

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie**

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



**Bc. Petr Vomáčka**

**Charakterizace virových nanočástic odvozených od myšního papilomaviru**

Characterization of viral nanoparticles derived from mouse papillomavirus

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Školitel: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

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

V Praze, 12.8.2019

Petr Vomáčka \_\_\_\_\_

**Poděkování:**

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce RNDr. Haně Španielové Ph.D. za její neustávající podporu a bezmeznou trpělivost. Za neocenitelné rady při provádění experimentální části, za veškeré rady při sepsování této práce. Za veškerý čas, který této práci věnovala, za veškeré úsilí, které s ochotou jí vlastní u této práce vynaložila. Dále bych rád poděkoval Mgr. et Mgr. Alžbětě Hejtmánkové, Mgr. Janě Váňové a Jiřině Žáčkové Suchanové Ph.D. za podporu a ochotu zodpovídat všetečné dotazy a za pomoc s elektronovou mikroskopií a prováděním luciferázových testů. Všem kolegům z laboratoře děkuji za přátelské prostředí, ve kterém byla radost pracovat.

Přede vším pak děkuji své rodině blízké i široké za poskytnutí rodinného zázemí a podporu v životě a při studiu.

## **Abstrakt**

L1 a L2 kapsidové proteiny papilomavirů se vyznačují schopností samoskládání do podoby virových kapsid, které je možné rozdělit dle vnitřního obsahu na pseudoviriony a virům podobné částice. Mimo fakt, že takto připravené částice mohou sloužit jako „nanokontejnery“ pro diagnostické a terapeutické látky, bylo také prokázáno, že papilomaviry, ať už přirozeně se vyskytující, pseudoviriony nebo virům podobné částice mají vyšší afinitu k nádorovým buňkám oproti buňkám nenádorovým.

Tato práce se zabývá relativně nově objeveným (2011) myším papilomavirem a od něj odvozených nanočástic. Tento papilomavirus byl vybrán pro své klady, mezi které mimo jiné patří snadná příprava virům podobných částic a pseudovirionů a dostupný modelový organismus pro případné testování. Dále v sobě skrývá potenciál pro použití při genové terapii a/nebo diagnostice nádorových onemocnění, neboť vůči myšimu papilomaviru neexistuje v lidské populaci imunitní odpověď. Cílem této práce bylo připravit expresní systému pro produkci pseudovirionů a virům podobných částic v dostatečné kvalitě a množství. Dále byla snaha o charakterizaci těchto částic a ověření dosavadních faktů týkajících se vyšší afinity papilomavirů k nádorovým buňkám a také ověření, zda je stejný efekt pozorován i u myšího papilomaviru.

Ve výsledcích této práce je možné pozorovat trend ukazující na preferenční vazbu PsVs a VLPs na nádorové buněčné linie, a také zvýšenou míru internalizace těchto částic nádorovými buňkami.

## **Klíčová slova:**

myší papilomavirus, VLPs, PsVs, virům podobné částice, pseudoviriony

## **Abstract**

The L1 and L2 capsid proteins of papillomaviruses are characterized by the ability to self-assemble into viral capsids, which can be divided into pseudovirions (PsVs) and virus-like particles (VLPs) by inner content. In addition to the fact that such particles can serve as "nano-containers" for diagnostic and therapeutic agents, it has also been shown that papillomaviruses, whether wild, PsVs or VLPs have a higher affinity for tumor tissue than non-tumor tissue. This thesis deals with relatively newly discovered (2011) mouse papillomavirus (MusPV) and nanoparticles derived from this virus. This papillomavirus has been chosen for its positives, including easy preparation of VLPs and PsVs, as well as an available model organism for possible testing. Furthermore, MusPV has the potential for use in gene therapy and cancer diagnosis, because there is no immune response in the human population. The aim of this diploma thesis is to prepare an expression system for the production of PsVs and VLPs. In addition it will also look at the quality and quantity of PsVs and VLPs, characterization of these particles and verification of existing postulates regarding higher affinity of papillomaviruses for tumor cells. Finally, it will also to verify whether the same effect is observed in MusPV.

In the results of this thesis we can observe a trend indicating preferential binding of PsVs and VLPs to tumor cell lines, as well as an increased degree of internalization of these particles.

### **Key words:**

mouse papillomavirus, VLPs, PsVs, virus-like particles, pseudovirion

# Obsah

Seznam zkratk:	3
1 Úvod	4
2 Literární přehled	5
2.1 Papilomaviry	5
2.2 Papilomaviry a jimi způsobovaná onemocnění	10
2.3 Myší papilomavirus	12
2.4 Pseudoviriony a virům podobné částice	13
2.4.1 Savčí expresní systém pro přípravu papilomavirových PsVs	14
2.4.2 Bakulovirový expresní systém pro přípravu VLPs	15
2.5 Aplikační potenciál virových částic odvozených od papilomavirů	16
3 Cíle práce	19
4 Materiál a metody	20
4.1 Materiál	20
4.1.1 Bakteriální kmeny	20
4.1.2 Buněčné linie	20
4.1.3 Viry a od nich odvozené částice	20
4.1.4 Primární protilátky	21
4.1.5 Sekundární protilátky	21
4.1.6 Markery molekulových vah	21
4.1.7 Roztoky a chemikálie	22
4.1.8 Komerční soupravy	25
4.1.9 Agarové plotny	25
4.1.10 Primery pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR)	26
4.1.11 Přístroje	27
4.1.12 Software	28
4.1.13 Vektory	28
4.2 Metody	29
4.2.1 Sterilizace	29
4.2.2 Příprava králičích sér pro imunologickou detekci proteinů	29
4.2.3 Práce s bakteriálními kulturami	29
4.2.3.1 Kultivace bakterií	29
4.2.3.2 Příprava kompetentních bakterií pro elektroporaci	29
4.2.3.3 Příprava bakteriálních konzerv	30
4.2.3.4 Elektroporace	30
4.2.4 Práce s DNA	31
4.2.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	31
4.2.4.2 PCR z bakteriálních kolonií (Genotypování bakteriálních kolonií)	32
4.2.4.3 Měření koncentrace DNA	33
4.2.4.4 Izolace plasmidu	33
4.2.4.5 Horizontální agarózová elektroforéza	34
4.2.4.6 Restrikční štěpení	35

4.2.3.7	DNA extrakce z agarózového gelu .....	36
4.2.3.8	Fenol-chloroformová extrakce DNA .....	36
4.2.3.9	Ligace DNA do vektoru .....	37
4.2.3.10	Sekvenace DNA .....	37
4.2.3.11	Příprava rekombinantního bakmidu .....	38
4.2.4	Práce s tkáňovými kulturami .....	39
4.2.4.1	Pasážování savčích buněčných linií .....	39
4.2.4.2	Pasážování hmyzích buněčných linií .....	39
4.2.4.3	Transfekce 293TT pomocí TurboFect™ Transfection Reagent .....	40
4.2.4.4	Infekce Sf9 rekombinantním bakulovirem .....	40
4.2.5	Práce s proteiny .....	42
4.2.5.1	Polyakrylamidová elektroforéza za přítomnosti SDS (SDS-PAGE) .....	42
4.2.5.2	Western Blot .....	44
4.2.5.3	Imunologická detekce proteinů na základě chemiluminiscence .....	44
4.2.5.4	Imuno Dot Blot .....	45
4.2.5.5	Ultracentrifugace v gradientu chloridu cesného .....	45
4.2.5.6	Centrifugace přes prázdou vrstvu - sacharózový polštář .....	46
4.2.5.7	Centrifugace v jodixanolovém gradientu – Optiprep™ .....	46
4.2.5.8	Zakoncentrování vzorku pomocí PEG .....	46
4.2.5.9	Elektronová mikroskopie a negativní barvení .....	47
4.2.5.10	Dialýza vzorků po centrifugaci .....	47
4.2.5.11	Měření koncentrace proteinů .....	48
4.2.5.12	Značení PsVs pomocí NHS-Rhodamine .....	48
4.2.5.13	Značení VLPs pomocí NHS-Rhodamine a Alexa Fluor™ 488 5-SDP Ester .....	48
4.2.5.14	Měření transdukční aktivity MusPV PsVs u nádorových a nenádorových buněčných linií .....	49
4.2.5.15	Izolace MusPV PsVs .....	50
4.2.5.16	Měření interakce značených MusPV VLPs s nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi .....	50
4.2.5.17	Izolace MusPV VLPs .....	52
5	Výsledky .....	54
5.1	Produkce papilomavirových VLPs .....	55
5.2	Příprava značených MusPV PsVs .....	65
5.3	Příprava značených MusPV VLPs pomocí Rhod a Ax488 .....	67
5.4	Kvantifikace počtu molekul barviva na VLPs .....	71
5.5	Měření transdukční aktivity MusPV PsVs u nádorových a nenádorových buněčných linií .....	71
5.6	Měření interakce značených VLPs s nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi .....	80
6	Diskuze .....	87
7	Závěr .....	94

## Seznam zkratek:

A2t	heterotetramer annexinu 2
Ax488-SDP	Alexa Fluor™ 488 5-SDP Ester
BPV	bovinní papilomavirus (z <i>Bovine papillomavirus</i> )
CcPV	papilomavirus Karety obecné (z <i>Caretta caretta papillomavirus</i> )
CcrPV	papilomavirus Hyeny skvrnité (z <i>Crocuta crocuta papillomavirus</i> )
CgPV	papilomavirus Guerézy pláštíkové (z <i>Colobus guereza papillomavirus</i> )
CmPV	papilomavirus Karety obrovské (z <i>Chelonia mydas papillomavirus</i> )
CPP	peptidy penetrující membránu (z angl. <i>cell-penetrating peptides</i> )
CyPB	cyklofilin B
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
FIPV	papilomavirus Frankolína žlutokrkého (z <i>Francolinus leucoscepus papillomavirus</i> )
FPV, FcPV	papilomavirus Pěnkavy obecné (z <i>Fringilla coelebs papillomavirus</i> )
HPV	lidský papilomavirus
HSPG	heparansulfátové proteoglykany
hTert	lidská telomerázová reverzní transkriptáza
IRES	vnitřní místo pro vstup ribozomu (z angl. <i>internal ribosome entry site</i> )
LRT	luciferázový reportérový test
MfPV	papilomavirus Makaka jánského (z <i>Macaca fascicularis papillomavirus</i> )
MmPV	papilomavirus Makaka rhesus (z <i>Macaca mulatta papillomavirus</i> )
MPyV	myší polyomavirus
MsPV	papilomavirus Krajty diamantové (z <i>Morelia spilota spilota papillomavirus</i> )
MusPV, MmuPV	papilomavirus myši domácí (z <i>Mus musculus papillomavirus</i> )
NHS-Rhod	NHS-Rhodamine
OD	optická hustota (z angl. <i>optical density</i> )
pb	páru bazí
PcPV	papilomavirus Pumy americké (z <i>Puma concolor papillomavirus</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce
PePV	papilomavirus Papouška šedého (z <i>Psittacus erithacus papillomavirus</i> )
PIPV	papilomavirus Mývala severního (z <i>Procyon lotor papillomavirus</i> )
PsVs	pseudoviriony
PtPV	papilomavirus Šimpanze učenlivého (z <i>Pan troglodytes papillomavirus</i> )
RaPV	papilomavirus Kaloně egyptského (z <i>Rousettus aegyptiacus papillomavirus</i> )
RE	restrikční enzym
RM	restrikční místo
RS	restrikční směs
SaPV	papilomavirus Mořana zlatého (z <i>Sparus aurata papillomavirus</i> )
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného
TGN	trans-Golgiho aparát (z angl. <i>trans-Golgi network</i> )
vDNA	virová deoxyribonukleová kyselina
vDNA/L2	komplex virové deoxyribonukleové kyseliny a minoritním kapsidovým proteinem L2
VLPs	virům podobné částice (z angl. <i>virus-like particles</i> )

# 1 Úvod

Myší papilomavirus je jedním z relativně nedávno (2011) objevených zvířecích papilomavirů a je prvním myším papilomavirem, který přirozeně infikuje imunodeficientní myši, a zároveň u něj byla prokázána schopnost přenosu z těchto imunodeficientních myší na imunokompetentní jedince stejného druhu. Obecně jsou papilomaviry malé neobalené viry obsahující dvouvláknovou virovou DNA. Kapsida těchto virů je složena ze dvou proteinů, a to majoritního proteinu L1 a minoritního proteinu L2. L1 resp. komplex L1/L2 proteinů se vyznačuje schopností „samoskládání“, čehož je možné využít při produkci nanočástic odvozených od papilomavirů tzv. pseudovirionů (PsVs) a virům podobných částic (VLPs).

Dnes je známo více než 200 druhů lidských papilomavirů. Papilomaviry, které u svého hostitele způsobují onemocnění, je možné rozdělit na méně nebo vysoce rizikové. Méně rizikové papilomaviry svým hostitelům způsobují různé typy bradavic a kožních novotvarů. U vysoce rizikových papilomavirů je znám jejich onkogenní potenciál a byla prokázána kauzalita mezi jejich přítomností v hostiteli a rizikem vzniku novotvarů vedoucích k nádorovému bujení. Mezi rakovinná onemocnění, která jsou způsobována papilomaviry patří mimo jiné karcinom děložního čípku nebo zhoubné nádory krku a hlavy. Díky svým vlastnostem je myší papilomavirus vhodným modelem pro studium papilomavirových onemocnění.

Roku 2016 byla publikována studie zabývající se vztahem mezi papilomaviry a nádorovými buňkami (Kines *et al.*, 2016), ve které potvrdili, že nanočástice odvozené od lidského papilomaviru preferenčně vážou nádorové buňky. Tato diplomová práce částečně navazuje na jejich snažení a zkoumá interakce mezi virovými částicemi odvozenými od myšího papilomaviru – PsVs a VLPs – a vybranými nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi.

Snahou této práce je potvrdit již známé skutečnosti platící pro lidské papilomaviry i pro myší papilomavirus a tudíž poskytnout možnost pro další bádání, které by mohlo vést k tvorbě terapeutického nebo diagnostického systému pro léčbu některých nádorových onemocnění, založeného na podstatě PsVs a VLPs odvozených od MusPV.

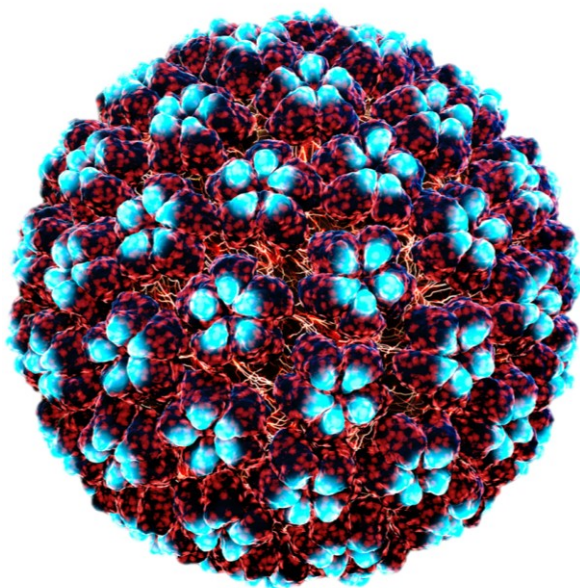


## 2 Literární přehled

### 2.1 Papilomaviry

Papilomaviry jsou malé neobalené viry patřící do čeledi *Papillomaviridae* a dle Baltimorovy klasifikace se řadí do 1. třídy sdružující DNA viry s dvouvláknovým genomem (de Villiers *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2010). Primárně infikují bazální epiteliální buňky, a to především savců, ale v průběhu let byla prokázána přítomnost těchto virů i u jiných obratlovců. Mimo jiné byly nalezeny u některých druhů ptáků (*Fringilla coelebs papillomavirus 1* (FPV, FcPV) - Osterhaus *et al.*, 1977; *Psittacus erithacus papillomavirus* (PePV) Tachezy *et al.*, 2002; *Psittacus erithacus papillomavirus* (PePV), *Fringilla leucoscepus papillomavirus 5* (FIPV5) - Pérez-Tris *et al.*, 2011; Truchado *et al.*, 2018), ryb (*Sparus aurata papillomavirus 1* (SaPV1) López-Bueno *et al.*, 2016) a plazů (Drury *et al.*, 1998; *Chelonia mydas papillomavirus 1* (CmPV1), *Caretta caretta papillomavirus 1* (CcPV1) - Herbst *et al.*, 2008; *Morelia spilota spilota papillomavirus 1* (MsPV1) - Lange *et al.*, 2011).

Všeobecně papilomavirové částice vykazují ikosahedrální symetrii kapsidy s průměrem od 50 nm do 60 nm. Virová kapsida (Obr. č. 1) se skládá ze dvou virových proteinů – majoritní kapsidový protein L1 a minoritní kapsidový protein L2. Tyto proteiny se skládají do 72 pentamerů, kdy jedna kapsomera je tvořena pěti majoritními kapsidovými proteiny



L1 a jedním minoritním proteinem L2 nacházejícím se uvnitř pentameru, což bylo prokázáno u lidského papilomaviru typu 16 (HPV16) (Modis *et al.*, 2002; Buck *et al.*, 2013; Wang & Roden, 2013). Uvnitř kapsidy se nachází virový genom skládající se z dvouvláknové DNA o velikosti v rozmezí 7 až 8 tisíců párů bází. Genom je v kapsidě v kondenzované formě. U lidského papilomaviru (HPV) a bovinního

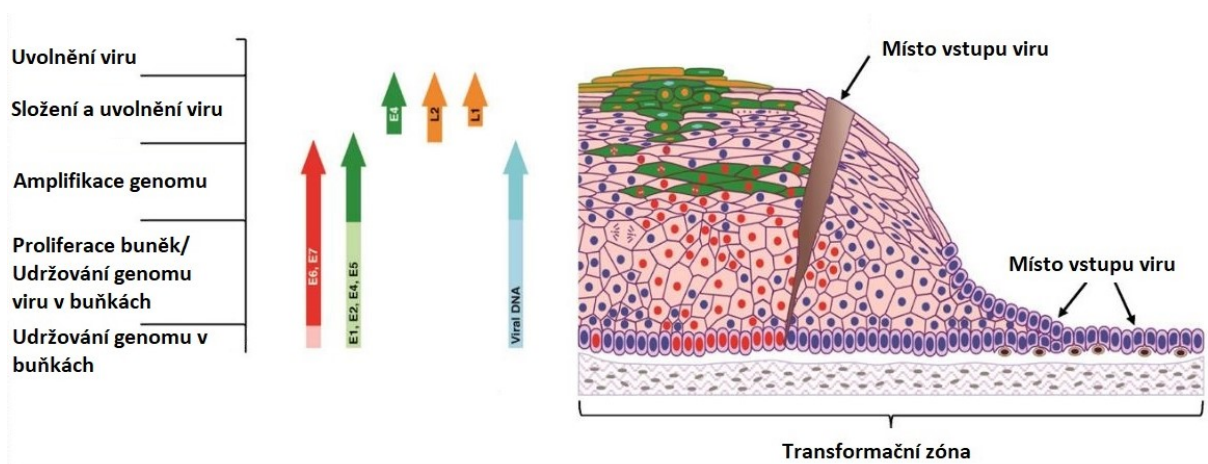
**Obr. č. 1 - Strukturální model kapsidy lidského papilomaviru typu 16**

Virová kapsida skládající se z pentamerů (modře) majoritního proteinu L1.

Převzato a upraveno: Hahn & Spach, 2018

papilomaviru (BPV) bylo prokázáno, že tomuto uspořádání napomáhají buněčné histony, které jsou získávány z infikovaných hostitelských buněk (Favre *et al.*, 1977). Genom papilomavirů kóduje časný (E, z angl. *early*) a pozdní geny (L, z angl. *late*). Časný geny obsahují sekvence pro regulační proteiny, které regulují transkripci a replikaci a mohou se angažovat v regulaci transformačních procesů v buňkách. Pozdní geny oproti tomu kódují již zmíněné strukturální proteiny L1 a L2, které jsou hlavními strukturálními prvky virové kapsidy (Tab. č. 1), (de Villiers *et al.* 2004; Buck *et al.*, 2013; Wang & Roden, 2013). Exprese jednotlivých genů papilomavirů úzce souvisí s diferenciací infikovaných epitelálních buněk v čase (Obr. č. 2).

Životní cyklus lidských genitálních papilomavirů začíná průchodem virových částic skrz epitel. Zde díky prvotnímu poranění pronikají až k bazálním epitelálním buňkám. Druhou možností je infekce buněk transformační zóny děložního hrdla, kdy se virus dostává k buňkám bez předchozího poranění (Obr. č. 2), což bylo prokázáno například u HPV16 ve studii Doorbar *et al.*, 2012 nebo u HPV16, 18, 31, 45 a 53 ve studii Siegler *et al.*, 2017. Za transformační zónu děložního hrdla se považuje oblast přechodu mezi originálním a cylindrickým epitelem. V této zóně je možné rozeznávat různé stupně vyžívání buněk (Havránková & Ondruš, 2004)



**Obr. č. 2 - Schématické znázornění vstupu viru HPV16 skrze poranění, resp. vstup viru přímým kontaktem s bazálními epitelálními buňkami v transformační zóně**

HPV16 se váže na bazální membránu nebo povrch bazálních epitelálních buněk nacházejících se v transformační zóně děložního hrdla, v průběhu diferenciaci epitelálních buněk dochází k postupné expresi různých papilomavirových genů, po vstupu virového genomu do jádra buňky dochází k počáteční amplifikaci virového genomu a následnému udržování genomu v epizomální formě, prvními exprimovanými virovými geny jsou časný geny E1 a E2, s postupem diferenciaci jsou dle potřeb viru exprimovány ostatní časný geny E4, E5, E6, E7, ve finální fázi diferenciaci dochází k expresi pozdních genů L1 a L2, což má za následek skládání virové kapsidy a tvorbu funkčních virových částí, převzato a upraveno: Doorbar *et al.*, 2012

Dalším kritickým krokem je vazba částic na heparansulfátové proteoglykany (HSPG), které fungují jako primární receptory pro vazbu na bazální membránu a/nebo hostitelskou buňku, jak bylo prokázáno u HPV11 (Joyce *et al.*, 1999), HPV16 a 33 (Giroglou *et al.*, 2001), HPV5, 16, 31 (Johnson *et al.*, 2009) a také u HPV16 (Abban & Meneses, 2010).

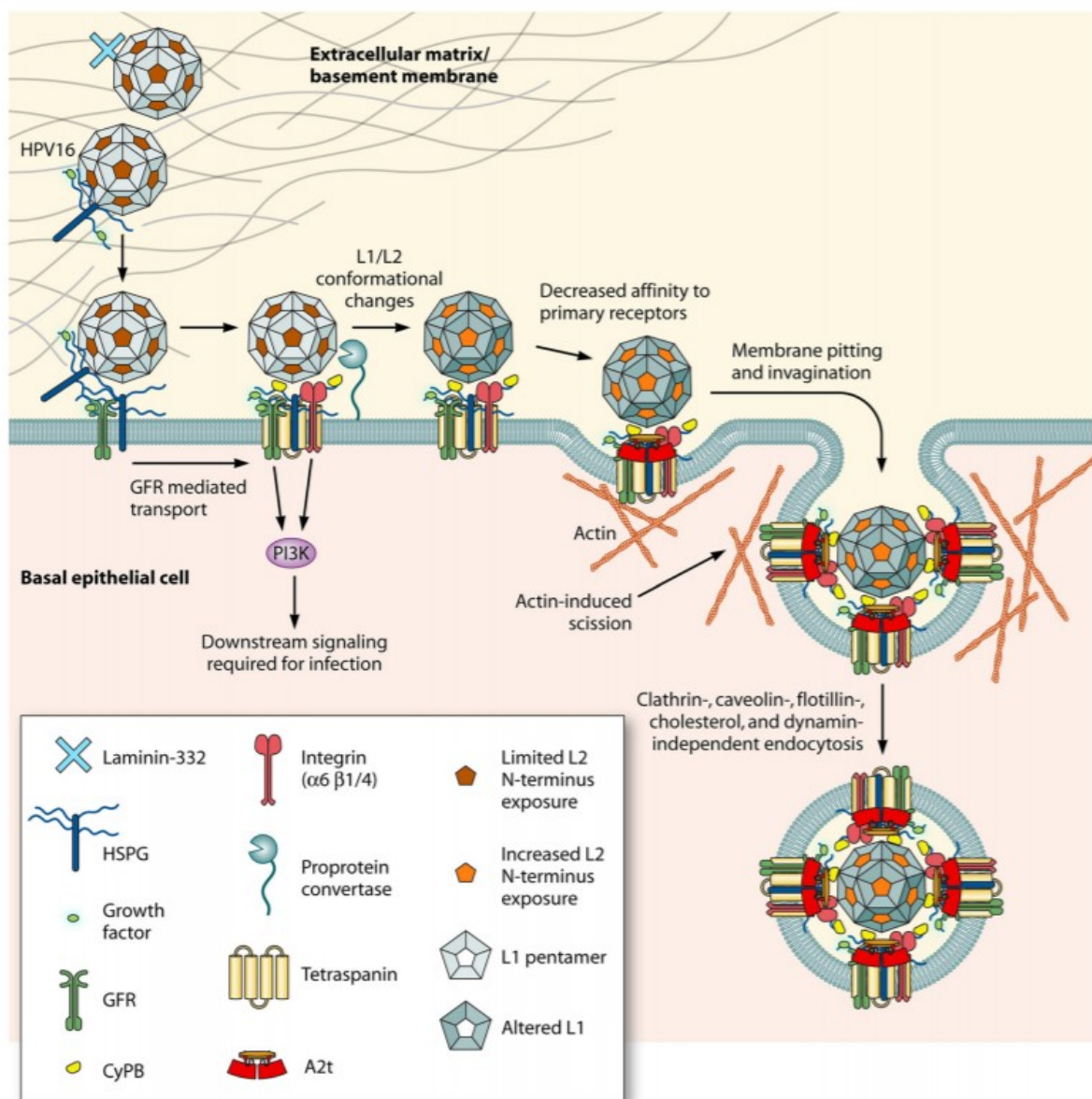
U virů HPV11 (Culp *et al.*, 2006) a HPV11, 16, 18 a 45 (Broutian *et al.*, 2010; Brendle & Christensen, 2014) bylo prokázáno, že vazba na bazální membránu může být také zprostředkována lamininem-332 (dříve označovaném jako laminin-5). Vazba na HSPG způsobuje konformační změny kapsidových proteinů, což umožňuje následnou vazbu na receptor zprostředkovávající vstup viru do hostitelské buňky. Tyto konformační změny jsou zprostředkovány cyklofilinem B (CyPB) (Bienkowska-Haba *et al.*, 2009). Prozatím nejsou receptory zodpovědné za vstup viru do buňky dostatečně prozkoumány a charakterizovány. V průběhu let však vznikly studie, které do jisté míry přisuzují tuto funkci například integrinu  $\alpha_6$  jako ve studii Evander *et al.*, 1997, ve které byl integrin  $\alpha_6$  zkoumán při použití virům podobných částic (VLPs) viru HPV6b. Integrinem  $\alpha_6$  se také zabývali ve své studii i Yoon *et al.*, 2001, kteří pracovali s VLPs viru HPV16 a Abban & Meneses, 2010, kteří využili pseudoviriony (PsVs) téhož viru, tedy HPV16. Dalšími kandidáty na post sekundárního receptoru pro vstup viru do buňky jsou: tetraspanin CD151, jenž bylo zkoumán ve studiích Spoden *et al.*, 2008 a Scheffer *et al.*, 2013 za použití HPV16 PsVs, receptory pro růstové faktory (EGFR) zkoumané ve studii Surviladze *et al.*, 2012 vypracované na PsVs virů HPV16 a HPV31, a nebo heterotetramer annexinu 2 (A2t), jenž byl zkoumán ve studii Woodham *et al.*, 2012 na PsVs i VLPs viru HPV16 a studii Dziduszko & Ozbun, 2013, kteří použili PsVs viru HPV16 (Obr. č. 3). Ve své studii využívající PsVs viru HPV16 Spoden *et al.*, 2008 rovněž předložili fakt, že papilomaviry vstupují do nediferencovaných bazálních buněk prostřednictvím endocytózy nezávislé na klatrinu, kaveolinu, flotilinu, cholesterolu a dynaminu.

Po vstupu viru do hostitelské buňky dochází k umístění virové částice do buněčného endozomu. Při maturaci endozomu dochází ke snižování endozomálního pH. Změna pH je klíčová pro štěpení minoritního kapsidového proteinu L2 za účasti furinu, což je endoproteáza vyskytující se v buněčných kompartmentech (Gary, 2007). To bylo testováno ve studii Richards *et al.*, 2006 na PsVs odvozených od HPV5, 6, 16, 18, 31 a ve

studii Smith *et al.*, 2008 využívající HPV31. Následně dochází k včlenění sestřiženého L2 proteinu do endozomální membrány za účasti buněčné  $\gamma$ -sekretázy, jak dokazují ve své studii Inoue *et al.*, 2018 při použití PsVs viru HPV5 a HPV16 a také včlenění penetrující peptidové domény (CPPs, z angl. *cell-penetrating peptides*) nacházející se na C-konci L2 proteinu, což prokázali Zhang *et al.*, 2018 u PsVs viru HPV5 a HPV16. Takto umístěný protein vyčnívá z endozomu do cytosolu svým C-koncem a interaguje s retromerem, který je zodpovědný za retrográdní transport viru k *trans* Golgiho aparátu (TGN, z angl. *trans-Golgi network*), což bylo prokázáno u PsVs HPV16 skupinou Lipovsky *et al.*, 2013 a Popa *et al.*, 2015. Retrográdní transport je završen fúzí endozomálního váčku s TGN a uvolněním virového genomu v komplexu s proteinem L2 (vDNA/L2).

Vstup virové DNA (vDNA) do jádra je přímo závislý na buněčném cyklu, resp. probíhající mitóze hostitelské buňky. Zastavení buněčného cyklu vede k akumulaci komplexu vDNA/L2 v TGN. Pouze v případech, kdy hostitelská buňka překoná kontrolní bod buněčného cyklu mezi G2 fází a mitotickou fází, dochází k transportu vDNA/L2 do jádra, jak to prezentovali Pyeon *et al.*, 2009 a Calton *et al.*, 2017 na viru HPV16 a od něj odvozených PsVs.

V jádře buňky dochází k počáteční amplifikaci virového genomu a jeho udržování v epizomální formě (Doorbar, 2005). Tento fakt byl prokázán mimo jiné u PsVs viru HPV16 ve studii Pyeon *et al.*, 2009. Následná diferenciací vede k expresi jednotlivých virových genů, ať už časných (E) od počátečních fází nebo pozdních (L) ve finální fázi v již terminálních keratinocytech. Po expresi L1 a L2 proteinu dochází k samoskládání do podoby virové kapsidy, do které je umístěn virový genom. Tento fakt byl prokázán ve studii Hagensee *et al.*, 1993 využívající expresní vektory viru vakcínie obsahující geny pro L1 a L2 kapsidové proteiny viru HPV1. Takto vzniklá funkční částice je uvolňována z hostitelských buněk. Papilomaviry z pravidla nelyzují hostitelské buňky a k jejich uvolnění dochází přirozeným odumíráním a rozpadem svrchní vrstvy keratinocytů, popřípadě se může angažovat virový protein E4, který váže cytokeratinová vlákna a zároveň je destruuje, což napomáhá rozpadu buněk (Doorbar, 2013). Organizace genomu a funkce jednotlivých produktů virových genů HPV16 jsou shrnuty v Tab. č. 1.

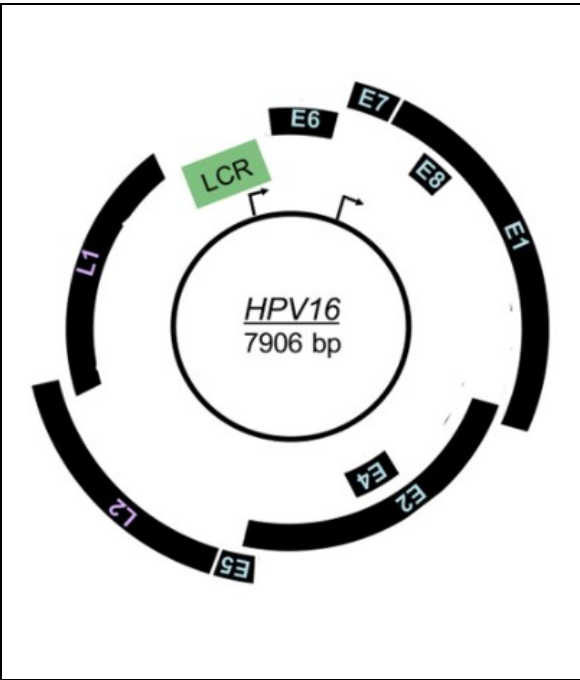


**Obr. č. 3 - Schématické znázornění vazby HPV16 na bazální membránu, resp. bazální epiteliální buňku a vstup viru do buňky**

HPV16 se váže na bazální membránu (*basement membrane*) nebo povrch bazálních epiteliálních buněk (*basal epithelial cell*) skrze heparansulfátové proteoglykany (HSPG) a/nebo laminin-332. Procesu vazby se mohou účastnit také epiteliální nebo keratinocytové růstové faktory (*grow factors*), jež se, v takovém případě, vyskytují v komplexu s HSPG a mohou iniciovat vnitrobuněčné signální kaskády, např. aktivaci fosfatidylinositol-3-kinázové dráhy. Po vazbě na HSPG dochází ke konformačním změnám kapsidy, jež jsou umožněny díky cyklofilinu B (CyPB). Tyto konformační změny L1 a L2 kapsidových proteinů mají za následek odhalení větší části N konce proteinu L2. Poté dochází k oslabení vazby mezi virovou částicí a HSPG a vazbě na sekundární receptory, které se podílí na vstupu částice do buňky. Za tyto sekundární receptory jsou dnes považovány integrin  $\alpha_6$ , heterotetramer annexinu 2 (A2t), tetraspanin a receptory pro růstové faktory (*grow factor receptor*). Virus vstupuje do hostitelské buňky pomocí endocytózy nezávislé na klatrinu, kaveolinu, flotilinu, cholesterolu a dynaminu. Převzato a upraveno: Raff *et al.*, 2013

**Tab. č .1 - Organizace genomu viru HPV16 a funkce jednotlivých virových proteinů**

Převzato a upraveno: Harden & Munger, 2017

	<b>E1</b>	protein vázající počátek replikace, ATP-závislá helikáza
	<b>E2</b>	regulátor transkripce virového genomu, asociace s E1, podílí se na rozdělování virového genomu
	<b>E4</b>	protein destabilizující síť cytokeratinová vlákna, podílí se na úniku a šíření viru
	<b>E5</b>	malý transmembránový protein, interaguje s EGFR a tím aktivuje mitogenní dráhy
	<b>E6</b>	působí na buněčný cyklus, což umožňuje amplifikaci genomu ve vyšších epiteliálních vrstvách, asociuje s E6AP a degraduje p53, aktivuje hTert
	<b>E7</b>	působí na buněčný cyklus, což umožňuje amplifikaci genomu ve vyšších epiteliálních vrstvách, váže pRB a způsobuje jeho degradaci, může způsobovat mutace během mitózy
	<b>E8</b>	působí jako represor transkripce a replikace virového genomu
	<b>L1</b>	majoritní kapsidový protein, tvoří pentamerní struktury a udává tvar kapsidy
<b>L2</b>	minoritní kapsidový protein, váže se do vnitřní části pentameru L1, účastní se vstupu a transportu viru v buňce	
<b>Časná oblast:</b> časná oblast kóduje proteiny důležité pro virovou replikaci		
<b>Pozdní oblast:</b> pozdní oblast kóduje proteiny virové kapsidy		
<b>LCR:</b> sekvence kontrolující virovou replikaci a transkripci		

## 2.2 Papilomaviry a jimi způsobovaná onemocnění

V dnešní době je známo více než 200 typů papilomavirů, jejichž hostitelem je člověk (Graham, 2017). Papilomaviry se přenáší blízkým stykem sliznic nebo pokožky a poté vstupují do hostitele skrze drobné poranění nebo v oblasti transformační zóny (Doorbar *et al.*, 2012). Velká většina těchto virů je v lidské populaci běžná a všudypřítomná a ve svých hostitelích se vyskytují bez viditelných příznaků, popřípadě může docházet k tvorbě méně či více závažných benigních bradavic. Papilomaviry, které se takto projevují, označujeme za méně rizikové (HPV6 a HPV11). V některých případech dochází k tvorbě novotvarů vedoucí ke vzniku karcinomů, mimo jiné karcinomu děložního čípku nebo zhoubným nádorům hlavy a krku. Tyto papilomaviry jsou označovány jako vysoce rizikové a patří mezi ně například sexuálně přenosný HPV16 nebo HPV18 (Siegler *et al.*, 2017).

V současné době jsou v České republice dostupné tři funkční vakcíny proti HPV, a to Cervarix, Gardasil a Gardasil 9.

Vakcína Cervarix je účinná proti HPV16 a HPV18. Jedná se o rekombinantní vakcínu obsahující mimo jiné virům podobné částice (VLPs) složené z kapsidového proteinu L1. Tyto částice jsou vyráběny rekombinantní DNA technologií s využitím bakulovirového expresního systému <sup>1</sup>.

Vakcína Gardasil je účinná proti HPV6, HPV11, HPV16 a HPV18. Jedná se o rekombinantní vakcínu obsahující mimo jiné virům podobné částice získané rekombinantní DNA technologií ve kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* <sup>2</sup>.

Vakcína Gardasil 9 je účinná proti HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV45, HPV52 a HPV58. Jedná se o rekombinantní vakcínu vyráběnou rekombinantní DNA technologií ve kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* <sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/cervarix-epar-product-information\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/cervarix-epar-product-information_cs.pdf)

<sup>2</sup> [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/gardasil-epar-product-information\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/gardasil-epar-product-information_cs.pdf)

<sup>3</sup> [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gardasil-9-epar-product-information\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gardasil-9-epar-product-information_cs.pdf)

## 2.3 Myší papilomavirus

Zvířecí papilomaviry jsou hojně využívanými laboratorními modely při výzkumu různých aspektů spojených s infekcemi způsobovanými lidskými papilomaviry, a to jednak kvůli bezpečnosti a také snadnější manipulaci. Papilomaviry byly objevovány průběžně u rozličných druhů savců, ptáků, ryb a plazů. Byla také objevena celá řada papilomavirů specializujících se na hlodavce, mezi které se řadí například *Micromys minutus* papilomavirus 1, *Phodopus sungorus* papilomavirus 1, *Mastomys natalensis* papilomavirus 1 a jiné (Uberoi & Lambert, 2017).

V roce 2011 Ingle *et al.* objevili nový zvířecí papilomavirus – *Mus musculus* papilomavirus 1 (MusPV, někdy též MmuPV1), který se vyskytl v kolonii laboratorních myší domácích (*Mus musculus*, kmen *NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>/ Foxn1<sup>nu</sup>*). Nově objevený MusPV se od ostatních papilomavirů napadajících druh *Mus musculus* liší mimo jiné tím, že se jedná o první myší papilomavirus, který přirozeně infikuje imunodeficientní myši, ale byl u něj zároveň prokázán přenos z těchto imunodeficientních myší na imunokompetentní jedince stejného druhu (Ingle *et al.*, 2011). Tento objev značně ovlivnil budoucí výzkum papilomavirů, neboť umožňuje pozorování viru v kontrolovaných laboratorních podmínkách na dobře dostupném a popsaném modelovém organismu, jakým je právě *Mus musculus* (Uberoy *et al.*, 2018).

U zmíněného myšího kmenu MusPV způsobuje léze na hranici mezi kožním a slizničním epitelem v oblasti tlamy a čenichu. Tyto léze nepřecházejí do slizniční oblasti a jsou zbarvovány do bílé, místy až hnědé barvy o velikosti od tří milimetrů v průměru a vyčnívají jeden až dva milimetry nad povrch kůže. Vlastní výrůstky pak dosahují délky od deseti do dvanácti milimetrů (Obr. č. 4) (Ingle *et al.*, 2011).



**Obr. č. 4 - Tlama a čenich laboratorní myši (*Mus musculus*, *NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>/ Foxn1<sup>nu</sup>*)**

Léze na rozhraní kožního a slizničního epitelu, převzato a upraveno: Ingle *et al.*, 2011



## 2.4 Pseudoviriony a virům podobné částice

Kapsidové proteiny nejen papilomavirů se vyznačují specifickou vlastností, kdy za určitých podmínek dochází k samoskládání jednotlivých proteinů do podoby částic, které jsou podobné částicím divokého viru. Nomenklatura označení těchto částic je v literatuře nejednotná. Často jsou tyto částice označovány jako pseudoviriony nebo virům podobné částice (VLPs, z angl. *virus-like particles*) (Hagensee *et al.*, 1993, Kirnbauer *et al.*, 1993). V poslední době se ustálil konsensus, že za pseudoviriony jsou považovány částice obsahující specifický reportérový gen ve formě plasmidu, zatímco VLPs jsou prázdné virové kapsidy (Conway & Meyers, 2009).

Roku 2016 Cerqueira *et al.* publikovali studii zabývající se rozkladem a samoskládáním kapsid HPV16 v bezbuněčném *in vitro* systému, za přítomnosti buněčných nukleárních extraktů a ATP. V této studii prokázali, že pokud je uskutečněno samoskládání virových kapsid v přítomnosti DNA, dochází k jejímu vkládání do nově vznikajících částic. Mimo jiné popsali mechanismus, kdy se virové částice snaží pojmout DNA do svého nitra, a to tak, že neustále zkoušejí různé molekuly DNA o různých délkách, ale jedině DNA nepřesahující délku přirozeného virového genomu – přibližně 8 tisíc pb, může být částicí pojmuta. Také bylo zjištěno, že již složené VLPs částice neobsahující DNA, vložené do popsaného *in vitro* systému dokáží pohlcovat molekuly DNA ze svého prostředí, tedy že dochází k destabilizaci kapsidy, umožňující vstup DNA do jejího nitra. Toto zjištění je možné dát do kontrastu s faktem, že pokud byly použity částice již obsahující DNA, nedocházelo k výměně obsahu kapsidy za DNA vyskytující se v jejich okolí. Z toho vyplývá, že pokud virová částice již obsahuje DNA ve svém nitru, tato DNA částici stabilizuje, a tedy neumožňuje enzymům nacházejícím se v nukleárním extraktu svou destabilizaci (Cerqueira *et al.*, 2016).

Částice odvozené od papilomavirů by mohly být využity jak k diagnostickým, tak k terapeutickým účelům. V prvním případě je možné na takto vzniklou částici navázat specifickou značku a/nebo využít reportérový gen přítomný uvnitř částice, což dále umožní mimo jiné vizualizovat buňky s nádorovým charakterem. V druhém případě, je možné „zabalit“ do takovýchto částic specifické geny sloužící k terapii poškozených částí genomu nebo přímo k likvidaci nádorových buněk – sebevražedné geny (Zarogoulidis *et al.*, 2013).

Na VLPs je dnes také založena celá řada vakcín, využívající buď odvozené VLPs od daného patogenu, nebo rekombinantní VLPs, které na svém povrchu nesou imunomodulantní epitopy typické pro jiné viry, popřípadě znaky charakterizující nádorové buňky.

### 2.4.1 Savčí expresní systém pro přípravu papilomavirových PsVs

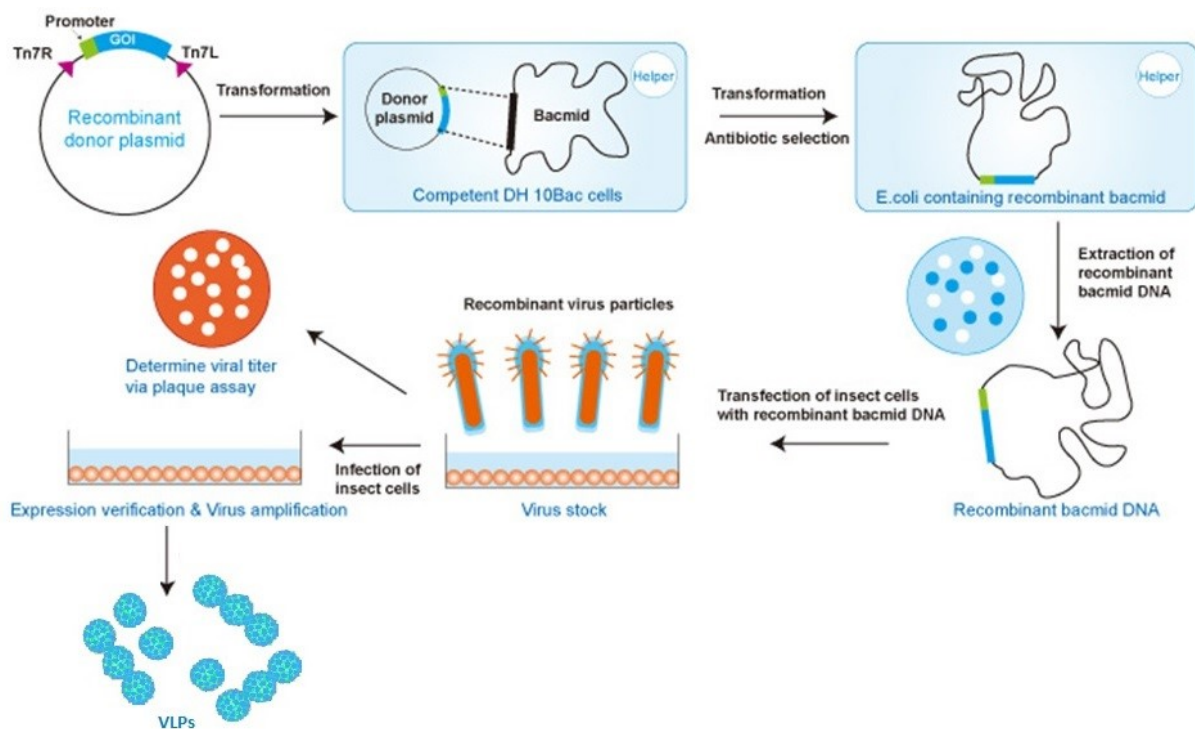
Savčí expresní systém je expresní systém využívající savčí buněčné linie schopné produkovat rekombinantní proteiny a je využíván zejména díky možnosti přirozeného prostorového uspořádání proteinu a jeho posttranslačním modifikacím, které jsou velmi podobné lidským. Na druhou stranu se savčí expresní systém vyznačuje vysokou cenou růstových médií, časovou náročností, ztíženou možností kontroly průběhu N-glykosilace, a v neposlední řadě také rizikem šíření virových nebo prionových nákaz (Sethuraman & Stadheim, 2006).

Roku 2004 Buck *et al.* publikovali studii zabývající se přípravou PsVs v savčím expresním systému, který oproti předchozím variantám vyniká svou efektivností a jednoduchostí. V této studii se zaměřili na produkci PsVs BPV1 a HPV16. K dosažení co možná nejvyšší míry koexprese L1 a L2 proteinu, vytvořili bicistronní L1/L2 plasmid obsahující vnitřní místo pro vstup ribozomu (IRES, z angl. *internal ribosome entry site*) pro virus myší encefalomyokarditidy (Buck *et al.*, 2004).

## 2.4.2 Bakulovirový expresní systém pro přípravu VLPs

Bakulovirový expresní systém je expresní systém vyžadující přípravu rekombinantního bakuloviru, který disponuje silnými promotory a umožňuje vysokou produkci genu našeho zájmu v hmyzích buňkách. Pro přípravu papilomavirových VLPs lze s výhodou využít komerčně dostupný systém Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, který slouží pro rychlou přípravu rekombinantního bakuloviru a lze s jeho pomocí produkovat proteiny L1 i L2 (Obr. č. 5).

Při produkci L1 proteinu pomocí bakulovirového expresního systému bylo zjištěno, že tento systém produkuje 3 velikosti L1 proteinu. Velikost se odvíjí dle použitého start kodonu (kodon pro methionin (Met)) – jsou tedy produkovány 3 typy L1 proteinů o velikostech 60,6 kDa (2. kodon pro Met), 57,6 kDa (28. kodon pro Met) a 57,4 kDa (30. kodon pro Met), (Joh *et al.*, 2014). Pro experimentální část této práce byl používán gen s 28. kodonem pro Met (predikce velikosti L1 proteinu je tedy 57,6 kDa).



**Obr. č. 5 - Schéma bakulovirového expresního systému**

K přípravě rekombinantního bakuloviru je používán donorový vektor např. pFastBac Dual. Donorový vektor pFastBac Dual obsahuje 2 promotory – polyhedrinový a p10 promotor, pod které je možné klonovat geny našeho zájmu. Takto připravený plasmid je transfekován do DH10Bac bakterií, které obsahují kyvadlový a pomocný plasmid. Díky tomu dochází v DH10Bac bakteriích k místně specifické rekombinaci, jejímž produktem je rekombinantní plasmid obsahující rezistenci k vybraným antibiotikům: gentamicin, kanamycin a tetracyklin, a zároveň obsahuje přerušovaný LacZα gen

Na selekčním médiu obsahujícím X-Gal a IPTG je možné odlišit monoklonie DH10Bac bakterií, které obsahují gen našeho zájmu, jenž se zbarvují na selekčním médiu bíle, zatímco monoklonie u kterých nedošlo k uchycení genu našeho zájmu, se zbarvují modře dalším krokem je izolace bakmidové DNA z bíle zbarvených kolonií, která je transfekována do Sf9 buněk, v těchto buňkách dochází k produkci rekombinantního bakuloviru, který se uvolňuje do média, to je možné využít jakožto inokulum pro opětovnou infekci, proteiny našeho zájmu jsou produkovány v Sf9 buňkách ze kterých jsou izolovány

Převzato: Invitrogen, Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, User guide

## 2.5 Aplikační potenciál virových částic odvozených od papilomavirů

Nové přístupy v nanomedicině vedou k rozvoji postupů, které pro diagnostiku a terapii vybraných nádorových onemocnění experimentálně využívají VLPs a PsVs. Virové částice s radioaktivním nebo fluorescenčním značením mohou být využity k detekci nádorových buněk již v počátečních stádiích rakovinného bujení. Také je možné využití těchto částic

při doručování terapeutických látek (např. sebevražedných genů) majících za úkol likvidaci nádorových buněk bez větších vedlejších následků pro pacienta (Ma *et al.*, 2011).

Stranou pozornosti nestojí ani papilomavirové částice (Xu *et al.*, 2006). Roku 2016 Kines *et al.* publikovali studii zabývající se preferenční vazbou papilomavirových částic – pseudovirionů (PsVs) a virům podobných částic (VLPs) – na některé typy nádorových buněk. Na základě jejich zjištění došli k závěru, že VLPs a PsVs odvozené od lidského papilomaviru by mohly být potencionálně využitelné při diagnostice a terapii některých nádorových onemocnění, jako jsou například rakovina vaječníků nebo rakovina plic. Ačkoli se tyto druhy rakoviny řadí mezi 10 nejčastějších onemocnění, které mají na svědomí nejvíce úmrtí, je dnešní léčba těchto onemocnění nedostatečná a soustředěná převážně na chirurgické odstraňování nádorové tkáně, radioterapii a chemoterapii. Při použití těchto léčebných postupů dochází nezdědká k vzniku rezistencí vůči použitým léčivům a častým opakovaným manifestacím onemocnění. Dalším hlavním problémem zůstává neschopnost identifikovat rakovinné onemocnění v nejranějších stádiích, kdy je také nejvyšší pravděpodobnost vyléčení (Reck *et al.*, 2013; Webb & Jordan, 2017). Na práci Kines *et al.* (Kines *et al.*, 2016) navázal roku 2018 Bayer *et al.* (Bayer *et al.*, 2018), kteří otestovali účinnost přenosu genů pomocí PsVs odvozených od 10-ti druhů zvířecích papilomavirů s kladným výsledkem (CcPV, CgPV1, PtPV1, CcrPV1, MfPV6, MfPV11, PIPV1, PcPV1, MmPV1 a RaPV1).

Využití VLPs a PsVs umožňuje také fakt, že v některých nádorových buňkách dochází k nadměrné expresi, mutacím a změnám HSPG, jako je například odstranění sulfátu z kyslíku v pozici 6, za pomoci extracelulárních enzymů - sulfatáz (Sanderson *et al.*, 2005; Hammond *et al.*, 2014). Tyto změny napodobují vzor HSPG na bazální membráně, jejichž funkcí je například buněčná signalizace, podpora angiogeneze, vazba růstových faktorů a chemokinů (Tumova *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; Fuster & Wang, 2010).

Přítomnost modifikovaných HSPG u nádorových buněk funguje jako selekční značka, která vede k vazbě virových částic a infekci pouze těchto buněk, zatímco zdravé buňky, které na svém povrchu nevystavují zmíněné pozměněné HSPG, zůstávají bez povšimnutí (Kines *et al.*, 2016).

Pro případné klinické využití VLPs jako nosičů diagnostických a terapeutických látek je výhodné využívat VLPs odvozené od zvířecích virů, protože v lidské populaci neexistují

proti těmto virům/VLPs protilátky. Laboratoř Virologie PŘF UK se dlouhodobě věnuje výzkumu aplikačního potenciálu VLPs odvozených od myšího polyomaviru a jejich modifikacím, které by zaručily preferenční vazbu a vstup těchto virů do nádorových buněk (Bouřa *et al.*, 2005, Hrušková *et al.*, 2009, Suchanová *et al.*, 2015, Fraiberk *et al.*, 2017). Zjištění, že VLPs odvozené od papilomavirů mohou přirozeně preferovat pro vazbu a vstup právě nádorové buňky (Kines *et al.*, 2016, Bayer *et al.*, 2018) a fakt, že částice odvozené od MusPV dosud nebyly v tomto ohledu blíže charakterizovány vedly k zadání této diplomové práce. Jejím cílem bylo ověřit hypotézu, že nanočástice odvozené od MusPV interagují s (některými) nádorovými buňkami ochotněji než s buňkami nenádorovými a ověřit, že lze MusPV VLPs vyprodukovat v dostatečném množství a kvalitě pro případné srovnávací studie s VLPs odvozenými od myšího polyomaviru.

### 3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je zjistit, zda se nanočástice odvozené od myšího papilomaviru preferenčně váží na nádorové buňky nebo do nich preferenčně vstupují.

Dílčí cíle při zpracovávání diplomové práce byly následující:

1. V savčím expresním systému vyprodukovat a následně charakterizovat MusPV PsVs nesoucí reportérové geny.
2. Připravit rekombinantní bakuloviry nesoucí L1 nebo L1/L2 geny MusPV pro produkci VLPs v bakulovirovém expresním systému; optimalizovat izolaci VLPs a následně VLPs charakterizovat.
3. Připravit dostatečné množství fluorescenčně značených MusPV VLPs pro analýzu vazebných interakcí s buňkami,
4. Analyzovat interakce fluorescenčně značených MusPV VLPs (analýza vazby na buňky) a MusPV PsVs nesoucích reportérový gen (analýza transfekční účinnosti) s vybranými nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Bakteriální kmeny

- **Bakteriální kmen *Escherichia coli* DH10Bac:** bakteriální kmen použitý pro elektroporaci
- **Bakteriální kmen *Escherichia coli* TOP10:** bakteriální kmen použitý pro elektroporaci

#### 4.1.2 Buněčné linie

- **Buněčná linie LNCaP:** linie lidských nádorových buněk odvozených od karcinomu prostaty
- **Buněčná linie HeLa:** linie lidských nádorových buněk odvozených od adenokarcinomu děložního čípku
- **Buněčná linie HEK-293:** linie lidských embryonálních ledvinných buněk transformovaná virovou DNA adenoviru typu 5
- **Buněčná linie U2OS:** linie lidských nádorových buněk odvozených od osteosarkomu
- **Buněčná linie PC3:** linie lidských nádorových buněk odvozených od adenokarcinomu prostaty
- **Buněčná linie NDHF:** linie normálních lidských fibroblastů
- **Buněčná linie Jurkat:** imortalizovaná lidská linie buněčných T-lymfocytů
- **Buněčná linie 3T6:** linie myších fibroblastů
- **Buněčná linie 293TT:** linie lidských embryonálních ledvinných buněk transformovaná DNA adenoviru typu 5 a polyomavirem SV40
- **Buněčná linie Sf9:** linie hmyzích buněk odvozená z ovariální tkáně motýla *Spodoptera frugiperda*

#### 4.1.3 Viry a od nich odvozené částice

- PsVs myšího papilomaviru typu 1 (MusPV1)
- PsVs lidského papilomaviru typu 16 (HPV16)
- PsVs bovinního papilomavirus typu 1 (BPV1)



#### 4.1.4 Primární protilátky

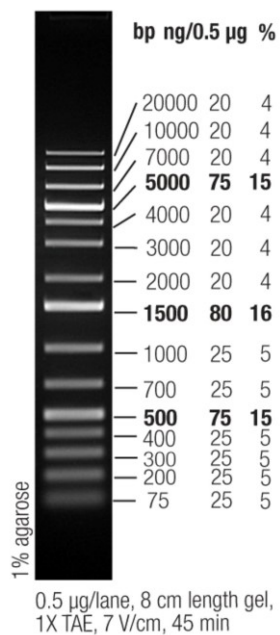
- Králičí polyklonální sérum – Rb $\alpha$ MusPV-N (proti nativním kapsidovým proteinům myšího papilomaviru, ředění 1:500)
- Králičí polyklonální sérum – Rb $\alpha$ MusPV-D (proti denaturovaným kapsidovým proteinům myšího papilomaviru, ředění 1:500)

#### 4.1.5 Sekundární protilátky

- G $\alpha$ Rb-PX – kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředění 1:1000)

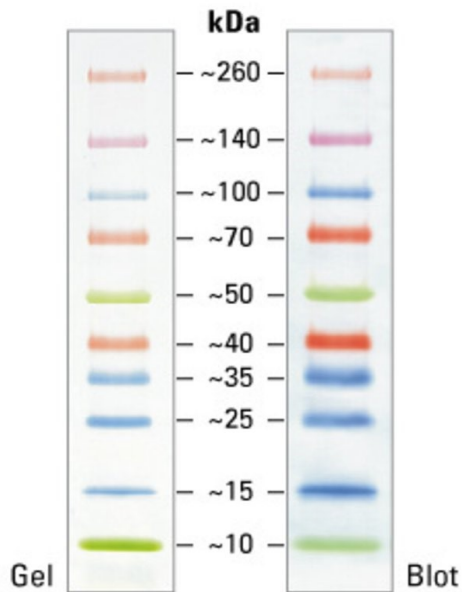
#### 4.1.6 Markery molekulových vah

- DNA marker molekulových vah: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), (Obr. č. 6)



**Obr. č. 6 - DNA Marker molekulových vah**  
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder používaný pro  
DNA elektroforézu

- Marker pro SDS-PAGE: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific), (Obr. č. 7)



**Obr. č. 7 - Marker molekulových vah pro SDS-PAGE**  
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder  
používaný pro proteinovou elektroforézu

#### 4.1.7 Roztoky a chemikálie

- 1x Pufr B
  - 10 mM Tris-HCl (Serva), pH 7,4
  - 150 mM NaCl (Lachner)
  - 0,01 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)
- 1x PBS
  - 137 mM NaCl (Lachner)
  - 2,7 mM KCl (Lachema)
  - 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Penta)
  - 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lachner)
  - upraveno pomocí HCl (Lachner) na pH 7,4
- 1x FoFr pufr
  - 10 mM Tris (Serva), pH 7,4
  - 150 mM NaCl (Lachner)
  - 25 mM Hepes (Sigma), pH 7,4
  - 0,01 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma)

- 1x Tris-acetátový pufr (TAE)
  - 40 mM Tris (Serva)
  - 20 mM kyselina octová (CH<sub>3</sub>COOH)
  - 1 mM EDTA-NaOH, pH 8,0 (Serva)
- 0,5x Tris-borátový pufr (TBE)
  - 45mM Tris (Serva)
  - 45 mM kyselina boritá (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)
  - 1 mM EDTA-NaOH, pH 8,0 (Serva)
- 5x koncentrovaný Laemliho pufr
  - 1,25% SDS (w/v) (Sigma)
  - 50mM Tris – HCl (Serva), pH 6,8
  - 25% β-merkapt ethanol (Serva)
  - 50% (v/v) glycerol (Lachema)
  - 0,005% bromfenolová modř (Lachema)
- 1x Running buffer
  - 25 mM Tris (Serva)
  - 192 mM glycin (Sigma)
  - 0,1% SDS (w/v), (Sigma), pH 8,3
- 1x Blotting buffer
  - 25 mM Tris (Serva)
  - 195 mM glycin (Sigma)
  - 20% (v/v) methanol (Lachema), pH 8,3
- Blokovací roztok
  - 5% (w/v) odtučněné sušené mléko v 1x PBS
- Vyvolávací roztoky pro detekci chemiluminiscence - směs roztoku 1 a 2 v poměru 1:1
  - Roztok 1
    - 0,1 M Tris-HCl (Sigma), pH 8,5
    - 250 mM Luminol (Sigma)
    - 90 mM kyselina p-kumarová (Sigma) v dH<sub>2</sub>O

- Roztok 2
  - 0,1 M Tris-HCl (Sigma), pH 8,5
  - 0,02% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v dH<sub>2</sub>O
- Hmyzí médium se sérem
  - TNM – FH hmyzí medium (Sigma)
  - 10% FBS - fetální sérum z telete (Sigma)
- Hmyzí médium bez séra
  - TNM – FH hmyzí medium (Sigma)
- DMEM médium se sérem
  - DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), (Sigma)
  - 10% (v/v) FBS -fetální sérum z telete (Sigma)
  - 2mM L-glutamin (Gibco)
- DMEM médium bez séra
  - DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), (Sigma)
  - 2mM L-glutamin (Gibco)
- IMDM médium se sérem
  - IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), (Sigma)
  - 10% (v/v) FBS - fetální sérum z telete (Sigma)
  - 2mM L-glutamin (Gibco)
- SOC médium
  - 2% (w/v) pepton pro bakteriologii (Imuna)
  - 0,5% (w/v) extrakt z kvasinek (Imuna)
  - 10 mM NaCl (Sigma)
  - 2,5 mM KCl (Lachema)
  - 20 mM glukóza (Serva)
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma)
  - 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Sigma)
  - Roztoky chloridu hořečnatého a síranu hořečnatého připraveny v koncentraci 100 mM, sterilizovány zvlášť a do média přidány těsně před použitím.

- Antibiotika
  - Ampicilin (Biomedica), koncentrace 100 µg/ml, pro selekci bakteriálních monoklonií
  - Kanamycin (Biomedica), koncentrace 50 µg/ml, pro selekci bakteriálních monoklonií
  - Gentamicin (Biomedica), koncentrace 7 µg/ml, pro selekci bakteriálních monoklonií
  - Tetracyklin (Biomedica), koncentrace 10 µg/ml, pro selekci bakteriálních monoklonií
  - Zeocin (InvivoGen), koncentrace 50 µg/ml, pro selekci bakteriálních monoklonií
  - Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma, Gibco), zásobní roztok je 100x koncentrován, v 1 ml je obsaženo 10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu a 25 mg amphotericinu B

#### 4.1.8 Komerční soupravy

- GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) pro izolaci plasmidu z bakteriálních kultur
- JetStar 2.0 Endotoxin-free Maxiprep Kit (Genomed) pro izolaci plasmidu z bakteriálních kultur pro výtěžek 300 – 500 µg plasmidové DNA
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)
- Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) pro stanovení koncentrace proteinů
- Qubit® Protein Assay Kit (Invitrogen) pro stanovení koncentrace proteinů

#### 4.1.9 Agarové plotny

- Agarové plotny obsahující LB médium (Luria-Bertani medium) a agar: 1,5% agar (Imuna), 1% (w/v) pepton (Imuna), 1% (w/v) NaCl (Sigma), 0,5% (w/v) kvasničný extrakt (Imuna)

#### 4.1.10 Primery pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR)

Všechny primery byly připraveny firmou IDT - Integrated DNA Technologies.

- Primery pro amplifikaci sekvence MusPV L1 a L2 (Tab. č. 2)

**Tab. č. 2 - Primery pro amplifikaci sekvence MusPV L1 a L2**

Popis	Určení	Sekvence primeru	Teplota tání
MusPV L1, EcoRI	forward	5'-GCATCGAATTCACCTCCATAGAAGACACCG-3'	63,1 °C
MusPV L1, HindIII	reverse	5'-GTACAACCCAGAGCTGTTT-3'	55,0 °C
MusPV L2, SmaI	forward	5'-ACTGTCCCGGGGGGTGCCGTGTTTCCTTTT-3'	68,9 °C
MusPV L2, PaeI	reverse	5'-GCTCGGCATGCTGGGTGCTAGCTCAGTAG-3'	67,0 °C

- Primery pro kontrolu klonování pod polyhedrinový (pPH) a p10 promotor do vektoru pFastBac Dual (Tab. č. 3)

**Tab. č. 3 - Primery pro kontrolu klonování pod pPH a p10 promotory do vektoru pFastBac Dual**

Popis	Určení	Sekvence primeru	Teplota tání
p10	forward	5'-ACTCGACGAAGACTTGATCACC-3'	58,0 °C
p10	reverse	5'-GAACAAACGACCCAACACC-3'	56,0 °C
pPH	forward	5'-ATTCATACCGTCCCACCATCG-3'	59,0 °C
pPH	reverse	5'-TGTGAAATTTGTGATGCTATTGC-3'	54,0 °C

#### 4.1.11 Přístroje

- Aparatura pro horizontální agarózovou elektroforézu multiSub Mini (Clever)
- Aparatura pro SDS-PAGE (BioRad, Hoefer)
- Aparatura pro Western Blot (BioRad)
- Centrifuga 3K30 (Sigma)
- Centrifuga GS–15R (Beckman)
- Centrifuga Megafuge 1.0R (Heraus Sepatech)
- Centrifuga Microfuge (Beckman)
- CO<sub>2</sub> termostat (Forma Scientific)
- DeepFreeze MDF-U53V(Sanyo)
- Elektronový mikroskop JEOL JEM 1200EX
- Elektroporátor Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad)
- Fluorescenční mikroskop BX-60 (Olympus)
- Konfokální mikroskop Leica TCS-sp
- Kultivační třepačky Orbital Shaker (Forma Scientific), Orbi-Safe TS (Gallenkamp)
- Laminární box (Forma Scientific)
- Magnetická míchačka IKA® Big Squid
- Mikrocentrifuga Beckman Mikrofuge Centrifuge (Beckman)
- Minicentrifuga Centrifuge C1200 (Labnet)
- Molecular Imager FX Pro Plus multiimager system (Bio-Rad)
- NanoDrop Spectrofotometr ND-1000 (NanoDrop Technologies)
- PCR cykler Mastercycler EP gradient S (Eppendorf)
- pH metr LANGE H138 miniLab™ (Hach)
- pH metr S20 SevenEasy (Mettler Toledo)
- Přístroj pro měření luciferázové aktivity MICROLITE-TLX2 (Promega) 48
- Qubit® fluorometer (Invitrogen)
- Refraktometr ABBE (Carl Zeiss Jena)
- Rozebírač gradientů (Beckman)
- Sonikátor Soniprep 150 (Schoeller Pharmacia Praha)
- Sonikátor QSonica (Q500)

- Termostat TCH100C (Biosan)
- Třepačka Duomax 1030 (Heidolph)
- Třepačka Shaker 30 (Labnet)
- Ultracentrifuga Optima TM L-90K, rotory SW28, SW41, SW55 (Beckman)
- UV transluminátor (BioLum)
- UV transluminátor Electronic EAC-20 Dual Light Translluminator (Ultra Lum)
- Vilber Fusion Fx (BioConsult Laboratories)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

#### 4.1.12 Software

- ImageJ
- NanoDrop
- SnapGene (GSL Biotech)
- PyMol
- GraphPad

#### 4.1.13 Vektory

- pFastBac Dual – bakulovirový vektor pro klonování genů pro kapsidové proteiny MusPV (Invitrogen)
- pMusheLL – plasmid nesoucí geny pro L1 a L2 kapsidové proteiny MusPV, L1+L2 pod cytomegalovirovým (CMV) promotorem (John Schiller; Addgene plasmid # 47023)
- pCLucf – plasmid nesoucí gen pro luciferázu (CMV promotor) a GFP (SV40 promotor), (John Schiller; Addgene plasmid #37328)



## 4.2 Metody

### 4.2.1 Sterilizace

Vybrané roztoky a jednorázové plastové mikrozkušavky, špičky pro mikropipety a další byly sterilizovány v autoklávu. Dle protokolu pro sterilizaci byly sterilizovány 30 minut při teplotě 127 °C a tlaku 120 kPa. Laboratorní sklo bylo sterilizováno horkým vzduchem dle protokolu při 180 °C po dobu 180 minut. Nástroje pro práci s bakteriálními kulturami, tj. mikrobiologické hokejky pinzety a další, byly žíhány v plamenu za použití 96 % (v/v) ethanolu. Rostoky, které nebylo možné sterilizovat v autoklávu, byly filtrovány skrze filtry s porézností 0,22 a 0,45 µm.

### 4.2.2 Příprava králičích sér pro imunologickou detekci proteinů

Králičí séra (RbαMusPV-N a RbαMusPV-D) byly připraveny cílenou imunizací králíků, která byla prováděna pomocí MusPV PsVs, jenž byly buď v nativní formě, nebo byly denaturovány varem. Na přípravě sér se podílela J. Žáčková Suchanová.

### 4.2.3 Práce s bakteriálními kulturami

#### 4.2.3.1 Kultivace bakterií

Bakterie byly kultivovány na plotnách obsahujících LB agar v termostatu s teplotou 37 °C po dobu 16-18 hodin nebo v tekutém LB médiu ve třepačce s teplotou 37 °C po dobu 16-18 hodin a 250 rpm. Do agaru a do média bylo přidáváno antibiotikum pro selekci kultivovaných bakteriálních monoklonií. Druh přidaného antibiotika závisel na typu rezistence, kterou bakteriím poskytoval vnesený plasmid.

#### 4.2.3.2 Příprava kompetentních bakterií pro elektroporaci

Bakterie TOP10 byly zaočkovány do 20 ml TPN média a inkubovány po dobu 16 hodin při 37 °C a 200 rpm. Byla změřena optická hustota (OD, z angl. *optical density*) směsi při vlnové délce  $\lambda=560$  nm ( $OD_{560}$ ) a směs byla zaočkována do 400 ml TPN média na výslednou OD 0,1. Směs byla inkubována na třepačce při 37 °C a 200 rpm. Ze směsi byly pravidelně odebírány vzorky, u kterých byla měřena OD, dokud hodnota OD nebyla v rozmezí 0,5-0,7. Směs byla rozdělena do 8 centrifugačních zkumavek typu Falcon o objemu 50 ml a centrifugována při 3 000 x g, 4 °C po dobu 10 minut. Centrifugací byl

vytvořen pelet obsahující bakterie, nad kterým se nacházel supernatant. Supernatant byl slit a bakteriální pelet byl resuspendován v 50 ml vychlazené sterilní ddH<sub>2</sub>O. Směs byla centrifugována při 3 000 x g, 4 °C po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl opět slit a zbylý pelet byl resuspendován v 25 ml vychlazené sterilní ddH<sub>2</sub>O. Takto připravená směs byla vždy po dvou spojena do celkem 4 centrifugačních zkumavek typu Falcon o objemu 50 ml. Směs byla centrifugována při 3 000 x g, 4 °C po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl slit a zbylý bakteriální pelet byl resuspendován v 2 ml 10% (v/v) glycerolu. Směs byla opět po 2 spojena do celkem 2 centrifugačních zkumavek typu Falcon o objemu 50 ml. Směs byla centrifugována při 3 000 x g, 4 °C po dobu 10 minut. Vzniklý pelet byl resuspendován v 1 ml 10% (v/v) glycerolu a směs byla rozdělena do 1,5ml mikrozkušavek po 50 µl, 100 µl a 150 µl. Mikrozkušavky obsahující bakteriální směs byly okamžitě umístěny do tekutého dusíku, kde došlo k prudkému zmrazení bakterií a ty byly umístěny do -80 °C.

#### 4.2.3.3 Příprava bakteriálních konzerv

LB médium bylo zaočkováno bakteriální kulturou, která byla inkubována na třepačce při 37 °C, 200 rpm po dobu 16 hodin. Bakteriální suspenze byla mísená se sterilním glycerolem tak, aby výsledná koncentrace byla 20 % (v/v). Takto připravené bakteriální konzervy byly umístěny do -80 °C.

#### 4.2.3.4 Elektroporace

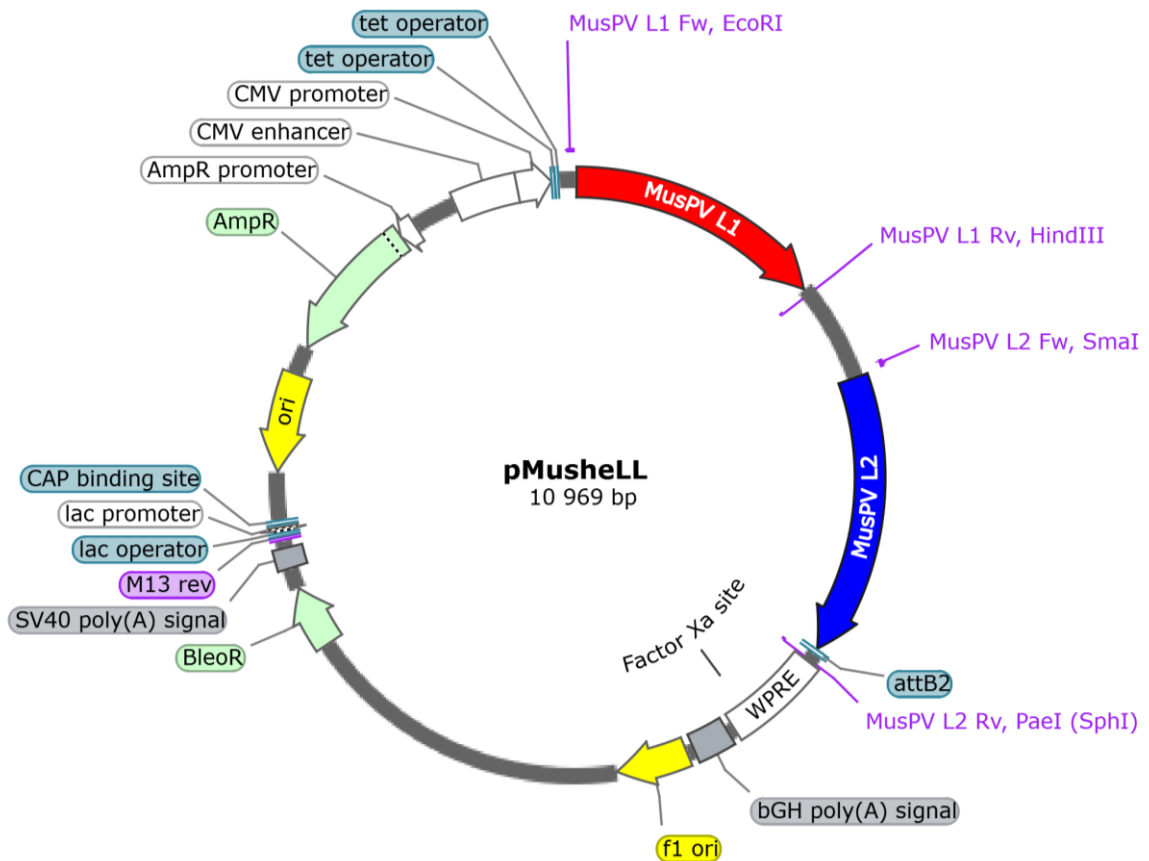
Bakterie byly skladovány při -80 °C. Pro potřebu elektroporace byly rozmrazeny na ledu a byla připravena směs bakterií (45 µl) s plasmidem (1 µl). Takto připravená směs byla inkubována po dobu 60 sekund na ledu. Na ledu byly předem vychlazeny sterilní elektroporační kyvety (vzdálenost elektrod 2 mm), do kterých byla po odběhnutí doby inkubace převedena směs bakterií s plasmidem. Směs byla sklepnuta na dno kyvety kvůli odstranění případných vzduchových bublin, které by mohly vést ke zkratu v elektroporační kyvetě. Naplněná kyveta byla osušena a umístěna do elektroporátoru Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad). V nastavení elektroporátoru byl vybrán přednastavený protokol pro bakterie a kyvetu se vzdáleností elektrod 2 mm a silou impulsu 2,5 kV. Na základě tohoto protokolu byla reakční směs vystavena elektrickému pulzu 25µF, 2,5 kV, 200 Ω o délce 4,9 ms. Ke směsi bylo neprodleně přidáno 1000 µl SOC média. Směs byla

v médiu resuspendována a převedena do 100 ml Erlenmayerovy baňky. Směs byla inkubována v třepačce 60 minut při 37 °C a 250 rpm. Po uplynutí inkubační doby byla směs vyseta na agarové plotny, obsahující selekční antibiotikum a inkubována po dobu 16-18 hodin při 37 °C v termostatu bez CO<sub>2</sub> atmosféry.

## 4.2.4 Práce s DNA

### 4.2.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce byla použita pro amplifikaci genů pro L1 a L2 kapsidové proteiny MusPV z plasmidu pMusheLL (John Schiller; Addgene plasmid #47023), (Obr. č. 8).



**Obr. č. 8 – Plasmid pMusheLL nesoucí gen pro kapsidový protein L1 a kapsidový protein L2 viru MusPV**

Pro PCR MusPV L1 genu (červený) byly navrženy primery (zobrazeny fialově) MusPV L1 Fw a MusPV L1 Rv, primer MusPV L1 Fw byl navržen s vloženým restričním místem (RM) pro restriční enzym EcoRI, primer MusPV L1 Rv byl navržen bez RM, protože v těsné blízkosti komplementární sekvence pro tento primer se nacházelo restriční místo pro enzym HindIII, pro gen MusPV L2 (modrý) byly navrženy primery MusPV L2 Fw nesoucí RM pro enzym SmaI a primer MusPV L2 Rv, nesoucí RM pro enzym PaeI (též značeno SphI)

Primery pro PCR by navrženy s pomocí programu SnapGene a byly připraveny firmou IDT. K dodaným primerům byla přidána ddH<sub>2</sub>O k dosažení výsledné koncentrace zásobního roztoku 100 μM. Primery ze zásobních roztoků byly ředěny na pracovní koncentraci 10 μM. PCR reakce byla připravena dle Tab. č. 4 a cyklus byl nastaven dle Tab. č. 5.

#### 4.2.4.2 PCR z bakteriálních kolonií (Genotypování bakteriálních kolonií)

Do mikrozkuvek byla v laminárním boxu napipetována sterilní ddH<sub>2</sub>O. Z vybraných monokolonií vyrostlých na selekčních agarových plotnách byla vždy odebrána část monokolonie sterilním párátkem, přesunuta do mikrozkuvky a povařena v termobločku při 96 °C po dobu 5 minut. Jakmile mikrozkuvky vychladly, byly centrifugovány na stolní centrifuze při 15 000 x g po dobu 5 minut. Supernatant získaný při centrifugaci byl použit jako templátová DNA pro PCR reakci. Složení PCR reakce viz Tab. č. 6 a nastavení PCR cyklu viz Tab. č. 5.

**Tab. č. 4 - Složky PCR reakce**

Jednotlivé složky pro reakci o objemu 50 μl	Objem dané složky
Pufr	5 μl
směs dNTP (10 mM)	1 μl
Primer Fw (10 μM)	2,5 μl
Primer Rv (10 μM)	2,5 μl
templátová DNA	10 ng
DNA polymeráza	0,5 μl
ddH <sub>2</sub> O	doplnit do objemu 50 μl

**Tab. č. 5 - Nastavení PCR cyklu**

Fáze cyklu, počet	Teplota	Trvání
Prvotní denaturace, 1x	95 °C	3 minuty
Denaturace, 30x	95 °C	30 sekund
Nasedání primerů, 30x	dle T <sub>m</sub> primerů	30 sekund
Syntéza DNA, 30x	72 °C	2 minuty
Finální syntéza DNA, 1x	72 °C	5 minut

**Tab. č. 6 - Složky směsi pro genotypování bakteriálních kolonií**

Jednotlivé složky pro reakci o objemu 20 µl	Objem dané složky
Pufr	2 µl
směs dNTP (10 mM)	0,4 µl
Primer Fw (10 µM)	0,6 µl
Primer Rv (10 µM)	0,6 µl
supernatant (templátová DNA)	2,5 µl
DNA polymeráza	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	11,7 µl
1% (v/v) Triton X-100	2 µl

#### 4.2.4.3 Měření koncentrace DNA

Pro měření DNA byly použity dva přístroje: fluorometr Qubit® (Invitrogen) a NanoDrop ND-1000. Měření probíhalo dle manuálů pro tyto přístroje.

#### 4.2.4.4 Izolace plasmidu

Po elektroporaci plasmidové DNA do bakteriální kultury byly bakterie vysety na selekční agarové plotny. Po inkubaci byly vybrány narostlé kolonie a přesunuty pomocí sterilního párátko do směsi LB média a antibiotika (typ závisel na rezistenci nesené vneseným plasmidem). Směs byla inkubována na třepačce při 37 °C, 250 rpm po dobu 16-18 hodin.

Po inkubaci byla směs bakterií podrobena centrifugaci při 4 800 x g, 4 °C po dobu 20 minut. Supernatant byl slit a zbylý pelet byl použit pro izolaci plasmidové DNA. Pro izolaci byly použity komerční soupravy. Dle objemu bakteriálního peletu byly použity tyto soupravy: GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) a JetStar 2.0 Endotoxin-free Maxiprep Kit (Genomed). Izolace plasmidové DNA byla provedena dle manuálů, které byly součástí souprav.

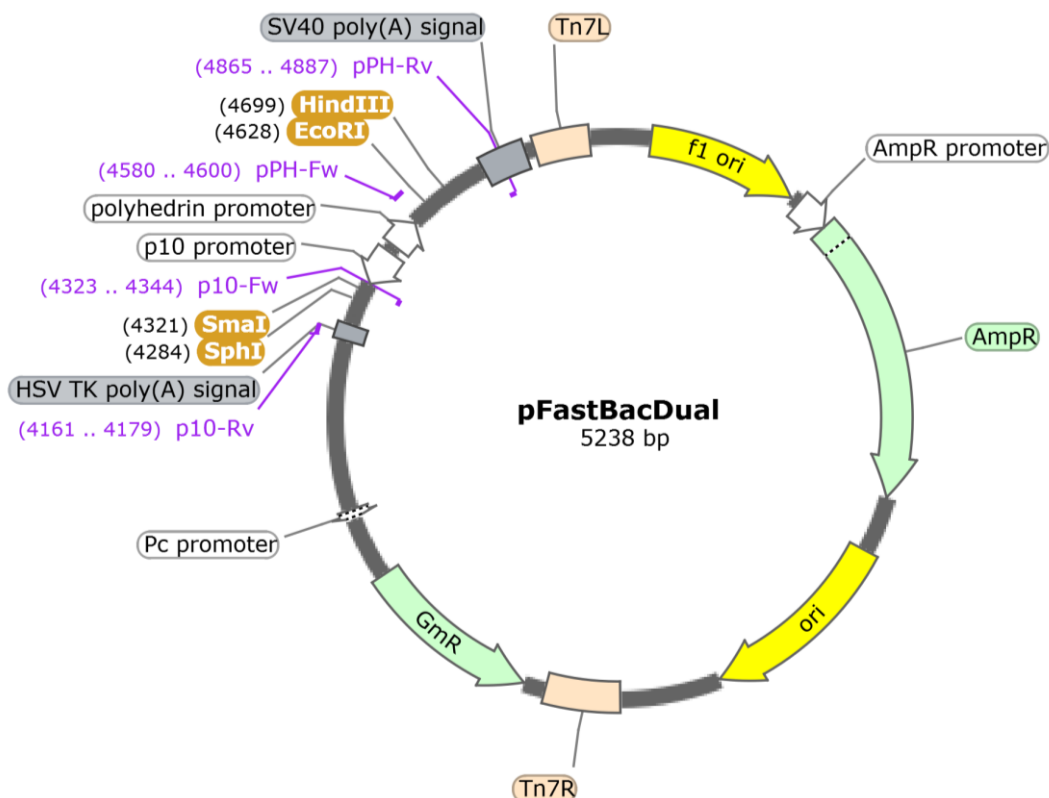
#### 4.2.4.5 Horizontální agarózová elektroforéza

Agarózová elektroforéza byla využívána pro rozdělování molekul DNA v elektrickém poli na základě jejich velikosti (délky), a také k přečišťování restrikčních směsí po restrikčním štěpení. Za účelem rozdělení molekul DNA byly připraveny 1% (w/v) agarózové gely v 0,5x koncentrovaném Tris-borátovém pufru (TBE pufr), do nichž byl přidán 1 000x ředěný ethidium bromid (Serva) o finální koncentraci 0,5 µg/ml pro detekci DNA. Takto připravená směs byla v tekutém stavu nalita do připravené elektroforetické aparatury s připraveným hřebenem, nutným pro vytvoření daného počtu jamek v gelu. Gel byl ponechán 30 minut při pokojové teplotě k docílení dostatečného ztuhnutí gelu. Ztuhlý gel byl umístěn do elektroforetické vany naplněné 0,5x koncentrovaným TBE pufrem. Na gel byl nanesen DNA marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) v objemu 3 µl, a také vzorky smíchané s 6x koncentrovanou nanášecí barvou (Thermo Fisher Scientific) v poměru 5:1 (vzorek:nanášecí barva). Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji elektrického napětí a gel byl ponechán 40-50 minut při napětí 5 V/cm. Po doputování nanášecí barvy k spodnímu okraji gelu byl gel přesunut do transluminátoru Electronic EAC-20 Dual Light Transilluminator (Ultra Lum) nebo do Vilber Fusion Fx (BioConsult Laboratories), osvícen UV zářením a vyfotografován.

Za účelem přečištění restrikčních směsí byly připraveny 1% (w/v) gely z agarózy (Amresco) a agarózy s nízkým bodem tání (NuSieve) v poměru 1:1 v 1x koncentrovaném Tris-acetátovém pufru.

#### 4.2.4.6 Restrikční štěpení

Restrikční štěpení bylo využito pro štěpení PCR produktů a vektoru pFastBac Dual (Obr. č. 9). Také bylo využito pro kontrolu připravených plasmidů. Za účelem štěpení PCR produktů a vektoru pFastBac Dual byla namíchána restrikční směs (RS) dle Tab. č. 7. Pro štěpení byly využity enzymy EcoRI, HindIII, PaeI (SphI) a SmaI.



**Obr. č. 9 – Mapa plasmidu pFastBac Dual obsahujícího dva silné promotory – polyhedrinový (pPH) a p10**

Pod promotory pPh a p10 byly vloženy geny pro kapsidové proteiny MusPV L1 a L2, na plasmidu jsou vyznačena RM, která byla využita pro klonování L1 (EcoRI a HindIII) a L2 (SmaI, PaeI - též značen jako SphI) genů, zároveň jsou na plasmidu vyznačena místa nasedání primerů pPH (Fw a Rv) a p10 (Fw a Rv), které byly použity pro ověření přítomnosti zaklonovaného genu v plasmidu při genotypování bakteriálních kolonií (viz kapitola 5.1)

RS byla inkubována při 37 °C po dobu 2 hodin. Byla provedena kontrola štěpení za použití horizontální gelové elektroforézy, v případě nedostatečného štěpení směsi byl přidán 1 µl restrikčního enzymu (RE) a směs byla inkubována při 37 °C po dobu 2 hodin. V restrikční směsi PCR produktů byly inaktivovány RE při 65 °C po dobu 20 minut. K restrikční směsi obsahující vektor pFastBac Dual byla přidána alkalická fosfatáza a směs

byla inkubována po dobu 10 minut. RS byla podrobena inaktivaci při 75 °C po dobu 20 minut, v tomto kroku byly inaktivovány jak RE, tak alkalická fosfatáza. RS byly kontrolovány pomocí horizontální gelové elektroforézy.

**Tab. č. 7 - Složky restrikční směsi**

Restrikční směs PCR produktu		Restrikční směs plasmidu	
celkový objem restrikční směsi = 100 µl			
10x R pufr	10 µl	10x R pufr	10 µl
PCR směs	40 µl	plasmid	2 µl
Restrikční enzym 1	3 µl	Restrikční enzym 1	3 µl
Restrikční enzym 2	3 µl	Restrikční enzym 2	3 µl
ddH <sub>2</sub> O	doplnit do 100 µl	ddH <sub>2</sub> O	doplnit do 100 µl

#### 4.2.3.7 DNA extrakce z agarózového gelu

Po purifikaci restrikčních směsí agarózovou elektroforézou byla směs vyříznuta z gelu. Z tohoto fragmentu byla extrahována přítomná DNA pomocí komerční soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) a dle přiloženého protokolu pro tuto soupravu.

#### 4.2.3.8 Fenol-chloroformová extrakce DNA

Pro fenol-chloroformovou extrakci byly vzorky po ligaci doplněny do objemu 400 µl a bylo k nim přidáno 400 µl fenolu. Vzorek byl protřepán a centrifugován při 14 000 x g po dobu 3 minut. Ve vzorku se ustanovily dvě fáze. Dolní fáze obsahující organickou fázi fenolu. A horní vodná fáze obsahující DNA, která byla přesunuta do nové mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 400 µl směsi fenolu a chloroformu v poměru 1:1. Směs byla protřepána a centrifugována při 14 000 x g po dobu 3 minut. Vodná fáze byla přesunuta do nové mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 400 µl chloroformu. Vzorek byl protřepán a centrifugován při 14 000 x g po dobu 3 minut. Horní vodná fáze byla přesunuta do nové mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 0,1x objem vzorku octanu sodného a 2,5x objem vzorku 96% (v/v) ethanolu (-18 °C). Vzorek byl protřepán a ponechán v mrazáku 12-14 hodin. Vzorek byl centrifugován při 14 000 x g, 4 °C po dobu 20 minut. Supernatant



byl odstraněn a vzniklý pelet byl resuspendován v 70% (v/v) ethanolu. Vzorek byl centrifugován při 14 000 x g, 4 °C po dobu 20 minut. Supernatant byl odebrán a pelet byl ponechán při pokojové teplotě, aby došlo k vypaření zbylého ethanolu. V posledním kroku byl pelet resuspendován v 30 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.2.3.9 Ligace DNA do vektoru

Dle protokolu *DNA Insert Ligation (sticky-end and blunt-end) into Vector DNA* (Thermo Fisher Scientific) byla připravena ligační směs pro ligaci fragmentů s přesahujícími konci (*sticky-end ligation*). Byly připraveny ligační směsi o různých poměrech linearizovaného DNA vektoru a DNA inzertu; 1:1, 1:3, 1:5 (vektor:inzert), viz Tab. č. 8.

**Tab. č. 8 - Složky ligační směsi**

	1:1	1:3
Linearizovaný DNA vektor	0,5 µl	0,5 µl
DNA inzert	0,5 µl	1,5 µl
10x koncentrovaný T4 DNA Ligázový pufr	2 µl	2 µl
Thermo Scientific T4 DNA Ligáza	0,5 µl (1 U)	0,5 µl (1U)
ddH <sub>2</sub> O	doplněno do 20 µl	

#### 4.2.3.10 Sekvence DNA

Vybrané plasmidy a PCR produkty byly kontrolovány pomocí sekvenace. Pro sekvenaci byly připraveny sekvenační reakce, které obsahovaly potřebné primery, DNA fragment a byly doplněny do 8 µl ddH<sub>2</sub>O, viz Tab. č. 9. Použité primery viz kapitola 4.1.9 Primery pro PCR.

**Tab. č. 9 - Složení reakční směsi pro sekvenaci DNA**

Složky reakce	Objem složek
plasmidová DNA nebo PCR produkt	3 ng/100 párů bazí nebo 5 ng/100 párů bazí
primery (10 μM)	0,5 μl
ddH <sub>2</sub> O	doplnit do 8 μl

#### 4.2.3.11 Příprava rekombinantního bakmidu

Rekombinantní bakmid byl připraven na základě homologní rekombinace mezi vektorem pFastBac Dual, nesoucím zaklonovaný inzert a bakmidovou DNA obsaženou v buňkách DH10Bac. Vektorový plasmid pFastBac Dual se zaklonovaným inzertem byl vyizolován z buněk TOP10 a byl elektroporován do buněk DH10Bac. Po provedené elektroporaci byla směs buněk resuspendována v 1 ml SOC média a přesunuta do třepačky při 37 °C a 250 rpm po dobu 3-4 hodin. Směs byla vyseta na selekční plotny a inkubována při 37 °C po dobu 36-40 hodin. Na základě rezistencí kódovaných bakmidem – tetracyklin a kanamycin, vnesených vektorem – gentamicin a porušením genu pro produkci β-galaktosidázy bylo možné selektivně vybrat monokolonie nesoucí rekombinantní bakmid. Bílé monokolonie obsahovaly vytvořený bakmid a byly přesunuty sterilním párátkem na novou selekční plotnu a byly kultivovány při 37 °C přes noc. Bíle zbarvené kolonie byly vybrány a přesunuty do Erlenmayerovy baňky s 5 ml LB média, 5 μl tetracyklinu, 5 μl kanamycinu a 3,5 μl gentamicinu a třepány při 37 °C dokud nedosáhly stacionární fáze. Z těchto kolonií byly připraveny bakteriální konzervy. Zbýlý materiál byl použit pro izolaci rekombinantní bakulovirové DNA dle protokolu *Isolating Recombinant Bacmid DNA Protocol*. Transformace hmyzích buněk probíhala dle protokolu Cellfectin™ Reagent Protocol.

## 4.2.4 Práce s tkáňovými kulturami

### 4.2.4.1 Pasážování savčích buněčných linií

Pro potřeby této diplomové práce byly pěstovány následující savčí buněčné linie: LNCaP, HeLa, HEK-293, U2OS, PC3, 293TT, NDHF, 3T6. Buněčné linie HeLa, HEK-293, U2OS, PC3, NDHF a 3T6 byly pasážovány v DMEM médiu se sérem (10 % (v/v)) na Petriho miskách o průměru 6 cm. Buněčná linie 293TT byla pasážována v DMEM médiu se sérem a antibiotiky na Petriho miskách o průměru 10 cm. Buněčná linie LNCaP byla pasážována v IMDM médiu se sérem (10 % (v/v)) a pro každou pasáž byla polovina nového IMDM média nahrazena starým médiem obsahujícím metabolity buněk. Buňky byly uchovávány v termostatu s 5% CO<sub>2</sub> atmosférou při 37 °C. Jakmile buňky konfluentně porostly dno Petriho misky, bylo z misky odsáto staré médium, resp. u buněk LNCaP ho byla část přesunuta na novou Petriho misku. Dále byly buňky opláchnuty 1 ml versenu a prokývány. Versen byl odsát a bylo přidáno 500 µl trypsinu. Takto ošetřené buňky byly přesunuty do termostatu na 5-10 minut (dle buněčné linie). Po té bylo k buňkám přidáno předehřáté médium. Buňky byly resuspendovány a vysety na předem připravené Petriho misky o průměru 6 cm obsahující nové růstové médium, resp. staré a nové médium v poměru 1:1 u buněk LNCaP. Buňky byly vysévány v poměrech 1:4 až 1:30 dle typu buněčné linie a rychlosti růstu. Pasážování bylo opakováno v rozmezí 3 až 7 dnů dle hustoty buněčné linie.

### 4.2.4.2 Pasážování hmyzích buněčných linií

Hmyzí buněčná linie Sf9 byla pasážována v médiu TNM-FH se sérem (10 % (v/v)) na Petriho miskách o průměru 6 cm při 27 °C. Jakmile buňky konfluentně porostly dno Petriho misky, byly manuálně seškrabány, resuspendovány protažením skrze pipetu ve starém médiu a rozděleny na nové, předem připravené Petriho misky o průměru 6 cm v poměru 1:4. Pasážování bylo opakováno v rozmezí 3-4 dnů dle hustoty buněčné linie.

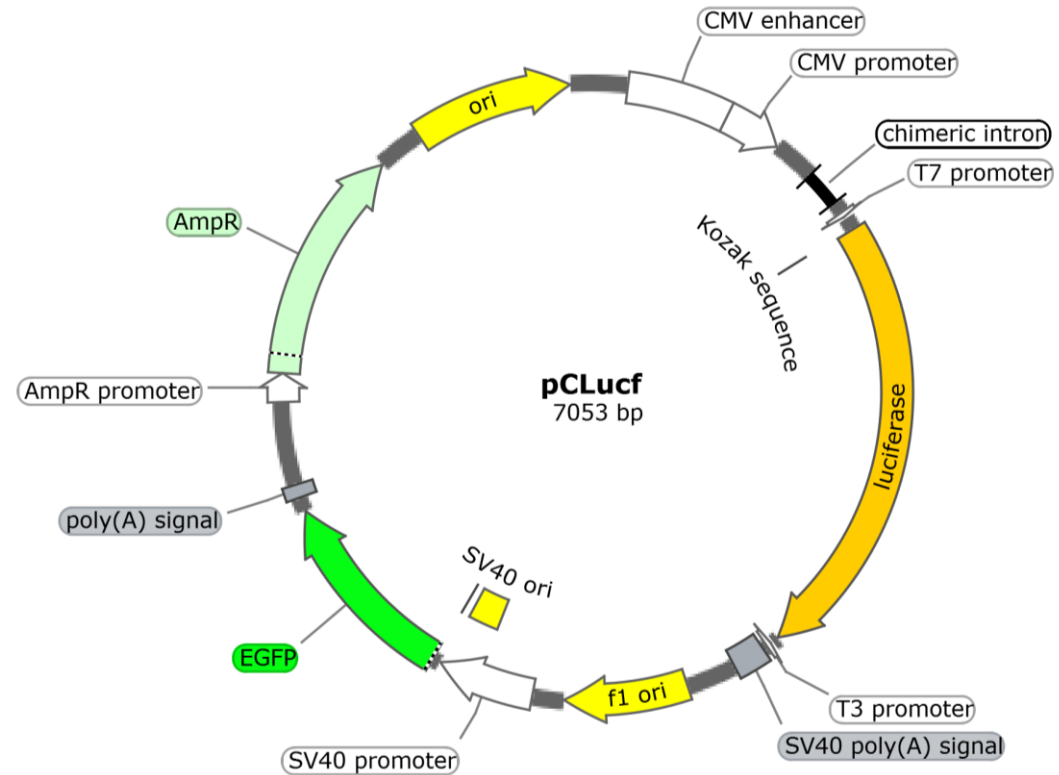
#### 4.2.4.3 Transfekce 293TT pomocí TurboFect™ Transfection Reagent

Konfluentně narostlé buňky 293TT byly transfekovány dle protokolu pro TurboFect™ Transfection Reagent pro adherentní buňky. Pro transfekci jedné Petriho misky o průměru 6 cm byla připravena reakční směs obsahující 3 µg plasmidu pMusheLL a 3 µg plasmidu pCLucf (Obr. č. 10) v 600 µl DMEM média bez séra. Do směsi bylo přidáno 12 µl TurboFect™ Transfection Reagent. Směs byla inkubována 15-20 minut při pokojové teplotě. Směs o objemu 600 µl byla přidána na 1 Petriho misku s buňkami 293TT. Po mírném kývání, zaručujícím rovnoměrné rozprostření směsi, byla Petriho miska s buňkami umístěna do termostatu s CO<sub>2</sub> atmosférou a teplotou 37 °C po dobu 48 hodin. Po uplynutí 48 hodin byly buňky zkontrolovány na fluorescenčním mikroskopu na přítomnost zeleného signálu, neboť plasmid pCLucf nesl gen pro zelený fluorescenční protein. Po kontrole byly buňky seškrábány do média a přesunuty do centrifugační zkumavky typu Falcon o objemu 50 ml a centrifugovány při 1 500 x g po dobu 7 minut. Vzniklý supernatant byl odebrán a pelet byl resuspendován v 5 ml DPBS (Ca, Mg) a centrifugován při 1 500 x g po dobu 7 minut. Získaný pelet byl resuspendován v 0,5 ml DPBS, přesunut do 1,5 ml mikrozkušavky a opět centrifugován při 1 500 x g po dobu 5 minut. Vzniklý supernatant byl odstraněn, buněčný pelet byl zamrazen při -20 °C a použit pro izolaci PsVs.

#### 4.2.4.4 Infekce Sf9 rekombinantním bakulovirem

Konfluentně narostlé hmyzí buňky Sf9 byly seškrábány z Petriho misek o průměru 6 cm a byly přesunuty na Petriho misky o průměru 15 cm s 5 ml TNM-FH médiem bez séra tak, že na jednu 15cm Petriho misku byly přesunuty tři 6cm Petriho misky. Petriho misky o průměru 15 cm byly ponechány v klidu při pokojové teplotě 15-20 minut kvůli rovnoměrnému přisednutí buněk k podkladu. Po uplynutí této doby bylo médium odsáto a byly buňky infikovány přidáním 3 ml inokula obsahujícího rekombinantní bakulovirus. Petriho misky o průměru 15 cm obsahující inokulum byly kývány při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Po uplynutí této doby bylo k buňkám přidáno 25 ml média se sérem (10% (v/v)). Buňky byly inkubovány 72 hodin při 27 °C v termostatu bez CO<sub>2</sub> atmosféry. Po uběhnutí inkubační doby byly hmyzí buňky zkontrolovány za použití optického mikroskopu, zda se u nich projevil cytopatický efekt. Po té byly buňky seškrábány do

média a převedeny do centrifugační zkumavky typu Falcon o objemu 50 ml a centrifugovány při 2 000 x g po dobu 5 minut. Vzniklý supernatant – inokulum – byl slit do nové centrifugační zkumavky, skladován při 4 °C a použit pro další infekce. Zbýlý buněčný pelet byl resuspendován v 10 ml DPBS a centrifugován při 2 000 x g po dobu 5 minut. Pelet byl použit pro izolaci VLPs.



**Obr. č. 10 – Plasmid pCLucf nesoucí gen pro luciferázu pod cytomegalovirovým promotorem a gen pro GFP pod promotorem SV40**

Plasmid vytvořil John Schiller (Addgene plasmid # 37328; <http://n2t.net/addgene:37328>; RRID:Addgene\_37328)

## 4.2.5 Práce s proteiny

### 4.2.5.1 Polyakrylamidová elektroforéza za přítomnosti SDS (SDS-PAGE)

Do aparatury pro přípravu gelů pro polyakrylamidovou elektroforézu (Bio-Rad, Hoefer) byla vložena omytá skla a byla utěsněna. Kontrola těsnosti byla provedena nalitím dH<sub>2</sub>O mezi skla. Po kontrole a vylití dH<sub>2</sub>O byl mezi skla nalit 10% spodní polyakrylamidový gel a převrstven 1 ml ddH<sub>2</sub>O k zajištění anoxického prostředí, které je nezbytné pro polymerizaci složek gelu. Tento gel byl připraven dle Tab. č. 10. Po 20-30 minutách nalitý gel zpolymeroval a bylo možné nalít mezi skla 5% zaostřovací gel, který byl připraven dle Tab. č. 11. Pro zajištění anoxických podmínek, a také kvůli vytvoření jamek pro vzorky, byl mezi skla vložen hřeben.

**Tab. č. 10 - Rozpis jednotlivých složek pro přípravu spodního gelu pro SDS-PAGE**

Spodní gel o koncentraci 10 %	
Složky gelu	Objem složek, celkem 12 ml
30% akrylamid (Serva)	4 ml
1M Tris-HCl, pH 8,8 (Sigma)	4,5 ml
10% (w/v) SDS (Sigma)	120 μl
ddH <sub>2</sub> O	3,5 ml
10% (w/v) peroxidisíran amonný	90 μl
TEMED	8,5 μl

**Tab. č. 11 - Rozpis jednotlivých složek pro přípravu zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE**

Zaostřovací gel o koncentraci 5 %	
Složky gelu	Objem složek, celkem 3 ml
30% akrylamid (Serva)	500 $\mu$ l
1M Tris-HCl, pH 6,8 (Sigma)	374 $\mu$ l
10% (w/v) SDS (Sigma)	30 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	2,11 ml
10% (w/v) peroxodisíran amonný	20 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

Po 20-30 minutách nalitý zaostřovací gel zpolymeroval a bylo možné připravený gel přesunout do aparatury pro proteinovou elektroforézu (Bio-Rad, Hoefer).

Pro lepší rozdělení byl použit i komerčně dostupný gradientový gel 4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well.

Z gelu byl vyjmut hřeben a gel byl zalit „Running“ puřrem. Jamky byly puřrem propláchnuty z důvodu odstranění případných zbytků nezpolymerovaného polyakrylamidového gelu. Vzorky pro SDS-PAGE byly připraveny doplněním objemu vzorku do 20  $\mu$ l 1x koncentrovaným puřrem B a přidáním 5x koncentrovaného Laemliho puřru v poměru 1:4. Dále byly vzorky promíchány a vařeny v termobločku při 100 °C po dobu 5 minut. Po vyjmutí z termobločku byly vzorky zcentrifugovány. Do jamek byly naneseny vzorky a marker Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Elektroforetické rozdělování proteinů probíhalo nejprve 30 minut při napětí 80 V. Po uplynutí 30 minutového intervalu byla hodnota napětí zvýšena na 140 V a rozdělování probíhalo po dobu 90 minut. Získaný gel byl vyjmut z aparatury a byl použit pro barvení dle protokolu pro Imperial™ Protein Stain (Thermo Fisher Scientific) nebo byl použit pro metodu Wester Blot.

#### 4.2.5.2 Western Blot

Western Blot je metoda umožňující přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulózovou membránu NC-45 (Serva). Polyakrylamidový gel s rozdělenými proteiny byl vložen do blotovacího sendviče, který se sestával z (od spodu) plastové mřížky, plastové houbičky o vysoké poréznosti, 4 filtračních papírů nebo 1 filtrační papír s vyšší gramáží (Whatman), polyakrylamidového gelu obsahujícího rozdělené vzorky, nitrocelulózové membrány, 4 filtračních papírů nebo 1 filtrační papír s vyšší gramáží (Whatman), plastové houbičky o vysoké poréznosti a plastové mřížky. Sendvič byl připravován v nádobě obsahující 1x koncentrovaný „Blotting“ pufr a při přípravě bylo dbáno na zamezení tvorby vzduchových bublin mezi jednotlivými vrstvami. Zavřený sendvič byl přesunut do blotovací aparatury (Bio-Rad) a zalit 1x „Blotting“ pufr. Do aparatury byl vložen chladicí bloček a magnetická míchací tyčinka (magnetické míchátko) pro zajištění správně teploty a cirkulace „Blotting“ pufru v aparatuře. Proteiny byly přenášeny v elektrickém poli z polyakrylamidového gely na nitrocelulózovou membránu po dobu 3 hodin při 250 mA. Nitrocelulózová membrána byla použita pro detekci proteinů pomocí protilátek. Zbýlý polyakrylamidový gel byl barven dle protokolu pro Imperial™ Protein Stain (Thermo Fisher Scientific) pro kontrolu kvality přenosu proteinů na membránu.

#### 4.2.5.3 Imunologická detekce proteinů na základě chemiluminiscence

Nitrocelulózová membrána, na kterou byly přeneseny proteiny byla blokována v 5% (w/v) roztoku odtučněného sušeného mléka v 1x koncentrovaném PBS po dobu minimálně 30 minut. Membrána byla promyta v 1x PBS. K membráně byla přidána primární protilátka ředěná v 5% (w/v) odtučněném mléce. Membrána byla inkubována s primární protilátkou po dobu 1 hodiny. Membrána byla 3 x promyta v 1x PBS po dobu 10 minut (celkem 30 minut) a poté inkubována se sekundární protilátkou, konjugovanou s křenovou peroxidázou po dobu 30 minut. Po inkubaci byla membrána 3 x promyta v 1x PS po dobu 10 minut.

Pro vizualizaci navázaných protilátek byly připraveny 2 vyvolávací roztoky. Roztoky 1 a 2 byly smíchány, promíseny a nality na nitrocelulózovou membránu se vzorky.



Po 30 sekundách byla membrána vyjmuta z roztoku, osušena o buničitou vatu a přesunuta do fotografických desek, kde byl k membráně přikládán RTG film po dobu 5-30 sekund. Film byl vyvolán v roztocích vývojky a ustalovače.

V průběhu experimentální části této práce byla upřednostněna detekce chemiluminiscence v přístroji Vilber Fusion Fx (BioConsult Laboratories), kde byla chemiluminiscence detekována kamerou a membrána focena.

#### 4.2.5.4 Imuno Dot Blot

Vzorky v množství od 2 do 5  $\mu$ l byly nanесeny na nitrocelulóзовou membránu NC-45 (Serva). Po mírném zaschnutí vzorků byla membrána podrobena detekci chemiluminiscence za použití protilátek.

#### 4.2.5.5 Ultracentrifugace v gradientu chloridu cesného

Ultracentrifugace v gradientu chloridu cesného byla prováděna za účelem izolace virových částic namnožených v hmyzích buňkách. Zmrazený pelet infikovaných hmyzích buněk byl resuspendován v 2 ml 1x koncentrovaného pufru B a sonikován pomocí stolního sonikátoru Qsonica (Q500) na ledu 4 x 30 sekund při 40% amplitudě. Mezi jednotlivými sonikačními bloky byl vždy vzorek ponechán 45 sekund bez zásahu, aby došlo k jeho opětovnému ochlazení, neboť při sonikaci se vzorek zahříval, což mohlo vést k ničení vzorku. Sonikovaný vzorek byl centrifugován při 4 800 rpm po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl přesunut do ultracentrifugační kyvety (pro rotor SW-41), pelet byl resuspendován v 1 ml 1x pufru B a převeden do mikrozkuhavky. Resuspendovaný pelet byl centrifugován při 13 000 rpm po dobu 3 minut. Vzniklý supernatant byl přesunut do ultracentrifugační kyvety. Supernatant byl doplněn 1x pufrem B do hmotnosti 8 g. Do kyvety bylo přidáno 3,65 g chloridu cesného a obsah byl promíchán převrácením kyvety. Byl změřen refraktometrický index směsi supernatantu a CsCl, který musel být roven  $1,3645 \pm 0,0005$ . Supernatant byl převrstven parafinovým olejem Bayol F (Serva). Kyvety byly vyváženy a přesunuty do rotoru SW-41 a centrifugovány při 35 000 rpm, 18 °C po dobu nejméně 20 hodin v ultracentrifuze Optima TM L-90K (Beckman). Po centrifugaci byly kyvety vyndány a opticky zkontrolovány na přítomnost proužku, naznačujícího přítomnost virových částic. Vzorek byl rozebrán za použití rozebírače frakcí na 16-18 frakcí o objemu přibližně 0,5 ml. U každé frakce byl změřen refraktometrický index a byl

vyhotoven Imuno Dot Blot. Na základě naměřených hodnot a Imuno Dot Blotu byly frakce sloučeny a dialyzovány do 1x koncentrovaného pufru B. Dále byly vzorky charakterizovány - byly připraveny sítěky pro elektronovou mikroskopii a byla změřena koncentrace proteinů ve vzorku.

#### **4.2.5.6 Centrifugace přes prázdnou vrstvu - sacharózový polštář**

Pro zvýšení koncentrace vzorku virových částic byla použita metoda centrifugace přes prázdnou vrstvu – sacharózový polštář. Vzorek byl podvrstven 1,5 cm silnou vrstvou 10% nebo 20% (w/w) sacharózy (Serva) a byl doplněn do plného objemu kyvety pufrům, ve kterém se nacházely částice. Vzorek byl centrifugován v ultracentrifuze Optima TM L-90K (Beckman) za použití rotoru SW41 nebo SW28. Při použití rotoru SW41 byly vzorky centrifugovány při 35 000 rpm, 4 °C po dobu 3 hodin, a při použití rotoru SW28 byly vzorky centrifugovány při 25 000 rpm, 4 °C po dobu 3 hodin. Po centrifugaci byl supernatant slit a z kyvety byla odstraněna zbylá sacharóza výtěrem buničitou vatou. Vzniklý pelet byl resuspendován v 1x pufru B přes noc při 4 °C.

#### **4.2.5.7 Centrifugace v jodixanolovém gradientu – Optiprep™**

Centrifugace v jodixanolovém gradientu byla využita pro izolaci pseudovirionů z buněk 293TT. Zmrazený pelet po transfekci (viz kapitola 4.2.4.3) byl resuspendován v DPBS. Pelet byl lyzován a po přečištění byl supernatant obsahující pseudoviriony přesunut do centrifugační kyvety pro rotor SW-55. Vzorek byl podvrstvován jodixanolem – koncentrace jodixanolu: 27% (v/v), 33% (v/v) a 39% (v/v) tak, že od vrchu dolů se koncentrace zvyšovala. Kyvety byly vyváženy, přesunuty do rotoru SW-55 a centrifugovány za použití ultracentrifugy Optima TM L-90K (Beckman) při 50 000 rpm, 16 °C po dobu 3,5 hodiny. Po centrifugaci byly kyvety opticky zkontrolovány na přítomnost proužku, naznačujícího přítomnost virových částic. Vzorek byl rozdělen do 11 frakcí o objemu 0,5 ml. Získané vzorky byly použity pro tvorbu sítěk na elektronovou mikroskopii, Imuno Dot Blotu a byly u nich změřeny koncentrace.

#### **4.2.5.8 Zakoncentrování vzorku pomocí PEG**

Dialyzační střeva obsahující vzorky v 1x pufru B byly zakoncentrovány za použití polyethylenglykolu (PEG, 20 000 g/mol). Dialyzační střeva byla položena na skleněnou

Petriho misku a byla obalena v PEG. Díky PEGu docházelo k průchodu pufru B skrze póry střeva ven a tím byl vzorek zkoncentrován. Jakmile vzorek dosáhl požadovaného objemu, byl PEG z dialyzačního střeva omyt a vzorek byl přesunut do „low binding“ mikrozkuřavky.

#### 4.2.5.9 Elektronová mikroskopie a negativní barvení

Na parafilm byly nanoseny vzorky, dále pro každý vzorek 2x 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O a 2x 50  $\mu$ l 2% (v/v) kyseliny fosfowolframové (PTA, z angl. *phosphotungstic acid*). Mikroskopické měděné sítky potažené parlodionovou pouhlíkovanou membránou byly postupně inkubovány se vzorkem po dobu 5 – 10 minut, dále byly sítky přesunuty na ddH<sub>2</sub>O a na každé kapce byly inkubovány 30 sekund. Poté byly sítky přesunuty na 2% PTA a na každé kapce byly sítky ponechány 1 minutu a po inkubaci byla ze sítěk odsáta přebytečná PTA pomocí filtračního papíru a sítky byly umístěny na filtrační papír kvůli doschnutí. Negativně barvené vzorky byly vizualizovány za využití elektronového mikroskopu JEOL JEM 1200EX a snímky byly pořízeny J. Žáčkovou Suchanovou Ph.D. a Mgr. et Mgr. A. Hejtmánkovou.

#### 4.2.5.10 Dialýza vzorků po centrifugaci

Po centrifugaci vzorků v gradientu chloridu cesného nebo v gradientu sacharózy byly jednotlivé frakce dle změřených refraktometrických indexů a výsledků Imuno Dot Blotu spojeny a přesunuty do dialyzačních střev, která byla uzavřena dialyzační svorkou. Střeva byla předem povařena při 100 °C v dH<sub>2</sub>O po dobu 10 minut. Uzavřená střeva byla přesunuta do kádinky s vychlazeným 1x koncentrovaným pufrem B o objemu 1,5 až 2 l. Po 30 minutách až 1 hodině byl pufr B vyměněn za čerstvý a kádinka byla přesunuta do chladové místnosti s konstantní teplotou 4 °C, kde probíhala dialýza přes noc za stálého míchání magnetickou míchačkou. Po dialýze byly vzorky buď zkoncentrovány PEGováním (kapitola 4.2.5.8) nebo byly centrifugovány přes prázdnu vrstvu – 10% nebo 20% (w/w) sacharózový polštář (kapitola 4.2.5.6).

#### 4.2.5.11 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace získaných proteinů byla měřena pomocí Qubit® fluorometer (Invitrogen) dle návodu dodávaného výrobcem přístroje a s využitím komerční soupravy Qubit® Protein Assay Kit (Invitrogen).

Koncentrace proteinů značených fluorescenční barvou byly měřeny pomocí ELISA readeru při vlnové délce 520 nm s využitím komerční soupravy Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) a dle návodu dodávaného výrobcem.

#### 4.2.5.12 Značení PsVs pomocí NHS-Rhodamine

Lyzáty transfekovaných buněk 293TT byly značeny pomocí NHS-Rhodamine (NHS-Rhod), (10mg/ml v DMSO). Dle změřených koncentrací byl ke vzorkům přidán NHS-Rhod v poměru 1:4 (PsVs:NHS-Rhod). Po přidání byly vzorky promíchány a inkubovány na ledu po dobu 2 hodin dle protokolu pro NHS-Rhod. Částice byly přečištěny od přebytečného nenavázaného NHS-Rhod pomocí centrifugace v jodixanolovém gradientu – Optiprep™. Po centrifugaci byl nakapán Dot Blot pro měření fluorescence, který byl měřen na Fluorometru Molecular Imager FX Pro Plus multiimager system (Bio-Rad). Vzorky byly převedeny z jodixanolu do 1x pufru B pomocí Microsep™ Centrifugal Devices 300K (Pall). V tomto kroku došlo ke značným ztrátám vzorků.

#### 4.2.5.13 Značení VLPs pomocí NHS-Rhod a Alexa Fluor™ 488 5-SDP Ester

Pro výpočet množství barvy bylo určeno molární množství lyzinů nacházejících se na povrchu virové částice. VLPs (vyizolovány v kapitole 4.2.5.16) byly dialyzovány pomocí dialyzačních střev (viz kapitola 4.2.5.10) do 1x koncentrovaného FoFr pufru a byly značeny pomocí NHS-Rhod a Alexa Fluor™ 488 5-SDP Ester (Ax488-SDP).

NHS-Rhod v 10 násobném molárním nadbytku byl přidán k částicím, které byly poté inkubovány 2 hodiny na ledu. Po inkubaci byly částice přesunuty do dialyzačních střev a dialyzovány v 1x pufru B o objemu 2 l (viz kapitola 4.2.5.10), kvůli inhibici reakce NHS-Rhod s virovými částicemi. Vzorky byly z dialyzačních střev přesunuty do kyvet pro rotor SW-41 a centrifugovány přes 10% (w/w) sacharózový polštář (viz kapitola 4.2.5.6). Výsledný pelet byl resuspendován v pufru B.

VLPs (viz kapitola 4.2.5.16) byly krátce před značením Ax488-SDP sonikovány ve vodní lázni po dobu 1 minuty. K VLPs byl přidán 0,25 molární ekvivalent Ax488-SDP a vzorky byly umístěny na rotační míchačku a přesunuty do chladové místnosti s konstantní teplotou 4 °C přes noc. Vzorky byly dialyzovány vůči 1x pufru B. Po dialýze (viz kap. 4.2.5.10) byly vzorky centrifugovány při 10 000 rpm, 4 °C po dobu 5 minut. Vzniklý supernatant byl odebrán a přesunut do ultracentrifugační kyvety pro rotor SW-41, pelet byl resuspendován v 1 ml pufru B a ponechán v sonikační lázni po dobu 1 minuty. Vzorek byl opět centrifugován při 10 000 rpm, 4 °C po dobu 5 minut. Celkově byl tento postup opakován 4x a při každém kroku byl odebraný supernatant přesunut do kyvety. Sbíraný supernatant byl centrifugován přes 20% (w/w) sacharózový polštář v rotoru SW-41 při 35 000 rpm, 4 °C po dobu 3 hodin (viz kapitola 4.2.5.6) Výsledný pelet po centrifugaci byl resuspendován v 1x pufru B. Pro výsledný materiál byla změřena koncentrace za použití přístroje Qubit® fluorometer (Invitrogen) dle návodu dodávaného výrobcem přístroje a s využitím komerční soupravy Qubit® Protein Assay Kit (Invitrogen), (viz kapitola 4.2.5.11) a vytvořeny sítě pro elektronovou mikroskopii (viz kapitola 4.2.5.9).

#### 4.2.5.14 Měření transdukční aktivity MusPV PsVs u nádorových a nenádorových buněčných linií

Transdukční aktivita byla měřena u nádorových a nenádorových buněčných linií: LNCaP, PC3, HeLa, U2OS, Jurkat, HEK-293, NHDF, 3T6 a 293TT. Konfluentně narostlé buňky v průhledných a/nebo bílých 96 jamkových destičkách byly inkubovány s MusPV PsVs po dobu 72 hodin. Po inkubaci byly průhledné desky kontrolovány na invertovaném fluorescenčním mikroskopu (Carl Zeiss) na přítomnost zeleného signálu produkovaného v infikovaných buňkách díky genu pro GFP neseného PsVs. Do každé jamky bylo přidáno 50 µl DPBS a destičky byly přesunuty do mrazáku. Opakované zmrazení a rozmrazení napomohlo lyzi buněk. Před vlastním měřením bylo do každé jamky přidáno 50 µl Bright-Glo™ Reagent. Měření probíhalo na základě reakce Bright-Glo™ Reagent s luciferázou, jejíž gen byl nesen PsVs za použití přístroje VarioScan (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.2.5.15 Izolace MusPV PsVs

MusPV PsVs byly připravovány na základě protokolu, který byl zaveden pro produkci papilomavirových PsVs v buněčné linii 293TT v laboratoři buněčné onkologie v National Cancer Institute, Center for Cancer Research, Bethesda, Maryland, USA na základě výzkumů Buck *et al.* (Buck *et al.*, 2004, Buck *et al.*, 2005, Buck & Thompson, 2007) a Cardone *et al.* (Cardone *et al.*, 2014).

Po prvotní transfekci buněk pomocí TurboFect™ Transfection Reagent (viz kapitola 4.2.4.3) byly buňky sklizeny seškrábáním z Petriho misky, převedením do centrifugační zkumavky typu Falcon o objemu 50 ml a centrifugovány při 1 500 rpm po dobu 7 minut. Vzniklý pelet byl resuspendován a opět centrifugován při stejných podmínkách. Pelet byl zmrazen a po rozmrznutí byl resuspendován v 1,4x objemu peletu DPBS, ke směsi byl přidán 1 µl aprotininu a vzorek byl krátce vortexován. Směs byla inkubována při 37 °C po dobu 30 minut. Triton X-100 o objemu 1/20 směsi byl ke vzorku přidána tak, aby výsledná koncentrace byla 0,5 %. Směs byla inkubována při 37 °C po dobu 24 hodin z důvodu maturace pseudovirionů. Během prvních 3 hodin byla směs několikrát promísena obracením mikrozskumavky. Lyzát byl použit pro barvení PsVs (viz kapitola 4.2.5.12) nebo byl pročištěn pomocí centrifugace při 5 000 x g, 4 °C po dobu 5 minut. Ze vzniklého supernatantu byly izolovány MusPV PsVs pomocí centrifugace v gradientu jodixanolu (Optiprep™), (viz kapitola 4.2.5.7).

#### 4.2.5.16 Měření interakce značených MusPV VLPs s nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi

Interakce značených VLPs získaných z peletů buněk Sf9 (viz kapitola 4.2.5.16) byla měřena na nádorových a nenádorových buněčných liniích HEK-293, HeLa, Jurkat, LNCaP, PC3, 3T6, 293TT, NHDF a U2OS.

Pro měření vstupu viru do buněk byly jednotlivé buněčné linie připraveny tak, že z konfluentně narostlých buněk na 12 jamkové destičce bylo odsáto médium se sérem (10 % v/v). Buňky byly opláchnuty 1 ml bezsérového média a do každé jamky byl přidáno 500 µl MusPV VLPs v bezsérovém médiu. Pro infekci byly použity tyto částice: VLPs L1/L2 značené rhodaminem (Rhod) o koncentraci 0,5 µg na jamku, VLPs L1/L2 značené Alexou Fluor 488 (Ax488) o koncentraci 0,5 µg na jamku, VLPs L1 značené Ax488 o koncentraci

2,5 µg na jamku a VLPs L1/L2 značené Ax488 o koncentraci 2,5 µg na jamku. Buňky byly se směsí VLPs a bezsérového média inkubovány při 37 °C v termostatu s CO<sub>2</sub> atmosférou po dobu 2 hodin. Po uplynutí inkubační doby byly buňky opláchnuty 1 ml verzenou a do každé jamky bylo přidáno 500 µl trypsinu. Po uvolnění buněk od podkladu bylo přidáno 500 µl inhibitoru trypsinu a buňky byly přesunuty do mikrozkušavek na ledu. Mikrozkušavky byly centrifugovány při 4 000 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán a pelet byl resuspendován v 1 ml 1x PBS a centrifugován při 4 000 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán a k peletu bylo přidáno 350 µl PBS s 0,5% (v/v) BSA. Díky těmto promývacím krokům byly buňky zbaveny značených VLPs asociovaných s buněčným povrchem a bylo možné měřit pouze částice, které vstoupily do buněk. Vzorky byly měřeny RNDr. Hanou Španielovou Ph.D. na průtokovém cytometru.

Buňky pro měření asociace VLPs s povrchem nádorových a nenádorových buněčných linií byly pěstovány na Petriho miskách o průměru 6 cm. Pro potřeby pokusu bylo z buněk odsáto médium a buňky byly opláchnuty 1 ml verzenou. Verzen byl odsát a k buňkám bylo přidáno 500 µl trypsinu, který zajišťoval, aby se buňky pustily podkladu a bylo možné je resuspendovat. Po inkubaci s trypsinem bylo k buňkám přidáno médium, byly přesunuty do centrifugační zkumavky typu Falcon o objemu 50 ml a uloženy do termostatu s CO<sub>2</sub> atmosférou při 37 °C. Po 60 minutách byly buňky přesunuty do zkumavek vhodných pro měření na průtokovém cytometru. Tato doba byla nezbytně nutná pro regeneraci povrchových receptorů na buňkách. Za použití průtokového cytometru byly buňky spočítány. Dle zjištěných koncentrací byly buňky dodatečně ředěny pomocí 1x PBS s 0,5% (v/v) BSA na koncentraci 1 000 000 buněk na 1 ml. K takto naředěným buňkám byla přidána směs MusPV VLPs značených pomocí Rhod o objemu 2,5 µl (178,7 ng). Vzorky byly měřeny RNDr. Hanou Španielovou Ph.D. na průtokovém cytometru.

#### 4.2.5.17 Izolace MusPV VLPs

Ze zmrazených peletů buněk Sf9 byly izolovány MusPV VLPs. Buněčný pelet byl rozmrazen, resuspendován v 1,4x objemu peletu DPBS a krátce vortexován. Byla přidána 1/20 objemu směsi Tritonu X-100 tak, aby výsledná koncentrace byla 0,5 %. Dále byla přidána 0,1% Benzonáza (Sigma) a 0,1% Plasmid Safe (Epicentre). Poté byla přidána 1/40 objemu směsi 1 M síranu amonného, pH 9. Směs byla inkubována při 37 °C po dobu 24 hodin pro dostatečné lyzování buněk. Během prvních 3 hodin byla směs několikrát promísena obrácením mikrozkuhavky. Směs byla centrifugována dle protokolu pro centrifugaci v gradientu chloridu cesného (viz kapitola 4.2.5.5). Navzdory úpravám protokolu se nepodařilo dosáhnout dostatečného výtěžku.

Pro následnou izolaci byl použit protokol pro izolaci VLPs na základě chloroform/n-buthanolové extrakce ( $\text{CHCl}_3/\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$  extrakce) vyvinutý Alžbětou Hejtmánkovou (za svobodna: Sekavová) pro izolaci VLPs viru SV40 (Sekavová, 2017).

Pelet buněk Sf9 byl rozmrazován při pokojové teplotě po dobu 30 minut. K peletu bylo přidáno 5 ml 1x koncentrovaného pufru B a buněčný pelet byl resuspendován. Dále bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru namíchaného dle protokolu: 500  $\mu\text{l}$  1x koncentrovaného pufru B, 5  $\mu\text{l}$  DNAzy I (Roche). Poté byl vzorek sonikován na ledu ve 4 cyklech po dobu 30 sekund při 40% amplitudě. Mezi každou sonikací byl vzorek ponechán bez zásahu kvůli zchladnutí. Směs byla centrifugována při 4 800 rpm, 4 °C po dobu 30 minut v centrifuze GS–15R (Beckman). Vzniklý supernatant byl přesunut do centrifugačních zkumavek typu Falcon o objemu 50 ml a byla přidána směs chloroformu a n-buthanolu tak, že objem supernatantu a chloroformu/n-butanolu byl 1:1. Směs chloroformu a n-butanolu byla namíchána 1:1. Směs byla důkladně promíchána a centrifugována při 4 800 rpm, 4 °C po dobu 15 minut v centrifuze GS–15R (Beckman). Ve směsi se oddělila vodná fáze obsahující VLPs a organická fáze. Vodná fáze byla odebrána a přesunuta do nové sterilní centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. Dále byl přidán 2,4 M síran amonný (0,32 g/ml) a chlorid sodný (11,5 g/l). Směs byla vortexována a zkumavka byla umístěna do rotační míchačky v chladové místnosti s konstantní teplotou 4 °C po dobu 30 minut. Směs byla centrifugována při 4 800 rpm, 4 °C po dobu 15 minut v centrifuze GS–15R (Beckman). Vzniklý precipitát byl resuspendován v 1 ml 1x koncentrovaného pufru B a přesunut do „low binding“ mikrozkuhavky. Resuspendovaný pelet byl centrifugován přes sacharózový



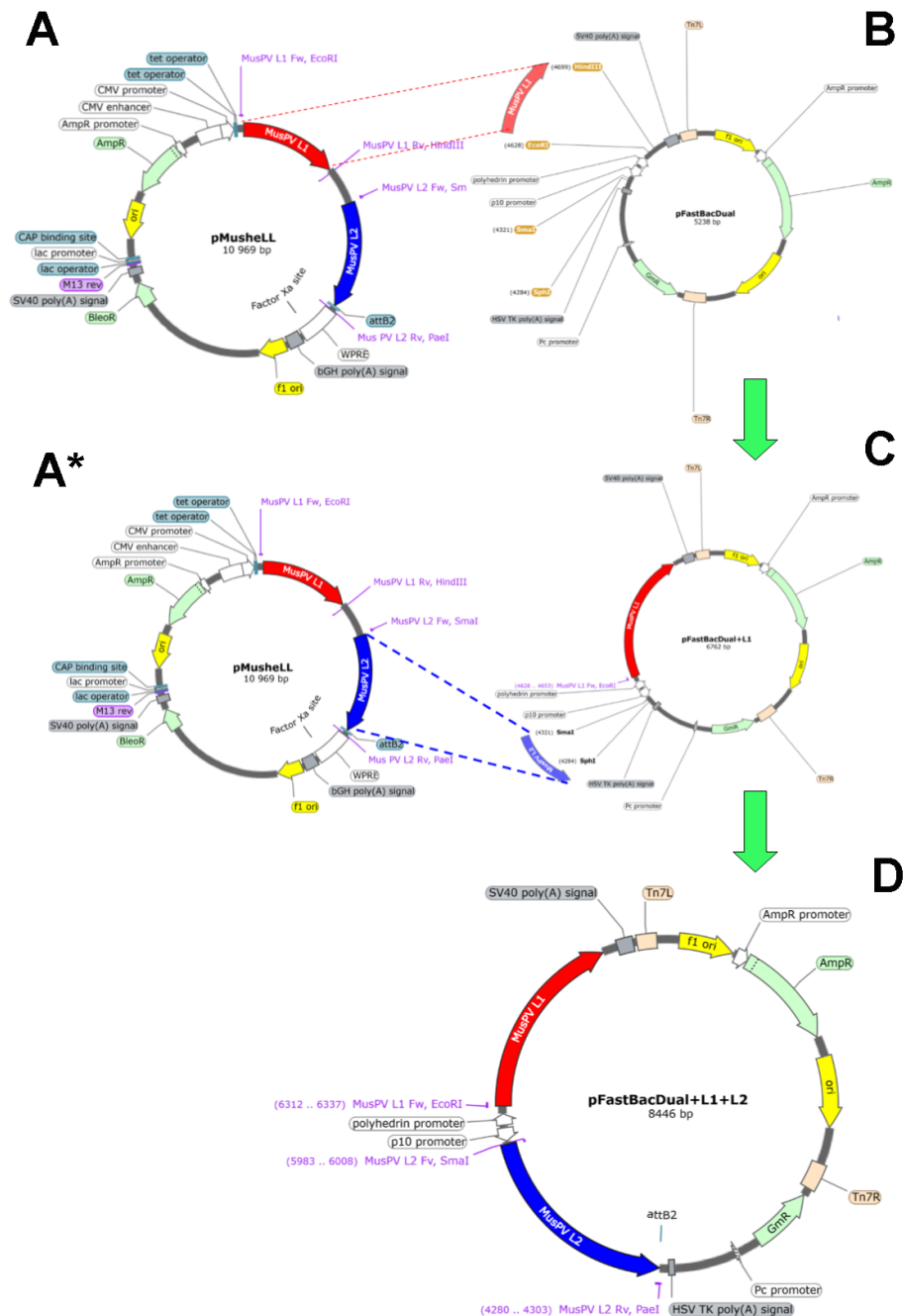
gradient. Gradient byl sestaven ze sacharózy o následujících koncentracích: 20 % (w/w), 40 % (w/w) a 55 % (w/w) v poměru 1:1:1,2. Nejprve byly do centrifugační kyvety pro rotor SW-41 nanесeny 2 ml 20% sacharózy, ta byla podvrstvena 40% sacharózou a pod to byla nanесena 55% sacharóza. Na takto připravený gradient byl shora nanесen promíchaný vzorek. Vzorek byl centrifugován při 35 000 rpm, 4 °C po dobu 3 hodin. Po centrifugaci byl gradient rozebrán rozebíračem frakcí. Z rozdělených frakcí byl připraven Imuno Dot Blot (4.2.5.4) a vytvořeny sítky pro elektronovou mikroskopii (viz kapitola 4.2.5.9). Dle získaných dat byly frakce sjednoceny a dialyzovány proti 1x koncentrovanému pufru B o objemu 1,5 -2 l.

## 5 Výsledky

Cílem této diplomové práce bylo připravit nanočástice – VLPs a PsVs, odvozené od myšního papilomaviru (MusPV) v savčím a bakulovirovém expresním systému a dostatečně je charakterizovat. Takto připravené částice byly značeny pomocí fluorescenčních barviv – NHS-Rhod a Ax488-SDP. Značené i neznačené částice – PsVs nesoucí reportérový gen pro GFP a luciferázu, byly použity k měření míry interakce s vybranými nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi. Pro přípravu pseudovirionů byl použit savčí expresní systém využívající savčí buněčnou linii 293TT. Buňky byly transfekovány plasmidem pMusheLL, nesoucím geny pro kapsidové proteiny L1 a L2 MusPV a plasmidem pCLucf, nesoucím geny pro zelený fluorescenční protein (GFP) a luciferázu. Takto připravené PsVs byly charakterizovány a poté použity pro pseudoinfekci nádorových i nenádorových buněčných linií a na základě plasmidů obsažených v částicích byla účinnost pseudoinfekce kontrolována na fluorescenčním mikroskopu na přítomnost zeleného signálu z GFP, tak za použití luciferázového reportérového testu. V práci byla ověřována hypotéza, že papilomavirové částice s vyšší mírou „infikují“ nádorové buňky oproti buňkám nenádorovým. Pro přípravu virům podobných částic byl použit bakulovirový expresní systém využívající hmyzí buněčnou linii Sf9. Pro tento expresní systém byly vytvořeny rekombinantní bakmidy – pro kapsidový protein L1 a pro kapsidové proteiny L1 a L2, které byly transfekovány do buněk Sf9. V těchto buňkách byly vytvořeny rekombinantní bakuloviry exprimující kapsidové proteiny MusPV. Exprese vedla k vytvoření dvou typů VLPs – jeden typ je tvořen pouze L1 kapsidovým proteinem a druhý je tvořen jak L1 tak L2 kapsidovým proteinem. Takto vytvořené VLPs byly charakterizovány a značeny pomocí fluorescenčních barviv NHS-Rhod a Ax488-SDP. Po obarvení byly VLPs využity k infekci vybraných nádorových a nenádorových buněčných linií a byla zkoumána jejich vzájemná interakce. Pro zobracování míry interakce byla využita metoda průtokové cytometrie. Buněčné linie byly vybrány na základě dostupnosti a s přihlédnutím k častěji používaným liniím v laboratoři virologie, jako jsou například buňky odvozené od karcinomu prostaty, které slouží ke zkoumání interakcí těchto buněčných linií s VLPs myšního polyomaviru, např. Suchanová, 2012. Dalším kritériem byla potřeba nenádorových buněk pro možná srovnání s buňkami nádorovými.

## 5.1 Produkce papilomavirových VLPs

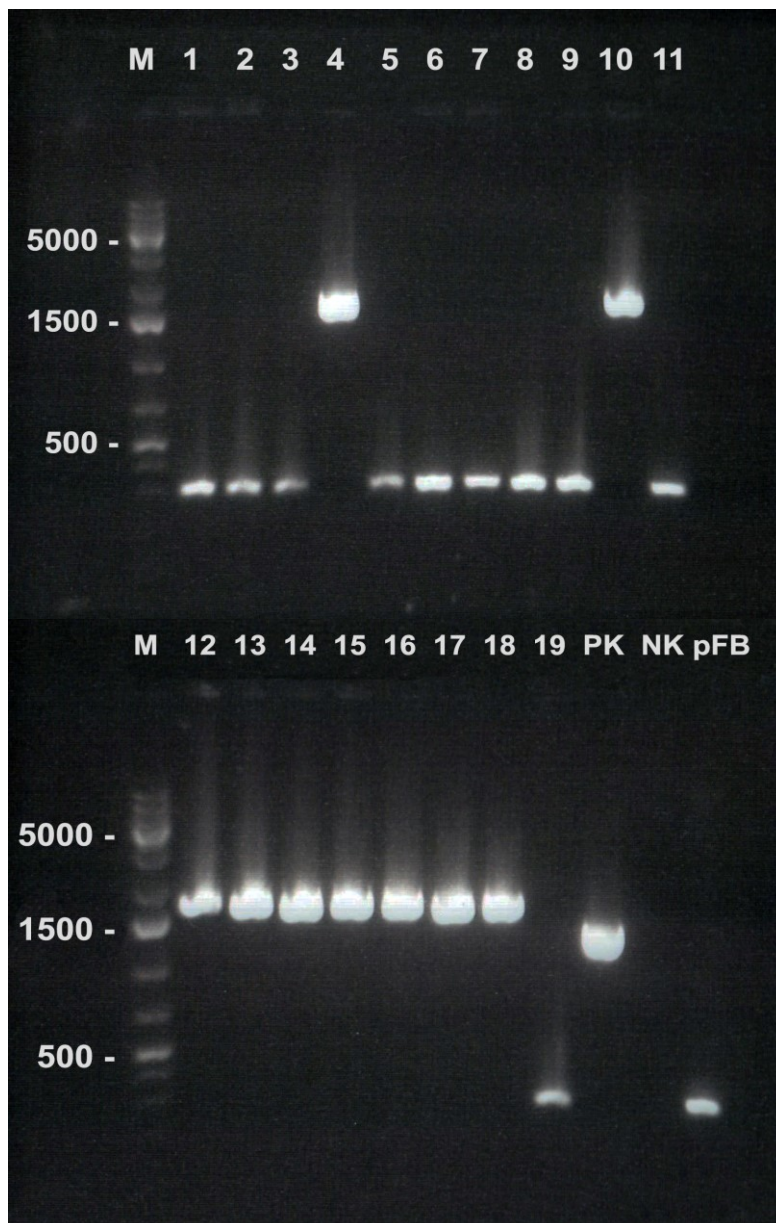
Pro produkci VLPs myšího papilomaviru byl využit bakulovirový expresní systém. Aby bylo možné úspěšně produkovat VLPs v hmyzích buňkách bylo zapotřebí překlonoval geny pro L1 a L2 kapsidové proteiny z plasmidu pMushell (John Schiller; Addgene plasmid #47023), (viz kapitola 4.2.4.1), který slouží pro produkci L1 a L2 proteinů v savčích buňkách (viz schéma vkládání genů do vektoru pFastBac Dual, Obr. č. 11).



**Obr. č. 11 – Schéma klonování genů pro kapsidové proteiny z plasmidu pMushell**

Gen pro L1 protein byl klonován pod pPH promotor a gen pro L2 protein byl klonován pod p10 promotor vektoru pFastBac Dual

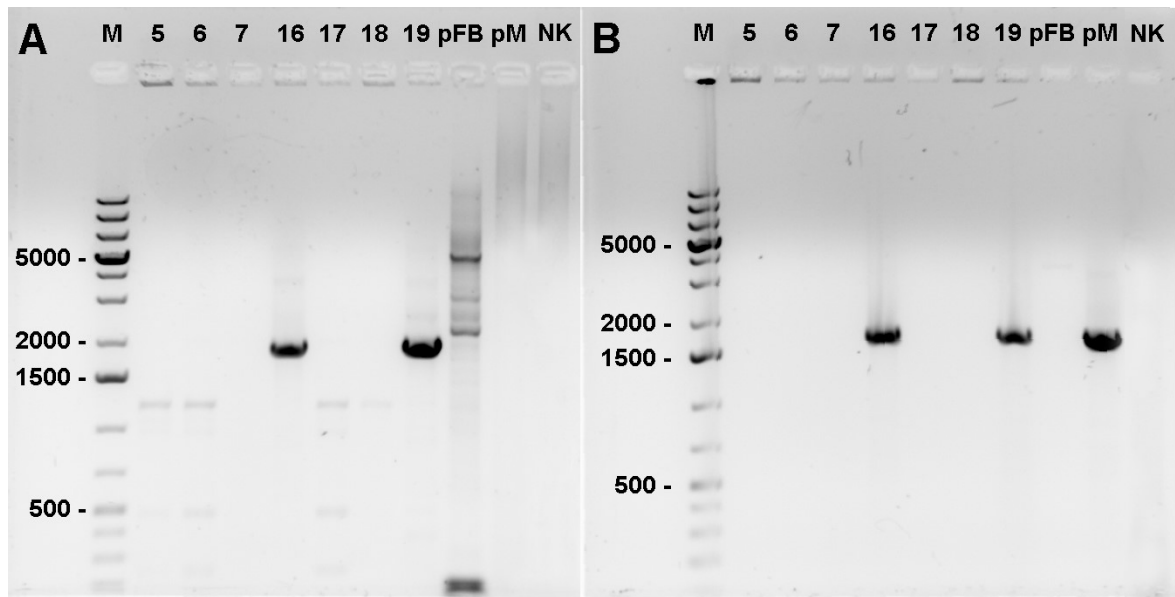
Z toho důvodu byla provedena polymerázová řetězová reakce s primery pro amplifikaci genů kapsidových proteinu L1 a L2, které měly na svých 5' koncích specificky nadefinovaná restrikční místa. Pro ověření úspěšné amplifikace byla použita metoda horizontální gelové elektroforézy. Dalším krokem bylo restrikční štěpení fragmentu L1 a plasmidu pFastBac Dual. Pro restrikční štěpení byly použity enzymy EcoRI a HindIII. Cílem restrikčního štěpení byla příprava linearizovaného vektoru s definovanými konci pro snadnější vložení fragmentu L1. Restrikční štěpení bylo kontrolováno metodou horizontální agarózové elektroforézy. Fragmenty připravené restrikčním štěpením byly přečištěny pomocí horizontální agarové elektroforézy za použití gelu obsahujícího agarózu s nízkým bodem tání. Po izolaci směsi pomocí komerční soupravy byly fragment L1 a linearizovaný pFastBac Dual ligovány za vzniku kruhového plasmidu nesoucího pod polyhedrinovým promotorem gen pro L1 kapsidový protein. Vzhledem k nízkým výtěžkům bylo upuštěno od metody přečištění pomocí horizontální agarózové elektroforézy a restrikční směsi byly přečištěny pomocí Fenol-chloroformové extrakce. Ligovaný vektor pFastBac Dual nesoucí gen pro L1 protein byl elektroporován do bakterií TOP10. Po elektroporaci byly bakterie vysety na selekční plotny obsahující ampicilin. Přítomnost vektoru ve vyrostlých monokloniích byla ověřena pomocí metody Genotypování bakteriálních kolonií („*Colony PCR*“) a horizontální agarózové elektroforézy. Během ověřování došlo k problémům s prokázáním přítomnosti vektoru pFastBac Dual s genem pro L1 protein. Po sérii opakování bylo zjištěno, že vzhledem k nadefinování primerů pro L1 gen, není tyto primery možné použít, neboť během restrikčního štěpení dochází k odštěpení části sekvence fragmentu a tudíž není možné, aby jeden ze zvolených primerů komplementárně nasedal na fragment. Proto byla použita sada primerů pro sekvence pod polyhedrinovým promotorem (pPH primery), (viz kapitola 4.2.4.3). Při použití těchto primerů byla ověřena přítomnost vektoru pFastBac Dual s genem pro L1 protein ve vybraných bakteriálních monokloniích (Obr. č. 12).



**Obr. č. 12 – Genotypování bakteriálních kolonií – gen pro L1 protein**

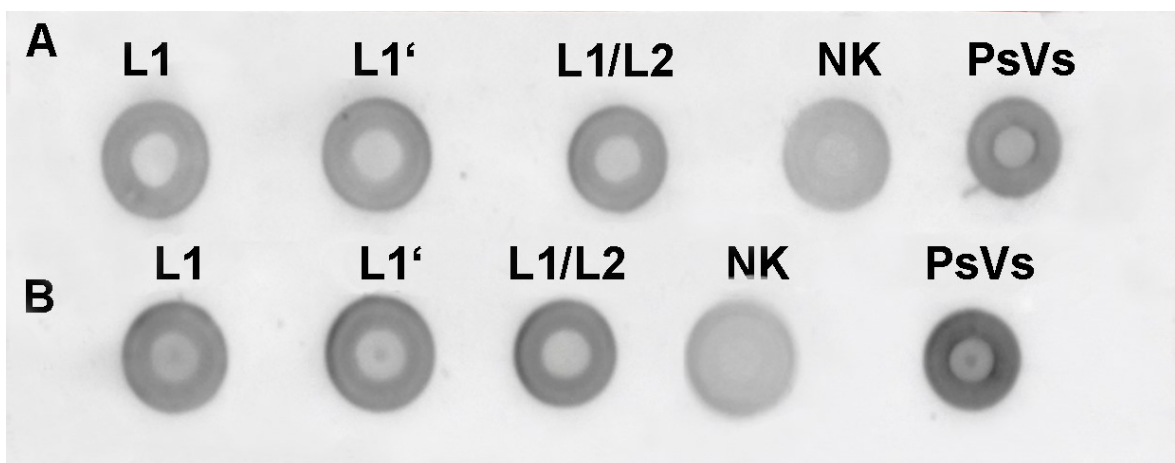
Genotypování provedené pomocí PCR s primery pro amplifikaci sekvence pod polyhedrinovým promotorem, kolonie 4, 10, 12-18 byly pozitivní na přítomnost vektoru pFastBac Dual s genem pro L1 protein, což bylo znázorněno proužkem o velikosti kolem 1600 pb, kolonie 1-3, 5-9, 11 a 19 byly negativní, jako kontrolní plasmid (PK), který pod polyhedrinovým promotorem nese kontrolní gen, byl použit plasmid pFastBac Dual se sekvencí pro VP1 protein viru SV40 vytvořený Mgr. et Mgr. Alžbětou Hejtmánkovou, což bylo znázorněno proužkem o velikosti přibližně 1090 pb, pFB označuje prázdný pFastBac Dual, NK označuje negativní kontrolu připravenou pro genotypování a obsahující pouze PCR směs bez templátové DNA

Pozitivní kolonie byly podrobeny sekvenaci a dle dodaných dat byla ověřeno, zda byl gen pro L1 kapsidový protein správně vložen do plasmidu pFastBac Dual. Bakterie obsahující správně vložený gen L1 byly kultivovány a z narostlých kolonií byl izolován plasmid. Část vyizolovaného plasmidu byla použita pro vkládání genu pro L2 kapsidový protein za vzniku plasmidu nesoucího oba kapsidové proteiny. Zbytek byl použit pro tvorbu rekombinantního bakulovirus pro infekci buněk Sf9. L2 gen byl vložen do vektoru již obsahujícího L1 gen stejným způsobem, jako tomu bylo u genu L1, jen s tím rozdílem, že gen L2 byl vkládán pod promotor p10. Přítomnost byla ověřena pomocí Genotypování bakteriálních kolonií (Obr. č. 13).



**Obr. č. 13 – Genotypování bakteriálních kolonií – gen pro L2 kapsidový protein**

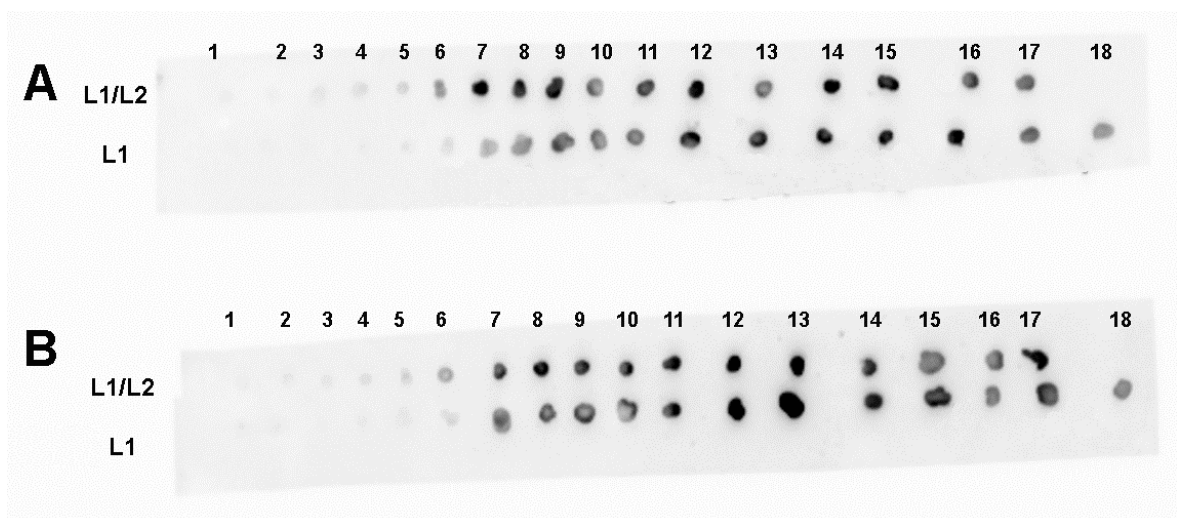
Genotypování provedené pomocí PCR s primery pro amplifikaci sekvence vložené pod p10 promotorem (A) a s primery pro amplifikaci genu L2 proteinu (B). Dle proužku o velikosti přibližně 1 700 pb bylo usuzováno, že kolonie 16 a 19 byly pozitivní na přítomnost vektoru pFastBac Dual s genem pro L1 a L2 protein, kolonie 5-7 a 17-18 byly negativní, pFB označuje plasmid pFastBac Dual, pM označuje plasmid pMusheLL, na obrázku B je možné vidět proužek u vzorku pM v rozmezí 1 500 pb a 2 000 pb, jenž by měl zobrazovat amplifikovaný gen L2 pomocí *forward* primeru MusPV L2, Smal a *reverse* primeru MusPV L2, Pael, NK označuje negativní kontrolu připravenou pro genotypování a obsahující pouze PCR směs bez templátové DNA



**Obr. č. 14 – Imuno Dot Blot z lyzátů infikovaných buněk Sf9**

Imuno Dot Blot byl vyvolán pomocí Rb $\alpha$ MuPV-D a Rb $\alpha$ MusPV-N a G $\alpha$ Rb-PX, PsVs sloužily jako pozitivní kontrola a jako negativní kontrola (NK) sloužil lyzát z neinfikované buňky Sf9, buněčný lyzát L1, L1' a L1/L2 byl pozitivní na přítomnost kapsidového proteinu L1 a L2, dle výsledků Imuno Dot Blotu bylo zjištěno, že jak Rb $\alpha$ MusPV-D, tak Rb $\alpha$ MuPV-D reaguje i s lyzátem z neinfikovaných buněk Sf9

Plasmidy pFastBac Dual nesoucí gen pro L1 protein nebo pro L1/L2 proteiny byly elektroporovány do buněk DH10Bac, které již obsahovaly bakulovirový genom ve formě bakmidu. Na základě homologní rekombinace mezi vektorem pFastBac Dual a bakmidem došlo k zaklonování genů pro L1 a L2 gen do rekombinantního bakmidu. Kolonie obsahující rekombinantní bakmid byly vybrány díky rezistencím vůči selekčním antibiotikům nesených rekombinantním bakmidem obsahujícím vložené geny a na základě porušení genu pro produkci  $\beta$ -galaktosidázy, jež umožňovala tzv. modro-bílou selekci. Vyrostlé bílé monokolonie byly pozitivní na přítomnost rekombinantního bakmidu a byly dále kultivovány kvůli jeho izolaci. Vyizolovaný bakmid byl transfekován transfekčním činidlem Cellfectin™ II do hmyzích Sf9 buněk dle protokolu výrobce. Po uplynutí doby nezbytné pro průběh transfekce bylo z Petriho misek odebráno virové inokulum obsahující rekombinantní bakulovirus a bylo použito pro následné infekce. Po provedení druhé série infekce buněk Sf9 pomocí rekombinantního bakuloviru byla přítomnost L1 a L2 proteinu ověřena pomocí Imuno Dot Blotu (Obr. č. 14). Pomocí metod SDS-PAGE a Western Blot byla snaha ověřit produkci L1 a L2 proteinu v lyzátech hmyzích buněk (data neuvedena). Na základě Imuno Dot Blotu bylo zjištěno, že Rb $\alpha$ MusPV-D i Rb $\alpha$ MusPV-N zároveň reagují i s buněčnými proteiny, které se vyskytovaly v lyzátu. Tato skutečnost ztěžovala možné rozdělení L1 a L2 proteinu, protože nebylo možné jednoznačně rozeznat virové proteiny od proteinů buněčných. Po nashromáždění dostatečného



**Obr. č. 15 – Imuno Dot Blot frakcí získaných rozebráním CsCl gradientu.**

Imuno Dot Blot byl vyvolán pomocí Rb $\alpha$ MusPV-D (A) a Rb $\alpha$ MusPV-N (B) a G $\alpha$ Rb-Px, v gradientu L1/L2 částic byly pozitivní frakce 6 až 17, v gradientu L1 částic byly pozitivní frakce 7 až 18

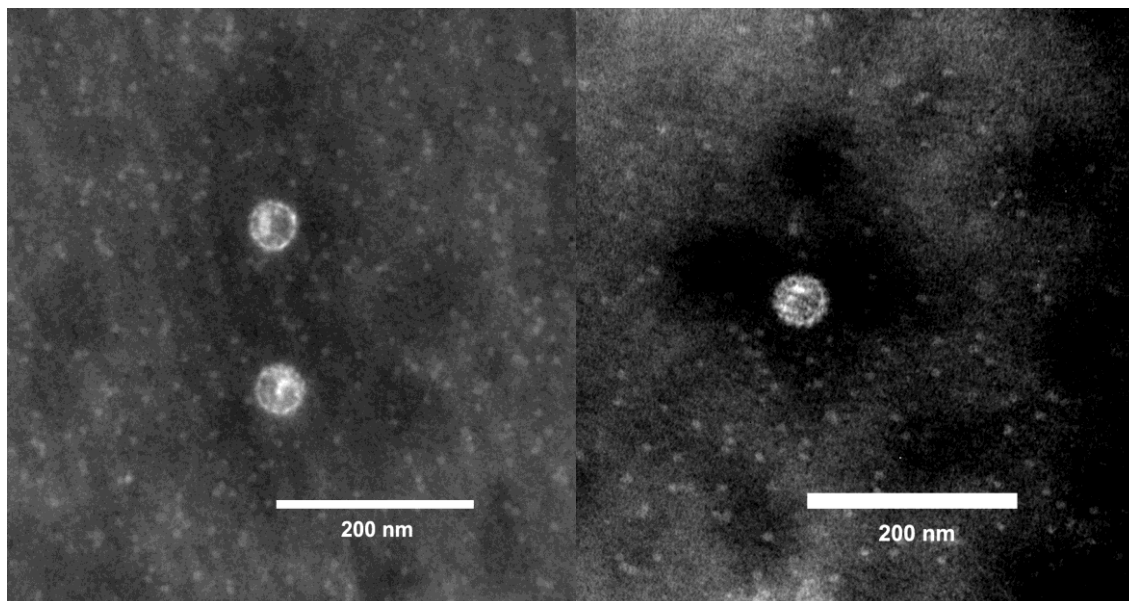
množství infikovaných buněk Sf9 byly buňky podrobeny izolaci VLPs na základě centrifugace v gradientu chloridu cesného (viz kapitola 4.2.5.5).

Přítomnost VLPs byla ověřena pomocí Imuno Dot Blotu (Obr. č. 15) a u vybraných frakcí i pomocí elektronové mikroskopie (Obr. č. 16). Na základě výsledků elektronové mikroskopie, kdy většina VLPs byla rozpadlá, byl změněn protokol pro izolaci VLPs. Původní protokol byl nahrazen protokolem  $\text{CHCl}_3/\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$  extrakce pro izolaci VLPs částic (viz kapitola 4.2.5.17). Dle tohoto protokolu byly vyizolovány VLPs. Po izolaci za použití sacharóзовého gradientu byly gradienty rozebrány a z jednotlivých frakcí byl připraven Imuno Dot Blot k dokumentaci přítomnosti kapsidových proteinů ve vzorcích (Obr. č. 17) a dle výsledků byly frakce sloučeny dialyzovány proti pufru B. Z vybraných směsí frakcí byly vytvořeny sítky pro elektronovou mikroskopii pro dokumentaci přítomnosti intaktních virových částic (Obr. č. 18). Vyizolované částice byly dále podrobeny analýze pomocí metody SDS-PAGE a Western Blot (Obr. č. 19), s cílem prokázat, že L1/L2 VLPs opravdu obsahují kromě L1 také L2 protein.

Při použití metod SDS-PAGE resp. Western Blot bylo očekáváno buď rozdělení jednotlivých kapsidových proteinů na základě odlišné mobility v gelu nebo alespoň kvalitativní navýšení proteinu v oblasti 60 kDa v případě L1/L2 VLPs. Bohužel, dle výsledků metod SDS-PAGE resp. Western Blot, nebylo možné od sebe odlišit L1 a L2 kapsidové proteiny VLPs, neboť na výsledném gelu resp. membráně se zobrazují jako pruh o hodnotě přibližně 60 kDa. Jediný náznak toho, že je možné od sebe odlišit L1 a L1/L2 VLPs přinesl polyakrylamidový gel po SDS-PAGE barvený pomocí Imperial™ Protein Stain (Obr. č. 20). Na tomto gelu je patrné, že při stejné nanášce proteinu na gel je intenzita proužku zobrazující L1/L2 VLPs vyšší, než intenzita proužku zobrazujícího L1 VLPs.

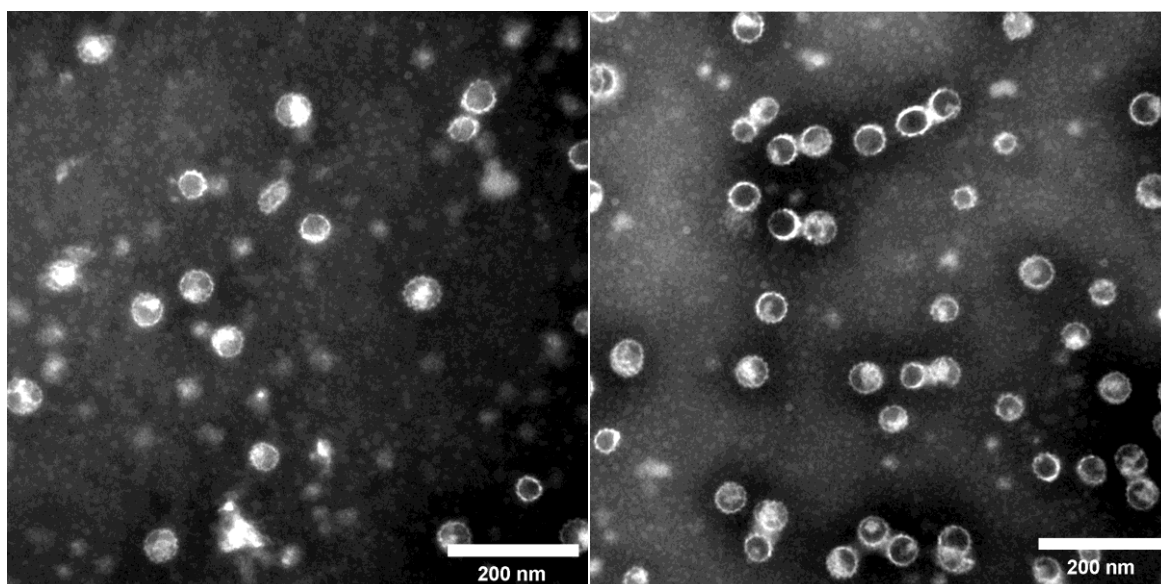
Pro odlišení L1 a L1/L2 VLPs byl použit komerční gradientový gel (kapitola 5.3), avšak ani na tomto gelu se nepodařilo na základě odlišné mobility L1 a L2 proteinů oba druhy rozlišit. MusPV VLPs částice byly použity pro značení pomocí NHS-Rhod a Ax488-SDP. Závěrem lze konstatovat, že pomocí bakulovirového expresního systému se podařilo vytvořit MusPV VLPs částice, jež byly analyzovány pomocí metod SDS-PAGE a Western Blot a jejichž morfologie byla ověřena pomocí elektronové mikroskopie. Bohužel nebylo možné rozlišit jednotlivé kapsidy o různých proteinových složeních.





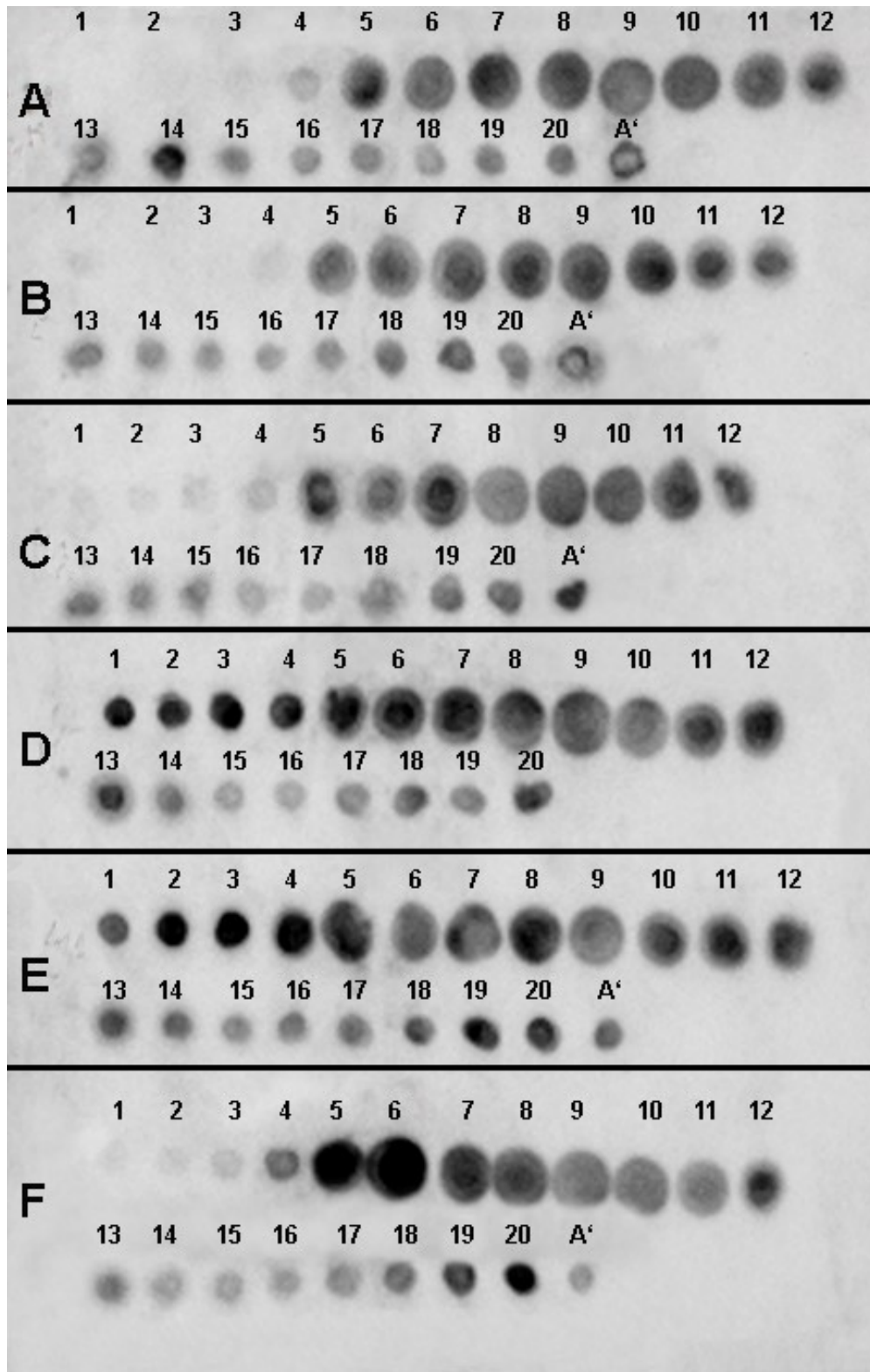
**Obr. č. 16 – Snímek z elektronového mikroskopu**

Na snímku jsou zobrazeny MusPV VLPs (vlevo MusPV L1/L2, vpravo MusPV L1), částice dosahují velikosti přibližně 55 nm, v okolí částic je vyplněno rozpadlým virovým materiálem



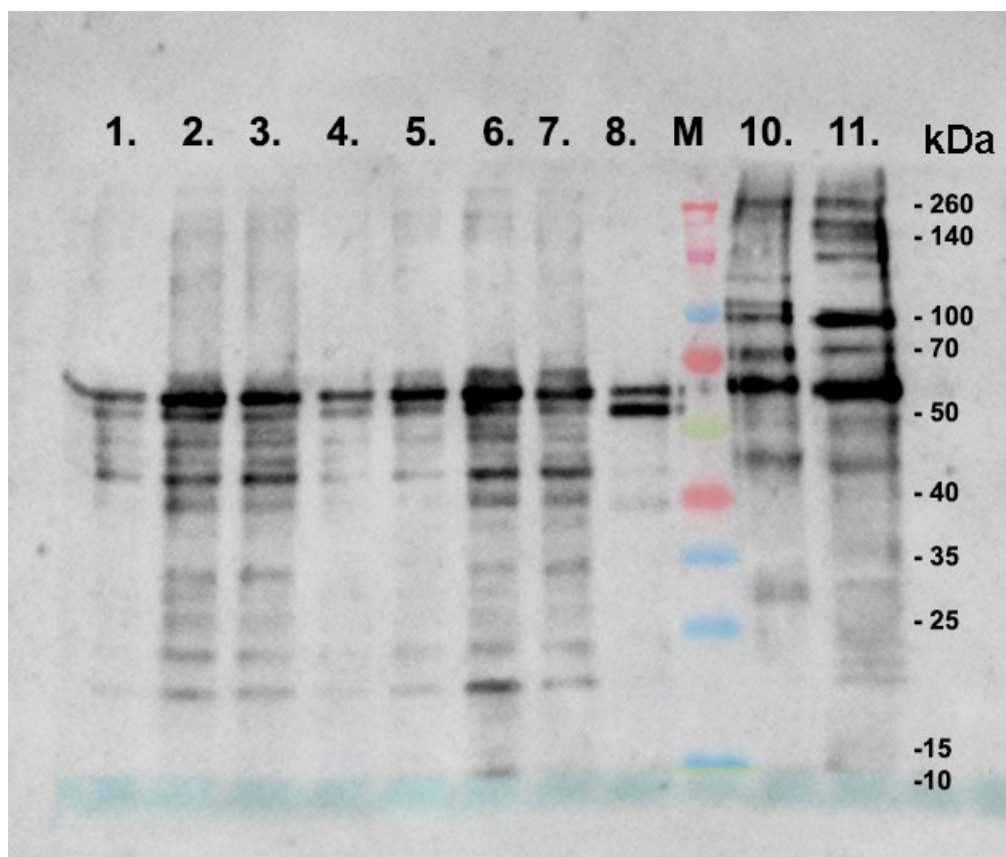
**Obr. č. 18 – Snímky z elektronového mikroskopu**

Na snímku jsou zobrazeny MusPV VLPs složené z L1/L2 proteinů (vpravo) a L1 proteinu (vlevo), izolované dle protokolu pro  $\text{CHCl}_3/\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$  extrakci

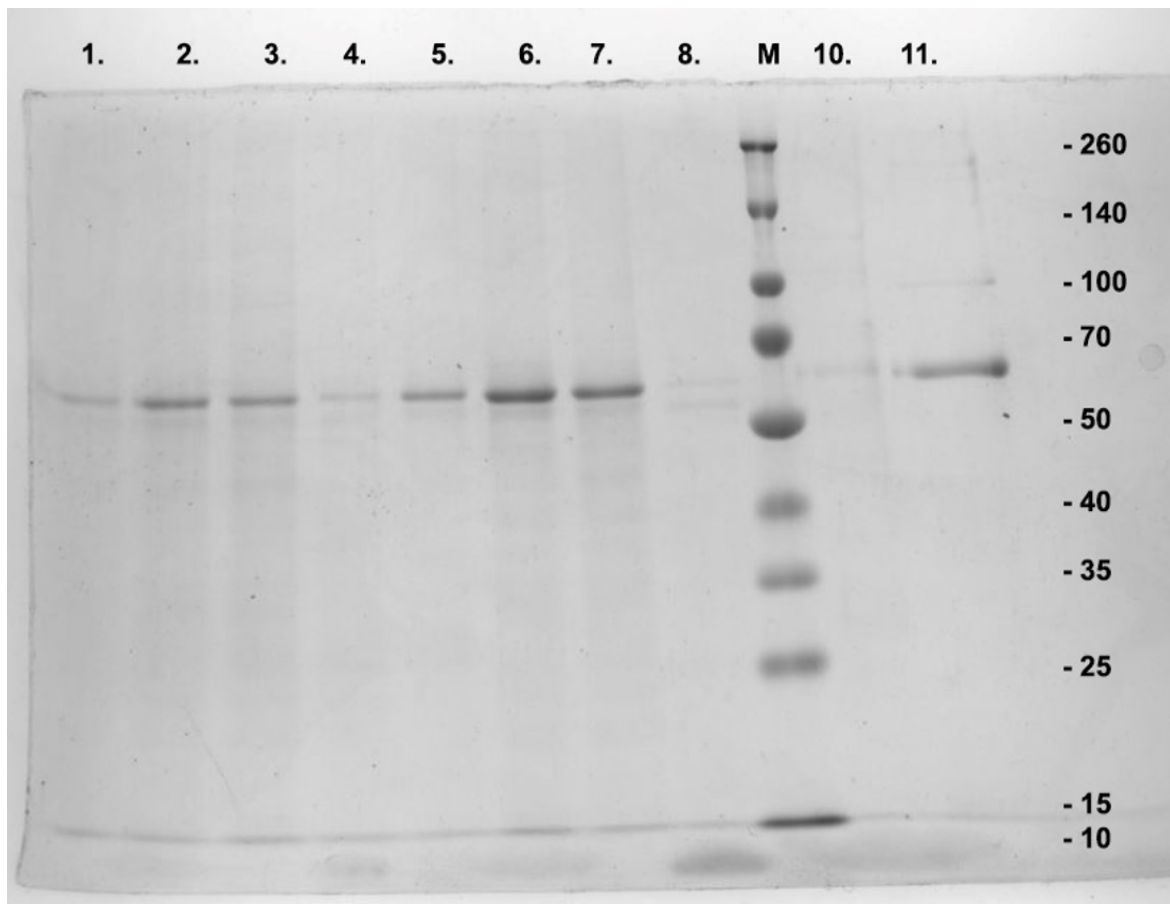


**Obr. č. 17 – Imuno Dot Blot po izolaci MusPV VLPs L1 a L1/L2**

Frakce 1-20 gradientu A-F, vzorek A' byl resuspendovaný pelet, který se vytvořil během centrifugace, Imuno Dot Blot byl vyvolán pomocí Rb $\alpha$ MusPV-N a G $\alpha$ Rb-PX, vzorky A a B obsahovaly MusPV L1 protein a vzorky C-F obsahovaly MusPV L1/L2 proteiny



**Obr. č. 19 – Western Blot MusPV VLPs složených z L1 a L1/L2 kapsidových proteinů**  
 1 - MusPV L1 VLPs 0,5  $\mu$ g, 2-4 – MusPV L1 VLPs 2  $\mu$ g, 5 - MusPV L1/L2 VLPs 0,5  $\mu$ g,  
 6-8 – MusPV L1/L2VLPs 2  $\mu$ g, M- marker, 10 – MusPV PsVs, 11 – MusPV PsVs od J.  
 Žáčkové Suchanové Ph.D. (použity pro imunizace při přípravě polyklonálního  
 králičího séra), vyvoláno pomocí Rb $\alpha$ MusPV-D a G $\alpha$ Rb-PX, L1 i L1/L2 VLPs se na  
 tomto gelu zobrazují jako proužek o velikosti přibližně 60 kDa



**Obr. č. 20 – Gel po SDS-PAGE rozbrazující MusPV L1 a L1/L2 VLPs barvený pomocí Imperial™ Protein Stain**

1 - MusPV L1 VLPs 0,5  $\mu$ g, 2-4 – MusPV L1 VLPs 2  $\mu$ g, 5 - MusPV L1/L2 VLPs 0,5  $\mu$ g, 6-8 – MusPV L1/L2VLPs 2  $\mu$ g, M- marker, 10 – MusPV PsVs, 11 – MusPV PsVs od J. Žáčkové Suchanové Ph.D. (použity pro imunizace při přípravě polyklonálního králičího séra), vyvoláno pomocí R $\beta$ MusPV-D a G $\alpha$ Rb-PX, L1 i L1/L2 VLPs se na tomto gelu zobrazují jako proužek o velikosti přibližně 60 kDa, u proužku ve vzorku 6 (L1/L2) je možné pozorovat vyšší intenzitu oproti vzorku 2 (L1) i přes shodnou nanášku rovnající se 2 $\mu$ g pro oba vzorky - tato skutečnost by mohla být způsobena přítomností L2 proteinu ve vzorku 6

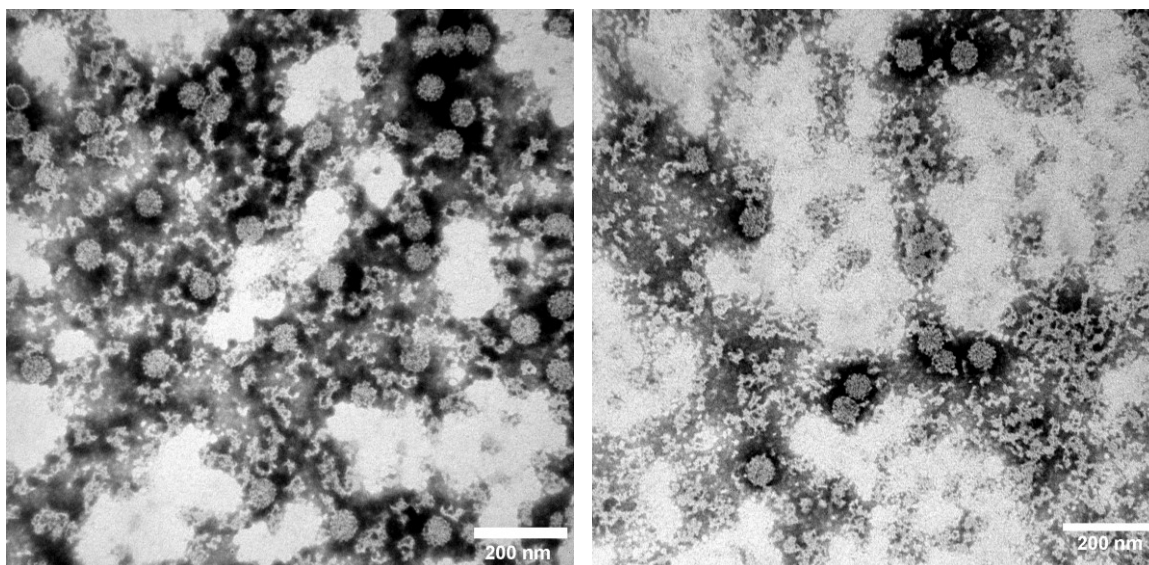
## 5.2 Příprava značených MusPV PsVs

Pro značení byly využity PsVs produkované v savčím expresním systému a VLPs produkované v bakulovirovém expresním systému. PsVs byly použity pro pilotní pokus značení virových částic pomocí fluorescenčního barviva NHS-Rhod. Toto značení probíhalo před tím, než bylo vyprodukováno dostatečné množství VLPs, poté bylo od značení PsVs upuštěno a VLPs částice byly značeny pomocí NHS-Rhod a Ax488-SDP. Od PsVs částic bylo rovněž upuštěno z důvodu nedostatečného výtěžku značených částic. Izolace PsVs probíhala pomocí ultracentrifugace v gradientu jodixanolu (Optiprep™), (viz kapitola 4.2.5.7), který komplikuje následné stanovení proteinové koncentrace a jeho odstranění vede k ohromným ztrátám materiálu.

Pro vlastní značení PsVs pomocí NHS-Rhod byl použit protokol doporučený výrobcem pro značení protilátek (viz kapitola 4.2.5.12). Po následném přečištění centrifugací v gradientu jodixanolu, byly ze vzorku vytvořeny sítky pro elektronovou mikroskopii (Obr. č. 21). Byly připraveny 2 nitrocelulózkové membrány. Jedna byla vyvolána pomocí Rb $\alpha$ MusPV-N a G $\alpha$ Rb-PX pro průkaz PsVs ve vzorku (Obr. č. 22) a druhá byla měřena pomocí fluorometru Molecular Imager FX Pro Plus multiimager system (Bio-Rad) pro průkaz fluorescenčního značení částic (Obr. č. 23).

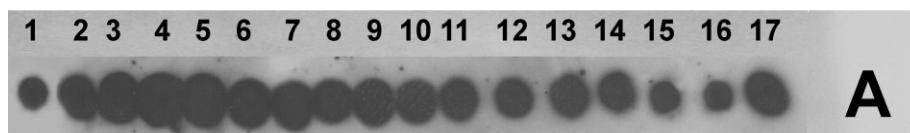
Dle výsledků Imuno Dot Blotu a fluorometrického měření byly vybrané frakce (3. - 9. frakce) jodixanolového gradientu spojeny a přečišťovány, aby byly jodixanolu zbaveny. Tento krok se stal kritickým, neboť při použití Microsep™ Centrifugal Devices 300K (Pall) nebylo možné centrifugací získat z kolonky materiál, protože skrze membránu kolonky neprotekl vzorek. Při tomto kroku došlo k výrazným ztrátám. Vzorek byl z kolonky přesunut do mikrozkuřavky a kolonka byla vypláchnuta 100  $\mu$ l 1x pufru B. Pro ověření přítomnosti kapsidových proteinů ve vzorcích získaných z kolonky byl proveden Imuno Dot Blot (Obr. č. 24), který prokázal, že vzorek obsahuje protejnový materiál. Jeho množství však bylo velmi malé a koncentraci proteinů se nepodařilo vůbec stanovit.

Závěrem lze konstatovat, že i když bylo pravděpodobně značení MusPV PsVs pomocí rhodaminu úspěšné, je zjevné, že šetrnou izolaci virových částic v gradientu jodixanolu (Optiprep™) nebude možné pro účely této práce používat.



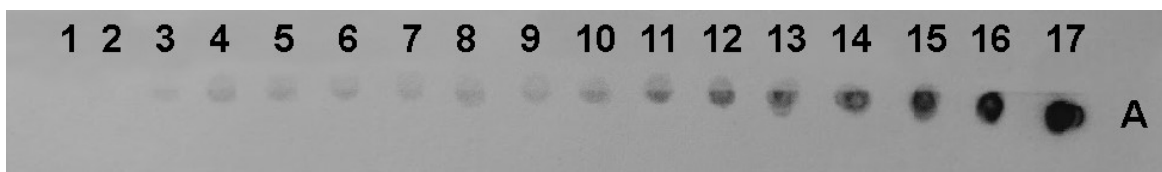
**Obr. č. 21 – Snímky z elektronové mikroskopie značených MusPV PsVs**

Snímky zachycují značené MusPV L1/L2 PsVs s navázaným Rhod, vlevo snímek 4. frakce, vpravo snímek 9. frakce, kolem částic je možné vidět rozpadlý materiál



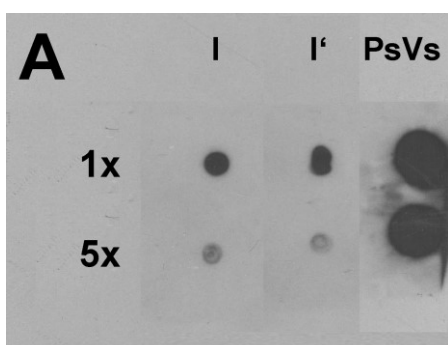
**Obr. č. 22 – Imuno Dot Blot jednotlivých frakcí po Optiprepu™**

Imuno Dot Blot pro průkaz proteinů L1 a L1/L2 v jednotlivých frakcích získaných rozebráním gradientu po centrifugaci v Optiprepu™, Imuno Dot Blot byl vyvolán pomocí Rb $\alpha$ MusPV-N a G $\alpha$ Rb-PX



**Obr. č. 23 – Měření fluorescenčního signálu značených MusPV L1/L2 PsVs**

Fluorescenční Dot Blot jednotlivých frakcí jodixanolového gradientu změřený pomocí fluorometru Molecular Imager FX Pro Plus multiimager system (Bio-Rad), 4. až 17. frakce byly pozitivní na Rhod signál, silný signál posledních frakcí byl pravděpodobně způsoben velkým množstvím nenavázaného barviva NHS-Rhod,



**Obr. č. 24 – Dot Blot MusPV PsVs po přečištění Microsep™ Centrifugal Devices 300K**

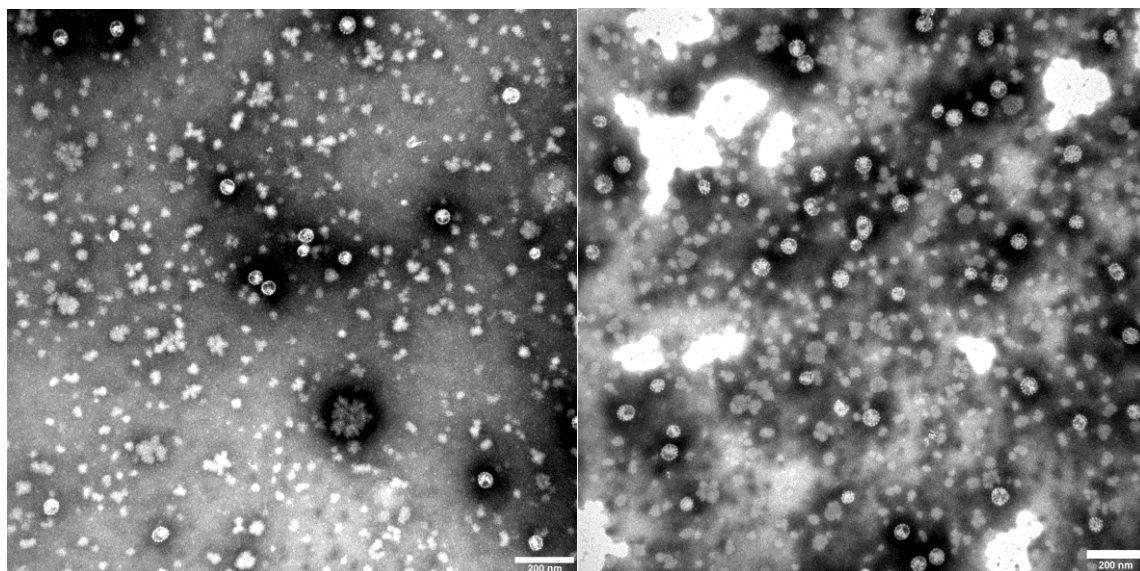
Imuno Dot Blot 1x a 5x ředěného vzorku (I) získaného z kolonky a vzorku získaného promytím kolonky 100  $\mu$ l 1x pufru B (I'), jako kontrola byly použity neznačené MusPV PsVs

### 5.3 Příprava značených MusPV VLPs pomocí Rhod a Ax488

Po nashromáždění dostatečného množství buněk infikovaných rekombinantním bakulovirem produkujícím MusPV L1 nebo MusPV L1/L2 VLPs byly z těchto buněk vyizolovány VLPs pomocí protokolu pro  $\text{CHCl}_3/\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$  extrakci a purifikovány v třístupňovém gradientu sacharózy (20%, 40% a 55% (w/w) gradient), (viz kapitoly 4.2.5.16 a 5.1). Vyizolované VLPs byly nejprve použity pro značení pomocí NHS-Rhod a poté i Ax488-SDP.

Barvení MusPV VLPs pomocí NHS-Rhod probíhalo dle stejného protokolu, jako tomu bylo u MusPV PsVs, s tím rozdílem, že pro barvení bylo použito menší množství barviva (viz kapitola 4.2.5.13). Po obarvení byly VLPs částice přečištěny pomocí centrifugace přes 20% (w/w) sacharózový polštář, resuspendovány v 1x pufru B, naneseny na sítky pro elektronovou mikroskopii (Obr. č. 25) a byla změřena koncentrace částic pomocí Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Barvení MusPV VLPs L1 a L1/L2 pomocí Ax488-SDP probíhalo dle protokolu pro dané barvivo. Během prvotní izolace neznačených VLPs se ve vzorcích vytvořila bílá sraženina, kterou nebylo možné

resuspendovat, a po centrifugaci se vždy usazoval materiál na dně. Z tohoto důvodu bylo barvivo přidáno ke směsi supernatantu a peletu vzorku a předpokládalo se, že značené částice budou posléze izolovány diferenciální centrifugací. Po obarvení byly částice dialyzovány proti 1x pufru B. Při dialýze částic MusPV L1/L2 VLPs došlo k prasknutí dialyzačního střeva se směsí frakcí 5.–8., kde bylo očekáváno nejvyšší zastoupení



**Obr. č. 25 – Snímky z elektronového mikroskopu – MusPV L1 a L1/L2 VLPs značené Rhod**  
MusPV VLPs skládající se z kapsidového proteinu L1 (vlevo) a proteinů L1/L2 (vpravo) značené pomocí Rhod

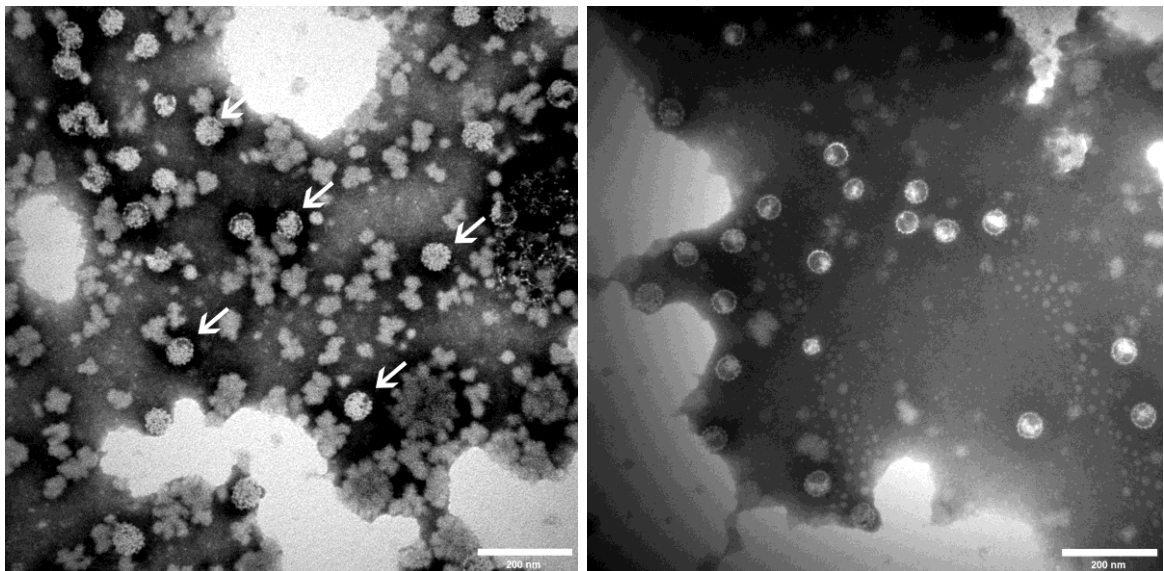
intaktních VLPs (viz kapitola 5.1 – Obr. č. 17). Pro další práci byla tedy použita směs frakcí 9-12. Směs VLPs značených Ax488 byla opakovaně centrifugována a vzniklý pelet byl resuspendován a sonikován. Po 4. resuspenování sraženého materiálu byl veškerý získaný supernatant centrifugován přes 20% (w/w) sacharózový polštář a ze vzniklého peletu, který byl resuspendován v pufru B, byly vytvořeny sítě pro elektronovou mikroskopii dokumentující stabilitu částic po barvení (Obr. č. 26).

Značené VLPs – jak částice značené Rhod, tak částice značené pomocí Ax488 byly rovněž analyzovány pomocí SDS-PAGE za použití komerčního gradientového polyakrylamidového gelu s koncentracemi od 4 % po 15 %. Gradientový gel byl zvolen jako další možná alternativa k rozlišení částic obsahujících L1/L2 kapsidové proteiny od částic složených pouze z L1 kapsidového proteinu. Gradientový gel byl po rozdělení vzorků nejprve analyzován za použití fluorometru Molecular Imager FX Pro Plus multiimager system (Bio-Rad), díky kterému bylo možné detekovat značené částice (Obr. č. 27 A a B)



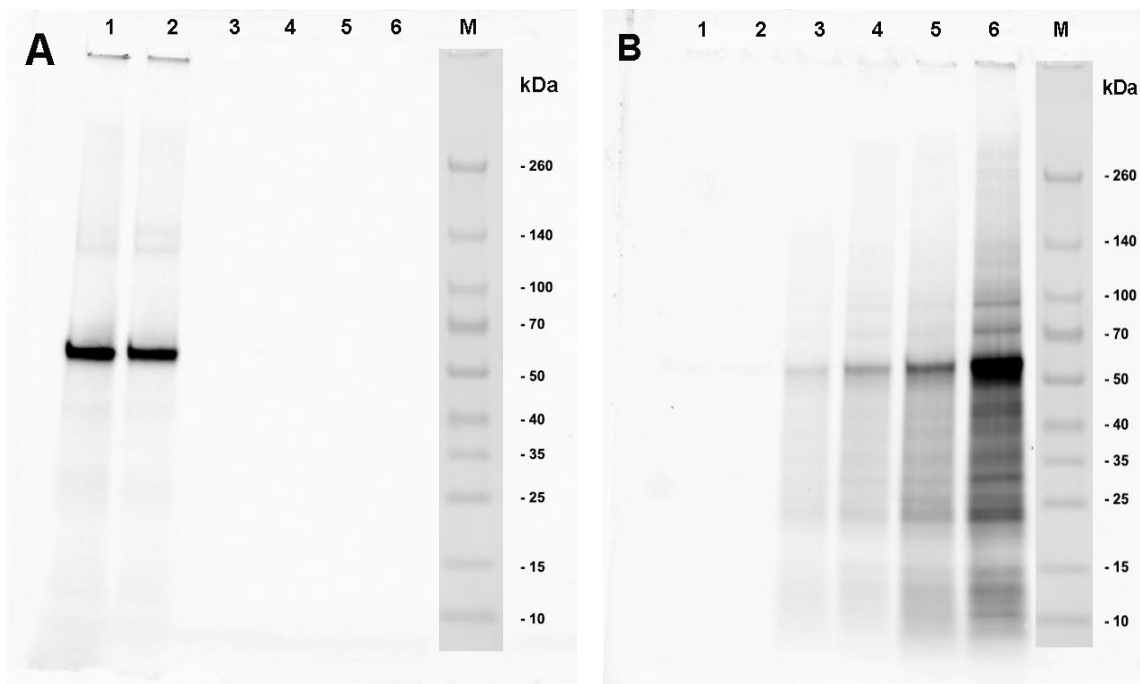
Při použití komerčního gradientového gelu a fluorescenčně značených částic bohužel nebylo možné detekovat rozdíly mezi L1 a L2 proteiny resp. L1 a L1/L2 částicemi.

Závěrem lze konstatovat, že ačkoli došlo k neočekávanému výskytu bílé sraženiny při izolaci VLPs dle protokolu pro  $\text{CHCl}_3/\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$  extrakci, nedošlo k výraznému úbytku VLPs ve vzorcích a ačkoli byla směs frakcí 5.-8. MusPV L1/L2 ztracena, tak byla plnohodnotně nahrazena směsí frakcí 9.-12. Značení MusPV VLPs proběhlo dle získaných výsledků z fluorometru úspěšně a tedy bylo vyprodukováno dostatečné množství VLPs značených pomocí Rhod a Ax488. Z výsledků metody SDS-PAGE za použití gradientového gelu vyplývá, že ani při použití tohoto typu gelu nebylo možné rozlišit L1 a L1/L2 částice dle jejich mobility v gelu. Značené VLPs byly dále použity pro zkoumání interakcí s nádorovými a nenádorovými buňkami.



**Obr. č. 26 – Snímky z elektronového mikroskopu - značené MusPV VLPs – Ax488**

MusPV VLPs skládající se z kapsidového proteinu L1 (vlevo) a proteinů L1/L2 (vpravo), oboje značené pomocí Ax488



**Obr. č. 27 – Gradientový gel s MusPV VLPs značenými Rhod a Ax488**

Gel byl vizualizovaný pomocí fluorometru Molecular Imager FX Pro Plus multiimager system (Bio-Rad),

A – zaznamenáno v kanálu pro Rhod, excitace při 532 nm, emise při 555 nm, 1 – L1 VLPs značené Rhod, nanáška 0,5  $\mu$ g, 2 – L1/L2 VLPs značené Rhod, nanáška 0,5  $\mu$ g, proužek s nejvyšší intenzitou signálu ve vzorcích 1 a 2 odpovídá velikosti kolem 60 kDa, což bylo považováno za důkaz přítomnosti značených proteinů L1 a L1/L2 VLPs, L1 a L1/L2 částice nebylo možné od sebe odlišit na základě jejich mobility v gelu, M - marker

B – zaznamenáno v kanálu pro Ax488, excitace při 488 nm, emise při 530 nm, 3 – L1 VLPs značené Ax488, nanáška 0,5  $\mu$ g, 4 – L1/L2 VLPs značené Ax488, nanáška 0,5  $\mu$ g, 5 – L1 VLPs značené Ax488, nanáška 2  $\mu$ g, 6- L1/L2 VLPs značené Ax488, nanáška 2  $\mu$ g, proužek s nejvyšší intenzitou signálu ve vzorcích 3-6 odpovídá velikosti kolem 60 kDa, což bylo považováno za důkaz přítomnosti značených proteinů L1 a L1/L2 VLPs, L1 a L1/L2 částice nebylo možné od sebe odlišit na základě jejich mobility v gelu, M - marker

## 5.4 Kvantifikace počtu molekul barviva na VLPs

Pro kvantifikaci počtu molekul byla měřena absorbance pomocí ELISA readeru. Pro každý typ částice – L1 nebo L1/L2 – značené pomocí Rhod nebo Ax488 bylo zjištěno absorpční spektrum v rozmezí 300 – 700 nm. Zároveň byla vytvořena kalibrační křivka závislosti koncentrace barviva a absorbance pro NHS-Rhod a Ax488-SDP. Dle absorbance jednotlivých částic a kalibračních křivek byla určena velikost absorbčního „píku“. Celkové množství molekul barviva ve vzorku bylo vypočteno jako podíl velikosti absorbčního „píku“ a kalibračního koeficientu získaného z kalibrační křivky pro dané barvivo. Počet molekul barviva na jednu částici byl přepočten dle molárního množství částic ve vzorku. Shrnutí v Tab. č. 12.

Tab. č. 12 – Tabulka s daty pro kvantifikaci počtu molekul barviva na VLPs

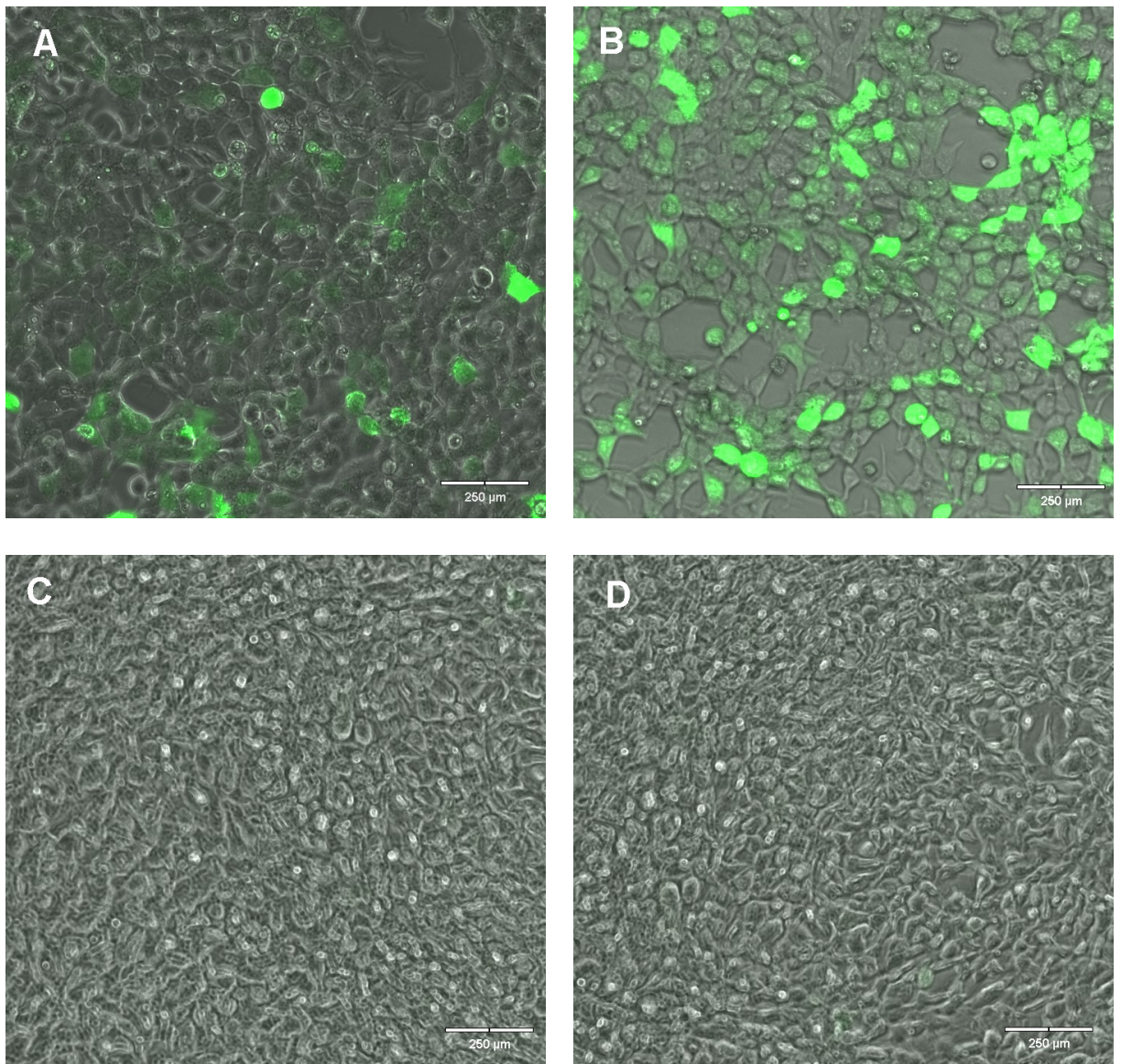
	VLPs Ax488 (L1)	VLPs Ax488 (L1/L2)	VLPs-Rhod (L1)	VLP-Rhod (L1/L2)
objem vzorku v ml	0,06	0,06	0,05	0,05
hmotnost barviva ve vzorku (µg)	0,005254989	0,005654102	0,056521739	0,099130435
molární hmotnost barviva	825,46	825,46	528	528
látkové množství barviva (mol)	6,37E-12	6,85E-12	1,07E-10	1,88E-10
počet molekul barvičky	3,83369E+12	4,12485E+12	6,44648E+13	1,13061E+14
koncentrace proteinů (µg/ml)	173	175	35,739	70,7056
počet VLP ve vzorku	3,01x10 <sup>11</sup>	2,52x10 <sup>11</sup>	5,18x10 <sup>10</sup>	8,48x10 <sup>10</sup>
počet molekul barviva na 1 částici	12,73565163	16,36845979	1243,975841	1332,535481

## 5.5 Měření transdukční aktivity MusPV PsVs u nádorových a nenádorových buněčných linií

Pro testování hypotézy, že jsou MusPV částice schopné s vyšší mírou dopravovat geny pro expresi do nádorových buněk než do buněk nenádorových, byly provedeny experimenty, kdy vytipované buněčné linie byly vystaveny pseudoinfekci pomocí MusPV PsVs ve srovnání s HPV16 PsVs a byla měřena aktivita reportérového genu v testovaných buňkách. Pro měření transdukční aktivity byly připraveny (viz kapitola 4.2.4.3) a použity MusPV

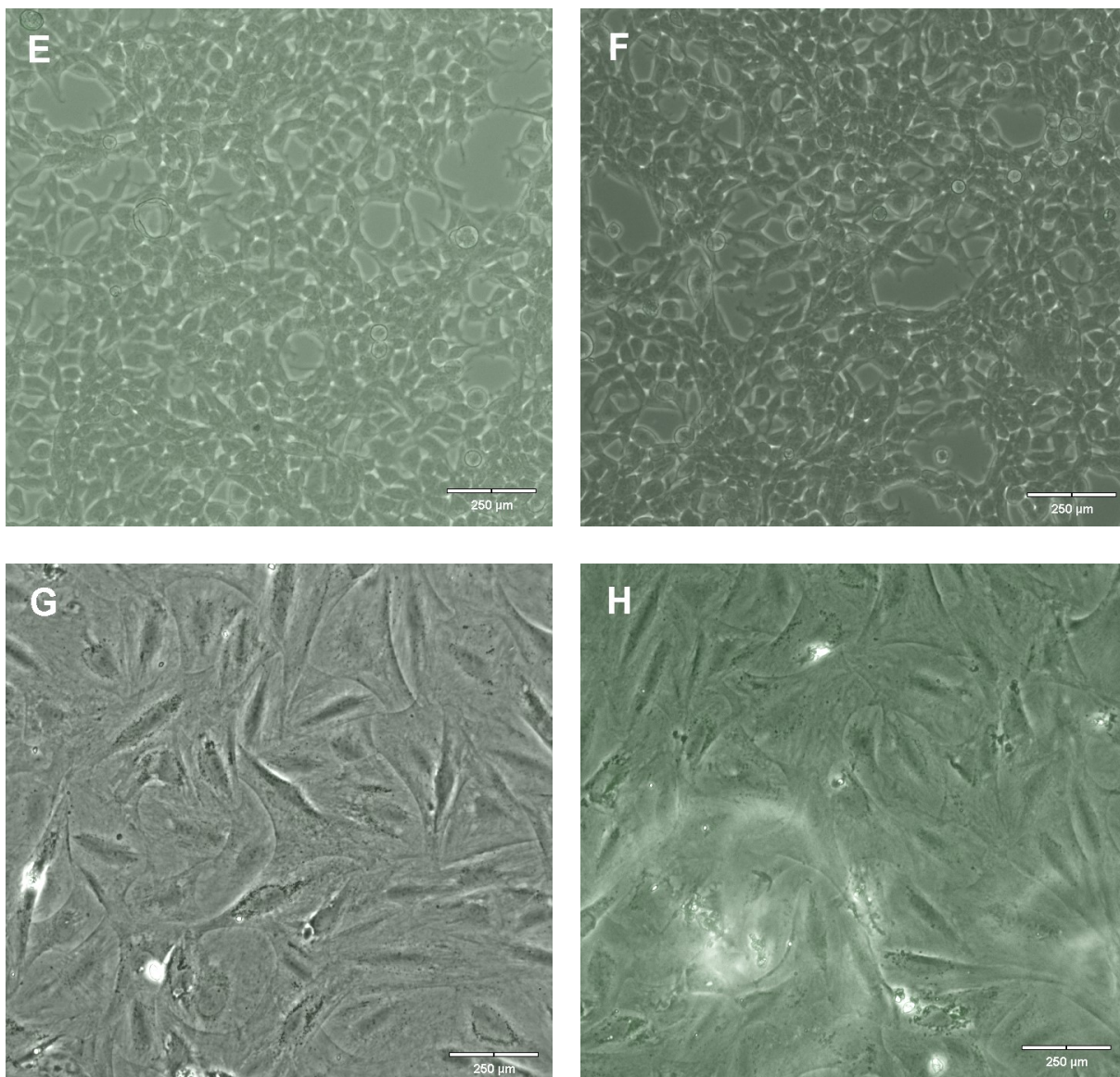
PsVs nesoucí dva reportérové geny: reportérový gen pro luciferázu a GFP. Po 72 hodinové inkubaci nádorových a nenádorových buněk byla míra transdukce genu GFP vizualizována pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu (Carl Zeiss) (Obr. č. 28, 29, 30, 31, 32). Jednotlivé buněčné linie byly fotografovány a jednotlivé 96 jamkové destičky byly zmrazeny pro důkladnou lyzi buněk pro luciferázový reportérový test (LRT). Po rozmrazení byl k buňkám přidán Bright-Glo™ Reagent způsobující lyzi ještě nezlyzovaných buněk, a který zároveň reagoval s luciferázou, což způsobovalo světelnou emisi. Celková emise jednotlivých buněčných liniích byla měřena na přístroji VarioScan (Thermo Fisher Scientific). Výstupem pak byla tabulka zobrazující počet zachycených světelných záblesků během 100ms měření, která byla zpracována ve formě grafu.

Po sérii pilotních experimentů (data neuvedena), proběhlo finální měření LRT ve dvou biologických opakováních v kvadruplikátech a naměřené hodnoty pro jednotlivé buněčné linie byly pro tvorbu grafu průměrovány. Pro testování byly vtipovány nenádorové buněčné linie 3T6, HEK-293 a NDHF a nádorové linie HeLa, LNCaP, PC3, Jurkat a U2OS. Jako kontrola sloužila buněčná linie 293TT, neboť se jedná o linii běžně používanou pro transdukční experimenty a titrace papilomavirových PsVs (Pastrana et al., 2004, Buck et al., 2005), a zároveň se tyto buňky používají pro produkci papilomavirů, což umožňuje jejich účinnou transdukci. Je však třeba zdůraznit, že reportérový vektor (pCLucf) obsahuje počátek replikace (ori) odvozený od polyomaviru SV40 a proto v liniích, které produkují replikační protein viru SV40 – velký T antigen (LT) – dochází k replikaci tohoto vektoru a tedy i k amplifikaci reportérových signálů. Linie 293TT patří mezi snadno transfekovatelné linie a produkuje velké množství LT a proto jsme předpokládali, že v této buněčné linii bude detekována nejvyšší míra aktivity luciferázy a nejvyšší transdukční účinnost hodnocená podle počtu GFP pozitivních buněk. Původním záměrem bylo, využít linie 293TT pro standardizaci transdukčních experimentů.



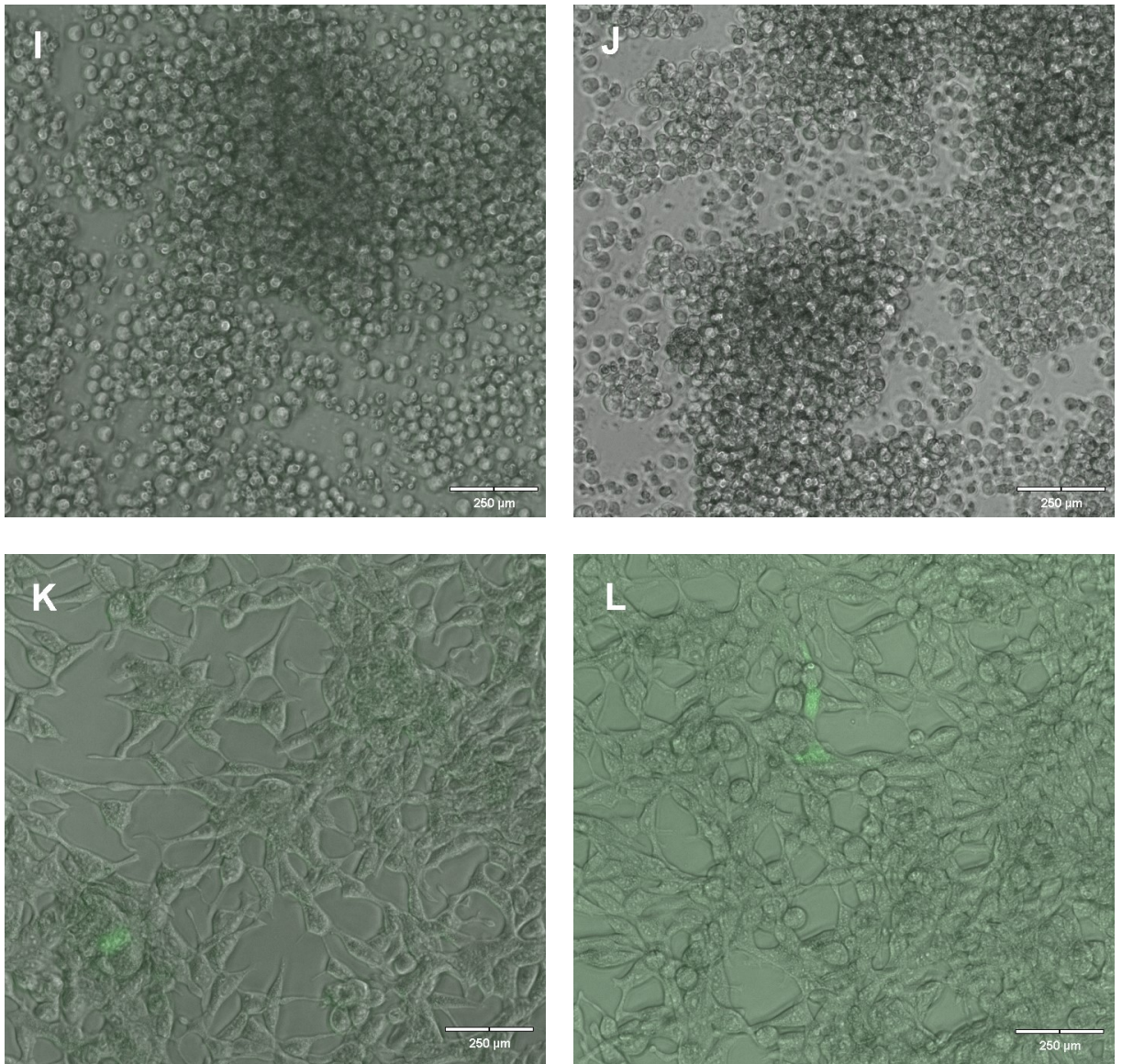
**Obr. č. 28 – Snímky transdukovaných buněk zachycující signál GFP, foceno fluorescenčním invertovaným mikroskopem**

A – buňky 293TT transdukované HPV16 PsVs, B – buňky 293TT transdukované MusPV PsVs,  
C – buňky 3T6 transdukované HPV16, D – buňky 3T6 transdukované MusPV PsVs



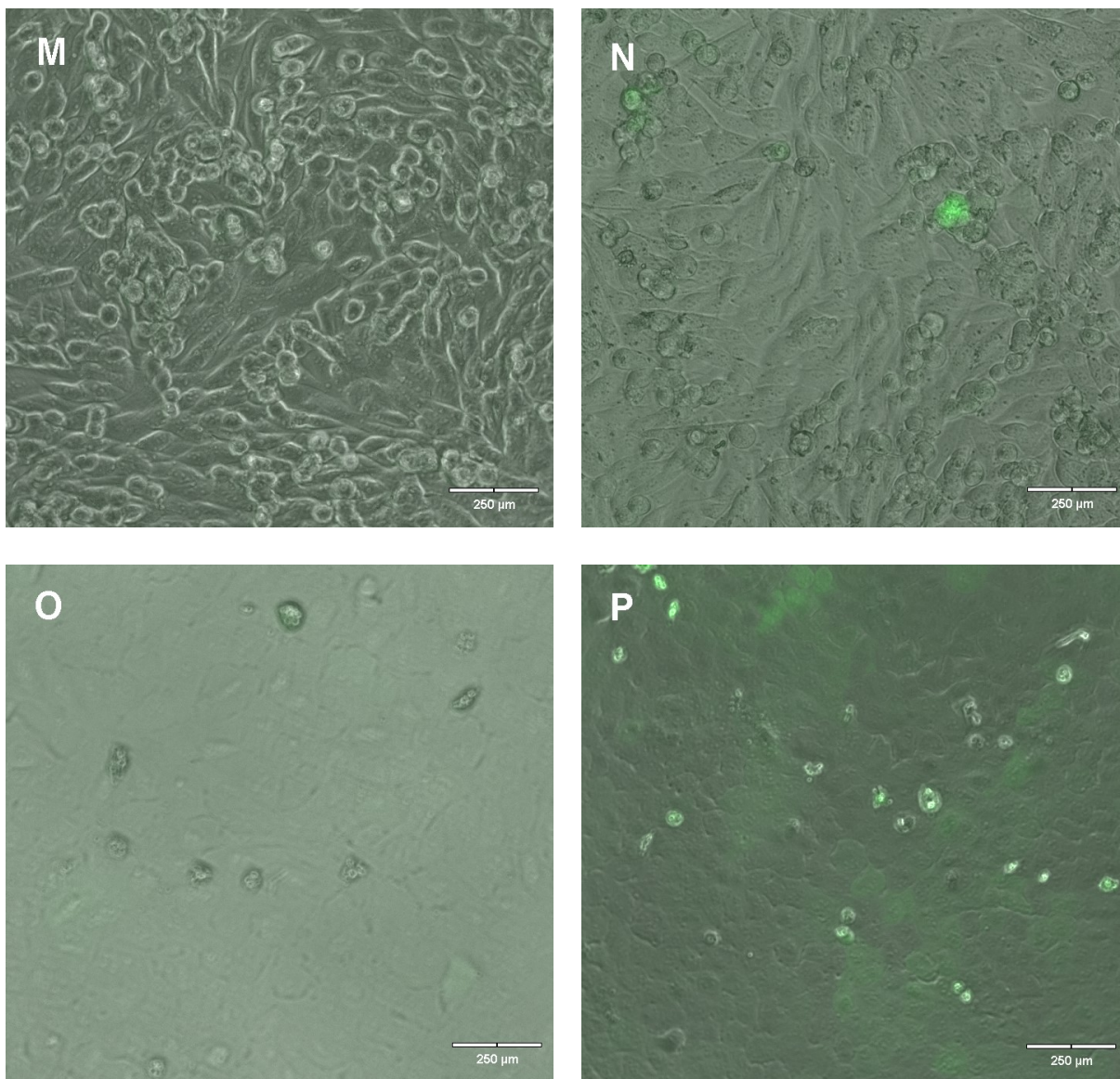
**Obr. č. 29 – Snímky transdukovaných buněk zachycující signál GFP, foceno fluorescenčním invertovaným mikroskopem**

E – buňky HEK-293 transdukované HPV16 PsVs, F – buňky HEK-293 transdukované MusPV PsVs, G – buňky NHDF transdukované HPV16, H – buňky NHDF transdukované MusPV PsVs



**Obr. č. 30 – Snímky transdukovaných buněk zachycující signál GFP, foceno fluorescenčním invertovaným mikroskopem**

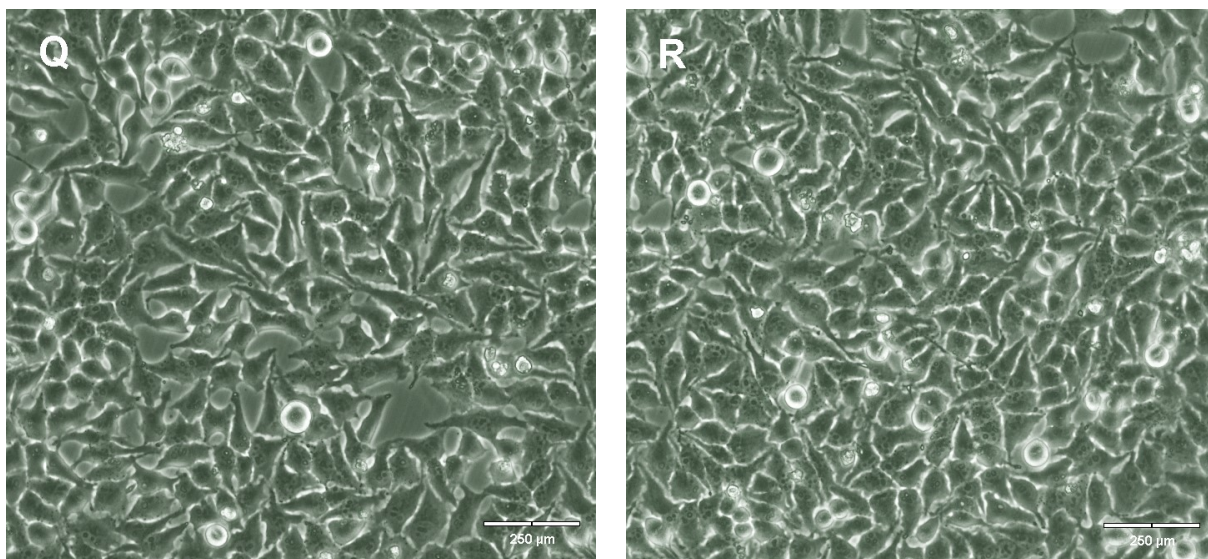
I – buňky Jurkat transdukované HPV16 PsVs, J – buňky Jurkat transdukované MusPV PsVs,  
K – buňky LNCaP transdukované HPV16, L – buňky LNCaP transdukované MusPV PsVs



**Obr. č. 31 – Snímky transdukovaných buněk zachycující signál GFP, foceno fluorescenčním invertovaným mikroskopem**

M – buňky PC3 transdukované HPV16 PsVs, N – buňky PC3 transdukované MusPV PsVs, O – buňky U2OS transdukované HPV16, P – buňky U2OS transdukované MusPV PsVs





**Obr. č. 32 – Snímky transdukovaných buněk zachycující signál GFP, foceno fluorescenčním invertovaným mikroskopem**

Q – buňky HeLa transdukované HPV16 PsVs, R – buňky HeLa transdukované MusPV PsVs

Výsledky pozorování exprese GFP v jednotlivých buněčných liniích sloužily k potvrzení proběhnutí transdukce nádorových a nenádorových buněčných linií. Na základě fotografického materiálu byly jednotlivé linie a použité PsVs vzájemně porovnávány. Nejvyšší míra signálu GFP byla pozorovatelná v linii 293TT při transdukci pomocí MusPV PsVs, čemuž nasvědčoval již výše zmíněný fakt související s produkcí genu LT SV40, a že tento gen může ovlivňovat expresi vektoru obsahujícího SV40 ori, což v tomto případě pravděpodobně amplifikovalo GFP signál. Zároveň byla tato skutečnost v rozporu se získanými daty z LRT na základě měření signálu luciferázy, kdy signál získaný z buněk transdukovaných HPV16 PsVs byl přibližně dvojnásobný oproti signálu z buněk transdukovaných MusPV PsVs. U nenádorových buněčných linií Jurkat, NHDF a 3T6 nebyl pozorován žádný GFP signál. Nádorové linie ve všech případech vykazovaly vyšší míru transdukce při použití MusPV PsVs oproti HPV16 PsVs. V případě buněčných linií HEK-293 a LNCaP bylo při transdukci MusPV PsVs pozitivních přibližně 20 % buněk v zorném poli mikroskopu (všechna procenta uvedena pro pozitivní buňky na GFP jsou vztažena na zorné pole mikroskopu) a při transdukci HPV16 bylo pozitivních přibližně 5-10 % buněk. U buněčné linie HeLa bylo při použití MusPV PsVs pozitivních přibližně 5 % buněk a při použití HPV16 PsVs přibližně 1-2 %. U linie U2OS bylo pozitivních přibližně 20% buněk při použití MusPV PsVs a přibližně 5 % buněk při použití HPV16 PsVs. U linie PC3 bylo při

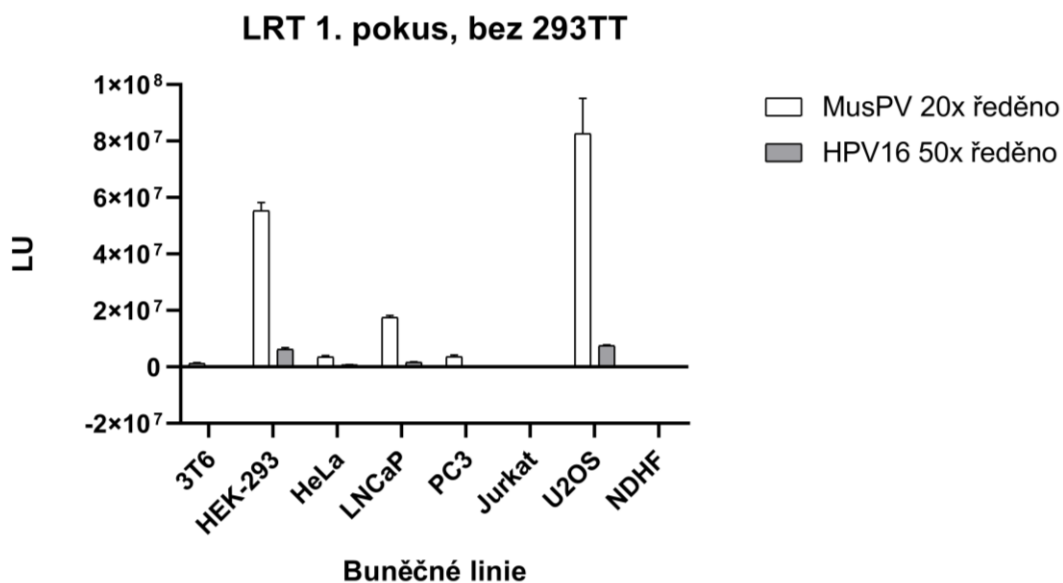
použití MusPV PsVs pozitivních přibližně 10 % buněk a při použití HPV16 PsVs přibližně 2 %. Tyto výsledky poukazují na trendu, kdy se MusPV PsVs vyznačují efektivnější transdukcí oproti HPV16 PsVs, což bylo možné pozorovat i ve výsledcích LRT, s výjimkou pro linii 293TT.

Výsledky prvního a druhého měření LRT na nádorových a nenádorových buněčných liniích (bez linie 293TT) jsou uvedeny v Obr. č. 33 a Obr. č. 34. Výsledky měření pro buněčné linie 293TT jsou uvedeny v Obr. 35. Párové srovnání aktivity luciferázy u jednotlivých linií transdukovaných pomocí MusPV a HPV16 bylo provedeno pomocí Mann-Whitney U testu. Z výsledku je patrné, že přestože HPV16 PsVs dosahovaly při zvoleném ředění po transdukcii v linii 293TT signifikantně vyšších aktivit luciferázy ( $p < 0.05$ ) než MusPV PsV (Obr. 35), je tomu u linií HEK-293, HeLa, LNCaP a PC3 v obou experimentech opačně. Grafy také ukazují, že buněčné linie Jurkat a NHDF nebyly úspěšně transdukovány a hodnoty měření u těchto buněčných linií se významně blíží hodnotám pozadí. Buněčná linie Jurkat byla do experimentu vybrána díky faktu, že u ní nebyla pozorována exprese HSPG (Vongchan & Lindhart, 2007) a tedy bylo předpokládáno, že papilomavirové PsVs do buněk nebudou vstupovat, což tento experiment potvrdil.

Pro analýzu, zda PsVs preferují pro transdukcii některou z testovaných linií, byla data také hodnocena odděleně pro MusPV a HPV16 PsVs. Byl použit Kruskalův–Wallisův test a pro vícenásobná porovnání Dunnův test v programu GraphPad. Tato analýza ukázala, že pozorované změny nejsou, až na několik výjimek, ve většině případů statisticky významné. Tabulka č. 13 ukazuje případy, kdy v alespoň jednom z experimentů, bylo možno identifikovat statisticky významné rozdíly (\* $p < 0,05$ ); \*\* $p < 0,01$ ; ns =  $p > 0,05$ )

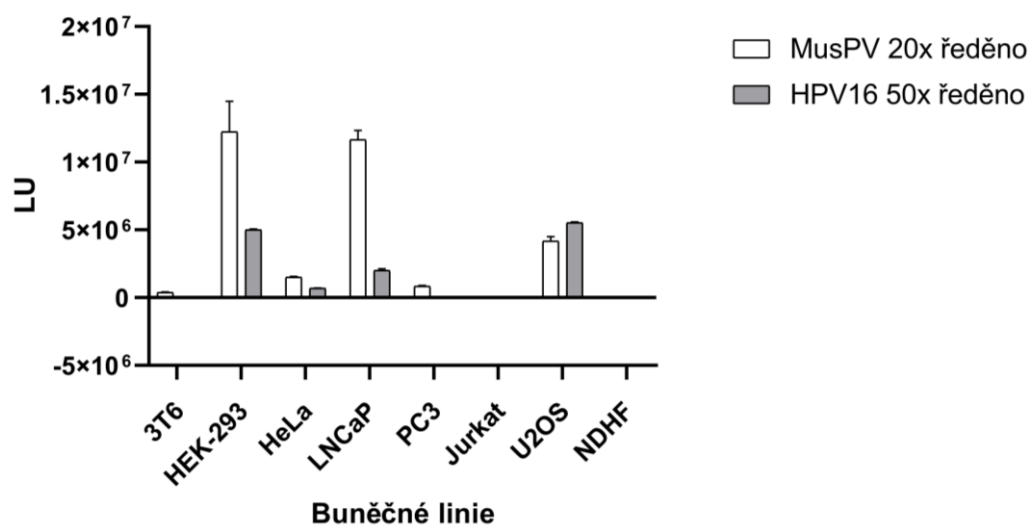
**Tab. č. 13 – Statisticky významné rozdíly**

	MusPV		HPV16	
	1.LRT	2.LRT	1.LRT	2.LRT
HEK-293 vs. NDHF	**	**	*	**
HEK-293 vs. Jurkat	ns	*	*	ns
Jurkat vs. U2OS	**	ns	**	**
U2OS vs. NDHF	***	ns	**	***
LNCaP vs. Jurkat	ns	*	ns	ns
LNCaP vs. NDHF	ns	**	ns	ns



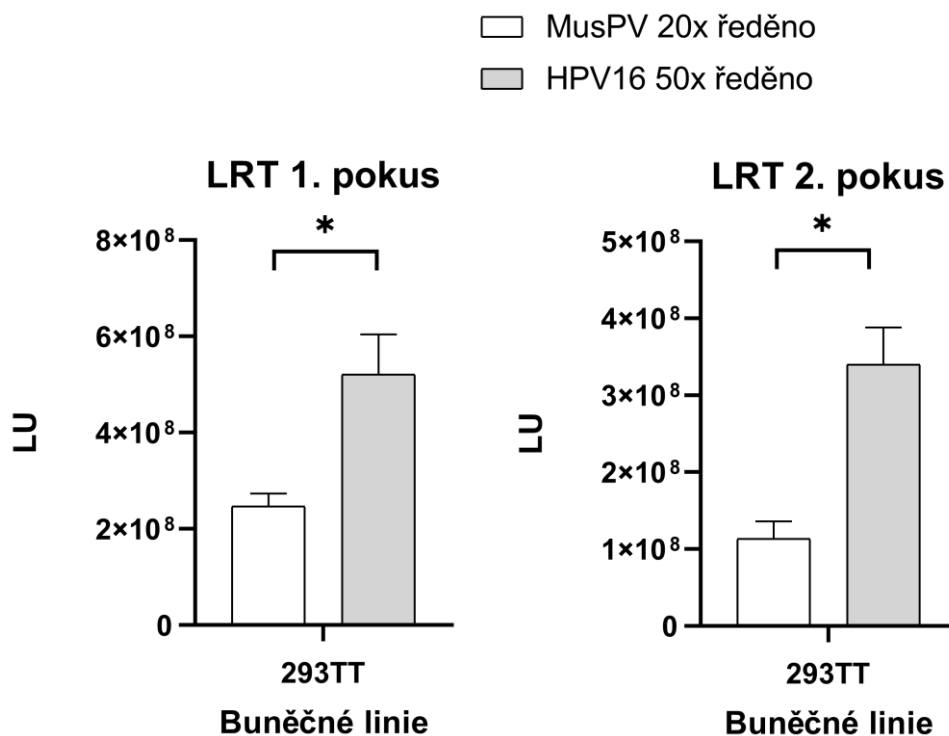
**Obr. č. 33 – Graf z měření LRT – 1. pokus**

Graf zobrazuje zprůměrované hodnoty měření kvadruplikátu, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku, v grafu nebyla vynesena linie 293TT, která oproti ostatním liniím vykazuje nadměrné hodnoty, aktivita luciferázy u jednotlivých linií transdukovaných pomocí MusPV a HPV16 byla porovnána Mann-Whitney U testem (n=4) a, s výjimkou linie NHDF, byly všechny pozorované rozdíly statisticky signifikantní (p<0.05)



**Obr. č. 34 – Graf z měření LRT – 2. pokus**

Graf zobrazuje zprůměrované hodnoty měření kvadruplikátu, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku, v grafu nebyla vynesena linie 293TT, která oproti ostatním liniím vykazuje nadměrné hodnoty, aktivita luciferázy u jednotlivých linií transdukovaných pomocí MusPV a HPV16 byla porovnána Mann-Whitney U testem (n=4) a všechny pozorované rozdíly byly statisticky signifikantní (p<0.05)



**Obr. č. 35 – Graf z měření LRT – 1. a 2. pokus se zobrazenými buněčnými liniemi 293TT**  
 Graf zobrazuje zprůměrované hodnoty měření kvadruplikátů buněčné linie 293TT transdukované pomocí MusPV PsVs a HPV16 PsVs., chybové úsečky značí směrodatnou odchylku, aktivita luciferázy v linii 293TT transdukované MusPV a HPV16 byla porovnána Mann-Whitney U testem (n=4) a rozdíly byly statisticky signifikantní (\*p<0.05)

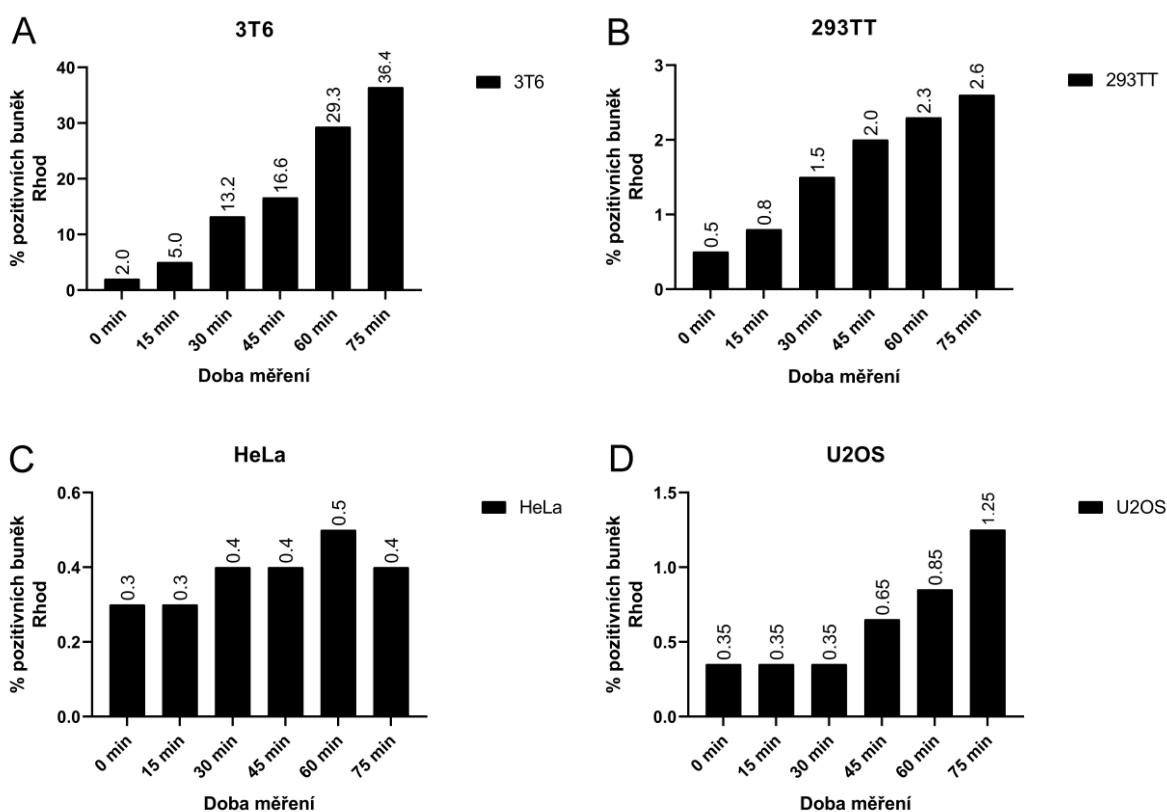
## 5.6 Měření interakce značených VLPs s nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi

Pro měření interakce značených VLPs s nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi byla použita metoda průtokové cytometrie. Pomocí této metody byla snaha o detekci vazby MusPV VLPs na vybrané buněčné linie a jejich internalizaci v čase.

Měření interakce MusPV VLPs bylo měřeno na těchto buněčných liniích: 3T6, 293TT, HeLa, U2OS, Jurkat, HEK-293, LNCaP, PC3 a NHDF. Pro měření byla používána koncentrace buněk odpovídající 1 000 000 buněk na 1 ml suspenze. Pro přesné měření počtu buněk byl použit průtokový cytometr, kterým bylo na počátku měření spočítáno množství buněk. Ty byly dle naměřených koncentrací naředěny na požadovanou koncentraci. Nejprve byla měřena buněčná suspenze bez přidaných MusPV VLPs jakožto negativní kontrola.

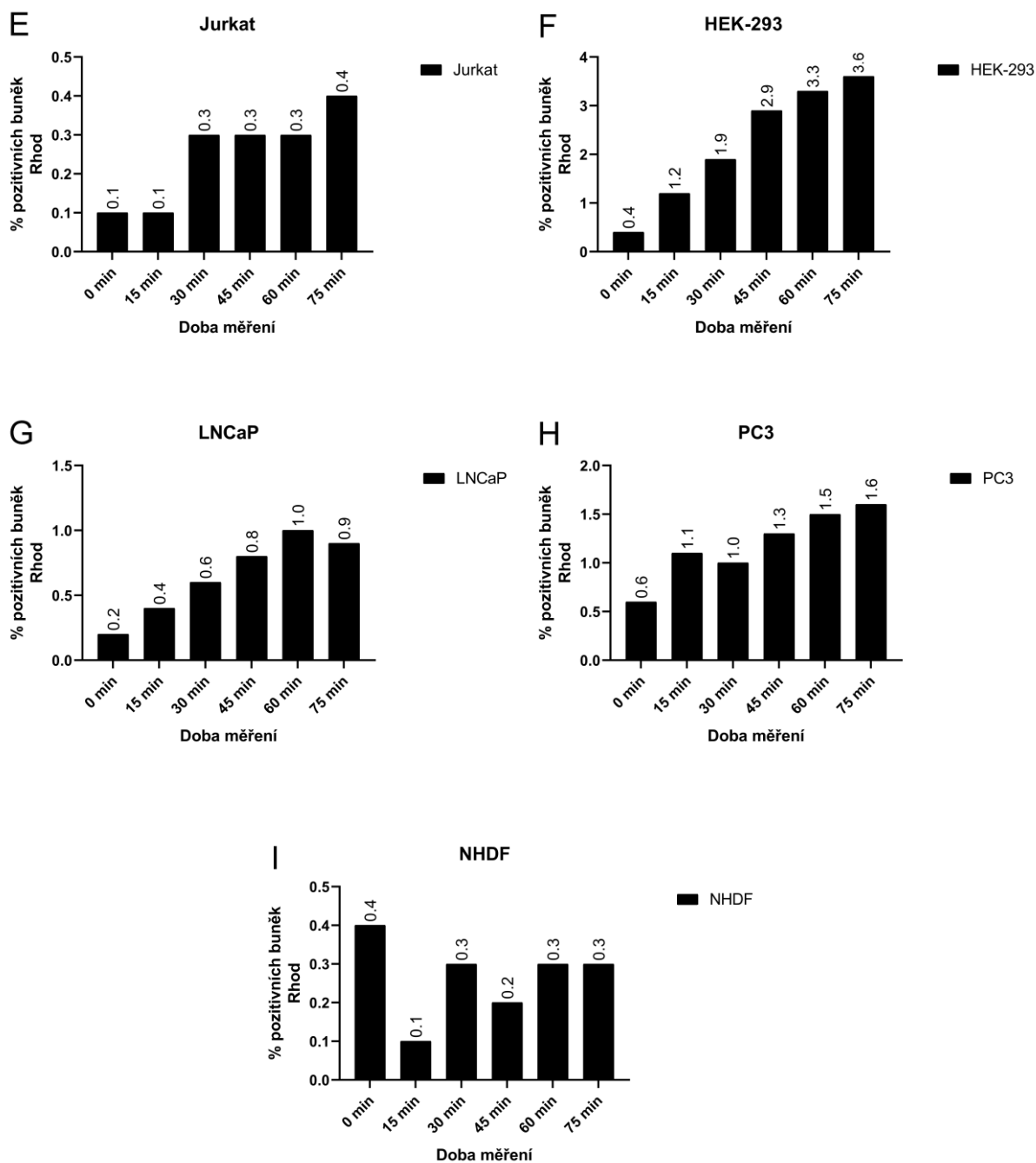
K buňkám bylo přidáno 178 ng MusPV L1/L2 VLPs, což odpovídalo  $4,24 \times 10^9$  částic, které byly značeny pomocí Rhod. Pro vlastní měření bylo použito 300 ul (300 000 buněk) buněčné směsi s VLPs, což odpovídalo 53,4 ng MusPV L1/L2 VLPs, a to odpovídalo teoreticky  $1,27 \times 10^9$  částic. Asociace VLPs s buňkami byla ihned měřena (čas 0 min) na průtokovém cytometru. Dále byly vzorky uchovávány na ledu (zastavení endocytózy) a byly měřeny v 6 patnáctiminutových cyklech.

Měření bylo provedeno RNDr. Hanou Španielovou Ph.D., jež zpracovala výsledky pomocí programu Kaluza. Měření interakce MusPV VLPs v čase jsou pro jednotlivé buněčné linie zobrazeny v grafech v Obr. č. 36 a Obr. č. 37. Vzhledem k tomu, že po přidání VLPs nebyly buňky promývány, byl při tomto experimentu detekován veškerý materiál, který adheroval na povrch buněk. Cílem experimentu bylo tedy zjistit, zda se VLPs účinně váží k povrchu nádorových buněk a oddělit tak fenomén vazby od procesu internalizace.



**Obr. č. 36 – Měření procenta buněk pozitivních na Rhod**

Jednotlivé grafy ukazují, jak se procentuální vazba VLPs značených pomocí Rhod na buňky měnila v čase, měření se opakovala vždy po 15 minutách, graf A zobrazuje buňky 3T6, B zobrazuje buňky 293TT, C zobrazuje buňky HeLa a D zobrazuje buňky U2OS, vztaženo na autofluorescenci buněk



**Obr. č. 37 – Měření procenta buněk pozitivních na NHS-Rhod pomocí metody FACS**

Jednotlivé grafy ukazují, jak se procentuální vazba VLPs značených pomocí Rhod na buňky měnila v čase, měření se opakovala vždy po 15 minutách, graf E zobrazuje buňky Jurkat, F zobrazuje buňky HEK-293, G zobrazuje buňky LNCaP, H zobrazuje buňky PC3 a I zobrazuje graf pro buňky NHDF, vztaženo na autofluorescenci buněk

Ze získaných výsledků vyplývá, že nejvyšší míra interakce MusPV VLPs značených pomocí NHS-Rhod se objevila u buněčné linie 3T6. Oproti tomu u buněčných linií Jurkat, NHDF a také HeLa míra positivity nepřesáhla 0,5 %. Naměřená data nijak výrazně nekorelovala s výsledky transdukčních experimentů. To mohlo být způsobeno tím, že se podařilo na VLPs nakonjugovat relativně hodně molekul Rhod (1332 molekul Rhod na 1 L1/L2 částici, viz kapitola 5.4) a mohl se tak významně změnit celkový povrchový náboj částice a tedy i její interakční schopnosti s buněčnými liniemi. V následujících experimentech byly proto využity také VLPs značené pomocí Ax488 s menší účinností (12 molekul Ax488 na L1 částici a 16 molekul Ax488 na L1/L2 částici, viz kapitola 5.4) a byla přímo sledována internalizace částic do buněk. Vzhledem k očekávané menší intenzitě fluorescence byly tyto částice použity ve dvou koncentracích.

Pro měření internalizace značených VLPs byly vybrány jen některé linie, na základě dříve provedených luciferázových reportérových testů. Byly vybrány tyto linie: 293TT, U2OS, NHDF, HeLa. Buněčné linie byly vysety na 12 jamkovou destičku tak, aby jamka v době experimentu obsahovala cca  $3 \times 10^5$  buněk. Buňky byly inkubovány po dobu 2 hodin s MusPV VLPs značenými pomocí Rhod o koncentraci 0,5  $\mu\text{g}$  na jamku a Ax488 o koncentracích 0,5  $\mu\text{g}$  a 2,5  $\mu\text{g}$  na jamku. Teoretický přepočítá dovoluje odhadnout, že bylo v experimentu použito v průměru 0,45 až 2,25 miliónů VLPs na buňku. Po inkubaci byl z povrchu buněk odstraněn adhezaní materiál pomocí versenu a trypsinu, buňky byly převedeny do suspenze, několikrát promyty a měřeny pomocí průtokové cytometrie (Obr. č. 38 a Obr. č. 39). V každém experimentu bylo měřeno  $1 \times 10^4$  buněk a pro každý typ částic byl experiment opakován dvakrát.

Z výsledků měření vyplývá, že typ značení nijak zásadně neovlivnil chování částic při internalizaci do vybraných buněčných linií. Ze srovnávacího experimentu, kdy bylo přidáno stejné množství částic (0,5  $\mu\text{g}$ ) značených extensivně pomocí Rhod (tisíce molekul barviva na jedné částici) nebo šetrně pomocí Ax488 (desítky molekul barviva na částici) vyplynulo, že intenzita fluorescence Ax488 ve srovnání s Rhod je tak nízká, že nedovoluje spolehlivé měření (medián fluorescence jen málo přesahoval hodnoty autofluorescence buněk, procento fluorescenčně značených buněk nepřesahovala 1%). Při značení Rhod byly naměřeny větší hodnoty procent pozitivních buněk. U buněčných linií, vyjma U2OS,

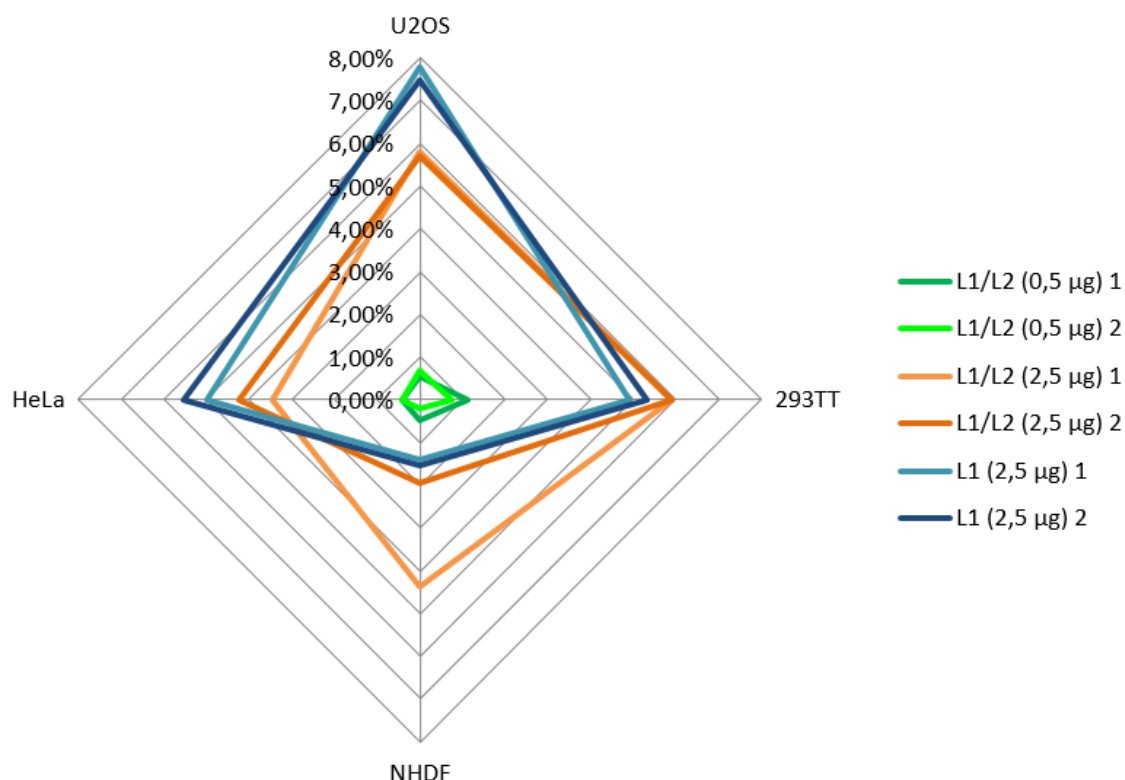
byly naměřeny hodnoty přibližně od 10 % do 20 % více než tomu je u VLPs značených pomocí Ax488, kde bylo množství VLPs navýšeno na pětinasobek (2,5 µg).

Při porovnání výsledků měření internalizace VLPs značených Ax488 vyneseny do pavučinového grafu (Obr. č. 29) je možné nalézt trend ve vyšší míře internalizace L1 i L1/L2 VLPs buněčnou linií U2OS. Na výsledném grafu je také možné pozorovat vyšší míru internalizace L1 VLPs oproti L1/L2 VLPs. Tato skutečnost by mohla být, po provedení dalších pokusů a jejím ověření, využita při dopravě diagnostických a terapeutických látek, neboť v případech, kdy se od VLPs očekává pouze vstup do buňky, je snazší a levnější produkovat částice složené pouze z jednoho kapsidového proteinu.

U L1/L2 VLPs značených pomocí Rhod (Obr. č. 30) je možné vidět podobný trend, jako u VLPs značených Ax488, a tedy, že tyto částice jsou s vyšší mírou internalizovány buňkami U2OS. Významným rozdílem je však procento pozitivních buněk, které se pohybuje kolem 80 %, což u L1/L2 VLPs značených Ax488 dosahuje tato hodnota přibližně 6 %.



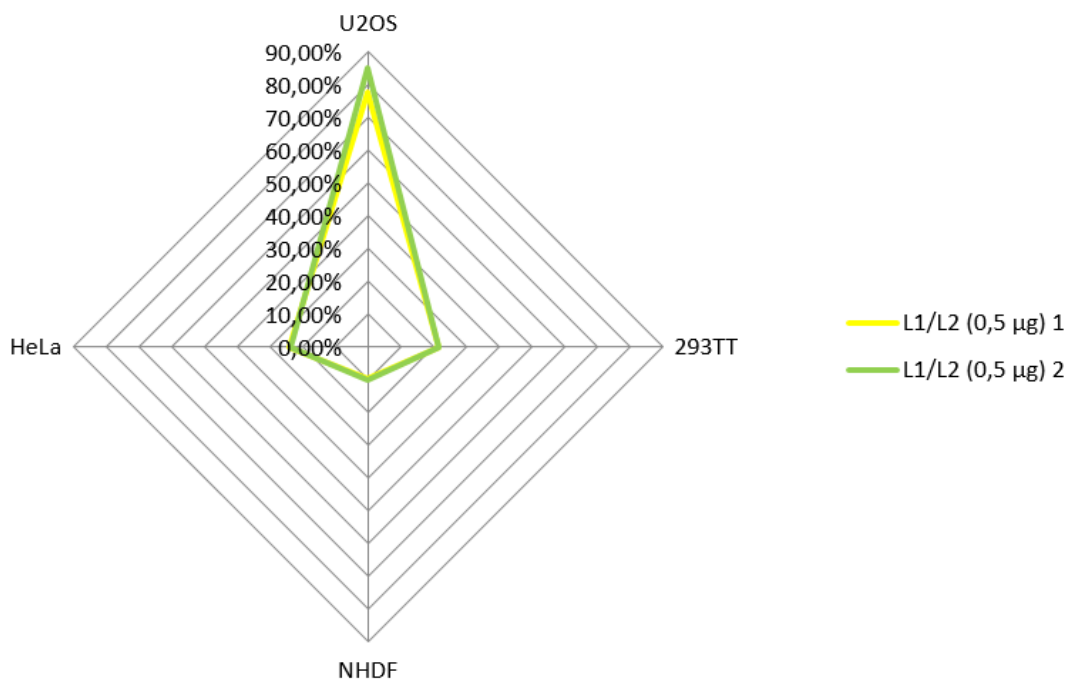
## Internalizace MusPV VLPs značených Ax488



**Obr. č. 38 – Měření procenta pozitivních buněk s internalizovanými MusPV VLPs značenými pomocí Ax488 pomocí průtokové cytometrie**

Vybrané buněčné linie byly pseudoinfikovány MusPV L1 a L1/L2 VLPs značenými Ax488, barvy stejné skupiny (zelená, oranžová, modrá) označují 2 vzorky duplikátu, tmavě zelená – L1/L2 VLPs o koncentraci 0,5 µg, světle zelená – L1/L2 VLPs o koncentraci 0,5 µg, světle oranžová – L1/L2 VLPs o koncentraci 2,5 µg, tmavě oranžová – L1/L2 VLPs o koncentraci 2,5 µg, světle modrá – L1 VLPs o koncentraci 2,5 µg, tmavě modrá – L1 VLPs o koncentraci 2,5 µg, vztaženo na autofluorescenci buněk

## Internalizace MusPV VLPs značených Rhod



**Obr. č. 39 – Měření procenta pozitivních buněk s internalizovanými MusPV VLPs značenými pomocí Rhod pomocí průtokové cytometrie**

Vybrané buněčné linie byly pseudoinfikovány MusPV L1/L2 VLPs značenými Rhod, žlutá a zelená označují duplikáty L1/L2 VLPs o koncentraci 0,5 µg, vztaženo na autofluorescenci buněk

## 6 Diskuze

Myší papilomavirus je jedním z nedávno objevených zvířecích papilomavirů, který v sobě skrývá nemalý potenciál v podobě dobře dostupného myšního modelu pro studium papilomavirů, jehož závěry by mohly sloužit k objasnění některých procesů spojených s onemocněními způsobovanými lidskými papilomaviry (Cladel *et al.*, 2015). Jedná se o malý neobalený DNA virus, který je složen ze dvou kapsidových proteinů L1 a L2. Papilomavirový kapsidový protein L1, resp. komplex proteinu L1/L2 již ze své podstaty umožňují takzvané „samoskládání“. To je vlastnost, kdy při vhodných okolních podmínkách a dostatečném množství správně sbalených kapsidových proteinů dochází k vytvoření prázdné intaktní částice, resp. částice, která při svém skládání může pojmout do svého nitra okolní molekuly DNA, pokud nepřesahují obvyklou velikost papilomavirového genomu, tj. přibližně 8 tisíc pb (Buck *et al.*, 2004, Buck *et al.*, 2013, Cerqueira & Schiller, 2018). Tento fakt nezůstal bez povšimnutí, a tudíž probíhají studie (Bayer *et al.*, 2018, Gonzales-Castro *et al.*, 2018), které si kladou za cíl osvětlit možné využití papilomavirových PsVs a VLPs při terapii a diagnostice lidských onemocnění.

Při využití savčích a bakulovirových expresních systémů je dnes možné produkovat relativně velké množství proteinu. Pro bakulovirový expresní systém od 0,65 g po 1,9 g proteinu na 1 litr média (López-Vidal *et al.*, 2015) a pro savčí expresní systém přibližně 10 mg proteinu na litr média dle protokolu pro produkci papilomavirových PsVs v buněčné linii 293TT (Buck *et al.*, 2015, viz kapitola 4.2.5.15). Jelikož je možné produkovat VLPs v bakulovirovém expresním systému, odpadají problémy spojené se savčími systémy pro produkci částic, jako jsou vyšší náklady a časová náročnost (Arya, Bhattacharya, & Saini, 2008, Khan, 2013). Velkou roli při praktickém použití savčích expresních systémů může hrát také zvýšená rizikovost, což zahrnuje mimo jiné šíření virových a/nebo prionových nákaz (Sethuraman & Stadheim, 2006).

V laboratoři virologie, kde byla vypracována tato práce, byly oba tyto expresní systémy zavedeny. Savčí expresní systém byl využíván k produkci polyomavirových a papilomavirových PsVs a bakulovirový expresní systém byl využíván pro produkci VLPs odvozených od polyomavirů. Jelikož existovaly již zavedené postupy, byly tyto postupy převzaty (MusPV PsVs), resp. upraveny (MusPV VLPs).

Pro produkci VLPs byly geny pro kapsidové proteiny klonovány do vektoru a na základě homologní rekombinace byla vytvořena bakmidová DNA, která byla transfekována do hmyzích buněk Sf9 odvozených od tkáně vaječníku. Vzhledem ke skutečnosti, že se dříve nedařilo odstranit jodixanol ze vzorku PsVs (viz kapitola 5.2), byla pro izolaci VLPs zvolena ultracentrifugace v gradientu chloridu cesného (viz kapitola 4.2.5.5). Bohužel při použití tohoto protokolu bylo vytvořeno pouze malé množství intaktních částic. Ze snímků elektronové mikroskopie (viz kapitola 5.1) je viditelné, že okolí přítomných intaktních VLPs je vyplněno rozpadlým materiálem, což naznačuje, že použití ultracentrifugace v gradientu chloridu cesného není vhodné pro izolaci VLPs a má za následek rozpad izolovaného materiálu. Pro další izolaci byl použit protokol pro  $\text{CHCl}_3/\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$  extrakci vytvořený A. Hejtmánkovou pro izolaci polyomavirových VLPs. Nový protokol byl vystavěn na lyzi buněk pomocí sonikace se součinností lyzačního pufu obsahujícího DNAsu I, a dále na odlišném postup přečištění. V případě nového protokolu byla použita  $\text{CHCl}_3/\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$  extrakce a vysolování pomocí síranu amonného a chloridu sodného následovaná centrifugací v gradientu sacharózy (viz kapitoly 4.2.5.16 a 5.1). Díky tomuto postupu bylo možné vyizolovat intaktní MusPV VLPs a zároveň se podařilo snížit podíl rozpadlého materiálu ve vzorku (viz kapitola 5.1).

MusPV VLPs byly připraveny ve dvou formách – L1 VLPs a L1/L2 VLPs. Částice rozdílných složení byly produkovány z několika důvodů. Dle dostupné literatury bylo známo, že L2 kapsidový protein může napomáhat skládání virové kapsidy a její stabilizaci a také, že je nedílnou součástí virové kapsidy, která umožňuje produktivní infekci (Wang & Roden, 2013, Zhang *et al.*, 2018). Z toho plyne, že jedním ze záměrů bylo ověřit stabilitu L1 VLPs, jejich vazebné schopnosti a změny při internalizaci L1 VLPs buňkami.

Proces tvorby částic byl doprovázen nespočtem kontrol, mezi které patří mimo jiné kontrolní restriční štěpení a sekvenační analýzy (data neuvěděna), které měly za úkol ověřit přítomnost daných genů ve vektorech použitých pro klonování. Na základě těchto ověření bylo předpokládáno, že klonování a tedy tvorba obou typů částic byla úspěšná. Problém však nastal při průkazu složení L1 a L1/L2 VLPs z daných proteinů. Pro odlišení jednotlivých kapsidových proteinů byla použita metoda SDS-PAGE a Western Blot. Získané výsledky (viz kapitola 5.1), i přes různé optimalizace metod, nevedly k úspěšnému rozdělení L1 a L1/L2 částic na základě jejich mobility v gelu. Nadějným výsledkem byl

polyakrylamidový gel barvený pomocí Imperial™ Protein Stain (viz kapitola 5.1 Obr. č. 20), na kterém byl patrný rozdíl v intenzitě proužků značících L1 (vzorek č.2) a L1/L2 VLPs (vzorek č. 6). Jedna z interpretací tohoto výsledku je ta, že jelikož měly oba vzorky shodnou nanášku 2 µg, vyšší intenzita v proužku náležícím ke vzorku obsahujícímu L1/L2 VLPs je způsobena právě přítomností L2 proteinu v kapsidě. Nicméně tento výsledek není možné chápat jako finální verdikt o přítomnosti L2 proteinu ve vzorku a tedy úspěšném rozdělení L1 a L1/L2 částic. Další postup v tomto bádání by se mohl ubírat směrem k hmotnostní spektrometrii, která by mohla pomoci odlišit proteiny L1 a L2 resp. L1 a L1/L2 VLPs. Tento postup však v této práci z časových důvodů nebylo možné prověřit.

Roku 2016 byla publikována studie Kines *et al.*, ve které byla ověřena hypotéza týkající se preferenční vazby kapsid (PsVs a VLPs) lidského papilomaviru na nádorové buňky. V této studii vycházeli z faktů, že primárním receptorem pro vazbu papilomaviru jsou HSPG, které se zároveň nacházejí ve zvýšené míře a s jistými mutacemi či změnami na buňkách odvozených od nádorových tkání (Sanderson *et al.*, 2005, Hammond *et al.*, 2014). Tyto skutečnosti dělají z nádorových buněk zajímavý cíl pro papilomaviry a v této studii se tedy snažili prokázat „tropismus“ virových částic (PsVs a VLPs) odvozených od HPV16. PsVs a VLPs byly produkovány na základě protokolu vytvořeného Buck *et al* (2007), který byl použit i v této práci pro produkci PsVs (viz kapitola 4.2.5.15). Pro vizualizaci interakce PsVs a VLPs s nádorovými buňkami připravili značené částice pomocí Ax488. Pro experimenty využili buněčné linie, které byly součástí NCI-60 panelu (*NCI-60 Human Tumor Cell Lines Screen*), což je panel 60 buněčných linií odvozených od lidských nádorů <sup>1</sup>, a mnoho dalších (seznam použitých buněk k dispozici ve studii Kines *et al.*, 2016). Částice značené Ax488 použili pro sérii infekčních a vazebných testů jak *in vitro*, tak *in vivo* (pro *in vivo* byly použity laboratorní myši, kmen BALB/c). Pro infekční testy bylo použito 57 buněčných linií z panelu NCI-60 a u všech prokázali citlivost k HPV16 PsVs, s tím, že nádorové linie odvozené od epitelu byly citlivější ve srovnání s ostatními liniemi.

---

<sup>1</sup> Seznam buněčných linií dostupný online:

[https://dtp.cancer.gov/discovery\\_development/nci-60/cell\\_list.htm](https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/cell_list.htm)

Mimo jiné se také snažili prokázat souvislost mezi vyšší afinitou HPV16 PsVs a VLPs a HPSG na povrchu nádorových buněk za použití heparinu, který kompetitivně blokoval vazbu částic značených Ax488 na nádorové buňky. Tím potvrdili úzkou souvislost mezi vazbou PsVs a VLPs na buňky a přítomností HSPG na jejich povrchu. Na základě jejich výsledků potvrdili, že částice odvozené od HPV16 preferenčně váží a infikují nádorové buňky. Byla by chyba opomenout i jeden z jejich závěrů týkající se faktu, že v některých epidemiologických studiích dochází k detekci papilomavirové DNA v nádorových tkáních, což bývá interpretováno jako důkaz, že spouštěčem pro nádorové bujení je právě onen papilomavirus, resp. jeho DNA. Dle zjištění Kines *et al.* nemusí tato interpretace být vždy správná, neboť přítomnost virové DNA může být zapříčiněna právě afinitou papilomavirů k nádorové tkáni. Tedy, že přítomnost DNA v nádorové tkáni může být následkem, nikoli příčinou.

Kines *et al.* taktéž nastiňují možná medicínální využití částic odvozených od HPV, ale zároveň neopomínají zdůraznit i problémy, kterým se nebude jednoduché vyhnout při jejich použití. To jsou mimo jiné problémy s imunitní reakcí při použití HPV PsVs nebo VLPs na lidech.

Studie Kines *et al.*, 2016 představuje jednu z hlavních myšlenek, na kterých byla stavěna tato práce. Pro rozšíření jimi ověřených hypotéz byl v této práci zvolen právě MusPV, se záměrem potvrdit fakta předložená Kines *et al.* pro HPV16, také na zvířecím modelu. Zároveň se tím naskýtá možné řešení pro některé problémy spočívající v použití částic odvozených od HPV16, a to, že u pro částice odvozené od MusPV neexistuje v lidské populaci imunitní odpověď. Ve výsledcích transdukčních experimentů s využitím MusPV PsVs, pseudoinfekcí provedených za použití značených VLPs je možné pozorovat trend, který je v souladu s pozorováním Kines *et al.*, a to, že MusPV PsVs a VLPs preferenčně váží a infikují nádorové buňky. Pro možné porovnání výše zmíněné studie a této práce byly k experimentům použity i HPV16 PsVs. Z výsledků je patrné, že u námi použitých nádorových buněčných linií (viz kapitola 4.1.2) byla míra transdukční aktivity při použití MusPV PsVs dokonce vyšší než tomu bylo pro HPV16 PsVs.

Jak bylo již výše zmíněno, pro měření transdukční aktivity byly použity MusPV PsVs, které v sobě obsahovaly reportérový plasmid s geny pro luciferázu a GFP. GFP bylo převážně použito pro optickou kontrolu průběhu infekce, a zároveň poskytovalo jistou

předzvěst o úspěchu či neúspěchu transdukce. Zajímavým zjištěním bylo, že ačkoli v některých buněčných liniích docházelo ke zvýšené expresi genu pro GFP, oproti ostatním liniím, při měření transdukční aktivity pomocí LRT byl zjištěn opačný trend. Je pravděpodobné, že zde hrál důležitou roli fakt, že gen pro GFP se v plasmidu pCLucf (viz kapitola 4.2.4.4) nachází pod promotorem SV40. Z toho vyplývá, že pokud dochází v buněčné linii k produkci replikačního proteinu viru SV40 – LT – dochází i k amplifikaci signálu GFP, protože LT SV40 funguje jako helikáza se schopností iniciovat replikaci přímou vazbou na SV40 počátek replikace (Pipas, 1992).

Pro měření transdukční aktivity byly kromě nádorových linií použity i linie nenádorové: NHDF, HEK-293 a 3T6. Linie 3T6 byla vybrána pro svůj původ, neboť se jednalo o linii myších buněk. Tyto linie sloužily jako kontrola a dle předpokladů měl být trend transdukce u těchto linií nižší, oproti nádorovým. Jako kontrola sloužila i buněčná linie Jurkat, což byla linie vybraná kvůli absenci HSPG na svém povrchu. Výsledky měření potvrdily nižší míru transdukce u nenádorových linií, avšak s jedním zajímavým zjištěním. Tím bylo chování MusPV PsVs s kombinací s nenádorovou linií HEK-293, ve které bylo možné pozorovat stejný trend jako u buněk nádorových. Tato skutečnost byla zřejmě způsobena tím, že linie HEK-293 je immortalizovaná pomocí Adenoviru typu 5, což může ovlivňovat aktivitu virových promotorů a regulačních elementů v reportérovém vektoru. Zajímavým výsledkem bylo také to, že ačkoli bylo možné sledovat trend vyšší míry transdukce PsVs odvozených od MusPV u nádorových buněčných linií v porovnání s PsVs HPV16, v buněčné linii 293TT byl trend opačný, a to tak, že PsVs HPV16 dosahoval dvojnásobných hodnot oproti PsVs MusPV.

Měření interakce MusPV s nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi bylo provedeno za použití VLPs značených pomocí Rhod a Ax488. Pro první fázi barvení bylo zvoleno barvivo NHS-Rhod, což s sebou neslo jistá úskalí při určování koncentrace proteinu – tedy značených VLPs. Dle klasických postupů byla snaha o změření koncentrace pomocí přístroje Qubit® fluorometer, avšak při měření docházelo k interferenci s použitým barvivem a nebylo možné přesně stanovit koncentraci vzorku. Koncentrace byla přesně změřena při použití komerční soupravy Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit. Tyto charakterizované částice byly použity pro měření interakce MusPV

VLPs v čase. Byla provedena série měření s časovým rozestupem 15 minut, během kterých bylo měřeno množství VLPs značených Rhod asociovaných na povrchu buněk.

Buněčná linie 3T6 se od ostatních odlišovala, neboť po 75 minutách od přidání značených částic se procento pozitivních případů pohybovalo nad hranicí 36 %. Tento výsledek je v rozporu s daty získanými během transdukčních testů, kdy byl u linie 3T6 pozorován trend spočívající v nízké míře transdukce. Pro výsledky získané při měření interakcí se nabízí vysvětlení, že jelikož se jedná o linii myších buněk, může na jejich povrchu existovat specifický receptor umožňující zvýšenou míru asociace MusPV VLPs.

Ostatní buněčné linie dosahovaly po 75 minutách hodnot mezi 1,0 až 3,6 %. Od výše zmíněných se odchylovaly buněčné linie Jurkat a NHDF. U těchto linií byly hodnoty měření po 75 minutách na shodných 0,5 %, což potvrzovalo trend viditelný v předchozích experimentech. Nízká asociace MusPV VLPs s linií Jurkat byla pravděpodobně zapříčiněna absencí HSPG na jejím povrchu. Překvapením byla buněčná linie HeLa, pro kterou dle předchozích výsledků získaných pomocí luciferázového reportérového testu byly hodnoty srovnatelné s buněčnou linií PC3, avšak při použití značených VLPs částic procento pozitivních případů dosahovalo maximálních hodnot 0,5 % a to v 60. minutě (pro linii PC3 1,5 %), zatímco v 75. minutě se již hodnota snížila na 0,4 % (pro linii PC3 1,6 %). Vysvětlením by mohla být odlišná skladba typů HSPG na jejím povrchu.

Další měření pomocí průtokové cytometrie se zaměřila na vlastní proces internalizace (při odstranění navázaných částic na povrchu buněk) a měření byly podrobeny vybrané buněčné linie: HeLa, U2OS, 293TT a NHDF. K těmto buněčným liniím byly přidávány MusPV VLPs značené pomocí Rhod a Ax488. Na rozdíl od předchozího experimentu bylo toto měření nastaveno tak, že buňky byly před počátkem měření inkubovány po dobu 2 hodin s virovými částicemi a po uplynutí inkubační doby byly buňky propláchnuty, což mělo zajistit odstranění částic adheovaných na povrch buněk a tedy měření fluorescenčního signálu pocházejícího z částic, které byly buňkou internalizovány. Výsledky nepotvrdily předchozí trend, který bylo možné pozorovat u transdukčních testů. Hodnoty pozitivních buněk na fluorescenční signál pro Rhod se pohybovaly lehce nad hodnotou 20 % u linií 293TT a HeLa, a nad 10 % u linie NHDF. Zajímavým zjištěním bylo měření buněk U2OS s přidanými částicemi značenými Rhod, kdy hodnota byla nad hranicí 80 % pozitivních.



Při měření interakce částic značených pomocí Ax488 se procenta pozitivních pohybovala v rozmezí 4 až 6 %. Takto nízké hodnoty mohou být vysvětleny již zmíněným množstvím barviva navázaného na MusPV VLPs – což odpovídá 16 molekulám Ax488 na jednu částici.

Jak již vyplývá z cílů této diplomové práce, ústřední myšlenkou bylo mimo jiné zjistit, zda se částice odvozené od MusPV dokáží preferenčně vázat na vybrané nádorové buněčné linie, případně tato zjištění porovnat s částicemi odvozenými od HPV16. Na základě dostupných výsledků transdukčních testů a měření interakce VLPs s nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi je možné prohlásit, že existuje trend spočívající v preferencích vazby MusPV resp. HPV16 na nádorové buněčné linie a vyšší míře internalizace virových částic. Výsledky této práce zároveň potvrzují závěry představené ve studii Kines et al., 2016, dokonce mohou obohatit tyto závěry o skutečnost, že trend preferenční vazby papilomavirů k nádorovým buňkám je možné nalézt také u MusPV.

## 7 Závěr

Cílem této diplomové práce byla snaha zjistit, zda částice odvozené od MusPV se dokáží preferenčně vázat na nádorové buňky, resp. jsou těmito buňkami ve vyšší míře internalizovány.

Prvním dílčím cílem bylo vyprodukovat a charakterizovat MusPV PsVs nesoucí reportérové geny pro GFP a luciferázu. Tyto částice byly produkovány za použití savčího expresního systému na základě protokolu vytvořeného Buck *et al.* (viz kapitola 4.2.5.15). Úspěšnost transdukce byla měřena za použití nádorových a nenádorových buněčných linií na základě exprese reportérových genů, tedy nejprve opticky na základě signálu GFP a následně na základě LRT, tedy signálu luciferázy. Tato metoda poskytla informace o existujícím trendu ve zvýšené preferenci nádorových buněk PsVs.

Na základě druhého dílčího cíle byly připraveny rekombinantní bakuloviru nesoucí geny pro L1 nebo L1/L2 kapsidové proteiny. Tyto bakuloviry byly použity pro produkci MusPV VLPs v bakulovirovém expresním systému. Pro izolaci vyprodukovaných VLPs byl optimalizován protokol vytvořený A. Hejtmánkovou a vyprodukované VLPs byly charakterizovány. Důvodem pro tvorbu obou typů VLPs – L1 a L1/L2 – byla snaha o objasnění vlivu L2 proteinu na vazbu VLPs na buňku, jeho vliv na stabilitu a internalizaci VLPs. Jakmile bylo vyprodukováno dostatečné množství VLPs, byly tyto VLPs použity pro fluorescenční značení pomocí Rhod a následně také Ax488. Toto značení umožnilo využít VLPs značené Rhod pro zkoumání vazebných interakcí mezi MusPV a nádorovými a nenádorovými buněčnými liniemi a jejich měření za použití průtokové cytometrie. Na základě výsledků je možné pozorovat trend poukazující na zvýšenou míru interakcí mezi značenými částicemi a nádorovými buňkami. VLPs značené Rhod a Ax488 byly rovněž použity pro analýzu účinnosti vstupu viru do buňky, jejímž závěrem je zjištění, že typ zvoleného fluorescenčního barviva zásadně neovlivnil míru účinnosti. Ve výsledcích, je také možné pozorovat již zmíněný trend ve vyšší míře transfekční aktivity pro nádorové buněčné linie. Z výsledků rovněž vyplývá, že částice složené pouze z L1 proteinu dokáží v některých případech konkurovat částicím složeným z L1/L2 proteinu.

## Seznam literatury:

- Abban, C. Y., & Meneses, P. I. (2010). Usage of heparan sulfate, integrins, and FAK in HPV16 infection. *Virology*, *403*(1), 1-16
- Arya, R., Bhattacharya, A., & Saini, K. S. (2008). Dictyostelium discoideum — a promising expression system for the production of eukaryotic proteins. *The FASEB Journal*, *22*(12), 4055–4066
- Bayer, L., Gumpel, J., Hause, G., Müller, M., & Grunwald, T. (2018). Non-human papillomaviruses for gene delivery in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, *13*(6), 1–14
- Bernard, H.-U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., & de Villiers, E.-M. (2010). Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology*, *401*(1), 70–79
- Bienkowska-Haba, M., Patel, H. D., & Sapp, M. (2009). Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. *PLoS Pathogens*, *5*(7)
- Bouřa, E., Liebl, D., Frič, J., Marek, M., Štokrová, J., Holáň, V., & Forstová, J. (2005). Polyomavirus EGFP-pseudocapsids : Analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells ~ pi. *FEBS Letters*, *579*(29), 6549–6558
- Brendle, S. A., & Christensen, N. D. (2014). HPV Binding Assay to Laminin-332/Integrin  $\alpha 6\beta 4$  on Human Keratinocytes. In *Cervical Cancer: Methods and Protocols*, 1249(0), 53–66
- Broutian, T. R., Brendle, S. A., & Christensen, N. D. (2010). Differential binding patterns to host cells associated with particles of several human alphapapillomavirus types. *Journal of General Virology*, *91*(2), 531–540
- Buck, Christopher B., Day, P. M., & Trus, B. L. (2013). The Papillomavirus Major Capsid Protein L1. *Virology*, *445*(0), 169–174
- Buck, Christopher B., Day, P. M., & Trus, B. L. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, *445*, 169–174
- Buck, Christopher B., Pastrana, D. V., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2015). Production of Papillomaviral Vectors ( Pseudoviruses )
- Buck, Christopher B, Pastrana, D. V, Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2004). Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors. *Journal of Virology*, *78*(2), 751–757
- Buck, Christopher B, Pastrana, D. V, Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2005). Generation of HPV Pseudovirions Using Transfection and Their Use in Neutralization Assays. *Methods in Molecular Medicine*, *119*(3), 445–462
- Buck, Christopher B, & Thompson, C. D. (2007). Production of Papillomavirus-Based Gene Transfer

- Vectors. In *Current Protocols in Cell Biology* (pp. 26.1.1.-26.1.19)
- Buck, Christopher B, Thompson, C. D., Pang, Y. S., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2005). Maturation of Papillomavirus Capsids. *Journal of Virology*, 79(5), 2839–2846
- Calton, C. M., Bronnimann, M. P., Manson, A. R., Li, S., Chapman, J. A., Suarez-Berumen, M., ... Campos, S. K. (2017). Translocation of the papillomavirus L2/vDNA complex across the limiting membrane requires the onset of mitosis. *PLoS Pathogens*, 13(5), 1–29
- Cardone, G., Moyer, A. L., Cheng, N., Thompson, C. D., Dvoretzky, I., Lowy, D. R., ... Trus, L. (2014). Maturation of the Human Papillomavirus 16 Capsid. *MBio*, 5(4), 1–11
- Cerqueira, C., Pang, Y. S., Day, P. M., Thompson, C. D., Buck, C. B., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2016). A Cell-Free Assembly System for Generating Infectious Human Papillomavirus 16 Capsids Implicates a Size Discrimination Mechanism for Preferential Viral Genome Packaging. *Journal of Virology*, 90(2), 1096–1107
- Cerqueira, C., & Schiller, J. T. (2018). Papillomavirus assembly: an overview and perspectives. *Virus Research*, 231(4), 103–107
- Cladel, N. M., Budgeon, L. R., Balogh, K. K., & Cooper, T. K. (2015). A Novel Pre-Clinical Murine Model to Study the Life Cycle and Progression of Cervical and Anal Papillomavirus Infections, 1–11
- Conway, M., & Meyers, C. (2009). Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *Jurnal of Dental Research*, 88(4), 307-317
- Culp, T. D., Budgeon, L. R., Marinkovich, M. P., Meneguzzi, G., & Christensen, N. D. (2006). Keratinocyte-Secreted Laminin 5 Can Function as a Transient Receptor for Human Papillomaviruses by Binding Virions and Transferring Them to Adjacent Cells. *Journal of Virology*, 80(18), 8940–8950
- de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17–27
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 32(SUPPL.), 7–15
- Doorbar, J. (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, 445, 80–98
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, 55–70
- Drury, S. E. N., McArthur, S., Gough, R. E., & Jessop, M. (1998). Detection of herpesvirus-like and papillomavirus-like particles associated with diseases of tortoises. *The Veterinary Record*, 143, 639
- Dziduszko, A., & Ozbun, M. A. (2013). Annexin A2 and S100A10 Regulate Human Papillomavirus

- Type 16 Entry and Intracellular Trafficking in Human Keratinocytes. *Journal of Virology*, 87(13), 7502–7515
- Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K., & McMillan, N. A. (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of Virology*, 71(3), 2449–2456
- Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., & Orth, G. (1977). Chromatin-Like Structures Obtained After Alkaline Disruption of Bovine and Human Papillomaviruses. *Journal of Virology*, 21(3), 1205–1209
- Fraiberk, M., Hájková, M., Krulová, M., Kojzarová, M., Drda Morávková, A., Pšikal, I., & Forstová, J. (2017). Exploitation of stable nanostructures based on the mouse polyomavirus for development of a recombinant vaccine against porcine. *PLoS ONE*, 12(9), 1–23
- Fuster, M. M., & Wang, L. (2010). Endothelial Heparan Sulfate in Angiogenesis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 93, 179–212
- Gary, T. (2007). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Molecular Cell*, 3(10), 753–766
- Giroglou, T., Florin, L., Scha, F., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2001). Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology*, 75(3), 1565–1570
- Gonzales-Castro, R., Galindo, G. A., Salcedo, Y. G., Capero, L. U., Perez, V. V., Carrillo-Tripp, M., ... Gomez Lim, M. A. (2018). Plant-based chimeric HPV-virus-like particles bearing amyloid- b epitopes elicit antibodies able to recognize amyloid plaques in APP-tg mouse and Alzheimer's disease brains. *Inflammopharmacology*, 26(3), 817–827
- Graham, S. V. (2017). The human papillomavirus replication cycle , and its links to cancer progression : a comprehensive review. *Clinical Science*, 131(June), 2201–2221
- Hagensee, M. E., Yaegashi, N., & Galloway, D. A. (1993). Self-Assembly of Human Papillomavirus Type 1 Capsids by of the L1 and L2 Capsid Proteins. *Journal of Virology*, 67(1), 315–322
- Hammond, E., Khurana, A., Shridhar, V., & Dredge, K. (2014). The Role of Heparanase and Sulfatases in the Modification of Heparan Sulfate Proteoglycans within the Tumor Microenvironment and Opportunities for Novel Cancer Therapeutics. *Frontiers in Oncology*, 4(195), 1–15
- Harden, M. E., & Munger, K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 772, 3–12
- Havránková, A., & Ondruš, J. (2004). Kolposkopická nomenklatura. *Praktická Gynekologie*, 04, 29–30
- Herbst, L. H., Lenz, J., Van Doorslaer, K., Chen, Z., Stacy, B. A., Wellehan, J. F. X., ... Burk, R. D.

- (2008). Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, *Chelonia mydas* papillomavirus 1 and *Caretta caretta* papillomavirus 1. *Virology*, 383(1), 131–135
- Hrušková, V., Morávková, A., Babiarová, K., Ludvíková, V., Frič, J., Vonka, V., & Forstová, J. (2009). Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles. *International Journal of Onkology*, 35(6), 1247–1256
- Ingle, A., Ghim, S., Joh, J., Chepkoech, I., Jenson, A. B., & Sundberg, J. P. (2011). Novel Laboratory Mouse Papillomavirus ( MusPV ) Infection. *Veterinary Pathology*, 48(2), 500–505
- Inoue, T., Zhang, P., Zhang, W., Goodner-Bingham, K., Dupzyk, A., DiMaio, D., & Tsai, B. (2018).  $\gamma$ -Secretase promotes membrane insertion of the human papillomavirus L2 capsid protein during virus infection. *The Journal of Cell Biology*, 217(10), 3545–3559
- Joh, J., Jenson, A. B., Ingle, A., Sundberg, J. P., & Ghim, S. (2014). Searching for the initiating site of the major capsid protein to generate virus-like particles for a novel laboratory mouse papillomavirus. *Experimental and Molecular Pathology*, 96(2), 155–161
- Johnson, K. M., Kines, R. C., Roberts, J. N., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. (2009). Role of Heparan Sulfate in Attachment to and Infection of the Murine Female Genital Tract by Human Papillomavirus. *Journal of Virology*, 83(5), 2067–2074
- Joyce, J. G., Sands, J. A., Tung, J.-S., Przysiecki, C. T., Jansen, K. U., Keller, P. M., ... Lehman, E. D. (1999). The L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 11 Recombinant Virus-like Particles Interacts with Heparin and Cell-surface Glycosaminoglycans on Human Keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5810–5822
- Khan, K. H. (2013). Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2), 257–263
- Kines, R. C., Cerio, R. J., Roberts, J. N., Thompson, C. D., Pinos, E. D. L., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2016). Human papillomavirus capsids preferentially bind and infect tumor cells. *International Journal of Cancer*, 138, 901–911
- Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Dürst, M., Gissmann, L., ... Schiller, J. T. (1993). Efficient Self-Assembly of Human Papillomavirus Type 16 LI and L1-L2 into Virus-Like Particles. *Journal of Virology*, 67(12), 6929–6936
- Lange, C. E., Favrot, C., Ackermann, M., Gull, J., Vetsch, E., & Tobler, K. (2011). Novel snake papillomavirus does not cluster with other non-mammalian papillomaviruses. *Virology Journal*, 436(8), 1–5
- Lipovsky, A., Popa, A., Pimienta, G., Wyler, M., Bhan, A., Kuruvilla, L., ... DiMaio, D. (2013). Genome-wide siRNA screen identifies the retromer as a cellular entry factor for human

- papillomavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18), 7452–7457
- Liu, D., Shriver, Z., Qi, Y., Venkataraman, G., & Sasisekharan, R. (2002). Dynamic Regulation of Tumor Growth and Metastasis by Heparan Sulfate Glycosaminoglycans. *SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS*, 28(1), 67–78
- López-Bueno, A., Mavian, C., Labella, A. M., Castro, D., Borrego, J. J., Alcami, A., & Alejo, A. (2016). Concurrence of Iridovirus, Polyomavirus, and a Unique Member of a New Group of Fish Papillomaviruses in Lymphocystis Disease-Affected Gilthead Sea Bream. *Journal of Virology*, 90(19), 8768–8779
- López-Vidal, J., Gómez-Sebastián, S., Bárcena, J., del Carmen Nunez, M., Martínez-Alonso, D., Dudognon, B., ... Escribano, J. M. (2015). Improved Production Efficiency of Virus-Like Particles by the Baculovirus Expression Vector System. *PLoS ONE*, 10(10), 1–13
- Ma, B., Roden, R. B. S., Hung, C.-F., & Wu, T.-C. (2011). HPV pseudovirions as DNA delivery vehicles. *Therapeutic Delivery*, 2(4), 427–430
- Modis, Y., Trus, B. L., & Harrison, S. C. (2002). Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal*, 21(18), 4754–4762
- Osterhaus, A. D. M. E., Ellens, D. J., & Horzinek, M. C. (1977). Identification and Characterization of a Papillomavirus from Birds (Fringillidae). *Intervirology*, 8, 351–359
- Pastrana, D. V., Buck, C. B., Pang, Y. S., Thompson, C. D., Castle, P. E., Fitzgerald, P. C., ... Schiller, J. T. (2004). Reactivity of human sera in a sensitive , high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology*, 321(4), 205–216
- Pérez-Tris, J., Williams, R. A. J., Abel-Fernández, E., Barreiro, J., Conesa, J. J., Figuerola, J., ... Benitez, L. (2011). A Multiplex PCR for Detection of Poxvirus and Papillomavirus in Cutaneous Warts from Live Birds and Museum Skins. *Avian Diseases*, 55(4), 545–553
- Pipas, J. M. (1992). Common and Unique Features of T Antigens Encoded by the Polyomavirus Group. *Journal of Virology*, 66(7), 3979–3985
- Popa, A., Zhang, W., Harrison, M. S., Goodner, K., Kazakov, T., Goodwin, E. C., ... DiMaio, D. (2015). Direct Binding of Retromer to Human Papillomavirus Type 16 Minor Capsid Protein L2 Mediates Endosome Exit during Viral Infection. *PLoS Pathogens*, 11(2), 1–21
- Pyeon, D., Pearce, S. M., Lank, S. M., Ahlquist, P., & Lambert, P. F. (2009). Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathogens*, 5(2)
- Reck, M., Heigener, D. F., Mok, T., Soria, J. C., & Rabe, K. F. (2013). Management of non-small-cell lung cancer: Recent developments. *The Lancet*, 382(9893), 709–719
- Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proceedings of*

*the National Academy of Sciences*, 103(5), 1522–1527

- Sanderson, R. D., Yang, Y., Kelly, T., Macleod, V., Dai, Y., & Theus, A. (2005). Enzymatic Remodeling of Heparan Sulfate Proteoglycans Within the Tumor Microenvironment : Growth Regulation and the Prospect of New Cancer Therapies. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96, 897–905
- Scheffer, K. D., Gawlitza, A., Spoden, G. A., Zhang, X. A., Lambert, C., Berditchevski, F., & Florin, L. (2013). Tetraspanin CD151 Mediates Papillomavirus Type 16 Endocytosis. *Journal of Virology*, 87(6), 3435–3446
- Sekavová, A. (2017). Preparation of polyomaviral nanostructures for diagnostics of BK virus infection.
- Sethuraman, N., & Stadheim, T. A. (2006). Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 341–346
- Siegler, E., Goldberg, Y., Baruch-Finkel, T., Shaked-Mishan, P., Segev, Y., Machuli, L., ... Lavie, O. (2017). Positive Correlation between Clearance of High-Risk Human Papillomavirus and Lack of Residual Disease after Loop Excision of the Transformation Zone in Early Stage Cervical Cancer. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 21(4), 294–298
- Smith, J. L., Campos, S. K., Wandinger-Ness, A., & Ozbun, M. A. (2008). Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. *Journal of Virology*, 82(19), 9505–9512
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C., & Florin, L. (2008). Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16 - Involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS ONE*, 3(10)
- Suchanová, J., Španielová, H., & Forstová, J. (2015). Applications of Viral Nanoparticles Based on Polyomavirus and. In *Viral Nanotechnology* (pp. 303–362)
- Surviladze, Z., Dziduszko, A., & Ozbun, M. A. (2012). Essential Roles for Soluble Virion-Associated Heparan Sulfonated Proteoglycans and Growth Factors in Human Papillomavirus Infections. *PLoS Pathogens*, 8(2)
- Tachezy, R., Rector, A., Havelkova, M., Wollants, E., Fiten, P., Opendakker, G., ... Van Ranst, M. (2002). Avian papillomaviruses: the parrot *Psittacus erithacus* papillomavirus (PePV) genome has a unique organization of the early protein region and is phylogenetically related to the chaffinch papillomavirus. *BMC Microbiology*, 2(19)
- Truchado, D. A., Williams, R. A. J., & Benítez, L. (2018). Natural history of avian papillomaviruses. *Virus Research*, 252(2), 58–67
- Tumova, S., Woods, A., & Couchman, J. R. (2000). Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface : versatile coordinators of cellular functions. *The International Journal of*



- Uberoi, A., & Lambert, P. F. (2017). Rodent papillomaviruses. *Viruses*, 9(12)
- Uberoy, A., Yoshida, S., & Lambert, P. F. (2018). Development of an in vivo infection model to study Mouse papillomavirus-1 (MmuPV1). *J Virol Methods*, 253, 11–17
- Vongchan, P., & Lindhart, R. J. (2007). Expression of human liver HSPGs on acute myeloid leukemia. *Clinical Immunology*, 122(2), 194–206
- Wang, J. W., & Roden, R. B. S. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445(0), 175–186
- Webb, P. M., & Jordan, S. J. (2017). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 41, 3–14
- Woodham, A. W., da Silva, D. M., Skeate, J. G., Raff, A. B., Ambroso, M. R., Brand, H. E., ... Kast, W. M. (2012). The S100A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection. *PLoS ONE*, 7(8)
- Xu, Y., Zhang, Y., Xu, X., & Song, G. (2006). Papillomavirus virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. *Archives of Virology*, 151(11), 2133–2148
- Yoon, C. S., Kim, K. D., Park, S. N., & Cheong, S. W. (2001).  $\alpha 6$  Integrin Is the Main Receptor of Human Papillomavirus Type 16 VLP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283(3), 668–673
- Zarogoulidis, P., Darwiche, K., Sakkas, A., Yarmus, L., Huang, H., Li, Q., ... Malecki, M. (2013). Suicide Gene Therapy for Cancer - Current Strategies. *J Genet Syndr Gene Ther*, 4
- Zhang, P., Monteiro, G., Deatherage, C., Burd, C., Zhang, P., Monteiro, G., ... Dimaio, D. (2018). Cell-Penetrating Peptide Mediates Intracellular Membrane Passage of Human Papillomavirus L2 Protein to Trigger Retrograde Trafficking Article Cell-Penetrating Peptide Mediates Intracellular Membrane Passage of Human Papillomavirus L2 Protein to Trigger Re. *Cell*, 175, 1–12
- Žáčková Suchanová, J. (2012). Cílení umělých virových partikulí polyomaviru na buňky nádoru prostaty