodin po infekci byla pozorována apoptóza jen u části buněk, zatím co většina buněk měla rysy nekrózy. Přítomnost obou typů buněčné smrti by se dala vysvětlit následovně: Při destrukci buněk navozené myším polyomavirem zřejmě hrají značnou roli strukturní proteiny. Při individuální transientní expresi jednotlivých strukturních proteinů v savčích buňkách byly pozorovány výrazné cytotoxické efekty (KEČKÉŠOVÁ 2003, BOUŘA 2004). Studie strukturních proteinů příbuzného viru SV40 (GORDON-SHAAG *et al.* 2003), ukázala vazbu strukturních proteinů VP1 a VP3 k jadernému enzymu poly(ADP-ribóza) polymeráze (PARP), který se účastní procesů, jako je oprava poškozené DNA, rekombinace či apoptóza. Masivní produkce tohoto enzymu, stimulovaná proteiny VP1 a VP3, vede k nekrotické smrti buňky, při níž dochází k narušení integrity membrán a to umožňuje virovému potomstvu buňku snadno opustit.

Naopak apoptóza by mohla být indukována zejména v silně transformovaných buňkách ještě dříve, než by se mohl projevit toxický vliv strukturních proteinů produkovaných ve velkém množství až v průběhu pozdní fáze infekce, což je v souladu

s naším pozorováním počátečních projevů apoptózy již v čase 24 hodin po infekci a pozorováním kompaktních jadérek. Tuto hypotézu podporuje studie indukce apoptózy při transformaci virem SV40, která ukazuje na schopnost velkého T antigenu indukovat apoptózu pomocí dvou segmentů na opačných koncích LT molekuly (COLE a TEVETHIA 2002) Vzhledem k sekvenční příbuznosti genomů obou virů by se obdobné vlastnosti dali očekávat i u T antigenů myšího polyomaviru. Apoptóza mohla být indukována i jako obrana buňky proti patogenu (O'BRIEN 1998).

## 6. 2. Interakce PyV s buněčnými proteiny

Během infekčního cyklu interaguje myší polyomavirus s celou řadou buněčných proteinů a struktur. Některé takové interakce, zejména v časných fázích polyomavirové infekce již byly v naší laboratoři studovány (LIEBL 2000, VELKOVÁ 2003). Pro další studium interakcí a studium reorganizace jádra během pozdních fází infekce, bylo nutné vyzkoušet metodu imunoelektronové mikroskopie s vybranými virovými a buněčnými antigeny a protilátkami. Vyzkoušeli jsme také dva postupy ke zvýšení efektivity imunoznačení odkrýváním antigenů na ultratenkých řezech.

Metody imunoelektronové mikroskopie umožňují označit antigeny na povrchu ultratenkých řezů pomocí primárních a sekundárních protilátek, které jsou konjugované s elektrodenzními částicemi koloidního zlata o velikosti několika nanometrů. Problém může nastat u některých komerčně dostupných primárních protilátek, které se sice s úspěchem používají pro imunoflorescencní značení, ale nemusejí být použitelné elektronovou mikroskopí. S problémem interakce protilátky a antigenu na ultratenkých řezech jme se setkali v naší laboratoři už dříve (LIEBL 2000). Pokusili jsme se jej vyřešit přípravou nové polyklonální protilátky proti kapsidovému proteinu VP1. Nová protilátka byla úspěšná jak při metodě přímé imunoelektronové mikroskopie, tak i při značení na ultratenkých řezech (VELKOVÁ 2003).

Pro sledování případných interakcí virových struktur s buněčnými proteiny v pozdních fázích infekce byla v této práci použita metoda tzv. „post-embeddingu“. Při této metodě dochází ke značení antigenů na ultratenkých řezech zapolymerovaných vzorků. Metoda vyžaduje šetrnou fixaci buněk a vhodné zalévací médium. D. Liebl (2000) ukázal, že použití glutaraldehydu i v malých koncentracích (již při koncentraci 0,1 %) má negativní vliv na zachování specifických epitopů na povrchu řezů pro interakci s protilátkami. Proto jsme vzorky fixovali 3% paraformaldehydem u něhož nebyl negativní vliv na antigenicitu prokázán a glutaraldehydem v koncentraci 0,05 %,

která ještě antigeny neničila. Jako vhodné zalévací médium byla použita pryskyřice LR-White, která zachovávala do jisté míry i morfologickou strukturu.

Tento metodou jsme testovali v časech 24, 36 a 48 hodin po infekci vybrané proteiny buněčného jádra: histon H1, lamin, nukleoporin a protein YY1. Kromě proteinu YY1 bylo u všech testovaných buněčných antigenů provedeno dvojí značení - též kapsidového proteinu VP1. Před imunoznačením laminu byly na řezech vyzkoušeny metody pro odkrývání antigenů. Pro značení jaderných markerů byly použity komerční protilátky, které sice fungovaly při imunofluorescenci, ale nebyly ověřené elektronovou mikroskopii.

Histon H1 je sice součástí replikačních komplexů myšího polyomaviru, ale nenachází se ve zralých virionech (McMILLEN a CONSIGLI 1974, YUEN a CONSLIGLI 1985). Imunoznačení protilátkou proti H1 a proti VP1 bylo provedeno v buňkách v čase 36 hodin po infekci. Značení obou proteinů bylo poměrně silné a histon H1 byl lokalizován především v místech, která nebyla vyplněna viriony. Výrazně byl označen jaderný chromatin. Pozorování odpovídá známým skutečnostem, že histon H1 je během morfogeneze vytěšňován z virového minichromosomu a nenachází se v maturovaných virionech.

Při dvojím značení nukleoporinu a proteinu VP1 v čase 36 hodin po infekci, odpovídala lokalizace obou proteinů očekáváním. Nukleoporin je součástí komplexů jaderných pórů a značka byla pozorována na specifických místech jaderné membrány a nekolokalizovala se značením proteinu VP1, které se vyskytovalo převážně na virionech. Protein YY1 byl detekován v jádřech buněk fixovaných v časech 24, 36 a 48 po infekci. Značení proteinu v čase 24 hodin, odpovídalo normálnímu rozmístění YY1 (body po celém jádře podobně jako v neinfikovaných buňkách). Lokalizace YY1 odpovídala imunofluorescenčnímu obrazu YY1 získanému P. Plevkou (PLEVKA, 2002). V čase 36 hodin, kdy se již v jádřech vyskytovalo virové potomstvo, byl YY1 detekován v těsné blízkosti oblastí s virovým potomstvem. Značka se také objevovala na fibrilárních komponentech jadérek, rovněž v blízkosti virového potomstva. Tato lokalizace je v souladu s možnou hypotézou, že by se YY1 mohl účastnit morfogeneze virionů, která je v současné době ověřována v naší laboratoři. V čase 48 hodin po infekci byla již struktura buněk poměrně špatně zachovalá, což může být dáno slabší fixací, zalévacím médiem a použitým slabším kontrastováním uranyl acetátem, ale hlavně také patrně pokročilým časem infekce, kdy již buňky podléhají značné destrukci. V těchto buňkách

byla značka proteinu YY1 lokalizována na zbytcích chromatinu na různých místech jádra.

Metodami klasické imunoelektronové mikroskopie se nám nikdy nepodařilo označit lamin. Proto byla před imunoznačením použita metoda odkrývání antigenů. Lamin byl značen na řezech buněk v čase 48 hodin po infekci, kde mohl být detekován i v cytoplasmě při uvolňování virionů z jader infikovaných buněk tak jak jsme pozorovali metodami konfokální mikroskopie (PLEVKA 2002). Pro odkrytí antigenů byly provedeny oba přístupy. Jeden s pomocí 8 % metaperiodátu sodného ( $\text{NaIO}_4$ ) na řezech buněk zapolymerovaných do pryskyřice AGAR100. Bylo totiž ukázáno, že inkubace v  $\text{NaIO}_4$  je schopná odkrýt antigeny i po fixaci vzorků osmiem a zapolymerování do epoxidové pryskyřice (STIRLING a GRAFF 1995). Druhý přístup představoval inkubaci řezů buněk zapolymerovaných do pryskyřice LR-White v citrátovém pufru, pH 6 při zvýšené teplotě (STIRLING a GRAFF 1995). Ani jeden přístup však k označení laminu nevedl, pouze bylo pozorováno zesílené značení proteinu VP1 na virionech po předchozí inkubaci v citrátovém pufru.

V budoucnu by mohla být v naší laboratoři vyzkoušena metoda „quick-freeze freeze-substitution“, která spočívá v rychlé fixaci buněk zmražením buněk v tekutém héliu a následné mrazové substituci. Tato metoda byla v nedávné době úspěšně použita právě pro značení laminu v myších buňkách (SENDA et al. 2005), ale naše laboratoř zatím nedisponuje potřebným vybavením nutným k provedení metody.

### **6. 3. Interakce genomu myšího polyomaviru s proteinem VP1 za přítomnosti transkripčního faktoru YY1 prováděné *in vitro***

Mechanismus procesu sestavování virionů a enkapsidace genomu myšího polyomaviru, který se odehrává v jádrech v pozdních fázích infekce není znám. Protože se dosud nepodařilo sestavit viriony z virového minichromosomu a virových strukturních proteinů *in vitro*, předpokládá se, že v tomto procesu hrají roli struktury a proteiny jádra hostitelské buňky. Ze studia morfogeneze SV40 provedeného A.Oppenheim (2002) vyplývá, že v regulační oblasti genomu SV40 se nachází iniciační sekvence zvaná *ses*, nutná pro zahájení morfogeneze. Do *ses* sekvence se váže transkripční faktor Sp1. Tento faktor také fyzicky interaguje se strukturními proteiny SV40. Autorka vyslovila hypotézu, že Sp1 zprostředkovává vazbu pentamerů VP1 (i s proteiny VP2/3) a genomu SV40 a zahajuje tak proces sestavování virionů. V genomu myšího polyomaviru se však nenachází žádná vazebná místa pro Sp1. Při hledání

putativních buněčných faktorů, které by se mohly na morfogenezi myšího polyomaviru podílet, byl kromě chaperonů vytypován jako jeden z kandidátů buněčný transkripční faktor a pleiotropní regulátor, YY1.

Protein YY1 byl vybrán díky několika jeho vlastnostem. Rozpoznává 4 vazebná místa na polyomavirové DNA (GENDRON *et al.* 1996, MARTELLI *et al.* 1996), interaguje přímo s D-E smyčkou kapsidového proteinu VP1 (PALKOVÁ *et al.* 2000b), během pozdní infekce migruje do míst, kde se akumuluje i protein VP1 a kde dochází k tvorbě virového potomstva (PLEVKA 2002, nepublikované výsledky) a navíc interaguje s jadernou matrix (původně byl identifikován jako protein s afinitou k jaderné matrix) (GUO *et al.* 1995). YY1 by mohl tedy plnit funkci jakéhosi prostředníka, který by se uplatňoval v asociaci genomů PyV k jaderné matrix a k řízené interakci se strukturálními proteiny. YY1 patří také mezi proteiny polycombové skupiny (ATCHISON *et al.* 2003) a mohl by se účastnit kondenzace virových genomů.

Tato část diplomové je tedy zaměřena na hypotézu, že YY1 by mohl hrát u polyomaviru podobnou roli jaká byla postulována pro Sp1 u SV40. Pro ověření hypotézy byly připraveny reakční směsi, ve kterých byly sledovány *in vitro* interakce mezi proteinem VP1, proteinem YY1 a polyomavirovou DNA, jež se v reakcích vyskytovaly v určitých molárních poměrech.

Reakce byly vizualizovány elektronmikroskopickou metodou rozprostírání (spreading) za použití BAC. Tato metoda pro svoje vysoké rozlišení umožňuje sledovat samotné nukleové kyseliny i komplexy nukleových kyselin a proteinů. Přidání proteinu YY1, v 7-násobném molárním nadbytku oproti DNA, mělo za následek vytvoření smyček na DNA. Zajímavé bylo, že tyto vlásenky vznikaly nejen na linearizované polyomavirové DNA, ale i na menších vláknech bakteriální plazmidové DNA, ze které byl polyomavirový genom vyštěpen. L. Horníková (2005) nalezla na plazmidové DNA (pMJ) specifickou sekvenci pro vazbu YY1 vzdálenou 650 bp od konce linearizované molekuly.

Pentamery proteinu VP1 ve 20-násobném molárním nadbytku oproti DNA se vázaly, jak se dalo očekávat na DNA nespecificky. Pokud byl v reakční směsi přítomen protein VP1 (ve 20-násobném molárním nadbytku vzhledem k DNA) i protein YY1 (v 50-násobném molárním nadbytku), docházelo ke tvorbě velikých agregátů. Tyto agregáty by mohly vznikat provázáním pentameru VP1 na různých místech DNA přes YY1 můstky. Nicméně byly pozorovány dlouhé úseky na DNA, které zůstávaly „holé“. Na velikost agregátů měla vliv koncentrace proteinu YY1, jelikož při dvojnásobné

konzentrací YY1 (ve 100-násobném molárním nadbytku oproti DNA a při stejné koncentraci VP1 pentamer) se vytvářely menší shluky a v některých případech byly pozorovány agregáty ve formě smyčky nukleové kyseliny obalené pentamery VP1, obtáčející se kolem elektrodenzího „ jádra“. „ Smyčkovité“ agregáty by mohly představovat iniciační komplexy. Na druhé straně by se mohlo jednat o nedokonale disociované prázdné kapsidy interagující s molekulami DNA. Problém těchto pokusů spočívá také ve skutečnosti, že reakce probíhaly v redukčních podmínkách (v přítomnosti dithiotreitolu), aby se předešlo tvorbě prázdných kapsid. Interakce testovaných složek tak mohly být narušené.

Silně redukčním podmínkám by bylo možné se vyhnout, pokud by byla připravena mutanta proteinu VP1, ve které by chyběl flexibilní C-konec odpovědný za interpentamerické vazby, aby nemohlo docházet k asociaci pentamer do struktur prázdných kapsid. Konstrukt plazmidu nesoucího mutovaný VP1 byl v rámci této práce připraven a restrikčně ověřen. Další analýzy budou prováděny po izolaci pentamer tvořených touto deleční mutantou VP1.

#### **6. 4. Ultrastrukturní analýza působení syntetického peptidu C35 obsahujícího posledních 35 aminokyselin společného C-konce minoritních proteinů VP2 a VP3 na buňky.**

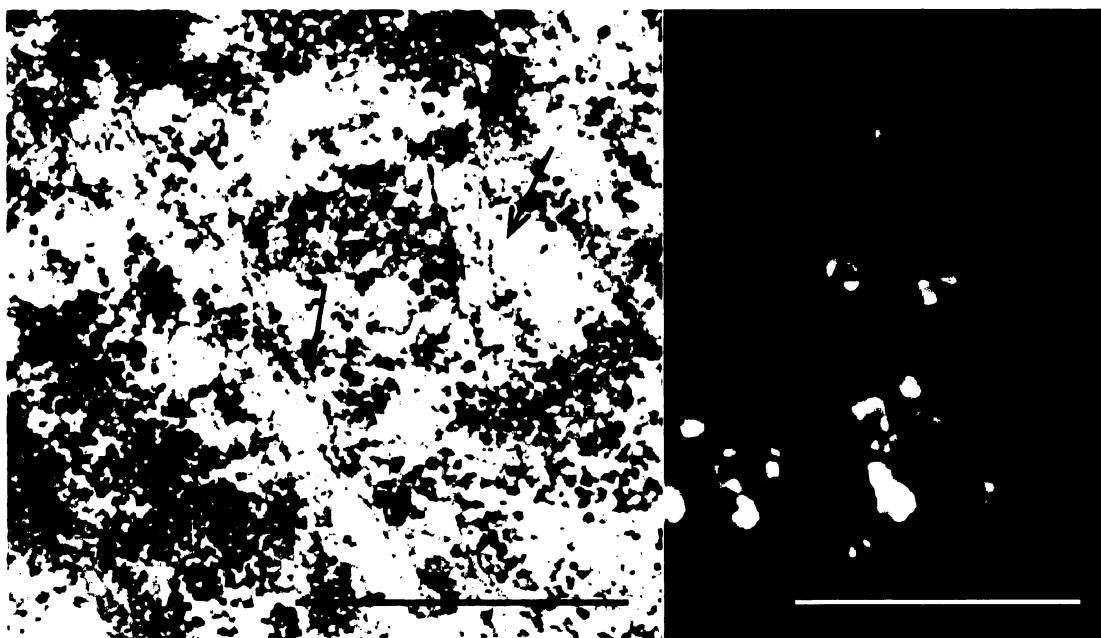
Tato část diplomové práce obsahuje předběžné výsledky ultrastrukturní analýzy vlivu synteticky připraveného peptidu C35 na savčí buňky. Analýza je součástí komplexní studie funkce C-konce minoritních strukturních proteinů polyomaviru v replikačním cyklu a rozšiřuje výsledky prezentované v diplomové práci V. Jiráska (2006), ve které byla studována pomocí nepřímé inmunofluorescence interakce peptidu s cytoplazmatickou membránou (po přidání peptidu k buňkám do růstového média).

Peptid C35 je tvořen posledními 35 aminokyselinami z C-konce minoritních proteinů myšího polyomaviru. C-koncová část minoritních proteinů, obsahující  $\alpha$  helix a několika aminokyselinami oddělený sled bazických aminokyselin vyhovuje svým uspořádáním konsensu tzv. protein transdukční domény. Naše hypotéza je, že by se po konformačních změnách mohla uplatňovat v interakci s membránami při vstupu virionů do buněk nebo při uvolnění virionů z endozomálních kompartmentů nebo při dopravě virových genomů do jádra.

Synteticky připravený peptid C35 byl přidán k myším fibroblastům 3T6, po dobu 5, 10, 15 a 30 min. Po inkubaci byly buňky fixovány 3 % glutaraldehydem, zapolymerovány do epoxidové pryskyřice AGAR100 a kontrastovány acetátem uranylu.

Oproti kontrolním buňkám bylo po 5 minutové inkubaci v naprosté většině buněk pozorováno narušení plazmatické membrány, u 50 % procent buněk docházelo těsně pod membránou k tvorbě velkého množství velikostně homogenních hladkých váčků a v některých buňkách byla pozorována i indukce tvorby klatrinových váčků. Neobalené váčky byly pozorovány i v 10 a 15 minutách po inkubaci, avšak hlouběji v cytoplazmě za ochranou bariérou svazků aktinových mikrofilament. Některé váčky tvořily shluky kolem vláknitých struktur. V deseti minutách po inkubaci byly váčky pozorovány v blízkosti vláken odpovídajících struktúre mikrotubulů (Obr. 6.1).

Tyto výsledky by mohly znamenat endocytozu peptidu do buněk a korespondují s výsledky V. Jiráska (2006), který pomocí nepřímé imunofluorescence pozoroval částečnou kolokalizaci peptidu s lehkým řetězcem klatrinu v 5 minutách po inkubaci a v 15 minutách po inkubaci pozoroval kolokalizaci peptidu s markerem kaveolární endocytózy kaveolinem-1. Přítomnost peptidu C35 v endocytických drahách bude nicméně nutno ověřit ještě imunoelektronovou mikroskopii.



Obr. 6.1 a) Váčky o homogenní velikosti (šípky) v blízkosti vláken připomínajících mikrotubuly v čase 10 min po interakci s peptidem C35 (koncentrace 10  $\mu$ g / ml media). Úsečka: 0,5  $\mu$ m b) Kolokalizace peptidu C35 (zelený) s  $\alpha$  tubulinem (červený), DNA (modře) v myších fibroblastech 3T6 v čase 15 minut po inkubaci s peptidem C35 (koncentrace 10  $\mu$ g / ml media). Úsečka: 10  $\mu$ m. Obr. 6.1b převzat z diplomové práce V. Jirásko (2006).

Zakulacený tvar buněk ovlivněných peptidem během 5, 10 a 15 minut inkubace zvětšená jádra i jadérka, rovněž zvětšené, kulovité endoplazmatické retikulum a zřetelně poškozená cytoplazmatické membrána, ukazují na toxický účinek peptidu C35 na buňky. Některé buňky již v 5 minutách po inkubaci vykazovaly pokročilé stádium apoptózy. Tyto buňky byly zřejmě zasaženy větším množstvím peptidu a nedokázaly přežít. Apoptotické buňky byly pozorovány ve všech zmínovaných časech, jejich množství se však s narůstající dobou inkubace nezvyšovalo. Buňky pozorované 30 minut po přidání peptidu překvapivě vypadaly zdravě, podobně jako buňky kontrolní. Toto pozorování by mohlo být vysvětleno první reakcí buněk na stress, která může vést k apoptóze (CHAN *et al.* 2005) a ty buňky, které nebyly působením peptidu usmrceny jej dokázaly eliminovat. Pozorování provedená konfokální mikroskopí toto vysvětlení podporuje: Hodinu po adsorpci peptidu na buňky signál polyklonální protilátky proti VP3 v buňkách, které přežily, zmizel. Nedávné pokusy studia účinků peptidu na lipozomy (R.FIŠER, nepublikované výsledky) ukázaly, že C35 peptid je schopen se zanořit do membrány lipozómů a způsobit její narušení.

## **7. SOUHRN**

**Výsledky této diplomové práce je možno shrnout do následujících bodů:**

- Provedli jsme ultrastrukturní analýzu dynamiky infekce myšího polyomaviru a popsali strukturní změny v buňkách nastávajících v důsledku infekce. V některých buňkách jsme pozorovali indukci apoptózy, ve většině buněk jsme pozorovali nekrotické procesy. Způsob uvolňování virionů nebyl objasněn, ale byl pozorován intenzivní transport virového potomstva z jádra do cytoplazmy a viriony vykazovaly afinitu k membránovým strukturám, zejména narušeným membránám mitochondrií.
- Metodou imunoelektronové mikroskopie jsme sledovali lokalizaci vybraných jaderných proteinů a organizaci jader během pozdních fází infekce. Pozorovali jsme buněčný histon H1 v sousedství virionových depozitů, což souhlasí s jeho absencí v maturovaných virionech. Dále jsme otestovali metodu odkrývání antigenů na ultratenkých řezech.
- Připravili jsme podmínky pro EM sledování interakcí v *in vitro* systému mezi polyomavirovou DNA, kapsidovým proteinem VP1 a buněčným transkripčním faktorem YY1.
- Zkonstruovali jsme rekombinantní plazmid nesoucí gen pro zkrácený protein VP1, který postrádá posledních 31 aminokyselin ze svého C-konce, a nebude tak vytvářet prázdné kapsidy a izolovali jsme pozitivní kolonie pro následnou produkci tohoto mutantního proteinu v bakteriích. Expresi  $\Delta$ VP1 genu bude nutno ověřit.
- Provedli jsme ultrastrukturní analýzu myších fibroblastů po jejich inkubaci se syntetickým peptidem tvořeným 35-ti aminokyselinami z C-konce minoritních strukturních proteinů VP2 a VP3, které strukturu připomínají protein transdukční domény. Pozorovali jsme, i) narušenou plazmatickou membránu buněk, ii) indukci tvorby hladkých monopinocytických i klatrinových váčků a jejich kolokalizaci s aktinovými vlákny a mikrotubuly, což je v souladu s pozorováním pomocí konfokálního mikroskopu, iii) známky apoptózy u některých buněk.

## **8. SEZNAM LITERATURY**

**Adams, J.M.** (2003): Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17: 2481 – 2495.

**An, K.**, Gillock, E.T., Sweat, J.A., Reeves, W.M., Consigli, R.A. (1999): Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J Gen Virol* 80: 1009 – 1016.

**An, K.**, Fattaey, H.K., Paulsen, A.Q., Consigli, R.A. (2000): Murine polyomavirus infection of 3T6 mouse cells shows evidence of predominant necrosis as well as limited apoptosis. *Virus Res* 67: 81 – 90.

**Anderson, T.F., Stanley, W.M.** (1941): *J Biol Chem* 139: 339

**Atchison, L.**, Ghias, A., Wilkinson, F., Bonini, N., Atchison, M.L. (2003): Transcription factor YY1 functions as a Pcg protein in vivo. *EMBO J* 22: 1347 – 1358.

**Barouch, D.H., Harrison, S.C.** (1994): Interactions among the major and minor coat protein of polyoma virus. *J Virol* 68: 3982 – 3989.

**Benjamin, T.L.** (2001): Polyoma virus: old findings and new challenges. *Virology* 289: 167 – 173.

**Birnboim, H.C., Doly, J.** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513.

**Bouřa, E.** (2004): Diplomová práce – Studium minoritních strukturních proteinů myšího polyomaviru. Vypracováno na fakultě molekulární biologie a genetiky, Přf UK.

**Brady, J.N., Wijnston, V.D., Consigli, R.A.** (1977): Dissociation of polyoma virus by chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J Virol* 23: 717 – 724.

**Brenner, S.**, Horne, R.W., (1959): A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta* 34: 103 – 110.

**Bronson, S.H.** (2004): A metod for measurement of the efficiency of immunogold labelling of epoxy-embedded proteins subjected to different retrieval techniques. *Micron* 35: 619 – 621. Short communication.

**Cahan, L.D., Singh, R., Paulson, J.C.** (1983): Sialyloligosaccharide receptors of binding variants of polyoma virus. *Virology* 130: 281 – 289.

**Carmichael, G.G., Schaffhausen, B.S., Dorsky, D.I., Olivek, D.B., Benjamin, T.L.** (1982): Carboxy terminus of polyoma middle-sized tumor antigen is required for attachment to membranes, associated protein kinase activities, and cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 3579 – 3583.

**Caruso, M., Belloni, L., Sthandler, O., Amati, P., Garcia, M.I.** (2003):  $\alpha 4\beta 1$  integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J Virol* 77: 3913 – 3921.

**Ceresa, B.P., Schmid, S.L.** (2000): Regulation of signal transduction by endocytosis. Curr Opin Cell Biol 12: 204 – 210.

**Cole, C.N.** (1996): Polyomavirinae: The Viruses and Their Replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds.): Fundamental virology. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 917 – 945.

**Cole, C.N.**, Landers, T., Goff, S.P., Manteuil-Brutlag, S., Berg, P. (1977): Physical and genetic characterization of deletion mutants of simian virus 40 constructed *in vitro*. J Virol 24: 277 – 294.

**Cole, S.L., Tevethia, M.J.** (2002): Simian virus 40 large T antigen and two independent T-antigen segments sensitize cells to apoptosis following genotoxic damage. J Virol 76: 8420 – 8432.

**Cripe, T.P., Delos, S.E., Estes, P.A., Garcea, R.L.** (1995): In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. J Virol 69: 7807 – 7813.

**Czajlik, A., Mesko, E., Penke, B., Perczel, A.** (2002): Investigation of penetratin peptides. Part 1. The environment dependent conformational properties of penetratin and two of its derivatives. J Pept Sci 8: 151 – 71.

**daCOSTA, S.R., Wang, Y., Vilalta, P.M., Schonthan, A.H., Hamm-Alvarez S.F.** (2000): Changes in cytoskeletal organization in polyoma middle T antigen-transformed fibroblasts: involvement of protein phosphatase 2A and src tyrosine kinases. Cell Motil Cytoskeleton 47: 253 – 268.

**Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., Prochiantz, A.** (1996): Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent. J Bio. Chem 271: 18188 – 18193.

**Dilworth, S.M.** (1990): Cell alterations induced by the large T-antigens of SV40 and polyoma virus. Semin Cancer Biol 1: 407 – 414.

**Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale C.W.** (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res 16: 6127 – 6145.

**Eddy, B.E., Borman, G.S., Grubbs, G.E., Young, R.D.** (1962): Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell cultures as simian virus 40. Virology 17: 65 – 75.

**Ellman, M., Bikel, I., Figge, J., Roberts, T., Schlossman, R., Livingston, D.M.** (1984): Localization of the simian virus 40 small t antigen in the nucleus and cytoplasm of monkey and mouse cells. J Virol 50: 623 – 628.

**Fidorra, J., Mielke, T., Booz, J., Feinendegen, L.E.** (1981): Cellular and nuclear volume of human cells during the cell cycle. Radiat Environ Biophys 19: 205 – 14.

**Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppe, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F., Giacca, M.** (2003): Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem* 278: 34141 – 34149.

**Forstová, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliot, J., Palková, Z., Strauss, M., Griffin, B.E.** (1995): Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum Gene Ther* 6: 297 – 306.

**Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A.J., Dilworth, S.M., Beard, S., Griffin, B.E.** (1993): Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J Virol* 67: 1405 – 1413.

**Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K., Parton, R.G.** (1995): De novo formation of caveole in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8655 – 8659.

**Fried, H., Cahan, L.D., Paulson, J.C.** (1981): Polyoma virus recognizes specific sialyloligosaccharide receptors on host cells. *Virology* 109: 188 – 192.

**Garcea, R.L., Benjamin, T.L.** (1983): Isolation and characterization of polyoma nucleoprotein complexes. *Virology* 130: 65 – 75.

**Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V., Hulme B.** (1971): New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1: 1253 – 1257.

**Gazit, E., La Rocca, P., Sansom, M.S., Shai, Y.** (1998): The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12289 – 12294.

**Gazit, E., Lee, W.J., Brey, P.T., Shai, Y.** (1994): Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry* 33: 10681 – 10692.

**Gendron, D., Delbecchi, L., Bourgault-Ramouzy, D., Bourgault, P.** (1996): An enhancer of recombination in polyomavirus DNA. *J Virol* 70: 4748 – 4760.

**Gilbert, J.M., Benjamin, T.L.** (2000): Early steps of polyomavirus entry into cells. *J Virol* 74: 8528 – 8588.

**Gilbert, J.M., Benjamin, T.L.** (2004): Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J Virol* 78: 12259 – 12267.

**Gordon-Shaag, A., Yosef, Y., Abd El-Latif, M., Oppenheim, A.** (2003): The abundant nuclear enzyme PARP participates in the life cycle of simian virus 40 and is stimulated by minor capsid protein VP3. *J Virol* 77: 4273 – 4282.

**Gross, L.** (1953): A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 83: 414 – 421.

**Gulbins, E.,** Dreschers, S., Bock, J. (2003): Role of mitochondria in apoptosis. *Exp Physiol* 88: 85 – 90. Review.

**Guo, B.,** Odgren, P.R., van Wijnen, A.J., Last, T.J., Nickerson, J., Pentan, S., Lian, J.B., Stein, J.L., Stein, G.S. (1995): The nuclear matrix protein NMP-1 is the transcription factor YY1. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10526 – 10530.

**Gutheil, W.G.,** Subramanyam, M., Flentke, G.R., Sanford, D.G., Munoz, E., Huber, B.T., Bachovchin, W.W. (1994): Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6594 – 6598.

**Horníková, L.** (2005): Diplomová práce – Viriony myšího polyomaviru: Interakce s buněčnými strukturami během vstupu viru do buněk a v průběhu jejich morfogeneze. Vypracováno na fakultě molekulární biologie a genetiky, Přf UK.

**Chaloin, L.,** Mery, J., Van Mau, N., Divita, G., Hertz, F. (1999): Synthesis of a template-associated peptide designed as a transmembrane ion channel former. *J Pept Sci* 5: 381 – 91.

**Chan, K.,** Truong, D., Shangari, N., O'Brien, P.J. (2005): Drug-induced mitochondrial toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1: 655 – 669.

**Chang, D.,** Haynes, J.I. 2nd, Brady, J.N., Consigli, R.A. (1993): Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* 191: 978 – 983.

**Chen, L., Fluck, M.** (2001): Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle. *J Virol* 75: 8368 – 8379.

**Chen, X.S.,** Stehle, T., Harrison, S.C. (1998): Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J* 17: 3233 – 3240.

**Chiarini, A.,** Whitfield, J.F., Armato, U., Dal Pra, I. (2002): Protein kinase C-beta II Is an apoptotic lamin kinase in polyomavirus-transformed, etoposide-treated pyF111 rat fibroblasts. *J Biol Chem* 277: 18827 – 18839.

**Ito, Y.,** Brocklehurst, J.R., Dulbeco, R. (1977): Virus-specific proteins in the plasma membrane of cells lytically infected or transformed by polyoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4666 – 4670.

**Jirásko, V.G.** (2006): Diplomová práce – Studium funkcí VP2 a VP3 strukturních minoritních proteinů myšího polyomaviru. Vypracováno na fakultě molekulární biologie a genetiky, Přf UK.

**Kalina, T., Pokorný, V.** (1981): Základy elektronové mikroskopie. Univerzita Karlova, Praha, 85 – 90.

**Kaplan, I.M.,** Wadia, J. S., Dowdy, S. F. (2005): Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release* 102: 247 – 253.

**Kečkéšová, Z.** (2003): Diplomová práce – Myší polyomavírus: štúdium skorej fázy infekcie a roľa minoritných proteinou. Vypracováno na fakulte molekulárnej biologie a genetiky, Přf UK.

**Kerr, J.F., Harmon, B.V.** (1991): *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Kerr, J.F.** (1965): A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 90: 419 – 435.

**Klockmann, U., Deppert, W.** (1983): Acylated simian virus 40 large T-antigen a new subclass associated with a detergent resistant lamina of the plasma membrane. *EMBO* 2: 1151 – 1157.

**Koppelhus, U., Awasthi, S.K., Zachar, V., Holst, H.U., Ebbesen P., Nielsen, P.E.** (2002): Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucl Acid Drug Dev* 12: 51 – 63.

**Krauzewicz, N., Štokrová, J., Jenkins, C., Elliot, M., Higgins, C.F., Griffin, B.E.** (2000): Virus-like gene transfer into cells mediated by polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther* 7: 2122 – 2131.

**Langel, U.** (2002): *Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications*, CRC Press: Boca Raton

**Leavitt, A.D.,** Roberts, T.M., Garcea, R.L. (1985): Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 260: 12803 – 12809.

**Leist, M., Jaattela, M.** (2001): Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell* 2: 589 – 598. Review.

**Li, M., Delos, S.E., Monstross, L., Garcea, R.L.** (1995): Polyomavirus VP1 phosphorylation: Coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in Sf9 insect cells. *Proc Natl Acad USA* 92: 5992 – 5996.

**Liddington, R.C.,** Yan, Y., Moulain, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, S.C. (1991): Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature* 354: 278 – 294.

**Liebl, D.** (2000): Diplomová práce – Interakce VP1 pseudokapsid a přirozených virionů polyomaviru s buněčnými strukturami: Elektronmikroskopická analýza. Vypracováno na fakulte molekulárnej biologie a genetiky, Přf UK.

**Lin, W., Hata, T., Kasamatsu, H.** (1984): Subcellular distribution of viral structural proteins during simian virus 40 infection. *J Virol* 50: 363 – 371.

**Lundberg, M.**, Wikstrom, S., Johansson, M. (2003): Cell Surface Adherence and Endocytosis of Protein Transduction Domains. *Molecular Therapy* 8: 1525 – 1528.

**Mannová, P., Forstová, J.** (2003): Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J Virol* 77: 1672 – 1681.

**Mannová, P.**, Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová, A., Štokrová, J., Palková, Z., Griffin, B.E., Forstová, J. (2002): Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J Gen Virol* 83: 2309 – 2319.

**Martelli, F.**, Jacobini, C., Causo, M., Felsani, A. (1996): Characterization of two novel YY1 binding sites in the polyomavirus late promoter. *J Virol* 70: 1433 – 1438.

**Marton, A.**, Marko, B., Delbecchi, L., Bourgaux, P. (1995): Topoisomerase activity associated with polyoma virus large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* 1262: 59 – 63.

**McMillen, J., Consigli, R.A.** (1974): Characterization of polyoma DNA-protein complexes. I. Electrophoretic identification of the proteins in a nucleoprotein complex isolated from polyoma-infected cells. *J Virol* 14: 1326 – 1336.

**Mellor, A., Smith, A.E.** (1978): Characterization of the amino terminal tryptic peptide of simian virus 40 small-t and large-T antigens. *J Virol* 28: 992 – 996.

**Momoi, T.** (2004): Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat* 28: 101 – 105.

**Moran, E.** (1988): A region of SV40 large T antigen can substitute for a transforming domain of the adenovirus E1A products. *Nature* 334: 168 – 170.

**Moreland, R.B., Garcea, R.L.** (1991): Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* 185: 513 – 518.

**Mullane, K.P., Ratnofsky, M., Cullere, X., Schaffhausen, B.** (1998): Signaling from polyomavirus middle T and small T defines different roles for protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol* 18: 7556 – 7564.

**Nermut, M.V.** (1982): Advanced method in electron microscopy of viruses. *Lab Res Methods Biol Med* 5: 1 – 58.

**Norkin, L.C.** (1999): Simian virus 40 infection via MHC class I molecules and caveolae. *Immunol Rev* 168: 13 – 22.

**O'Brien, V.** (1998): Viruses and apoptosis. *J Gen Virol* 79: 1833 – 1845.

**Oehlke, J., Krause, E., Wiesner, B., Beyermann, M., Bienert, M.** (1997): Extensive cellular uptake into endothelial cells of an amphipathic beta-sheet forming peptide. *FEBS Lett* 415: 196 – 199.

**Oehlke, J.**, Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., Melzig, M., Bienert, M. (1998): Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior nonendocytically. *Biochim. Biophys. Acta* 1414: 127 – 139.

**Olson, M.O.**, Dundr, M., Szebeni, A. (2000): The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol* 10: 189 – 196.

**Oppenheim, A.**, Sandalon, Z., Peleg, A., Shaul, O., Nicolis, S., Ottolenghi, S. (1992): A cis-acting DNA signal for encapsidation of simian virus 40. *J Virol* 66: 5320 – 5320.

**Padgett, B.L.**, Walker, D.L., ZuRhein, G.M., Eckroade, R.J., Drasel, B.H. (1971): Cultivation of a papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1: 1257 – 1260.

**Palková, Z.**, Adamec, T., Liebl, D., Štokrová, J., Forstová, J. (2000a): Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Letters* 478: 281 – 289.

**Palková, Z.**, Španielová, H., Gottifredi, V., Hollanderová, D., Forstová, J., Amati, A. (2000b): The polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the nuclear matrix regulatory protein YY1. *FEBS letters* 467: 359 – 364.

**Pelkmans, L.**, Kartenbeck, J., Helenius, A. (2001): Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3: 473 – 483.

**Pallas, D.C.**, Fu, H., Haehnel, L.C., Weller, W., Collier, R.J., Roberts, T.M. (1994): Association of polyomavirus middle tumor antigen with 14-3-3 proteins. *Science* 265: 535 – 537.

**Pallas, D.C.**, Shahrink, L.K., Martin, B.L. (1990): Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* 60: 167 – 176.

**Pho, M.T.**, Ashok, A., Atwood, W.J. (2000): JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol* 74: 2288 – 2292.

**Plevka, P.** (2002): Diplomová práce – Vliv polyomaviru a jeho strukturního proteinu VP1 na cytoskelet a organizaci vybraných jaderných proteinů. Vypracováno na fakultě molekulární biologie a genetiky, Přf UK.

**Potocky, T. B.**, Menon, A. K., Gellman, S. H. (2003): Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J Biol Chem* 278: 50188 – 50194.

**Pouny, Y.**, Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., Shai, Y. (1992): Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31: 12416 – 12423.

**Rassoulzadegan, M.**, Cowie, A., Carr, A., Glaichenhaus, N., Kamen, R., Cuzin, F. (1982): The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 300: 713 – 718.

**Raška, I., Smetana, K.** (1978): A further contribution on nucleoli of human lymphocytes. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 105: 200 – 215.

**Richardson, W.D.**, Roberts, B.L., Smith, A.E. (1986): Nuclear localization signal in polyoma virus large-T. *Cell* 44: 77 – 85.

**Richterová, Z.**, Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Štokrová, J., Hozák, P., Korb, J., Forstová, J. (2001): Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol* 75: 10880 – 10891.

**Rittner, K.**, Benavente, A., Bompard-Sorlet, A., Heitz, F., Divita, G., Brasseur, R., Jacobs, E. (2002): New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther* 5: 104 – 114.

**Rothbard, J.B.**, Garlington, S., Lin, Q., Kirschberg, T., Kreider, E., McGrane, P.L., Wender, P.A., Khavari, P.A. (2000): Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med* 6: 1253 – 1257.

**Rothberg, K.G.**, Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., Anderson, R.G.W. (1992): Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673 – 682.

**Ruchaud, S.**, Korfali, N., Villa, P., Kottke, T.J., Dingwall, C., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C. (2002): Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *EMBO J* 21: 1967 – 1977.

**Salunke, D.M.**, Caspar, D.L., Garcea, R.L. (1986): Self assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46: 895 – 904.

**Sambrook, J.**, Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): A molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Savill, J.**, Dransfield, Hogg, N., Haslett, C. (1990): Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343: 170 – 173-

**Senda, T.**, Iizuka-Kogo, A., Shimomura, A. (2005): Visualization of the nuclear lamina in mouse anterior pituitary cells and immunocytochemical detection of lamin A/C by quick-freeze freeze-substitution electron microscopy. *J Histochem Biochem* 53: 497 – 507.

**Shaw, P., Doonan, J.** (2005): The nucleolus. Playing by different rules? *Cell Cycle* 4: 102 – 105.

**Shen, Y., Shenk, T.E.** (1995): Viruses and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 5: 105 – 111.

**Shi, Y., Lee, J.S., Galvin, K.M.** (1997): Everything you have ever wanted to knot about Yin Yang 1. *Biochim Biophys Acta* 1332: F49 – F66.

**Schmidt, M.K., Mann, K.** (1987): Glycosylation of simian virus 40 T antigen and localization of glycosylated T antigen in the nuclear matrix. *Virology* 156: 268 – 281.

**Silhol, M., Tyagi, M., Giacca, M., Lebleu, B., Vive's, E.** (2002): Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat. *Eur J Biochem* 269: 494 – 501.

**Simons, K., Toomre, D.** (2000): Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31 – 39.

**Sontag, E., Federov, S., Kamibayashi, C., Robbins, D., Cobb, M., Muby, M.** (1993): The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cells proliferation. *Cell* 75: 887 – 897.

**Staufenbiel, M., Deppert, W.** (1983): Different structural systems of the nucleus are targets for SV40 large T antigen. *Cell* 33: 173 – 181.

**Stehle, T., Gamblin, S.J., Yan, Y., Harrison, S.C.** (1996): The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 4: 165 – 182.

**Stehle, T., Harrison, S.C.** (1996): Crystal structures of murine polyomavirus in komplex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4: 183 – 194.

**Stehle, T., Yan, Y., Benjamin, T.L., Harrison, S.C.** (1994): Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* 369: 160 – 163.

**Stewart, S.E., Eddy, B.E., Borgise, N.G.** (1958): Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J Natl Cancer Inst* 20: 1223 – 1243.

**Stirling, J.W., Graff, P.S.** (1995): Antigen unmasking for immunoelectron microscopy: labeling is improved by treating with sodium ethoxide or sodium metaperiodate, then heating on retrieval medium. *J Histochem Cytochem* 43: 115 – 123.

**Štokrová, J., Korb, J., Pliss, A., Raška, I., Stulík, J., Dvořáková, M.** (2002): Overexpression of v-myb oncogene or c-myb proto-oncogene in insect cells: characterization of newly induced nucleolus-like structures accumulating Myb protein. *Int J Mol Med* 9: 547 – 554.

**Štokrová, J., Vojtíšková, M., Paleček, E.** (1989): Electron microscopy of supercoiled pEJ4 DNA containing homopurine.homopyrimidine sequences. *J Biomol Struct Dyn* 6: 891 – 898.

**Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V.M.** (2000): Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 2000 69: 217 – 245. Review

**Streuli, C.H.**, Griffin, B., (1987): Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* 326: 619 – 622.

**Su, W.**, Liu, W., Schaffhausen, B.S., Roberts, T.M. (1995): Association of polyomavirus middle tumor antigen with phospholipase C $\square$ -1. *J Biol Chem* 270: 12331 – 12334.

**Sugihara, R., Sugihara, S. Jr.** (1976): Electron microscopic observations on the morphogenesis of renal cell carcinoma induced in rat kidney by dimethylnitrosamine and N-(3,5-dichlorophenyl)succinimide. *Cancer Res* 36: 533 – 550.

**Talmage, D.A.**, Freund, R., Zouny, A.T., Dahl, J., Dawe, C.J., Benjamin, T.L. (1989): Phosphorylation of middle T by pp60c-src: a switch for binding of phosphatidylinositol 3-kinase and optimal tumorogenesis. *Cell* 59: 55 – 65.

**Trump, B.F.**, Berezesky, I.K., Chang, S.H., Phelps, P.C. (1997): The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol* 25: 82 – 88. Review.

Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., Rapoprot, T.A. (2003): Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J* 22: 4346 – 4355.

**Turler, H.**, Beard, P. (1985): Simian virus 40 and polyoma virus: growth, titration, transformation and purification of viral components. In: Mahy B.W.J. (ed.): *Virology: a practical approach*. IRL Press, Oxford, 169 – 192.

**Tyagi M.**, Rusnati, M., Presta, M., Giacca, M. (2001): Internalization of HIV-1 Tat Requires Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *J Biol Chem* 276: 3254 – 3261.

**Varga, M.J.**, Weibull, C., Everitt E. (1991): Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J Virol* 65: 6061 – 6070.

**Varsavsky, A.J.**, Bakayev, V.V., Chumackov, P.M., Georgie, G.P. (1976): Minichromosome of simian virus 40: Presence of H1. *Nucleic Acids Res* 3: 2101 – 2113.

**Velková, K.** (2003): Diplomová práce – Studium interakcí myšího polyomaviru se strukturami hostitelských buněk. Vypracováno na fakultě molekulární biologie a genetiky, Přf UK.

**Wachtler, F., Stahl, A.** (1993): The nucleolus - a structural and functional interpretation. *Micron* 24: 473 – 505.

**Wakabayashi, T.** (2002): Structural changes of mitochondria related to apoptosis: swelling and megamitochondria formation. *Acta Biochim Pol* 46: 223 – 237.

**Wender, P.A.**, Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., Rothbard, J.B. (2000): The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13003 – 13008.

**Winston, V.D.**, Bolen, J.B., Consigli, R.A. (1980): Isolation and characterization of polyoma uncoating intermediates from the nuclei of infected mouse cells. *J Virol* 33: 1173 – 1181.

**Xia, H.**, Mao, Q., Davidson, B.L. (2001): The HIV Tat protein transduction domain improves the biodistribution of beta-glucuronidase expressed from recombinant viral vectors. *Nat Biotechnol* 19: 640 – 644.

**Yamamoto, A.**, Murphy, N., Schindler, C.K., So, N.K., Stohr, S., Taki, W., Prehn, J.H., Henshall, D.C. (2006): Endoplasmic reticulum stress and apoptosis signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 65: 217 – 225.

**Yan, Y.**, Stehle, T., Liddington, R.C., Zhao, H., Harrison, S.C. (1996): Structure determination of simian virus 40 and murine polyomavirus by a combination of 30-fold and 5-fold electron-density averaging. *Dstructure* 4: 157 – 164.

**Yang, L.**, Guan, T., Gerace, T. (1997): Lamin-binding fragment of LAP2 inhibits increase in nuclear volume during the cell cycle and progression into S phase. *J Cell Biol* 139: 1077 – 1087.

**Yen, A., Pardee, A.B.** (1979): Role of nuclear size in cell growth initiation. *Science* 204: 1315 – 1317.

**Yuen, L.K.C., Consigli, R.A.** (1985): Identification and protein analysis of polyomavirus assembly intermediates from infected primary mouse embryo cells. *Virology* 144: 127 – 138.

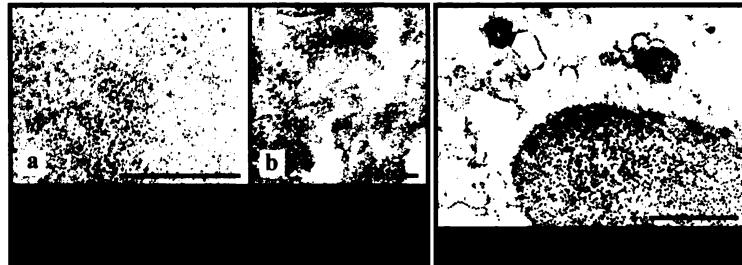
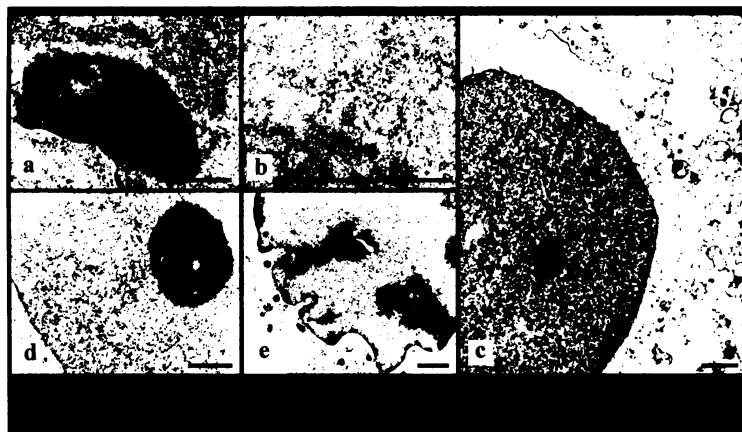
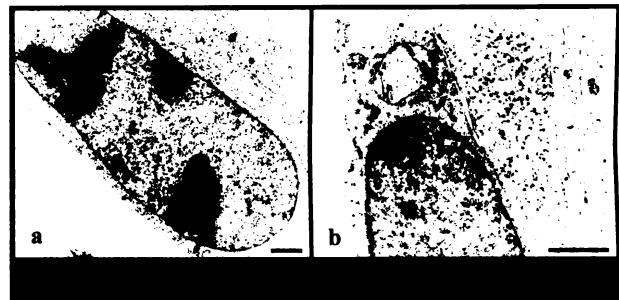
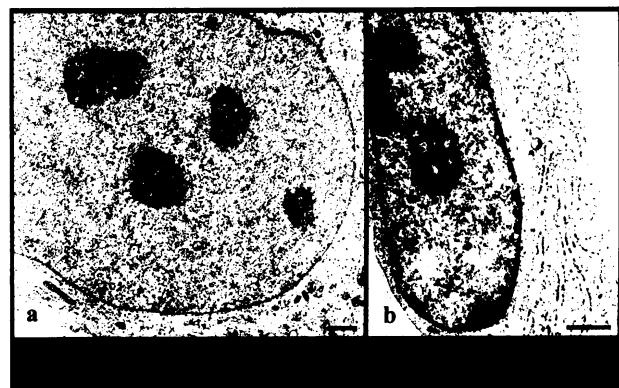
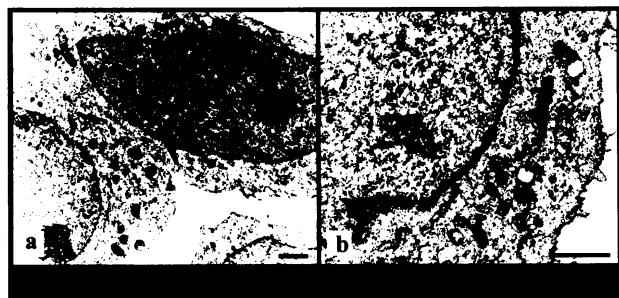
## INTRODUCTION

The mouse polyomavirus (PyV) is a small tumorogenic DNA virus. Its genome encodes only six gene products, three early (large, middle and small T antigens) and three structural proteins (VP1, VP2 and VP3). Mechanisms of cell transformation by PyV has been intensively studied. Also, PyV capsid-like particles, self-assembled from the PyV major capsid protein, are investigated as potential vectors for gene- and immuno-therapy. However, little is known about interactions of Py virions and individual proteins with cellular structures during virus entry and trafficking towards cell nucleus. Also detailed analysis of cell structural changes as a response on PyV infection during virion assembly and release of virus progeny is missing.

The purpose of this work is to analyse changes in cell structures during late phase of PyV infection.

## RESULTS

Synchronized mouse 3T6 fibroblasts were infected with PyV, scraped at 12, 24, 36 and 48 h post infection (h p.i.), and embedded either to epoxy resin AGAR 100 (for morphology analysis) or to acrylate resin LR White (for immunoelectron microscopy). Unlike uninfected cells (Fig. 1 a), volume of the nuclear compartment of infected cells increased markedly already 3 h p.i. (Fig. 1 b). After 12 h p.i., large nucleoli with nucleolonemas were observed (Fig. 2 a) suggesting stimulation effect of PyV infection, as nucleoli of this type were seen in cells engaged in intensive metabolism or in proliferation. The structure of cytoplasmic organelles was also changed, particularly rough endoplasmic reticulum (RER) became swollen (Fig. 2 b), indicating increased synthesis of proteins. With progression of infection (24 h p.i.) the volume of nucleoli still increased and their architecture was changed from type with nucleolonema to a more compact type (Fig. 3 a). The giant mitochondria were found in the cytoplasmic area, indicating early steps of apoptotic process (Fig. 3 b). The first virus progeny located at specific sites of the nucleus were observed after 36 h p.i. The newly synthesized virions were often observed in the proximity of nucleoli (Fig. 4 a), as indicated by the marker of major capsid PyV protein VP1 (Fig. 4 b). However, at the same time, some cells contained high amount of virions spread all over the nucleus (Fig. 4 c). In addition, the openings in the nuclear membrane, for virion release, were found. At this time of infection, most of the nucleoli revealed compact character, typical for transformed cells (Fig. 4 d). The apoptosis continued by chromatin clumping, indicating its later stages (Fig. 4 e). In addition, the mutual localization of PyV VP1 marker with both histon H1 or nucleoporin (NuP) proteins was followed at this time of infection. Anti VP1 antibody indicated clearly PyV progeny, while H1 marker was predominantly localized on the chromatin of infected cells (Fig. 5 a). The NuP protein was found in specific sites without any colocalization with VP1 marker (Fig. 5 b). Release of virus progeny continued at 48 h p.i.. Surprisingly, new virions released from cell nuclei were found attached to intracellular membrane structures decorating membranous vesicles and in some cases also membrane of destroyed mitochondria (Fig. 6).



## CONCLUSIONS

Electronmicroscopic approaches were used to analyse the ultrastructural changes of mouse fibroblasts after PyV infection and to find out cooperation of virus with some cellular components during virions assembly and their release from the cells. The strong stimulation effect of PyV infection is obvious from increase of nuclear volume of infected cells already after virus internalisation and by presence of nucleoli with nucleolonema. The late phases of infection are characterized by increase of protein synthesis, as indicate swollen RER. Compact nucleoli indicate transformed character of infected cells. Localization of virus progeny in the proximity of nucleoli indicates that these organelles could help with virion replication and/or assembly. It has been described (Olson et al. Cell Biology, 10, 189-195 (2000)) that variety of macromolecules are present in the nucleolus with no apparent function in ribosomal machinery and that nucleolus serves as a staging area for transport in nuclear compartment. Finding of giant mitochondria confirms the induction of initial steps of apoptotic process in the cytoplasm of PyV infected cells. The growing of virions number actively promotes the late steps of apoptosis in the nuclei. On one hand, the apoptosis could represent a defence of the cells against virus infection, but on the other hand, the apoptosis could help to spread virus progeny to surrounding cells. Accumulation of H1 histone around the sites of virus assembly, prove its elimination from mature virions. The composition of membranous structures that PyV uses for its release from infected cells remains to be elucidated.