

Univerzita Karlova v Praze

Prírodovedecká fakulta

Študijný program: Biológia

Študijný obor: Genetika, molekulárna biológia a virológia



Bc. Alexandra Kozmanová

Príprava monoklonálnej protilátky proti hlavnému štruktúrnemu proteínu VP1 BK
vírusu a konštrukcia plazmidov pre vyhládávanie proteínových interakcií
metódou BiFC

Preparation of monoclonal antibody against the major structural protein, VP1, of BK
virus and construction of plasmid for protein interaction analysis by BiFC method

Diplomová práca

Školiteľ: Doc. RNDr. Jitka Forstová, Csc.

Praha, 2011

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca, ani jej podstatná časť, nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe 20. 8. 2011

Podpis

Na tomto mieste by som chcela poďakovať **doc. RNDr. Jitke Forstovej, Csc.** za neoceniteľnú pomoc a užitočné rady pri vypracovávaní tejto diplomovej práce.

Ďalej ďakujem **RNDr. Alene Morávkovej PhD.** za imunizáciu myšiek, pomoc s prácou s hybridómami a rady pri práci.

Tiež ďakujem **Mgr. Lenke Horníkovej** sa všestranné rady v laboratóriu,

Mgr. Vojtechovi Žilovi za zhotovenie elektrónmikroskopických snímok,

Mgr. Ondrejovi Šebestovi za snímky z konfokálneho mikroskopu a **Mgr. Martinovi Fraiberkovi** za rady, povzbudenie a dobrú náladu v laboratóriu.

Ďakujem tiež milým laborantkám **Vlaste Sakařovej** a **Ivane Polívkovej** za technickú pomoc v laboratóriu a celému kolektívu nášho laboratória.

Najviac však ďakujem rodičom a sestre, mamke za stálu psychickú a finančnú pomoc, bez ktorej by táto práca ani nevznikla, ockovi za vedenie k prírode, ktoré ma dovedlo až sem a v neposlednej rade svojmu priateľovi, bez ktorého by som to nezvládla.

Predkladaná diplomová práca vznikla v rokoch 2008 - 2011 za podpory grantov: GAUK 263206, 261214 a 1M0508, MSM0021620858, LC545 Ministerstva školstva, mládeže a telovýchovy Českej Republiky.

ABSTRAKT

Hlavným cieľom práce bolo vytvorenie monoklonálnej protilátky proti VP1 proteínu BK vírusu pre štúdium jednotlivých krokov jeho replikačného cyklu. BK vírus je ľudský polyomavírus spôsobujúci u imunosuprimovaných pacientov závažné ochorenie - nefropatiu asociovanú s polyomavírusom (PVAN) po transplantácii obličiek, alebo hemoragickú cystitídu po transplantácii kostnej drene. Virióny BK vírusu majú kapsidu s ikozahedrálnou symetriou pozostávajúcu z 360 molekúl hlavného kapsidového proteínu VP1 a dvoch minoritných štruktúrnych proteínov VP2 a VP3, ktoré však nie sú exponované na povrchu kapsidy. VP1 je silne imunogénny, čo dáva možnosť produkovať protilátky umožňujúce sledovanie BK vírusu detekciou kapsidového proteínu. Ako antigén pre imunizáciu myši pre prípravu hybridómov boli použité štruktúry prázdnych BK vírusových kapsíd produkovaných v hmyzích bunkách z rekombinantného bakulovírusu. Klonovaním hybridómov vzniknutých fúziou myelómových buniek a B-lymfocytov z imunizovanej myši sa podarilo získať radu primárnych klonov. Jeden z nich bol klonovaný do homogenity a monoklonálna protilátka proti VP1 BK vírusu bola čistená z hybridómového média afinitnou chromatografiou. Z výsledkov testovania vyplýva, že získaná protilátka 5/G10/A5/B2/8 rozpoznáva konformačný epitop a dá sa používať pre detekciu proteínu VP1 i viriónov v bunkách metódou nepriamej imunofluorescencie. Protilátka nedetekuje VP1 sekvenčne príbuzného vírusu SV40. Minoritné proteíny VP2 a VP3 polyomavírusov sa viažu na vnútrobunkové membrány a perforujú ich. Bolo postulované, že táto ich vlastnosť by mohla byť vírusom využívaná k uvoľneniu viriónov z endoplazmatického retikula do cytosólu na jeho ceste do bunkového jadra. Predpokladá sa, že VP3 na membránach oligomerizuje a vytvára otvory pre únik rozvoľnených viriónov. Schopnosť VP3 oligomerizovať sme chceli dokázať metódou BiFC (bimolecular fluorescence complementation). Pre tento účel bola navrhnutá séria primerov pre konštrukciu 4 plazmidov pre expresiu VP3 proteínu fúzovaného s jednou alebo druhou časťou žltého fluorescenčného proteínu v oboch orientáciách. Konštrukty boli overené sekvenovaním. Dva skonštruované plazmidy pcDNA3-NYFP-VP3 exprimujúci fúzny proteín pozostávajúci z N-terminálnej časti YFP pripojeného na N-konci VP3 proteínu a pcDNA3-VP3-NYFP exprimujúci fúzny proteín tiež N-terminálnej časti YFP

na C-konci VP3 proteínu mali správne sekvencie a sú pripravené k použitiu. Zatiaľ sa nepodarila konštrukcia vektoru nesúceho gén pre fúzny proteín C-terminálnej časti YFP a VP3 v oboch orientáciách, kde sekvenovanie dokázalo sekvenčné poruchy. Preto zatiaľ nebolo možné objasnenie oligomerizácie VP3 proteínov touto metódou komplementácie YFP - BiFC realizovať.

Kľúčové slová: polyomavírus, BKV, VP1, antigén, VP2, VP3, oligomerizácia, BiFC

ABSTRACT

The aim of this study was to create a monoclonal antibody against VP1 protein BK virus for study of individual steps of its replication cycle. BK virus is human polyomavirus which causes serious disease - polyomavirus associated nephropathy in immunocompromised patients after renal transplantation or hemorrhagic cystitis after bone-marrow transplantation. Virions of BK virus have capsids with icosahedral symmetry consisting of 360 molecules of the major capsid protein VP1 and two minor structure proteins VP2 and VP3, which are not exposed on the capsid surface. VP1 is highly immunogenic what gives us possibility to produce antibodies capable of BK virus monitoring by capsid protein detection. Empty BK virus particles produced in insect cells from a recombinant baculovirus were used as antigen to immunize mice for preparing hybridomas. Cloning of hybridomas created by fusion of myeloma cells with B-lymphocytes from immunized mouse gave us series of primary hybridoma clones. One of them, 5/G10/A5/B2/8, was cloned to homogeneity and monoclonal antibody against VP1 BK virus was purified from hybridomas medium by affinity chromatography. The analysis of antibody properties revealed that it recognizes a conformation epitope and can be used for VP1 protein and virion detection in cells by indirect immunofluorescence. Antibody does not detect VP1 of related SV40 virus.

Polyomavirus minor proteins, VP2 and VP3, bind intracellular membranes and perforate them. It was suggested that this ability could be used to release virions from the endoplasmic reticulum to cytoplasm on their trafficking to cell nucleus. It is postulated that molecules of VP3 oligomerise at the membrane and create an aperture for partially disassembled virion escape. We decided to prove the ability of VP3 oligomerization by BiFC (bimolecular fluorescence complementation). For this we designed series of oligonucleotide primers for constructing 4 plasmids for expression of VP3 protein fused with one or other part of yellow fluorescent protein in both orientations. Sequencing of all four constructs proved two of them – pcDNA3-NYFP-VP3 which encodes fusion protein consisting of N-terminal part YFP linked to the N-terminus of VP3 and pcDNA3-VP3-NYFP which encodes fusion protein consisting of N-terminal part of YFP linked to the C-terminus of VP3 protein to be correct. They are now ready to use. Unfortunately, vectors carrying gene for

C-terminal part of YFP fused with VP3 in both orientation exhibited several sequence defects. Therefore, we were not able to prove VP3 protein oligomerization by complementation of YFP - BiFC yet.

Key words: polyomavirus, BKV, VP1, antigen, VP2, VP3, oligomerization, BiFC

OBSAH

1. Úvod	16
2. Literárny prehľad	18
2.1. Čeľad' Polyomaviridae	19
2.2. Štruktúra viriónov	21
2.3. Charakteristika BK vírusu	22
2.3.1. Epidemiológia	22
2.3.2. Virión a organizácia genómu	23
2.3.3. Nekódujúci kontrolný regulačný región	24
2.3.4. Produkty včasného regiónu genómu BKV a ďalších lepšie charakterizovaných polyomavírusov	25
2.3.4.1. Veľký T antigén	25
2.3.4.2. Malý T antigén	26
2.3.5. Produkty pozdneho regiónu BKV genómu	27
2.3.5.1. VP1 proteín	27
2.3.5.2. Minoritné štruktúrne proteíny VP2 a VP3	29
2.3.5.3. Agnoproteín	30
2.3.6. Životný cyklus BK vírusu	31
2.3.6.1. Receptory buniek pre BK vírus	32
2.3.6.2. Vstup BK vírusu do bunky	33
2.3.6.3. Úloha minoritných proteínov myšieho polyomavírusu v adsorpcii vírusu na povrch a vo vstupe do bunky	34
2.3.6.4. Doprava viriónov k jadru	35
2.3.6.5. Úloha minoritných proteínov v trafikingu a vstupe genómu do jadra.	37
2.3.6.6. Včasná transkripcia	39
2.3.6.7. Pozdná fáza infekcie	39
2.3.6.8. Úloha minoritných proteínov myšieho a opičieho polyomavírusu v smrti hostiteľskej bunky	40
2.4. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)	43
3. Ciele diplomovej práce	47
4. Materiál a metódy	49

4.1. Materiál.....	50
4.1.1. Prístroje.....	50
4.1.2. Chemikálie.....	51
4.1.3. Zloženie roztokov.....	52
4.1.4. Antibiotiká.....	53
4.1.5. Kultivačné média.....	53
4.1.5.1. Média pre tkanivové kultúry	53
4.1.5.2. Média pre baktérie	54
4.1.6. Protilátky a enzýmy.....	54
4.1.6.1. Primárne protilátky	54
4.1.6.2. Sekundárne protilátky	55
4.1.6.3. Enzýmy.....	55
4.1.7. Markery molekulových hmotností.....	56
4.1.8. Bunkové línie, bakteriálne kmene, vírusy a plazmidy	56
4.1.8.1. Bunkové línie	56
4.1.8.2. Bakteriálne kmene.....	57
4.1.8.3. Vírusy	57
4.1.8.4. Plazmidy.....	57
4.1.9. Primery.....	57
4.2. Metódy.....	58
4.2.1. Práca s tkanivovými kultúrami.....	58
4.2.1.1. Pasážovanie hmyzích buniek	58
4.2.1.2. Pasážovanie cicavčích buniek 3T6 a RPTEC	58
4.2.1.3. Pasážovanie ľudských RPTEC buniek na infekciu	58
4.2.1.4. Infekcia RPTEC buniek	59
4.2.1.5. Fixácia buniek na sklíčkach	59
4.2.1.6. Imunofluorescenčné značenie proteínov v bunkách	59
4.2.2. Príprava antigénu na imunizáciu myší	60
4.2.2.1. Izolácia VP1 pseudokapsíd	60
4.2.2.1.1. Ultracentrifugácia cez sacharózový vankúš.....	60
4.2.2.1.2. Ultracentrifugácia v rovnovážnom gradiente chloridu cézneho..	60
4.2.2.1.3. Dialýza frakcií.....	61

4.2.2.2. Overenie prítomnosti VP1 proteínu	61
4.2.3. Imunizácia myší.....	61
4.2.4. Fúzia buniek	62
4.2.4.1. Príprava myelómových buniek.....	62
4.2.4.2. Príprava slezinných buniek z imunizovanej myši	62
4.2.4.3. Prepieranie slezinných a myelómových buniek	62
4.2.4.4. Príprava podporných buniek	62
4.2.4.5. Bunková fúzia	63
4.2.5. Práca s hybridómami	63
4.2.5.1. Rozplnenie hybridómov.....	63
4.2.5.2. Liečba geneticínom.....	63
4.2.5.3. Testovanie a klonovanie hybridómov	64
4.2.5.3.1. Kontrola rastu hybridómov	64
4.2.5.3.2. Testovanie hybridómových médií na prítomnosť žiadanej protilátky	64
4.2.5.3.3. Klonovanie hybridómov	64
4.2.6. Práca s proteínmi	64
4.2.6.1. Testovanie hybridómových médií prietokovou cytometriou.....	64
4.2.6.2. SDS PAGE	65
4.2.6.2.1. Príprava gélov pre elektroforézu.....	65
4.2.6.2.2. Elektroforéza	66
4.2.6.2.3. Farbenie a fixácia gélu po SDS-PAGE.....	66
4.2.6.2.4. Western Blot po SDS-PAGE	66
4.2.6.3. Dot Blot	66
4.2.6.4. Imunologická detekcia proteínov na membránach	67
4.2.7. Izolácia BK vírusu	67
4.2.8. Práca s baktériami.....	68
4.2.8.1. Kultivácia baktérií	68
4.2.8.2. Skladovanie baktérií	68
4.2.8.3. Príprava kompetentných buniek pre elektroporáciu.....	68
4.2.8.4. Elektroporácia baktérií	68
4.2.9. Práca s DNA.....	69

4.2.9.1.	Izolácia plazmidovej DNA Qiagen Kitom	69
4.2.9.2.	Maxiizolácia plazmidovej DNA Quagen Kitom	69
4.2.9.3.	Maxipreparácia plazmidovej DNA- alkalická metóda	69
4.2.9.4.	Odstránenie RNA RNázou.....	70
4.2.9.5.	Fenol-chloroformové Čistenie plazmidu	70
4.2.9.6.	Minipreparácia rekombinantnej plazmidovej DNA- alkalická metóda	70
4.2.9.7.	Agarózová elektroforéza	71
4.2.9.8.	Štiepenie DNA restričnými endonukleázami	71
4.2.9.9.	Ligácia DNA.....	71
4.2.9.10.	Amplifikácia DNA polymerázovou reťazovou reakciou.....	72
5.	VÝSLEDKY	73
5.1.	Príprava monoklonálnej protilátky proti VP1 proteínu BK vírusu	74
5.1.1.	Izolácia a overenie prítomnosti VP1 proteínu z infikovaných hmyzích buniek.....	74
5.1.2.	Imunizácia myší a fúzia buniek	78
5.1.2.1.	Imunizácia	78
5.1.2.2.	Bunková fúzia	78
5.1.3.	Testovanie hybridómov	78
5.1.4.	Klonovanie hybridómov.....	79
5.1.5.	Purifikácia protilátky 5/G10/A5/B2/8.....	82
5.1.6.	Neutralizačný test protilátky	83
5.1.7.	Vizualizácia vírusu v bunkách detekciou VP1 proteínu monoklonálnou protilátkou proti VP1 proteínu BK vírusu.....	85
5.2.	Príprava expresných plazmidov pre produkciu minoritného štruktúrneho proteínu VP3 fúzovaného s N- a C- koncovými časťami EYFP pre štúdium oligomerizácie minoritných proteínov u myšieho polyomavírusu.....	89
5.2.1.	Plazmidy pEYFP-N1 a pcDNA3+	90
5.2.2.	Návrh primerov pre PCR fragmenty	92
5.2.3.	Amplifikácie DNA pre vytvorenie jednotlivých fragmentov	95
5.2.4.	Ligačné zmesi a minipreparácie DNA z bakteriálnych kolónií	98
5.2.4.1.	Ligačné zmesi.....	99

5.2.4.2. Minipreparácie DNA z bakteriálnych monokolónií	99
5.2.5. Sekvenácie pozitívnych bakteriálnych kolónií	102
5.2.6. Výsledky sekvenácií DNA konštruktov	102
6. Diskusia	105
6.1. Príprava monoklonálnej protilátky proti VP1 proteínu BK vírusu	106
6.2. Príprava expresných plazmidov pre produkciu minoritného štruktúrneho proteínu VP3 fúzovaného s N- a C- koncovými časťami EYFP pre štúdium oligomerizácie minoritných proteínov u myšieho polyomavírusu	109
7. Súhrn	112
1. Príprava monoklonálnej protilátky proti hlavnému štruktúrnemu proteínu VP1 BK vírusu	113
2. Príprava expresných plazmidov pre produkciu minoritného štruktúrneho proteínu VP3 fúzovaného s N- a C- koncovými časťami EYFP pre štúdium oligomerizácie minoritných proteínov u myšieho polyomavírusu	113
8. Zoznam literatúry	114

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ANTP	Antennapedia proteín
BiFC	bimolecular fluorescence complementation
BKV	BK polyomavírus
bp	bázové páry
BSA	bovine serum albumin
cav-1	caveolin-1
DAPI	4',6-diamino-2-fenylindol dihydrochlorid
ddH ₂ O	demineralizovaná voda
dH ₂ O	destilovaná voda
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DMSO	dimetylsulfoxid
ds	dvojreťazcová
E2F	E2F transkripčný faktor
EGTA	etylénglykol-tetraoctová kyselina
EHNA	erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine hydrochloride
ER	endoplazmatické reticulum
ERAD	degradačná dráha asociovaná s ER
ERE	estrogen response element
EY	Eyeless proteín
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FCS	fetálne teľacie sérum
ffu	fluorescence forming unit
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GA	Golgiho aparát
GFP	zelený fluorescenčný proteín
GRE	glucocorticoid response element
HIV	vírus ľudskej imunodeficiencie
JCV	JC polyomavírus
KI	Karolinska Institute virus
LT	veľký T antigén
M β CD	metyl- β -cyklodextrín

MCPyV	Merkel cell polyomavirus
MPyV	myší polyomavírus
NCCR	non-coding control region
NLS	jadrový lokalizačný signal
nt	nukleotid
ORF	otvorený čítací rámec
ori	začiatok replikácie
PARP	polymeráza poly (ADP)-ribózy
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PP2A	proteín fosfatáza A2
pRb	retinoblastoma protein
PRE	progesterone response element
PVAN	polyomavirus associated nephropathy
rpm	rotate per minute
RPTEC	renal proximal tubular epithelial cell
SDS	sodium dodecyl sulfát
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza
siRNA	malá interferujúca RNA
sT	malý T antigén
SV40	simian vacuolating virus
T	triangulačné číslo
TEMED	N,N,N',N'-tetrametylēthlēnediāmin
tris	tris(hydroxymetyl)aminometán
VLPs	virus-like particle
WU	Washington University virus
YFP	yellow fluorescent protein

1. ÚVOD

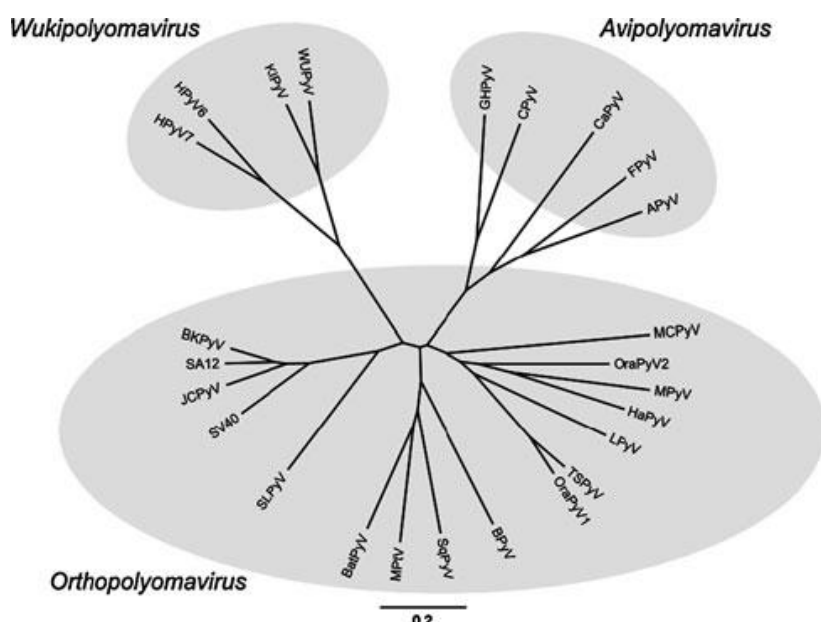
Polyomavírusy patria medzi malé neobalené DNA vírusy rozšírené na celom svete. Boli objavené v 50-tych rokoch minulého storočia a odvtedy patrí myšší polyomavírus a opičí vírus SV40 k dôkladne študovaným objektom. Zaujímavé sú pre svoj onkogénny potenciál, ale poslúžili tiež k objasneniu mechanizmov regulácie bunkového cyklu, funkcie niektorých tumor supresorov, objasneniu génovej expresie a u SV40 bol objavený alternatívny zostrih. Myším polyomavírusom, ktorý patrí k modelovým organizmom, sa zaoberá dlhodobo aj naše laboratórium. Nespornou výhodou u tohoto vírusu je nepatogénnosť u ľudí a teda relatívna bezpečnosť pri práci s ním. Avšak objavením polyomavírusov ako ľudských patogénov, z ktorých niektoré spôsobujú závažné ochorenia u imunosuprimovaných pacientov, sa do popredia dostali aj tieto polyomavírusy. Medzi najviac študované ľudské polyomavírusy patria BK vírus, JC vírus a v poslednej dobe aj Merkel cell polyomavírus, ktorého DNA bola nájdená u pacientov s najagresívnejšou formou rakoviny kože. Je preto dôležité poznať životné cykly týchto vírusov, ich receptory na bunkách, interakcie s hostiteľskými bunkami, internalizačné procesy, ako aj interakcie vírusov s intracelulárnymi bunkovými komponentami. Tieto procesy by v budúcnosti mohli pomôcť aj z lekárskeho hľadiska pri vývoji potrebných liekov. Laboratórium sa preto odnedávna zaoberá aj BK vírusom, ktorého prirodzeným hostiteľom je človek a u infikovaných imunosupresívnych ľudí spôsobuje polyomavírusom asociovanú nefropatiu alebo hemoragickú cystitídu. Preto sme sa rozhodli prispieť k štúdiu životného cyklu BK vírusu. Táto diplomová práca sa viac-menej zaoberá vývinom reagensí – konštrukciou plazmidov pre štúdium proteínových interakcií a prípravou monoklonálnej protilátky nevyhnutnej pre vizualizáciu viriónov v bunkách.

2. LITERÁRNY PREHĽAD

2.1. ČEĽAĎ POLYOMAVIRIDAE

Členovia čeľade Polyomaviridae sú malé neobalené vírusy s dvojvláknovou DNA a kapsidou s ikozahedrálnou symetriou (Gottlieb et al., 2001). Sú schopné perzistentnej infekcie, majú onkogénny potenciál a boli nájdené u mnohých druhov cicavcov a vtákov (Allander et al., 2007).

Čeľaď Polyomaviridae je súčasne zastúpená jediným rodom- Polyomavirus. V októbri 2010 navrhla Výskumná skupina pre Polyomavírusy z Medzinárodného Výboru pre Taxonómiu Vírusov (International Committee on Taxonomy of Viruses-ICTV) rozdelenie čeľade Polyomaviridae na Orthopolyomavirus a Wukipolyomavirus, ktoré by obsahovali cicavčie druhy a Avipolyomavirus vtáacie druhy. Kritériá použité pri vytváraní nových taxónov zahŕňajú biologické vlastnosti, ako aj vzťahy nukleotidových sekvencií, teda okruh hostiteľov, genetický repertoár a sekvenčnú identitu celého genómu (Johne et al., 2011).



Obr.2.1: Fylogenetické vzťahy medzi Polyomavírusmi založené na celogenómovej nukleotidovej sekvencii. Strom bol vytvorený metódou neighbour joining použitím Kimura 2-parametrového distančného modelu (prevzaté z Johne et al., 2011).

Prvý objavený bol v roku 1953 myšší polyomavírus (MPyV) Ludwikom Grossom, ktorý študoval prenos myšej leukémie. Zistil, že u myšší inokulovaných extraktom buniek z myšší, ktoré nemali leukémiu, sa vyvinuli tumory parotíd- veľkých slinných žliaz a že

tento parotídový agens môže byť oddelený od vírusu myšej leukémie filtráciou s malými pórmami (Gross 1953). Neskôr Eddy a Stewart zistili, že tento vírus spôsobuje mnoho rôznych typov nádorov pri inokulácii myšiam a nazvali ho preto "poly"oma z gréčtiny (Eddy et al., 1958, Stewart et al., 1958). Vírus bol používaný pre štúdium bunkovej transformácie a štúdium interakcií vírusu s hostiteľom, ktoré vedú k rozvoju nádoru (Losada et al., 2006).

Roku 1960 bol objavený Simian virus 40 (SV40), ktorého hostiteľom je makak rhesus, ako kontaminant formalínom inaktivovaného poliovírusu pestovanom na obličkových bunkách makaka rhesusa (Sweet & Hilleman, 1960). Táto poliovírusová vakcína bola distribuovaná niekoľko stotisíc ľuďom od roku 1955 až 1963. SV40 indukuje nádory u hlodavcov a je schopný transformovať mnoho typov bunkových kultúr, vrátane ľudských. Je obľúbeným laboratórnym modelom pre štúdium mechanizmov molekulárnych procesov v eukaryotických bunkách a štúdium bunkovej transformácie (Butel et al., 1999).

Prvé dva polyomavírusy s človekom ako prirodzeným hostiteľom boli objavené v roku 1971. Bol to JC vírus, vyizolovaný z primárnych kultúr ľudských fetálnych buniek mozgového tkaniva po inokulácii extraktom z mozgu pacienta s progresívnou multifokálnou leukoencefalopatiou (Padgett et al., 1971). A krátko na to bol objavený BK vírus v moči pacienta pod vplyvom imunopresív po transplantácii obličiek (Gardner et al., 1971).

Skríningom ľudských vzoriek respiračného traktu boli v roku 2007 detekované ďalšie, dovtedy neznáme polyomavírusy- KI (Karolinska Instituted) a WU (Washington University) u ľudí s respiračným ochorením (Allander et al., 2007, Gaynor et al., 2007). Aj keď sú si KI a WU vírusy navzájom podobné, miera divergencie medzi KI a WU je väčšia ako divergencia medzi SV40 a BKV. Niektoré analýzy podporujú hypotézu, že vetva WU/KI je bližšia primátim polyomavírusom, zatiaľ čo črty WU genómu podporujú názor, že by mohol byť viac podobný myšiemu polyomavírusu (Gaynor et al., 2007).

Hľadaním infekčného agens vo vzorkách karcinómov Merkelových buniek v roku 2008, bol až v 80 % týchto karcinómov objavený genóm nového polyomavírusu- (Merkel Cell Polyomavirus), integrovaný v genóme nádorových buniek (Feng et al., 2008).

Ďalšie dva polyomavírusy- human polyomavirus 6 a 7 boli objavené amplifikačnou technikou (rolling circle amplification) vo vzorkách kože zdravých jedincov (Schowalter et al., 2010).

V tom istom roku bol u pacienta s ochorením trichodysplasia spinulosa nájdený vírus, nazvaný Trichodysplasia spinulosa- associated polyomavirus. Toto ojedinelé ochorenie spôsobuje kožné lézie na tvári, hlavne nose a obočí u imunosuprimovaných pacientov (Meijden et al., 2010).

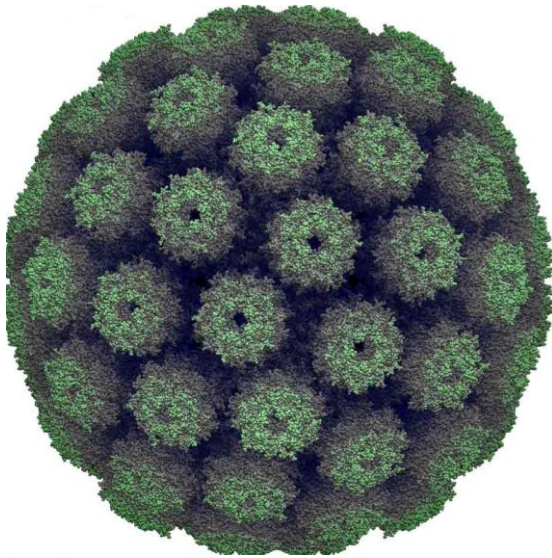
Genus Orthopolyomavirus (type species Simian virus 40)		
Baboon polyomavirus 1	SA12	monkey
Bat polyomavirus	BatPyV	bat
B-lymphotropic polyomavirus	LPyV	monkey
BK polyomavirus	BKPyV	human
Bornean orangutan polyomavirus	OraPyV1	orangutan
Bovine polyomavirus	BPyV	cattle
California sea lion polyomavirus	SLPyV	sea lion
Hamster polyomavirus	HaPyV	hamster
JC polyomavirus	JCPyV	human
Merkel Cell polyomavirus	MCPyV	human
Murine pneumotropic virus	MPTV	mouse
Murine polyomavirus	MPyV	mouse
Simian virus 40	SV40	monkey
Squirrel monkey polyomavirus	SqPyV	monkey
Sumatran orangutan polyomavirus	OraPyV2	orangutan
Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus	TSPyV	human
Other related virus that may be a member of the genus Orthopolyomavirus but has not been approved as a species		
Genus Wukipolyomavirus (type species KI polyomavirus)		
Human polyomavirus 6	HPyV6	human
Human polyomavirus 7	HPyV7	human
KI polyomavirus	KIPyV	human
WU polyomavirus	WUPyV	human
Genus Avipolyomavirus (type species Avian polyomavirus)		
Avian polyomavirus	APyV	parrot, birds
Canary polyomavirus	CaPyV	canary birds
Canary polyomavirus	CPyV	jackdaw
Crow polyomavirus	FPyV	bullfinch
Finch polyomavirus	GHPyV	goose
Goose hemorrhagic polyomavirus		
Other viruses with similarities to members of the family Polyomaviridae that have not been assigned to a polyomavirus species		
Athymic rat polyomavirus	ratPyV	rat
Baboon polyomavirus 2	BPYV2	monkey
Cynomolgus polyomavirus	CyPV	monkey
Rabbit kidney vacuolating virus	RKV	rabbit

Tab.2.2: Tabuľka znázorňuje doteraz objavené polyomavírusy s označením a uvedením hostiteľa (prebraté a upravené z Johne et al., 2011).

2.2. ŠTRUKTÚRA VIRIÓNOV

Jedným z najjednoduchších a najlepšie charakterizovaných príkladov polyomavírusov je myš polyomavírus. Jeho kapsidu tvorí 360 molekúl hlavného kapsidového proteínu VP1 a celkom 72 molekúl minoritných proteínov VP2 a VP3. Molekuly VP1 proteínu sú na povrchu usporiadané do pentamérnych jednotiek, pričom každá pentaméra tvorí dutinu, do ktorej sa nekovalentne viaže minoritný proteín VP2 alebo VP3 (Barouch & Harrison 1994). 12 pentavalentných a 60

hexavalentných kapsomér je poskladaných do pozície 5- a 6- koordinovaných vrcholov (Caspar & Klug, 1962). Karboxyterminálny koniec VP1 sprostredkuje interpentamérne kontakty, ktoré držia kapsidu pohromade a aminoterminálny koniec má úlohu vo väzbe vírusovej DNA. Sekvencia blízko C-konca VP2/VP3 je nevyhnutná a dostačujúca pre vznik komplexu pentaméru VP1 s molekulou minoritného proteínu (Barouch & Harrison 1994).



Obr.2.3: Kryštálová štruktúra myšieho polyomavírusu v komplexe so sialyloligosacharidovými receptorovými fragmentami (Stehle T, Harrison SC 1996, prevzaté z http://www.virology.wisc.edu/virusworld/images/polyoma_1sid.jpg)

2.3. CHARAKTERISTIKA BK VÍRUSU

2.3.1. EPIDEMIOLOGIA

BK vírus (BKV) je rozšírený a všadeprítomný, viac ako 70 % ľudí na celom svete je séropozitívnych, teda boli vystavení Polyomavirus hominis typu 1, teda BKV. Epidemiologické, virologické a fylogenetické dáta ukazujú, že sa ľudské polyomavírusy vyvíjali spolu s hostiteľom, o čom svedčí vysoká prevalencia, nízka morbidita, latencia a asymptomatická reaktivácia. BK vírus zdieľa 75 % svojho genómu s JCV a 70 % s SV40 (Hirsch & Steiger, 2003).

Infekcia BKV sa objavuje v útlom detstve zvyčajne po vymiznutí materských protilátok bez špecifických syndrómov, nasledovaná nereplikatívnou infekciou v rôznych tkanivách, hlavne urogenitálnom trakte. Asi u 5 % ľudí dochádza k

asymptomatickej reaktivácii a replikácii vírusu na nízkej úrovni. Pri vysokých úrovniach replikácie vírusu dochádza k “polyomavirus- associated nephropathy” - PVAN (nefropatia asociovaná s polyomavírusom) pri transplantácii obličiek a hemoragickej cystitíde pri transplantáciách kostnej drene, pričom PVAN sa pokladá za jednu z hlavných príčin odhojenia transplantátu do prvých dvoch rokov po transplantácii (Hirsch, 2005).

Hlavná liečba BKV nefropatie spočíva v redukcii imunosupresie. Rôzne stratégie zahŕňajú redukciu alebo prerušenie liečby kalcineurínovým inhibítorom a/alebo iných adjuvans, zámenou za azatioprín, sirolimus, alebo leflunomid. Životaschopnosť pacientov sa zvyšuje pri diagnostikovaní BKV nefropatie do 6 mesiacov po transplantácii v porovnaní s prípadmi, keď dochádza k diagnostike neskôr (Bohl & Brennan, 2007).

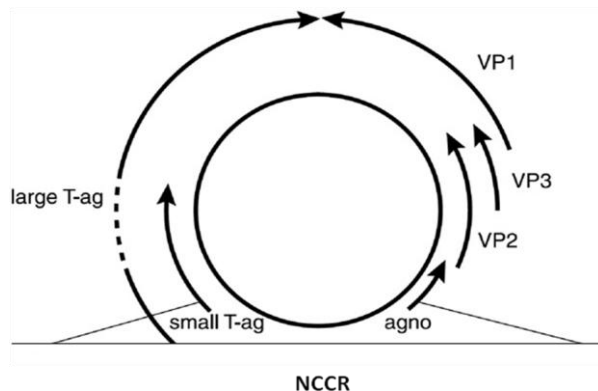
Okrem toho sa BKV pri autoimunitných ochoreniach považuje za spúšťača patologickej imunitnej odpovede, v experimentálnych štúdiách môžu byť tieto odpovede indukované DNA proteínovými komplexami s histónmi alebo veľkým T antigénom. Tiež bola postulovaná asociácia medzi BKV a systémovým ochorením lupus erythematoses, ale hypotetická úloha BKV v autoimunitných ochoreniach nie je špecifická a podobnú odpoveď u týchto pacientov môžu vyvolať aj iné antigény (van Ghelue et al., 2003).

Cesta prenosu BKV nie je celkom objasnená, súčasné štúdie ukazujú, že BKV je schopný infikovať a replikovať sa v bunkách slinných žliaz, čo by mohlo svedčiť o potencionalnej ceste prenosu. BKV bol detekovaný v slinách pacientov s HIV-asociovanou patológiu slinných žliaz, ako aj u zdravých jedincov (Jeffers et al., 2009).

2.3.2. VIRIÓN A ORGANIZÁCIA GENÓMU

Vírusová kapsida má ikozahedrálnu symetriu a má veľkosť 45-50 nm v priemere. Genóm, podobne ako u iných polyomavírusov, pozostáva z cirkulárnej dvojvláknovej DNA s veľkosťou asi 5 tisíc bázových párov (bp). Genóm BKV sa člení na včasný región, pozdny región a regulačný alebo nekódujúci kontrolný región, ktorý obsahuje promótoary, enhancery a počiatok replikácie. Genóm je prepisovaný v oboch smeroch, včasný región kóduje neštruktúrne proteíny- veľký a malý T antigén

(LT , St), zatiaľčo pozdný región kóduje štruktúrne proteíny VP1, VP2, VP3 a neštruktúrny agnoproteín (Jeffers et al.,2009).



Obř.2.4: Schematické znázornenie genómu BK vírusu (prevzaté a upravené z Myhre et al., 2009)

2.3.3. NEKÓDUJÚCI KONTROLNÝ REGULAČNÝ REGIÓN

Nekódující kontrolný regulačný región NCCR (Non coding control region) je lokalizovaný medzi včasným a pozdným regiónom. Zatiaľčo napríklad u SV40 je dlhý okolo 350 bp, u BKV jeho veľkosť varíruje medzi rôznymi izolátmi (Johnsen et al.,1995). NCCR je rozdelený do piatich po sebe idúcich blokov označených, P 68, Q 39, R 63 (Markowitz & Dynan, 1988), O 142 ako origin a S 63, kde čísla udávajú dĺžku v bázových pároch (Sundsford et al., 1994, Ferguson & Subramani, 1994).

Sú v ňom obsiahnuté repetitívne sekvencie, napr. rozšírený kmeň Dunlop obsahuje triplikáciu 68 bp dlhého bloku s 18 bp dlhou deléciou v stredovej repetícii, kmeň WW je odlišný od väčšiny BKV kmeňov svojou absenciou repetitívnych DNA sekvencií (Markowitz & Dynan, 1988). Heterogenita NCCR rozličných BKV kmeňov by mohla odrážať schopnosť polyomavírusov na adaptáciu na nové bunkové prostredia, pretože duplikácie, delécie a nové spojenia P, Q a R blokov vytvárajú údajne nové väzbové miesta pre transkripčné faktory. Takáto variácia by teda mohla ovplyvniť relatívnu účinnosť transkripcie a replikácie v rôznych hostiteľských bunkách a teda aj permisivitu a onkogénny potenciál ako v bunkových kultúrach, tak aj v ľudskom organizme (Johnsen et al.,1995).

Aktivita enhancerov v NCCR je závislá na väzbe hostiteľských transkripčných faktorov. Každý jeden z troch kmeňov- Dunlop, WW, MM obsahujú 3- 6 väzbových miest pre proteín z NF1 rodiny transkripčných faktorov (Markowitz & Dynan, 1988).

Okrem toho BKV kontrolný región obsahuje aj jednotku odpovedajúcu na hormóny, ktorá pozostáva z glukokortikoid a/alebo progesterón odpovedajúceho elementu (GRE/PRE- glucocorticoid and/or progesterone response element) a z estrogénového elementu (ERE- estrogen response element). Štúdie ukázali, že glukokortikoidný receptor a progesterónový receptor sa viažu do tejto BKV GRE/PRE sekvencie, zatiaľčo estrogénový receptor sa viaže do BKV ERE motívu. Pridanie syntetických steroidných hormónov zvyšuje permisivitu hostiteľských buniek pre infekciu BKV niekoľkokrát. Tieto BKV hormónové elementy by tak mohli hrať dôležitú úlohu zvyšovaním produktívnej BKV infekcie a možno aj pri reaktivácii latentnej infekcie behom zvýšenej hladiny steroidných hormónov za fyziologických, či patologických podmienok, teda aj pri BKV reaktivácii počas tehotenstva (Moens et al., 1994).

2.3.4. PRODUKTY VČASNÉHO REGIÓNU GENÓMU BKV A ĎALŠÍCH LEPŠIE CHARAKTERIZOVANÝCH POLYOMAVÍRUSOV

Včasný región kóduje veľký tumorový antigén (LT antigén) ako hlavný regulačný proteín a podporujúci malý tumorový antigén (St antigén) (Hirsch & Steiger, 2003). Vznikajú alternatívnym zostrihom mRNA (Lee & Langhoff, 2002).

2.3.4.1. VEĽKÝ T ANTIGÉN

LT antigén je veľký jadrový fosfoproteín nevyhnutný pre vírusovú replikáciu (Cole et al., 1996). Jeho úloha v životnom cykle je dôležitá pre produktívnu infekciu, expresia T antigénu je okrem regulácie transkripcie kontrolovaná aj posttranskripčne. U SV40 boli nájdené microRNA, ktoré downregulujú expresiu T antigénu (Sullivan et al., 2005).

LT antigén viaže oblasť počiatku vírusovej replikácie a rekrutuje hostiteľskú DNA polymerázu (Dyson et al., 1990). LT iniciuje DNA replikáciu svojou helikázovou aktivitou, ktorá rozvíja DNA duplex dvojsmerne. Iniciačným krokom je väzba LT do ori. Zheng et al. ukázali, že aminokyseliny ATP- väzbového miesta LT antigénu BKV hrajú dôležitú úlohu v sprostredkovaní replikácie vírusovej DNA. Porovnanie sekvencií ukázal konzerváciu týchto kritických aminokyselín aj u JC vírusu a vírusu SV40 (Zheng et al., 2009).

T antigén má schopnosť viazať proteíny z rodiny pRb, p107 a p130 *in-vivo* aj *in-vitro*. Všetky tieto tri proteíny viaže aj LT antigén SV40 vírusu, ale hlavným rozdielom je, že pre detekciu interakcie LT BKV s pRb, p107 a p130 musia byť použité väčšie množstvá bunkových lyzátov (50-100x viac ako pre SV40). Fakt, že je v bunke syntetizované malé množstvo LT antigénu naznačuje, že iba malá frakcia pRb, p107 a p130 je inaktivovaná väzbou s LT antigénom BK vírusu (Harris et al., 1996). LT antigén stimuluje predčasné uvoľnenie E2F faktora z pRb komplexu väzbou hypofosforylovanej formy pRb. pRb normálne tento E2F transkripčný faktor viaže a reprimuje transkripciu génov zahrnutých do priebehu S fázy a DNA syntézy, teda voľný E2F tieto gény aktivuje (Dyson et al., 1990).

Ďalšia doména LT antigénu viaže p53, ktorého normálnou funkciou je detekovať poškodenia DNA v bunke a zastaviť bunkový cyklus alebo aktivovať apoptický program (Dyson et al., 1990).

LT viaže väčšinu p53 proteínu v bunke. Proteín p53 indukuje pri DNA poškodení pozastavenie bunkového cyklu v G₁ fáze alebo apoptózu. Pozastavenie bunkového cyklu poskytne čas na opravy DNA a pokiaľ je poškodenie DNA príliš veľké, bunka prejde apoptózou. Obe patria ku kritickým schopnostiam bunky odpovedať na interné alebo externé stimuly a ochrániť tak bunku pred potencionálnymi zhubnými mutáciami (Harris et al., 1996).

Teoreticky by veľký T antigén mohol byť dobrým cieľom pre objavenie liekov, pretože je kľúčový proteín nevyhnutný pre DNA replikáciu, je vysoko konzervovaný v rôznych vírusových kmeňoch a neexistuje žiaden homológny proteín, ktorý by sa nachádzal v ľudských bunkách, čo ponúka dobrú šancu na vývoj anti- vírusových látok s akceptovateľným profilom toxicity (Zheng et al., 2009).

2.3.4.2. MALÝ T ANTIGÉN

Všetky polyomavírusy obsahujú otvorený čítací rámec a zostrihové signály pre St antigén. St antigén zdieľa amino- terminálny región s LT antigénom, pretože oba proteíny sú iniciované z jedného ATG iniciačného kodónu. Unikátny karboxylový koniec St antigénu je vytvorený zostrihom spoločnej mRNA (Pipas, 1992). St antigén u SV40 vírusu uplatňuje svoj efekt hlavne väzbou podjednotiek proteín fosfatázy A2

a teda moduluje zložky dráh signálnych transdukcií a zamedzuje defosforylácii viacerých transkripčných faktorov (Moens et al., 1997).

2.3.5. PRODUKTY POZDNEHO REGIÓNU BKV GENÓMU

Expresia z pozdnej oblasti je iniciovaná po štarte DNA replikácie. Produktom sú kapsidové proteíny VP1, VP2, VP3 a neštruktúrny agnoproteín. VP1 proteín sa usporiadáva po svojej syntéze do pentamérov. Jedna molekula VP2 alebo VP3 sa ešte v cytoplazme viaže k dutine pentaméru a celý komplex je transportovaný do bunkového jadra. (Griffith et al., 1992).

2.3.5.1. VP1 PROTEÍN

Vo virióne tvorí VP1 asi 80 % všetkých proteínov. Bolo dokázané, že rekombinantný proteín VP1 produkovaný v baktériách je schopný sa usporiadať *in vitro* do prázdnych kapsidových štruktúr s veľkosťou a morfológiou podobnou natívnym kapsidám, za prítomnosti vápnika (Gillock et al., 1997). VP1 monoméry pozostávajú z antiparalelných reťazcov zložených do β -barelovej štruktúry s vystavenými vonkajšími interaktívnymi slučkami a s XC- koncovými flexibilnými vláknami, ktoré sa tlačia na susedný monomér (Stehle et al., 1996).

Úsek na N konci VP1 proteínu, ktorý tvorí asi 15 aminokyselín je orientovaný do dutiny pentaméru a interaguje s nukleoproteínovým jadrom. Prvých 11 aminokyselín na N konci VP1 tvorí jadrový lokalizačný signál (NLS- nuclear localization signal) (Chang et al., 1992). Okrem toho prvých 5 aminokyselín na N konci VP1, bolo identifikovaných ako esenciálna VP1 DNA- väzbová doména bez DNA sekvenčnej špecifity (Chang et al., 1993).

C- koniec VP1 proteínu sprostredkuje interpentamérne kontakty, ktoré držia kapsidu pohromade (Garcea et al., 1987). Úsek aminokyselín od Pro- 232 po Asp- 364 polyomavírusového VP1 proteínu má schopnosť viazať vápnik (Ludlow & Consigli, 1987). V kapside SV40 sa nachádza asi 700 miest pre väzbu vápnikových iónov. Tieto miesta sa vyskytujú na každej molekule VP1 v páre. Dve zdvojené miesta koordinujú vápnikové ióny medzi dvomi VP1 reťazcami z jedného pentaméru a karboxyterminálnym koncom z druhého pentaméru a týmto spevňujú interpentamérne interakcie v kapside (Liddington et al., 1991, Stehle et al., 1996).

Z barelového základu VP1 proteínu BK vírusu, ako aj iných polyomavírusov, vybieha päť sľučiek- BC, DE, EF, GH a HI. Sľučka BC zahŕňa krátky región- “BKV subtyping region”- 1744- 1812 nt, ktorý je charakterizovaný nukleotidovým polymorfizmom, ktorý sa používa na klasifikáciu kmeňov BKV do 4 subtypov- BKV I, II, III a IV (Tremolada et al., 2010).

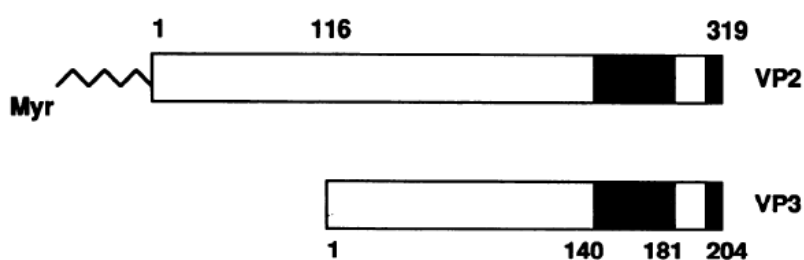
Z výsledkov nedávnej identifikácie fosforylovaných aminokyselín v štruktúrnych proteínoch BK vírusu vyplýva, že fosforylácia Ser- 80 vo VP1 proteíne je kľúčová pre šírenie BK vírusu, pri cielenej mutagenéze dochádza k zrušeniu expresie LT a VP1 proteínu (Chen et al., 2011).

Kapsidy SV40, ako aj myšieho polyomavírusu sú schopné disociovať na VP1 pentaméry za redukčných podmienok po ošetrovaní EGTA (Brady et al., 1977). To bolo potvrdené, keď kryštalografické analýzy SV40 viriónov identifikovali disulfidickú väzbu medzi β - β' pentamérmi a dva vápnikové ióny pre každú VP1 molekulu, ktoré sú zahrnuté do interpentamérnych interakcií (Stehle et al., 1996). Disociované virióny myšieho polyomavírusu sa *in vitro* reasemblujú do infekčných viriónov po odstránení redukčného činidla a pridaní vápnikových iónov (Brady et al., 1979). Kanesashi et al. ukázali, že odlišné podmienky indukujú usporiadanie VP1 pentamérov SV40 do štruktúrne polymorfných partikulí t.z. “virus-like particles” (VLPs), T=7 ikozahedrálnej partikulí, T=1 ikozahedrálnej partikulí a dlhých tubulárnych štruktúr (Kanesashi et al., 2003). U myšieho polyomavírusu bolo ukázané, že keď je alkalický roztok kapsomér dialyzovaný proti pufru s pH 5 s 0,5 mM CaCl₂, vznikajú 3 odlišné typy agregátov. Okrem partikulí so známou ikozahedrálou štruktúrou so 72 pentamérmi, vznikali aj 12- pentamérne partikule s ikozahedrálou štruktúrou a 24- pentamérne partikule s oktahedrálou symetriou (Salunke et al., 1989).

Tak isto ako SV40 a myší polyomavírus, aj VP1 proteín BK vírusu produkovaný pomocou rekombinantného bakulovírusového systému, je schopný sa usporiadať do virus-like particles o veľkosti 45-50 nm (Touzé et al., 2001), zatiaľčo Li et al. ukázali vznik partikulí s dvomi odlišnými veľkosťami- 50 a 26 nm v priemere, väčšie boli zo 72 pentamérnych jednotiek. Podľa imunologických štúdií BK - VLPs majú aj podobné antigénne vlastnosti ako reálne BKV partikule (Li et al., 2003).

2.3.5.2. MINORITNÉ ŠTRUKTÚRNE PROTEÍNY VP2 A VP3

Sekvence minoritných kapsidových proteínov sa prekrývajú: VP2 obsahuje celú VP3 sekvenciu s pridanými 115 aminokyselinami na N- konci. Aminoterminálny glycín VP2 proteínu je u všetkých polyomavírusov myristylovaný (Streuli & Griffin, 1987). Zdieľaná doména VP2 a VP3 SV40 obsahuje VP1 interaktívnu doménu, jadrový lokalizačný signal- NLS a u primátich polyomavírusov aj DNA- väzbovú doménu (Clever et al.,1993, Clever & Kasamatsu 1991, Gharakhanian & Kasamatsu, 1990). Na rozdiel od primátich polyomavírusov, myší polyomavírus a ostatné hlodavčie vírusy nie sú schopné viazať DNA (Chang et al., 1993).



Obr.2.5: Schematické znázornenie VP2 a VP3 proteínu myšieho polyomavírusu. Tmavovyznačená (140-181) je VP1-interaktívna doména (prevzaté a upravené z Barouch & Harrison, 1994).

VP2 by mohol mať úlohu pri rozvoľňovaní vírusu a oba proteíny sú pravdepodobne dôležité pre morfogézu vírusu. Fragment dlhý 42 aminokyselín situovaný blízko karboxylového konca VP3 (140- 181) myšieho polyomavírusu je dostačujúci pre interakciu minoritných proteínov s VP1 pentamérom. Táto interakcia je rýchla, saturateľná a špecifická pre spoločný C-koniec VP2 a VP3 (Barouch & Harrison, 1994).

Pri eliminácii VP2 alebo VP3 špecificky cielenou mutagenézou u SV40 dochádza k výrazne zníženému rastu vírusu, pri eliminácii oboch minoritných proteínov, vírus nie je schopný produktívnej infekcie buniek (Cilmi, 1991). Experimenty u myšieho polyomavírusu naznačujú, že minoritné proteíny majú úlohu v morfogéze vírusu a tiež vo včasných fázach infekcie, ale VP2 a VP3 nie sú nevyhnutné pri formovaní virus- like particles v hmyzích bunkách (Montross et al., 1991). U myšieho polyomavírusu má VP2 úlohu aj vo včasných fázach infekcie, mutantné vírusy obsahujúce nemyristylovanú VP2 formu vykazujú oneskorenie rastu vírusu v ďalšom infekčnom cycle s defektom v skorých fázach infekcie (Krauzewicz et al., 1990, Mannová et al. 2002).

Nedávne štúdie ukázali, že minoritné proteíny SV40 sú schopné viazať sa do membrán endoplazmatického retikula a perforovať ich. (Daniels et al., 2006, Rainey-Barger et al., 2007). Bol analyzovaný hydrofóbny charakter aminokyselinových sekvencií vo VP2 a VP3 proteíne a definované 3 transmembránové domény VP2 proteínu: 1. 69- 101 aminokyselinových zvyškov na N- konci VP2. 2. 126- 165 aminokyselinových zvyškov v spoločnej VP2 a VP3 sekvencii a 3. 287- 305 aminokyselinových zvyškov v spoločnom VP2 a VP3 C-konci. Bolo postulované, že doména 1 by mohla byť zodpovedná za perforáciu membrán a doména 2 za membránovú väzbu (Rainey-Barger et al., 2007).

Transientná expresia minoritných štruktúrnych proteínov myšieho polyomavírusu v permisívnych bunkách indukuje rýchlu apoptózu buniek a expresia VP3 proteínu skráteneho na polovicu (s deléciou hydrofóbnej domény 2 z N-konca) vykazuje nižšiu schopnosť zabíjať bunky, ako aj zníženú afinitu k membránam. Nízka toxicita u skráteneho VP3 naznačuje, že doména 2 u minoritných proteínov môže byť dôležitá pre väzbu k membránam a pre indukciu apoptózy (Huerfano et al., 2010).

Iba nedávno boli identifikované fosforylované aminokyseliny v štruktúrnych proteínoch BKV vírusu a ich biologický efekt. Pri nahradení Ser-254 vo VP2 proteíne cielenou mutagenézou a následnej tranfekcii Vero buniek dochádza k zrušeniu expresie LT a VP1 proteínu, teda fosforylácia Ser- 254 u VP2 sa zdá byť kľúčová pri šírení BKV (Chen et al., 2011).

2.3.5.3. AGNOPROTEÍN

Genómy primátich polyomavírusov obsahujú na 5` konci pozdneho regiónu otvorený čítací rámec (ORF) kódujúci polypeptid zo 62 aminokyselín u SV40, 66 aminokyselín u BKV a 71 aminokyselín u JCV (Cole et al., 1996). Prvýkrát bol tento otvorený čítací rámec objavený pri sekvenácii SV40 vírusu v pozdnych 70-tych rokoch (Dhar et al., 1977).

Produkt tohoto čítacieho rámca s molekulovou váhou 7900 Da a 61 aminokyselín v bunkách infikovaných SV40 bol identifikovaný ako agnoproteín. Akumuluje sa v pozdnych fázach lýtického cyklu a má krátku dobu existencie- približne 2 hodiny. Je silne bázický (pH 10,6) a má afinitu k jednovláknovej aj dvojláknovej DNA (Jay, 1981). Analýzy u SV40 vírusu odhalili, že agnoproteín je asociovaný s vírusovým

nukleoproteínovým komplexom, ale nie s maturovanými viriónmi (Jackson & Chalkley, 1981).

N- a C- terminálne domény agnoproteínu sú hydrofilné, centrálna časť je relatívne hydrofóbna (von Heijne, 1981). SV40 mutanty postrádajúce agnoproteín sú životaschopné, ale produkujú infekčné potomstvo pomalšie ako vírus divokého typu (Mertz et al., 1983).

Neskôr bol detekovaný aj agnoproteín BK vírusu, objavuje sa v perinukleárnej oblasti a cytoplazme pozde v infekčnom cykle. Je fosforylovaný *in vivo*, v BKV agnoproteínovej sekvencii existuje niekoľko potenciálnych fosforylačných miest, ktoré zahŕňajú 2 konsenzus fosforylačné sekvencie pre proteín kinázu C konzervované medzi tromi primátami polyomavírusmi (SV40, BKV, JCV), jedno BKV unikátne fosforylačné miesto pre proteín kinázu C a jedno fosforylačné miesto pre kaseín kinázu II (Rinaldo et al., 1998). Fosforylovaný Ser- 11 sa zdá byť dôležitý, mutáciou Ser- 11 za alanín alebo aspartát dochádza k porušeniu šírenia vírusu a redukcii produkcie infekčných vírusových partikulí (Johannessen et al., 2008).

Zmeny NCCR regiónu BKV, ktoré zahŕňali čiastočnú 5` koncovú deléciu agnoproteínovej kódujúcej sekvencie sa prejavili v tom, že tieto rekombinantné vírusy zlyhali pri produkcii infekčného potomstva. Defekt bol následne napravený po rekonštrukcii agnogénovej oblasti. Teda absencia agnoproteínu bola spojená s nedostatkom intracelulárneho aj extracelulárneho infekčného potomstva, čo podporuje hypotézu, že agnoproteín hraje úlohu v produkcii infekčných vírusových partikulí (Myhre et al., 2010).

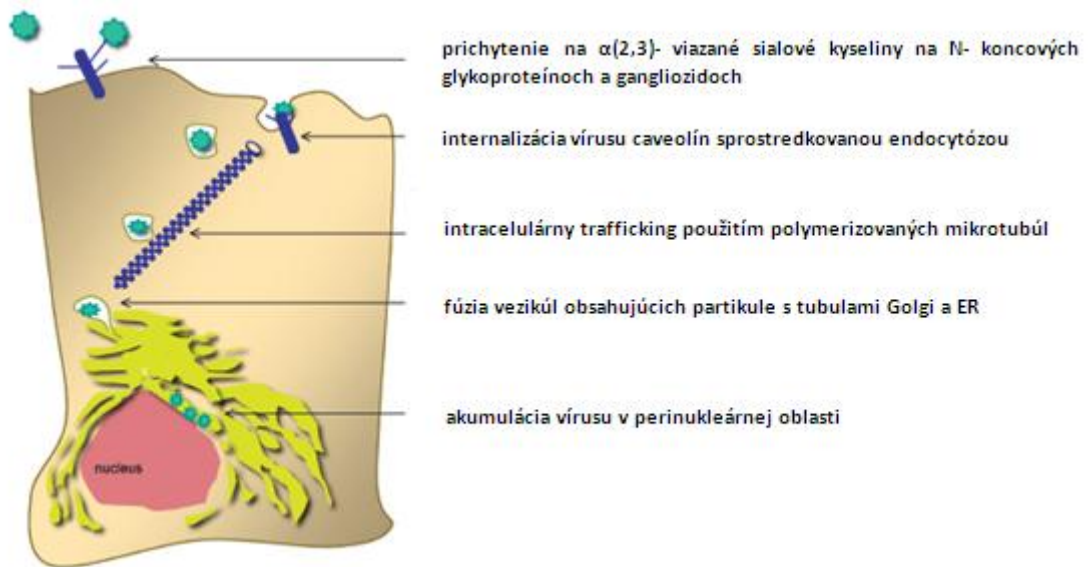
Ani pri vysokej expresii BKV agnoproteínu *in vivo* neboli nájdené zodpovedajúce úrovne humorálnej a bunkovej imunitnej odpovede, čo značí slabú imunogenicitu agnoproteínu BKV (Leuenberger et al., 2007).

Zdá sa, že agnoproteín má úlohu nie iba v replikatívnom životnom cykle polyomavírusov, ale aj v deregulácii bunkových procesov- ako kontrola bunkového cyklu a oprava DNA, čo by mohlo prispievať k neoplázii (Khalili et al., 2005).

2.3.6. ŽIVOTNÝ CYKLUS BK VÍRUSU

Životný cyklus BK vírusu začína interakciou vírusu s bunkovými receptormi a následným vstupom do bunky. Pre dosiahnutie produktívnej infekcie musí byť

vírusový genóm doručený do jadra, kde sú exprimované včasné gény, potom sa replikuje vírusová DNA, nasleduje transkripcia pozdných génov a zostavovanie nových viriónov (Jiang et al., 2009).



Obr.2.6: Cesta infekcie BKV (prebraté z upravené z Dugan et al.,2006)

2.3.6.1. RECEPTORY BUNIEK PRE BK VÍRUS

Pri štúdiu chemickej podstaty BK vírusového receptora na ľudských erythrocytoch s použitím rôznych enzýmov bolo zistené, že interakcia vírusu s bunkami bola najviac citlivá k odstráneniu terminálnych sialových kyselín neuraminidázou (Seganti et al., 1981). Neskôr bolo zistené, že gangliozidy sú zahrnuté pri viazaní vírusu na červené krvinky, úloha gangliozidov bola demonštrovaná, keď pri ošetrení buniek neuraminidázou a neuraminidázou aj β -galaktozidázou boli následne tieto bunky odolné voči aglutinácii BK vírusom, ale táto schopnosť bola renovovaná obalením buniek gangliozidmi- teda po pridaní rozpustných gangliozidov (Sinibaldi et al., 1986). Sinibaldi et al. tiež zistili, že pri extrahovaní gangliozidov z Vero buniek dochádza k zníženiu infekčnosti BK vírusom a že sú gangliozidy po pridaní schopné obnoviť vnímavosť buniek pre infekciu BK vírusom (Sinibaldi et al., 1990). O dva roky neskôr tá istá vedecká skupina zistila, že pri extrahovaní fosfolipidov z Vero buniek dochádza k inhibícii BKV infekčnosti a hemaglutinácie, ale pri pridaní fosfolipidov na tieto ošetrené bunky dochádza zas k obnoveniu vnímavosti buniek k BK vírusovej infekcii aj hemaglutinácii (Sinibaldi et al., 1992).

Dugan et al., zistili, že pri odstránení $\alpha(2,3)$ - viazaných sialových kyselín z Vero buniek dochádza k obmedzeniu BKV infekcie. Najprv enzymaticky odstránili terminálne $\alpha(2,3)$ - a $\alpha(2,6)$ - viazané sialové kyseliny. Sialidáza S odstraňuje $\alpha(2,3)$ - viazané sialové kyseliny a neuraminidáza odstraňuje $\alpha(2,3)$ - viazané kyseliny pri nízkej koncentrácii a $\alpha(2,3)$ - aj $\alpha(2,6)$ - viazané kyseliny pri vysokej koncentrácii. Keďže použitie oboch enzýmov inhibovalo infekciu, je zrejmé, že $\alpha(2,3)$ - viazané sialové kyseliny sú kritické pre infekciu BKV.

Ďalej použitie sialyltransferázy špecifickej pre adíciu $\alpha(2,3)$ - viazaných sialových kyselín na N- koniec glykoproteínov, na bunky s odstránenými sialovými kyselinami obnovilo infekciu. Ale sialyltransferáza špecifická pre adíciu $\alpha(2,6)$ - viazaných sialových kyselín na N- koniec glykoproteínov infekčivitu neobnovilo, čo potvrdzuje, že $\alpha(2,3)$ - viazané sialové kyseliny pripojené na N-konci majú dôležitú úlohu v infekcii Vero buniek BK vírusom. Potvrdením úlohy glykoproteínov na N-konci ako receptorov bolo, keď iba inhibítor N-glykozylácie znižoval infekciu v závislosti na dávkach inhibítora (Dugan et al., 2005).

Gangliozidy majú úlohu v prichytávaní ľudských vírusov na bunky a v infekcii. Sú jedným z typov sfingolipidov zložených z ceramidu a oligosacharidového reťazca obsahujúceho jeden alebo viac sialových kyselín v $\alpha(2,3)$ - alebo $\alpha(2,8)$ -orientácii (Dugan et al., 2007).

Low et al., dokázali, že BKV silne interaguje s lipozómami obsahujúcimi GT1b a GD1b gangliozidy, nie však s lipidmi obsahujúcimi GM1. Dokonca boli LNCaP (ľudské bunky karcinómu prostaty) normálne rezistentné pre infekciu BK vírusom, po opôsobení GD1b a GT1b vnímavé pre infekciu BKV (Low et al., 2006).

2.3.6.2. VSTUP BK VÍRUSU DO BUNKY

Neobalené vírusy nemôžu fúzovať s membránou hostiteľskej bunky, musia využívať iné cesty vstupu vírusu. Eash et al. zistili, že BKV vstupuje do Vero buniek caveolin sprostredkovanou endocytózou závislou na pH. Použitím techník pre štúdium internalizácie vírusu zistili, že BKV vstupuje do buniek relatívne pomaly, takže väčšina vírusu úspešne unikne účinku neutralizačného séra medzi 2 a 4 hodinami po vstupe. Deplécia membránového cholesterolu metyl- β -cyklodextrínom (M β CD) inhibuje infekciu, pričom u Vero buniek so zablokovanou clathrin dependentnou

endocytózou infekcia úspešne postupuje. A naopak pri expresii mutantného caveolinu-1 bola blokována internalizácia vírusu- teda intaktný caveolin-1 je dôležitý pre BKV infekciu. Okrem toho ukázali, že BKV kolokalizuje s markerom pre caveolin sprostredkovanú endocytózu (cholera toxin B), zatiaľčo s markerom pre clathrin sprostredkovanú endocytózu BKV nekolokalizuje (Eash et al., 2004). K podobným výsledkom dospeli Moriyama et al. s použitím ľudských buniek proximálneho renálneho epitelového tubulu (RPTEC), kde s použitím M β CD a nystatínu (spôsobujú depléciu cholesterolu, teda inhibujú caveolin sprostredkovanú endocytózu), bola úroveň expzie T antigénu v bunkách signifikantne nižšia ako pri infekcii iba BK vírusom. BKV infekcia bola inhibovaná v RPTEC bunkách transfekovaných s caveolin-1 siRNA (malé interferujúce RNA spôsobujúce depléciu caveolinu-1), ale infekcia v bunkách transfekovaných s clathrin siRNA (spôsobujú depléciu clathrinu) inhibovaná nebola (Moriyama et al., 2007).

Avšak pri štúdiu degradácie caveolinu-1, ako hlavného proteínu tvoriaceho caveoly sa zistilo, že je detekovaný v pozdnych endozómoch a lyzozómoch, kde je potom degradovaný. Autori teda navrhujú, že "caveozomy" ako nezávislá organela odlišná od endozómov, ako ju predchádzajúcich prácach popísali, sa vlastne zhoduje s kompartmentami pozdnych endozómov modifikovaných akumuláciou overexprimovaného cav-1 čakajúceho na degradáciu (Hayer et al., 2010).

2.3.6.3. ÚLOHA MINORITNÝCH PROTEÍNOV MYŠIEHO POLYOMAVÍRUSU

V ADSORPCII VÍRUSU NA POVRCH A VO VSTUPE DO BUNKY

Myristylované kapsidové proteíny môžu byť zahrnuté vo včasných fázach vírusovej infekcie- interakcie s receptormi a vstupom.

Mnoho bunkových proteínov je acylovaných a u mnohých je funkciou tejto modifikácie interakcia proteínov s membránami. N- terminálna myristylácia-kotranslačná acylácia 14- uhlíkovej nasýtenej mastnej kyseliny na N- terminálny glycín, bola nájdená na širokom spektre proteínov. Neslúži iba na ukotvenie proteínov do intracelulárnych membrán. Mnoho vírusových proteínov asociovaných so zostavovaním viriónov je N- myristylovaných. Fakt, že sa myristylácia bežne objavuje medzi vírusovými proteínmi naznačuje, že definícia jej presnej úlohy by mohla byť užitočná pri navrhovaní inhibítorov vírusovej infekivity. Keďže

myristylácia je medzi polyomavírusmi vysoko konzervovaná, musí vírusom predávať podstatnú výhodu (Krauzewicz et al., 1990).

Krauzewicz et al. študovali úlohu myristylácie VP2 proteínu u myšieho polyomavírusu a zistili, že pri cielenej mutagenéze N-terminálneho glycinu za glutamovú kyselinu, boli vírusové partikule pozorované elektrónovým mikroskopom ľahko deformované, ale mutantný vírus bol schopný infikovať bunky s podstatne nižšou infektivitou (Krauzewicz et al., 1990).

Naopak Mannová et al. neidentifikovali úlohu myristylovej kyseliny vo včasných fázach infekcie myším polyomavírusom, lebo v prvom kole infekcie nebola žiadna fáza infekčného cyklu výraznejšie spozdená a výťažok viriónov bol po prvom kole infekcie porovnateľný s výťažkom vírusu divokého typu. Pri reinfekciách sa však postupne začal výťažok viriónov znižovať u vírusu s nemyristylovaným VP2. Na druhej strane ale úplná absencia minoritných proteínov sa prejavila už vo včasných fázach infekcie, množstvo infikovaných buniek mutantným vírusom bez VP3 bolo o jeden rád nižšie ako v u vírusu divokého typu a v prípade mutantu bez VP2 až o dva rády nižšie ako wild-type vírusu (Mannová et al., 2002).

Úlohu VP2 a VP3 u SV40 vírusu študovali Daniels et al., ktorí vytvorili mutantné genómy bez VP2, VP3, alebo bez VP2 aj VP3. Zistili, že partikule bez VP2, VP3 a bez VP2 aj VP3 neboli infekčné. Vírusové partikule bez VP2 mali zníženú adsorpčnú afinitu k povrchu buniek v porovnaní s viriónmi divokého typu, naopak pri odstránení VP3 sa na bunky viazalo dvojnásobné množstvo vírusu. Virióny so zvýšenou väzbou na bunky (ktoré postrádali VP3) obsahovali vyšší pomer VP2 a VP1 v porovnaní s vírusom divokého typu. Všetky tieto výsledky ukazujú, že VP2 je zapojený do väzby vírusu na bunky a jeho absencia výrazne znižuje viazanie vírusu na bunky, naopak, zvýšenie množstva VP2 zvyšuje viazanie vírusu (Daniels et al., 2006a).

2.3.6.4. DOPRAVA VIRIÓNOV K JADRU

Eukaryotické bunky majú komplexnú sieť membránových bariér a prepájacích transportných systémov, ktoré musia vírusy prekonať, aby doručili svoj genóm do jadra na expresiu a replikáciu. Preto využívajú rôzne mechanizmy vstupov do hostiteľskej bunky založené na tom, či je daný vírus obalený alebo nie. Neobalené

vírusy sa viažu na povrch bunky, sú internalizované endocytózou a transportované k organelám kde sa spúšťa rozvoľňovanie kapsíd a uvoľnenie genómu (Daniels et al., 2006a).

Úlohu mikrofilament a mikrotubúl v cytoplazmatickom transporte BKV študovali Eash & Atwood. Zistili, že zrušenie integrity siete mikrofilament narušením aktínovej polymerizácie latrunkulínom A neinhibovalo BKV infekciu vo Vero bunkách, ale stabilizácia aktínových vlákien jasplakinolidom viedla k redukcii infekcie BKV. Ukázali teda, že porucha zostavovania a rozkladania mikrofilament interferuje s infekciou BKV a dopravou k jadrú. Naopak použitie nokodazolu (spôsobuje rozklad tubulínových polymérov) znižovalo úroveň BKV infekcie, tento inhibičný efekt bol ale reverzibilný, odmytie inhibítora obnovilo infektivitu. Naopak stabilizácia tubulínu paklitaxelom nemala žiaden vplyv na infektivitu BKV. Ich experimenty ukázali, že BKV je závislý na neporušenej sieti mikrotubúl počas infekcie (Eash & Atwood 2005). K podobný výsledkom dospeli Moriyama & Sorokin pokusmi na bunkách primárnych línií ľudských proximálnych epiteliálnych tubulov (RPTEC). Inkubácia RPTEC buniek s nocodazolom a colcemidom (zbavujú bunku mikrotubúl) inhibovala BKV infekciu, ale na rozdiel od Vero buniek, u RPTEC buniek hraje dynamika mikrotubúl dôležitú úlohu v transporte BK vírusu, čo bolo zistené použitím paclitaxelu. Naopak inhibícia dyneínu ako motorového proteínu mikrotubúl pomocou EHNA (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine hydrochloride) s infekciou BKV neinterferovala. Autori navyše ukázali, že BKV kolokalizuje s markerom endoplazmatického retikula (ER), pravdepodobne ho dosahuje 6-8 hodín po infekcii. Je možné, že na tejto ceste obchádza Golgiho aparát, alebo cez neho prechádza v inom čase ako študovali, lebo kolokalizácia s Golgiho aparátom bola veľmi slabá (Moriyama & Sorokin 2008).

Po internalizácii BK vírusu cez caveoly, endozómy s BKV partikulami navzájom fúzujú a vytvárajú clastre vezikúl nazývané caveozómy (Drachenberg et al., 2003). Bolo ukázané, že použitie brefeldínu A (inhibítor pohybu proteínu z ER do Golgiho aparátu) interferuje s BKV infekciou v RPTEC bunkách, teda BK vírus je transportovaný do ER pred dosiahnutím jadra, membrána ER dokonca obsahuje receptory pre BK vírus (Low et al., 2006).

Otázkou zostáva, ako sú kapsidy rozvoľnené. Veľmi malé množstvo intaktných viriónov v porovnaní s množstvom perinukleárných vírusových agregátov naznačuje,

že k rozvoľneniu dochádza pred vstupom do jadra (Drachenberg et al., 2003). ER proteín disulfid izomeráza spôsobuje konformačnú zmenu vo VP1, ktorá vedie k rozvoľneniu alebo vírusu cez endozomálne membrány (Magnuson et al. 2005, Schelhaas et al., 2007). Okrem toho, proteíny zahrnuté v ERAD dráhe (ER asociovaná proteín degradačná dráha), ktoré normálne odstraňujú nezbalené proteíny z ER pre proteazomálnu degradáciu, sú zahrnuté v ceste polyomavírusu do jadra (Lilley et al., 2006, Schelhaas et al., 2007).

Pohyb BK vírusu v bunke je vysoko regulovaný, so striktnými časovými a priestorovými požiadavkami, zahŕňajúce krok s nízkym pH a účasťou endoplazmatického retikula. Závislosť na pH pre BKV infekciu v RPTEC bola študovaná použitím NH_4Cl , ktorý selektívne vstupuje do bunkových kompartmentov s nízkym pH a zvyšuje ho, teda ruší acidifikáciu týchto štruktúr. Použitie NH_4Cl výrazne znižovalo infekciu BKV. Okrem toho použitie brefeldínu A, ktorý inhibuje tvorbu COPI vezikúl zahrnutých v retrográdnom transporte z Golgiho aparátu do ER, tiež výrazne znižovalo percento infikovaných buniek. Jiang et al. chceli zistiť, či hrajú hostiteľské faktory úlohu v uniknutí z ER. Testovali, či sú proteíny rodiny Derlinov-transmembránových proteínov dôležitých pre cielenie nezbalených proteínov z ER do cytoplazmy pre proteazomálnu degradáciu (ERAD dráha) zahrnuté v tomto procese, podobne ako je tomu u myšieho polyomavírusu (Lilley et al., 2006). V bunkách, ktoré expimovali mutantný Derlin-1, bola inhibovaná infekcia BKV, teda Derlin- 1 hraje úlohu v transporte BKV von z ER (Jiang et al., 2009).

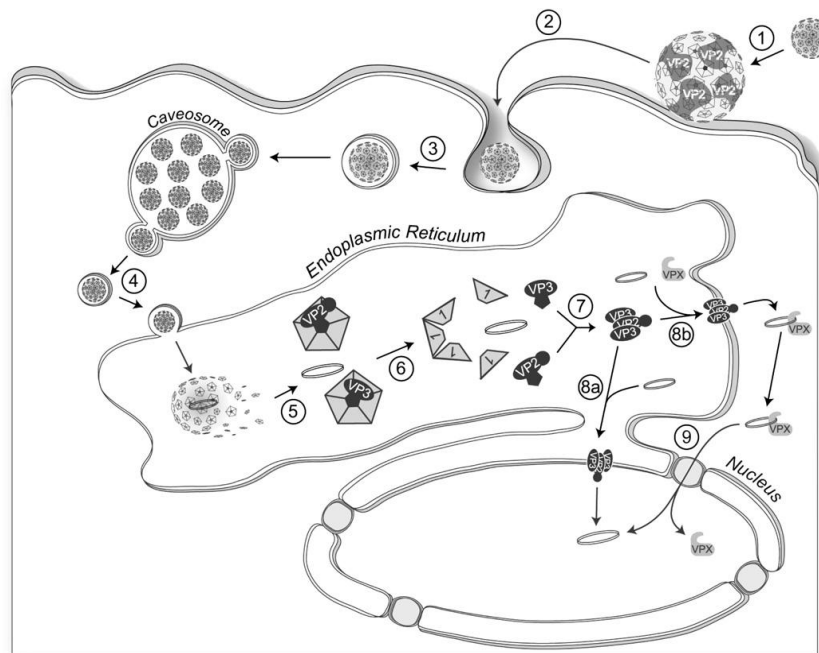
2.3.6.5. ÚLOHA MINORITNÝCH PROTEÍNOV V TRAFIKINGU A VSTUPE GENÓMU DO JADRA

Potenciálnu úlohu VP2 a VP3 v doručení genómu SV40 do jadra cez membránu ER (už po rozvoľnení vírusu v ER) skúmali Daniels so spolupracovníkmi, využitím *in vitro* translačného systému, ktorý umožňuje skúmať VP2 a VP3 oligomerizácie, ktoré by charakterizovali integráciu do membrány ER. Ich výsledky ukázali, že VP2 a VP3 existujú ako solubilné proteíny viazané na VP1, ale v absencii VP1 sa obe efektívne integrujú do membrány ER čo naznačuje, že by mohli mať funkciu v translokácii DNA cez membránu ER. Purifikácia VP2 a VP3 proteínov vírusu SV40 z baktérií vyžaduje detergent pre izoláciu, zatiaľčo malý t antigén a VP1 sú izolované aj bez detergentu,

čo podporuje hypotézu, že VP2 a VP3 sú schopné integrovať a viazať sa na membrány. Ukázali, že VP2 a VP3 sú integrované v membráne v konformácii, ktorá bola vysoko senzitívna k proteolýze (Daniels et al. 2006a).

VP3 je posttranslačne integrovaný do membrány ER pomocou niekoľkých transmembránových segmentov. Táto konformácia je charakteristická pre proteíny tvoriace kanály alebo vioporíny, ale konformácia VP3 v monomérnom stave nie je postačujúca pre tvorbu kanálu, ktorý by mohol pomôcť translokácii genómu cez membránu ER. Autori skúmali schopnosť VP3 tvoriť oligoméry, túto schopnosť následne aj potvrdili. Je nutné podotknúť, že prítomnosť VP1 takmer úplne ruší integráciu VP2 aj VP3 do membrány ER.

Daniels et al. navrhujú, že pravdepodobne existujú dve cesty DNA z lúmenu ER do jadra. Prvá zahrňuje translokáciu do cytoplazmy nasledovanú klasickým transportom cez jadrový pór, druhá zahrňuje transport priamo z lúmenu ER do jadra cez vnútornú jadrovú membránu (Daniels et al., 2006a).



Obr. 2.7: Model vstupu SV40 do ER a penetrácie SV40 vírusu do ER membrány: 1. väzba vírusu na bunku v kooperácii VP1 a VP2, 2. prienik membránou a vstup v caveolách, 3. endocytóza vírusu a transport v caveolách do caveozómu, 4. pučanie partikulí z caveozómu a cestovanie k ER, 5. rozvoľnenie kapsidy v ER za pomoci ER- prítomných molekulárnych chaperónov a oslobodenie genómu a VP1 pentamérov asociovaných s VP2 a VP3, 6. disociácia VP1 pentamérov a tým uvoľnenie VP2 a VP3, 7. oligomerizácia VP2 a VP3 a inzertovanie do ER membrány a formovanie komplexu, ktorý pomáha transportu genómu do jadra cez ER membránu, 8a. integrácia VP2 a VP3 komplexu do príľahlej ER membrány pre priamy transport genómu do jadra, 8.b integrácia VP2 a VP3 komplexu do membrány ER a transport genómu do cytoplazmy, 9. jeden zo štruktúrnych proteínov VPX uplatní svoj NLS a DNA- väzbovú doménu a transportuje genóm do jadra (prevzaté z Daniels et al., 2006a).

2.3.6.6. VČASNÁ TRANSKRIPCIA

Vírusová DNA je doručená do jadra-miesta replikácie a skladania viriónov doteraz neznámym spôsobom a dochádza k transkripcii včasných génov pre veľký a malý T antigén. Tieto produkty včasnej transkripcie sú podrobnejšie opísané v kapitole 2.3.4.1 a 2.3.4.2. Transkripciu zabezpečuje hostiteľská RNA polymeráza II. Promótorová oblasť u BK vírusu nie je úplne charakterizovaná, ale u archetypálneho kmeňa dochádza v tejto oblasti k prestavbám, čo vedie k vysokému stupňu variability v transkripčnej aktivite medzi jednotlivými kmeňmi. Boli identifikované väzbové miesta pre transkripčné faktory NF-1, Sp-1, AP1, NFκB v tejto oblasti, ale ich úloha nebola celkom objasnená. Podrobnejšie je táto oblasť opísaná v kapitole 2.3.3 (prebraté z review Eash et al., 2006).

2.3.6.7. POZDNÁ FÁZA INFEKcie

Po transkripcii dochádza k prepnutiu na DNA replikáciu, toto prepnutie je iniciované veľkým T antigénom, ktorý viaže origin replikácie a indukuje dvojsmernú DNA replikáciu. Veľký T antigén je zároveň silným aktivátorom pozdného vírusového promótoru, čo vedie po zahájení replikácie k ďalšiemu prepnutiu pre expresiu pozdných génov vírusu- VP1, VP2, VP3, ako aj regulačného proteínu- agnoproteínu, podrobnejšie opísané v kapitolách 2.3.5.1-2.3.5.3 (prebraté z review Eash et al., 2006).

V pozdnej fáze životného cyklu vírusu dochádza tiež k morfogénéze viriónov a ich uvoľneniu z hostiteľskej bunky. Zostavovanie polyomavírusov začína formovaním kapsomér a translokáciou komplexov VP1 s VP2 alebo VP3 do jadra. Interakcia VP2 alebo VP3 s pentamérom VP1 je sprostredkovaná ich C-koncom a všetky štruktúrne proteíny obsahujú jadrový lokalizačný signál (Fields, 2007). Morfogénéza viriónov nie je celkom objasnený proces. Podobne ako u iných polyomavírusoch, pri expresii v eukaryotickom expresnom systéme sú schopné virus- like particles BK vírusu skladať sa iba z VP1 proteínu bez pomoci ďalších bunkových proteínov (Liet al., 2003). Yuen & Consigli izolovali centrifugáciou v CsCl gradiente populáciu viriónov SV40 vírusu pozostávajúcu zo stabilných a nestabilných partikulí, stabilné virióny s hodnotou sedimentácie 240S a novo generované virióny s hodnotou 160- 170S. Tieto výsledky naznačujú, že polyomavírusové kapsidy sú generované z nestabilných

nematurovaných viriónov, že najprv dochádza k organizácii kapsidových proteínov okolo SV40 chromatinu. Postupné pridávanie kapsomér k DNA- core vedie k formovaniu rôznych štádií viriónov počas infekcie v permissívnych bunkách. Dokonca predchodzie výsledky toho istého laboratória demonštrovali, že stabilné virióny môžu byť disociované na DNA- protein core a kapsoméry a že tieto disociačné produkty môžu byť *in vitro* znova zostavované do viriónov (Yuen & Consigli 1983).

Infekčný cyklus končí smrťou infikovanej bunky. Niektoré štúdie naznačujú, že vírus opúšťa aktívne ešte živé bunky (Fields, 2007). Daniels et al. ale predpokladajú, že VP1 pentaméry viažu novosyntetizované VP2 a VP3, čím bránia ich inzercii do bunkových membrán, tým VP1 funguje ako časovač, ktorý zabezpečí, že až po obsadení všetkých pentamérov sa VP2 a VP3 môžu inzerovať do hostiteľských membrán a spôsobiť tým bunkovú smrť a uvoľnenie viriónov (Daniels et al, 2006b).

2.3.6.8. ÚLOHA MINORITNÝCH PROTEÍNOV MYŠIEHO A OPIČIEHO

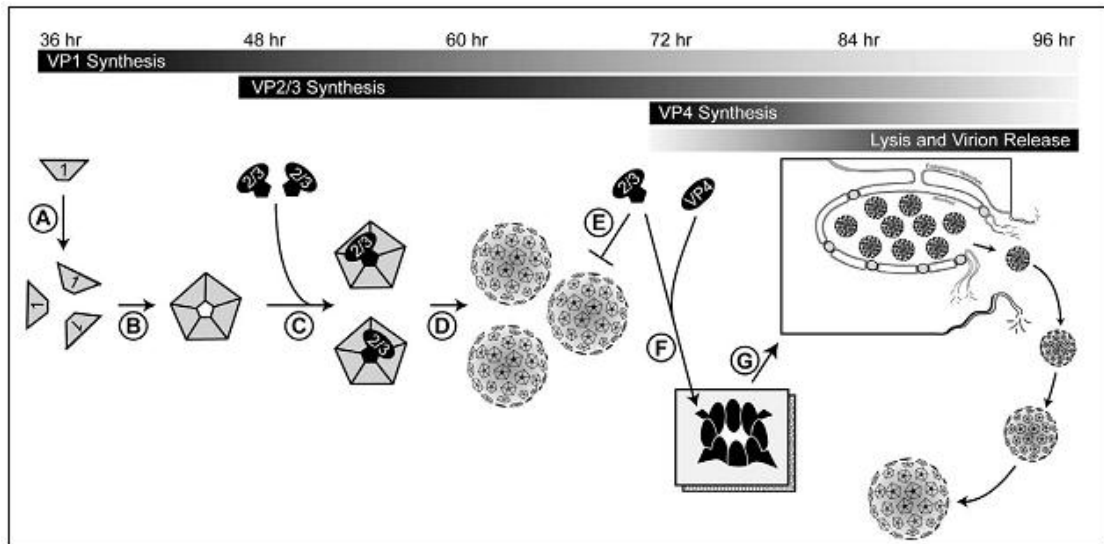
POLYOMAVÍRUSU V SMRTI HOSTITEĽSKEJ BUNKY

Neobalené vírusy sú zostavované v jadre, preto musí vírusové potomstvo počas procesu uvoľňovania z bunky prejsť cez membrány jadra/ER a plazmatickú membránu, bez obaľovania týmito membránami. Neobalené vírusy predchádzajú týmto problémom navodením nekrózy. Tá je charakterizovaná zväčšovaním buniek, fragmentáciou drsného ER a permeabilizáciou plazmatickej membrány, čo vyúsťuje do uvoľnenia cytosolických zložiek a lýzy bunky. Avšak je málo známe to, ktoré bunkové membrány sú permeabilizované a aké vírusové komponenty umožňujú proces uvoľňovania vírusového potomstva (zhrnuté v Daniels et al., 2006b).

V čase produkcie štruktúrnych proteínov je možné pozorovať na bunkách cytopatický efekt. An et al. pri štúdiu mechanizmov cytotoxického efektu v infekcii myším polyomavírusom ukázali, že infikované bunky vykazovali zvýšenie apoptózy o 5% a zvýšenie nekrózy až o 46% v porovnaní s neinfikovanými bunkami. Elektrónová mikroskopia odhalila 10% buniek s morfológickými znakmi apoptotických buniek a až 40% buniek s nekrotickými znakmi. Infikované bunky vykazovali hlavne nekrózu, aj keď niekoľko buniek vykazovalo apoptózu v pozdnej fáze infekcie (An et al., 2000).

Huerfano et al. ukázali, že transientná expresia minoritných štruktúrnych proteínov v permissívnych bunkách indukuje smrť buniek. Vytvorili fúzne varianty VP2 a VP3 proteínov s EGFP. Varianty VP2 a VP3 s EGFP na ich C-konci boli podobne ako samotné nefúzované VP2 a VP3 vysoko toxické, zatiaľčo opačné varianty s EGFP na N- konci vykazovali oveľa nižšiu toxicitu. Okrem toho skrátенý VP3 proteín- s deléciou hydrofóbnej domény 2 fúzovaný s EGFP nespôsovoval smrť buniek. Úroveň cytotoxicity VP2 a VP3 variant korelovala s ich schopnosťou indukovať apoptózu, vysoko toxické varianty VP2 a VP3 sa ukázali byť silnými induktormi apoptózy. Použitím pankaspázového inhibítora ukázali, že pri individuálnej expresii minoritné štruktúrne proteíny indukujú programovanú smrť bunky, ktorá je závislá na kaspázovej aktivite. Autori pozorovali, že indukcia apoptózy súvisí so schopnosťou minoritných proteínov interagovať s vnútrobunkovými membránami a že cytotoxicita minoritných proteínov je počas infekčného cyklu potlačená vytvorením komplexu s VP1 (Huerfano et al., 2010).

Daniels et al. ukázali, že SV40 vírus dokonca exprimuje ďalší pozdný proteín VP4, exprimovaný cca 12- 24 hodín po expresii pozdných štruktúrnych proteínov, ktorý je esenciálny pre uvoľnenie vírusového potomstva. Syntéza VP4 je podobne ako VP3 iniciovaná z vnútorného AUG kodónu, avšak objavuje sa až v čase, ktorý sa zhoduje s lýzou bunky a nie je inkorporovaný do viriónov. Mutácia vo VP4 iniciačnom kodóne SV40 údajne opožďuje lýzu až o dva dni a redukuje uvoľňovanie infekčných partikulí. Okrem toho spoločná expresia VP3 a VP4, ale nie ich individuálna expresia, spôsobuje lýzu u baktérií, čo naznačuje že ich lýtické vlastnosti sú výsledkom oligomerizácie VP4 a VP3. Teda SV40 exprimuje VP4 pre iniciáciu smrti hostiteľskej bunky a účinné uvoľnenie vírusového potomstva (Daniels et al., 2007).



Obr.2.8: Navrhovaný model znázorňujúci reguláciu lýtického cyklu SV40: prvý syntetizovaný je VP1, ktorý tvorí pentaméry, do ktorých sú zabudované VP2 a VP3 (A-C) a vznikajú nové virióny (D). Stechiometria piatich VP1 na 1 VP2/VP3 bráni inkorporácii ďalších molekúl VP2 a VP3 do partikulí (E). Syntetizovaný VP4 oligomerizuje s VP3 príp. s VP2 a formujú pór na hostiteľskej membráne (F), ktorý potom iniciuje lýzu bunky a uvoľnenie potomstva (G) (prebraté z Daniels et al., 2007).

Okrem toho VP3 proteín je schopný indukovať bunkovú smrť aj iným spôsobom. VP3 proteín SV40 vírusu stimuluje aktivitu PARP, 49 C- koncových aminokyselín VP3 je potrebných pre väzbu a stimuláciu PARP enzymatickej aktivity (Gordon-Shaag et al., 2003). PARP je jadrový enzým vysoko konzervovaný a konštitutívne exprimovaný vo väčšine eukaryotických buniek. Modifikuje proteíny katalyzáciou pripájania značne vetvených polymérov poly(ADP-ribózy) s využitím NAD^+ ako substrátu. Katalytická aktivita PARP je stimulovaná väzbou na DNA zlomy. PARP má na svedomí mnoho bunkových procesov ako opravu DNA poškodenia, rekombinácie, predlžovanie telomér a chromozómovú stabilitu, apoptózu atď. Pri poškodení DNA PARP rýchlo aktivuje opravy DNA rekrutovaním base- excision repair komplexu (zhrnuté v Oliver et al., 1999).

Experimenty ukázali, že stimulácia PARP aktivity proteínom VP3 vedie u infikovaných buniek k nekróze charakterizovanej stratou membránovej integrity a tým uľahčeniu uvoľňovania viriónov z bunky. PARP participuje v pozdnej fáze vírusového cyklu až po expresii pozdných génov, pretože táto expresia nie je ovplyvnená PARP inhibítorom. (Gordon-Shaag et al., 2003).

2.4. BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION (BiFC)

Proteín- proteínové interakcie hrajú dôležitú úlohu v mnohých biologických procesoch v bunkách. Priama vizualizácia týchto interakcií pomáha pochopeniu bunkových funkcií *in vivo*. Pre vizualizáciu proteínových interakcií bolo vyvinutých niekoľko metód, zahrňujúce napr. „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET), „protein fragment complementation“ alebo „bimolecular fluorescence complementation“ (BiFC). Z pomedzi týchto metód je BiFC široko využívaná vďaka svojej jednoduchosti a vysokej citlivosti (Kerppola 2008).

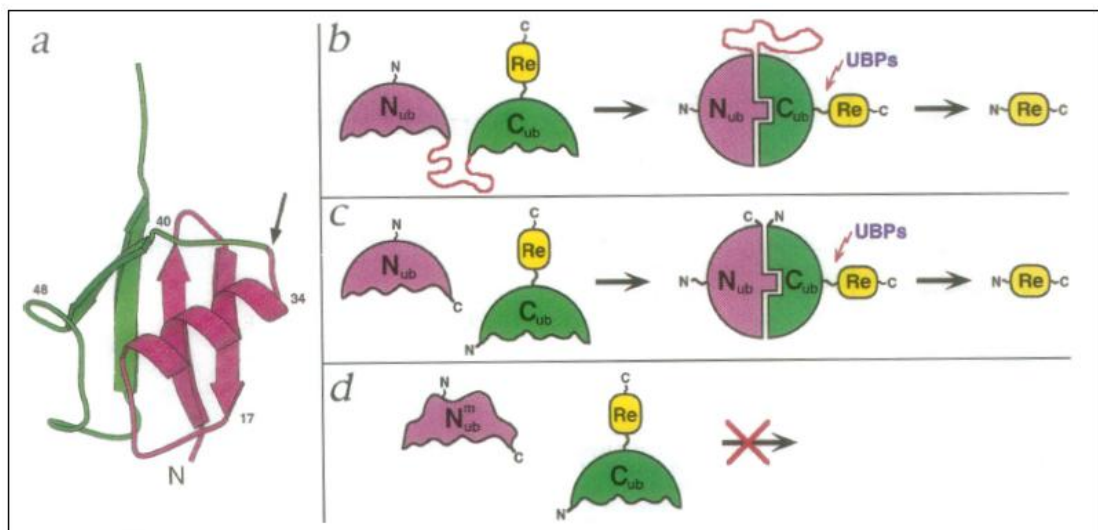
Je relatívne jednoduchou technikou založenou na rekonštitúcii fluorescenčného proteínu. Interagujúci proteínový komplex môže byť vizualizovaný priamo v živých bunkách. Pokiaľ sú k jednému z interagujúcich proteínov pripojené sekvencie zhruba jednej polovice žltého fluorescenčného proteínu (YFP) a k druhému interagujúcemu proteínu druhá polovica YFP sekvencie, pri interakcii týchto proteínov dochádza ku opätovnej rekonštitúcii fluorescenčného proteínu, a teda k obnoveniu fluorescenčného signálu. Navyše dochádza k vizualizácii subcelulárnej lokalizácie interagujúcich proteínov (Pattanaik et al., 2011).

Proteínová komplementácia je študovaná už takmer pol storočia. Ukázalo sa, že fragmenty mnohých proteínov navzájom asociujú a vytvárajú funkčné komplexy. Komplementáciu medzi enzýmovými fragmentami prvýkrát pozoroval Richards ešte v roku 1957, použitím subtilizínom štiepenej hovädzej pankreatickej ribonukleázy. Subtilizínom ju rozdelil na N- terminálny peptid (RNase-S-Pep) a zvyšok molekuly (RNase-S-Prot). Ošetrením trichloracetátovej kyseliny bolo možné tieto fragmenty od seba úplne oddeliť, pričom vykazovali iba menej ako 5% zvyškovej enzymatickej aktivity. Následne však po zmiešaní fragmentov bola plne obnovená enzymatická aktivita (Richards 1958).

Genetická komplementácia medzi rozdielnymi alelami rovnakého génu bola charakterizovaná použitím β -galaktozidázových mutantov, ktoré rástli na laktóze pri koexpresii v tých istých bunkách (Ullman et al., 1965, 1967, 1968).

Mimoriadny význam štúdiu proteínových interakcií dodala demonštrácia, že asociácia medzi proteínovými fragmentami môže byť uľahčená fúziou fragmentov

so špecifickým interagujúcim partnerom, ako prvýkrát ukázali Johnsson & Varshavsky u kvasiniek. Fúzne proteíny obsahujúce časti ubiquitínu boli po interakcii *in vivo* rýchlo štiepené ubiquitin- špecifickými proteázami, ktoré rozpoznávajú zbalenú konformáciu ubiquitínu. Keď bol C-terminálny fragment ubiquitínu (C_{ub}) exprimovaný ako fúzny proteín k reportérovému proteínu, tak fúzny proteín bol štiepený iba keď N- terminálny fragment ubiquitínu (N_{ub}) bol tiež exprimovaný v tých istých bunkách. Rekonštitúcia natívneho ubiquitínu z týchto fragmentov nebola pozorovaná s mutáciou upraveným N_{ub} . Avšak ak C_{ub} a upravený N_{ub} boli každý pripojený k polypeptidom interagujúcim *in vivo*, štiepenie fúzneho proteínu obsahujúceho C_{ub} bolo obnovené. Táto metóda, ktorú nazvali USPS (ubiquitin-based split- protein sensor), prakticky umožnila monitorovať proteín- proteínové interakcie v čase a v ich prirodzenom mieste v živých bunkách (Johnsson & Varshavsky 1994).



Obr. 2.9: Štiepenie ubikvitínu (Ub) ako senzoru príbuznosti *in vivo*. a. diagram štruktúry ubikvitínu s jeho dvomi subdoménami znázorenými fialovou a zelenou (ako aj v b-d). Šípka znázorňuje miesto inzercie 68 zvyškov alebo štiepenia medzi subdoménami. Číslami sú znázornené niektoré zvyšky, Ile-13 je miesto mutácie, je v druhom reťazci β -listu, kde interaguje s hydrofóbnou stranou α -helixu. b. novoformovaný Ub s inzerciou (červenou linkou) medzi N- terminálnou (fialovým) a C- terminálnou časťou (zeleným) viazaný k reportérovému proteínu (Re, žltou). Inzercia neinterferovala so skladaním Ub, čo bolo potrebné pre štiepenie fúzneho proteínu Ub-špecifickými proteázami (UBPs) *in vivo* a došlo k odštiepeniu voľného reportéru. c. ak boli N_{ub} a C_{ub} koexprimované ako oddelené fragmenty, s C_{ub} stále viazaným k reportéru, bola aj tak zas pozorovaná rekonštrukcia Ub. d. rekonštrukcia Ub z oddelených fragmentov ale nebola detekovaná s mutovaným N_{ub} fragmentom, čo značí, že N_{ub}^m zámena na pozícii 13 vadí, pravdepodobne spôsobuje konformačnú destabilizáciu v porovnaní s divokým typom N_{ub} , čo indukuje pozmenený tvar N_{ub}^m subdomény (prevzaté a upravené z Johnsson & Varshavsky 1994).

Následne bola ukázaná komplementácia fragmentov β - galaktozidázy v neporušených cicavčích bunkách (Rossi et al., 1997) a komplementácia fragmentov dihydrofolát reduktázy (Pelletier et al., 1998).

Od začiatkov klonovania sa zelený fluorescenčný proteín z medúzy *Aequorea victoria* stal potenciálnym nástrojom v biológii. GFP bol manipulovaný a modifikovaný a v súčasnosti je k dispozícii set derivátov fluorescenčných proteínov vykazujúcich rozličné spektrálne vlastnosti a stabilitu. GFP proteín je schopný tolerovať inzerciu peptidu bez zrušenia fluorescenčnej charakteristiky (Abedi et al, 1998, Baird et al, 1999). To viedlo k poznaniu, že rozdelené GFP fragmenty môžu byť rekonštituované a bola detekovaná prvá komplementácia varianty zeleného fluorescenčného proteínu (GFP) u *E. coli* použitím fúzie k umelým interagujúcim peptidom (Ghosh et al., 2000).

Vizualizácia proteínových interakcií *in vivo* definitívne získala na hodnote prácou Hu et al. v cicavčích bunkách. Ukázali komplementáciu fragmentov žltého fluorescenčného proteínu (YFP) v cicavčích bunkách pri zisťovaní interakcie medzi bZIP a Rel rodinou transkripčných faktorov (Hu et al., 2002).

Dnes sa pre BiFC používa množstvo derivátov GFP- žltý fluorescenčný proteín- YFP, Venus a Cerulan (Shyu et al, 2006), alebo ďalšie fluorescenčné proteíny mRFP (Jach et al, 2006), mCherry (Fan et al., 2008) a Dronpa (Lee et al.,2010).

Dokonca bola táto technológia použitá u živočíšnych modelových organizmov, zo stavovcov u *Xenopus laevis* pre vizualizáciu jadrovej translokácie Smad2/Smad4 komplexu v embryonálnych explantátoch (Saka et al., 2007). Zo zástupcov bezstavovcov bola použitá na odhalenie interakcií medzi polypeptidmi leucínového zipsu u *Caenorabditis elegans* (Zhang et al., 2004) alebo medzi transkripčnými faktormi Hox a Pax u *Drosophila melanogaster*, kde sa podarilo detekovať interakciu ANTP (Antennapedia proteínu) s EY (Eyeless proteínu) *in vivo* (Plaza et al., 2008).

Metóda BiFC sa využíva aj u vírusov, nedávno bola použitá pre zisťovanie proteínových interakcií v bunkách infikovaných herpes vírusom (Hernandez & Sandri-Goldin 2011).

BiFC je hodnotná z viacerých dôvodov. Umožňuje priamu vizualizáciu proteínových interakcií a nie je závislá na detekcii ďalších sekundárnych efektoch. Interakcie môžu byť vizualizované v živých bunkách, čím dochádza k eliminácii potenciálnych

artefaktov asociovaných s lýzou alebo fixáciou buniek. Proteíny sú exprimované v ich normálnom bunkovom prostredí, ideálne na úrovni porovnateľnej s ich endogénnymi variantami. Preto odrážajú vlastnosti natívnych proteínov. Metóda umožňuje simultánnu vizualizáciu rozmanitých proteínových komplexov v tej istej bunke a umožňuje tak analýzu kompetície medzi alternatívnymi interagujúcimi partnermi pre formovanie komplexu, ktoré zdieľajú nejaké rovnaké podjednotky. Okrem toho nevyžaduje špecializované zariadenie okrem invertovaného fluorescenčného mikroskopu a priama detekcia fluorescenčného komplexu nevyžaduje žiaden zber dát. BiFC je výkonným nástrojom biológov pre pochopenie proteínových interakcií v živých bunkách (Kerppola 2008).

3. CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE

V nedávnej dobe sa v našom laboratóriu začal študovať vedľa myšieho polyomavírusu aj ľudský BK vírus. Predpokladom pre štúdium jednotlivých krokov replikačného cyklu BKV je dostupnosť protilátok proti jednotlivým vírusovým antigénom. Preto prvým konkrétnym cieľom tejto práce bolo:

1. Pripraviť monoklonálnu protilátku proti hlavnému štruktúrnemu proteínu VP1 BK vírusu pre budúce štúdiá jednotlivých fáz BK vírusovej infekcie

Z nedávnych prác o polyomavírusoch vyplýva, že ich minoritné štruktúrne proteíny VP2 a VP3 by mohli hrať úlohu pri uvoľnení rozvoľneného viriónu alebo jeho časti z endoplazmatického retikula do cytosolu k následnej doprave do bunkového jadra cez jadrové póry. Predpokladá sa, že VP3 alebo VP2 oligomerizujú na membráne ER a vytvoria pór pre transport rozvoľneného viriónu do cytosólu. Oligomerizácia VP2 a/alebo VP3 však doteraz nebola dokázaná. Preto sme sa rozhodli zaviesť BiFC systém pre detekciu interakcií v bunkách, aby sme sa tak pokúsili detekovať oligomerizáciu minoritných proteínov na endozomálnych membránach. Vzhľadom k tomu, že BK vírus zatiaľ v našom laboratóriu nie je dostatočne rozpracovaný, rozhodli sme sa oligomerizáciu testovať na štruktúrnych minoritných proteínoch myšieho polyomavírusu.

Ďalšou úlohou tejto práce bolo:

2. Pripraviť expresné plazmidy pre produkciu minoritného štruktúrneho proteínu VP3 fúzovaného s N- a C- koncovými časťami EYFP pre štúdium oligomerizácie VP3 myšieho polyomavírusu

4. MATERIÁL A METÓDY

4.1. MATERIÁL

4.1.1. PRÍSTROJE

- ❖ Analytické váhy Pioneer (Schoeller)
- ❖ Aparatúra pre gélovú elektroforézu (GeneLine Power Supply, Beckman)
- ❖ Aparatúra pre SDS-PAGE 260 (Hofer)
- ❖ Aparatúra pre Western Blot TE22 (Amersham Biosciences)
- ❖ Centrifúga GS-15 R centrifuge, rotor S4180 (Beckman)
- ❖ Centrifúga 3K30, rotor 12171, 12154-H a 18776-H (Sigma)
- ❖ Centrifúga s výkyvným rotorom MSE (MSE)
- ❖ Elektrónový mikroskop JEOL JEM 1200 EX
- ❖ Elektroporátor Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad)
- ❖ Elektroporátor Nucleofector II (Amara Biosystems)
- ❖ Fluorescenčný invertovaný mikroskop IX71 (Olympus)
- ❖ Fluorescenčný mikroskop BX-60 (Olympus)
- ❖ Invertovaný mikroskop (Carl Zeiss-Jena)
- ❖ Invertovaný mikroskop CK40 (Olympus)
- ❖ Konfokálny mikroskop TCS SP2 Laser Scanning Confocal Microscope (Leica)
- ❖ Kultivačná trepačka Orbital Shaker (Forma Scientific)
- ❖ Kultivačná trepačka Orbi-Safe TS (Gallenkamp)
- ❖ Kývačka Labnet, Duomax 1030 (Heidolph)
- ❖ Kývačka Shaker 30 (Labnet)
- ❖ Laminárny box (Forma Scientific)
- ❖ Magnetická miešačka Big Squid (Ika)
- ❖ Magnetická miešačka B212 (Bibby)
- ❖ Mikrocentrifúga MiniSpin plus, rotor IL 016 (Eppendorf)
- ❖ Peristaltická pumpa (F.A.Hughes)
- ❖ pH meter S20 SevenEasy (Mettler Toledo)
- ❖ Prietokový cytometer LSR II (BD Biosciences)
- ❖ Refraktometer ABBE (Carl Zeiss Jena)

- ❖ Sonikátor Soniprep 150 (Schoeller)
- ❖ Spektrofotometer Heλios β (Thermo Electron)
- ❖ Spektrofotometr ND – 1000 (NanoDrop)
- ❖ Termoblok CH-100 (Biosan)
- ❖ Termocykler Mastercycler eppgradient S (Eppendorf)
- ❖ Termostat Termobox LBT 165
- ❖ Termostat CO₂ (Forma Scientific)
- ❖ Termostat TCH 100 (laboratorní přístroje Praha)
- ❖ Ultracentrifúga Optima TM L-90K, rotor SW 41 a SW 28 (Beckman)
- ❖ UV transluminátor (BioLum)
- ❖ Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
- ❖ Vodný kúpeľ SUB (Grant)

4.1.2. CHEMIKÁLIE

- ❖ Amresco: agaróza na elektroforézu
- ❖ BioWhittaker, Lonza: trypsin 10x s verzénom
- ❖ Fermentas: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- ❖ Fluka: Tween 20
- ❖ Gibco: fetálne teľacie sérum FBS, HAT doplnok 50x, HEPES: 10 mM H3375
- ❖ Imuna Pharm: kvasničný autolyzát, peptón pre bakteriológiu, živný agar
- ❖ Lachner/Lachema: brómfenolová modrá, 99% CH₃COOH, DMSO (dimetylsulfoxid), 96% etanol, 35% HCl, 70% HClO₄, chloroform, izoamylalkohol, izopropanol, KCl, KH₂PO₄, MgCl₂, MgSO₄, Na₂HPO₄·12 H₂O, metanol, NaCl, sacharóza
- ❖ Merck: CH₃COONa
- ❖ Penta: CH₃COOK, glycerol, NaOH,
- ❖ Serva: akrylamid, bisakrylamid (N,N'-metylén bisakrylamid), Coomassie brilliant Blue G 250, CsCl, EDTA-disodium (etylendiamin-tetraacetat disodny), etídum bromid, glukóza, glycín, H₃BO₃, persíran amónny, tris(hydroxymetyl)aminometán, RNáza A
- ❖ Sevac: verzén
- ❖ Sigma: aprotinín, BSA (bovinný sérový albumín), CaCl₂, DAPI (4',6-diamidino-

2- fenyлиндol dihydrochlorid), upravený fenol [destilovaný, pufrovaný 1 M tris-HCl (pH = 8) s pridaním 0,1% 8-hydroxycholínu – upravené výrobcom], H₂O₂ (30%),L-glutamín, p-kumarová kyselina, luminol, 2-merkaptoetanol, NP-40, paraformaldehyd, PMSF (fenylmetánsulfonylfluorid), pyruvát sodný 100 mM, saponín, SDS (dodecyl sulfát sodný), TEMED (N,N,N',N'-tetrametyletyléndiamín), Triton X-100, Tween 20, urea, želatina z prasačej kože

4.1.3. ZLOŽENIE ROZTOKOV

- ❖ 30% akrylamid/bisakrylamid: 29% akrylamid, 1% bisakrylamid, rozpustené v dd H₂O
- ❖ B pufo: 10 mM tris-HCl pH 7,4 , 150 mM NaCl, 10 μM CaCl₂
- ❖ blotovací pufo pre Western Blot: 25 mM tris, 192 mM glycín, 20% metanol, pH 8,3
- ❖ chloroform s izoamylalkoholom v pomere 24:1
- ❖ farbiaci roztok pre polyakrylamidové gély: 3,5% CH₃COOH , 0,5% Coomassie Brilliant Blue G 250
- ❖ fixačný roztok pre polyakrylamidové gély: 50% metanol, 5% CH₃COOH
- ❖ Laemmliho pufo 5x: 50% glycerol, 25% merkaptoetanol, 50 mM tris-HCl pH 6,8 , 5% SDS, 0,005% brómfenolová modrá
- ❖ luminol: roztok A: 17 ml dH₂O, 2 ml tris-HCl pH 8,5, 200 μl luminolu v DMSO, 88 μl kyseliny p-kumarovej v DMSO, roztok B: 17 ml dH₂O, 2 ml tris-HCl pH 8,5, 20 μl H₂O₂, roztoky zmiešané tesne pred vyvolávaním membrány
- ❖ PBS (phosphate buffered saline): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ , 6,5 mM KH₂PO₄
- ❖ pufo pre SDS-PAGE (10x): 25 mM tris, 192 mM glycín, 1% SDS v dd H₂O, pH upravené HCl na 8,3
- ❖ RIPA pufo: 50 mM tris-HCl (pH = 7,4), 1 mM EDTA-NaOH (pH = 8,0), 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % deoxycholát sodný, 0,1 % SDS
- ❖ roztok ethidium bromidu: 1 mg/ml v destilovanej vode
- ❖ roztoky pre izoláciu DNA: roztok I: 50 mM glukóza, 25 mM Tris- HCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8), roztok II: 1% SDS, 0,2 M NaOH, roztok III (100ml) : 60 % 5 M

KAc, 11,5 % kyselina octová, 28,5 % dH₂O

- ❖ roztok RNázy (Ribonuclease A): 10 mg/ml rozpustené v sterilnom TE pufre
- ❖ TBE (1 liter 5x koncentrovaného roztoku): 54 g Tris- HCl, 27,5 g kyselina boritá, 20 ml 0,5M EDTA (pH=8)
- ❖ TE pufo: 10 mM Tris- HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)
- ❖ trypsín: 0,25% v PBS
- ❖ verzén: 0,02% v PBS

4.1.4. ANTIBIOTIKÁ

- ❖ ampicilín (Biotika): používaný v konečnej koncentrácii 100 µg/ml
- ❖ geneticín (Sigma): G 418 50 mg/ml, používaný v konečnej koncentrácii 300 µg/ml
- ❖ kanamycín (Sigma): používaný v konečnej koncentrácii 50 µg/ml
- ❖ zmes antibiotík pre tkanivové kultúry (Gibco): 100x koncentrovaný roztok obsahujúci 10000 jednotiek ampicilínu, 10 mg streptomycínu, 25 mg amfotericínu B na 1 ml

4.1.5. KULTIVAČNÉ MÉDIA

4.1.5.1. MÉDIA PRE TKANIVOVÉ KULTÚRY

- ❖ HAT médium pre hybridómy: RPMI- 1640 (Sigma), 10% FBS, 1% 2 mM glutamín, 1% pyruvát sodný, 1% antibiotiká, 1% HEPES, 2% HAT suplement, 0,2% prefiltrovaný merkptoethanol
- ❖ médium pre hmyzie Sf9 bunky bez FBS: TNM-FH Insect Medium s L- glutamínom (Sigma) v redetillovanej vode pH 6,2 upravené NaOH, filtrované, 1% 2 mM glutamine
- ❖ médium pre hmyzie Sf9 bunky s FBS: TNM-FH Insect Medium s L-glutamínom (Sigma) v redetillovanej vode PH 6,2 upravené NaOH, filtrované, 10% FBS, 1% 2mM glutamín
- ❖ médium pre 3T6 bunky: DMEM- Dulbecco`s modified eagle`s medium (Sigma) s glukózou 4500 mg, pyridoxínom, HCl a NaHCO₃, pridané 10% FBS a 1% 2 mM glutamín

- ❖ médium pre HRPTEC bunky: REBM-Renal epithelial cell basal medium (Lonza, Clonetics) s rhEGF 0,5 ml, inzulínom 0,5 ml, hydrokortizónom 0,5 ml, GA-1000 0,5 ml, FBS 2,5 ml, epinefrínom 0,5 ml, T3 0,5 ml a transferínom 0,5 ml

4.1.5.2. MÉDIÁ PRE BAKTÉRIE

- ❖ Luria-Bertani médium (1liter): 10 g peptón, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl, doplnené demineralizovanou vodou, sterilizované a pridané príslušné antibiotikum
- ❖ TPN médium (450 ml): 9 g peptón pre bakteriológiu, 2,25 g kvasničný extrakt, 2,25 g NaCl
- ❖ SOC médium: 2% peptón pre bakteriológiu, 0,5% kvasničný autolyzát, 20 mM glukóza, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ (MgCl₂ a MgSO₄ sterilizované oddelene pred použitím)
- ❖ živný agar s ampicilínom alebo kanamycínom: 4 % živný agar, ampicilín 100 µl/ml, kanamycín 50 µl/ml
- ❖ živný bujón s ampicilínom alebo kanamycínom: 2 % živný bujón, ampicilín 100 µl/ml, kanamycín 50 µl/ml

4.1.6. PROTILÁTKY A ENZÝMY

4.1.6.1. PRIMÁRNE PROTILÁTKY

- ❖ králičia polyklonálna protilátka proti VP1 BK vírusu, riedená 200x (pripravená M.Stančíkovou)
- ❖ myšia polyklonálna protilátka proti VP1 BK vírusu (pripravená J. Čáslavským)
- ❖ kozia polyklonálna protilátka proti markerom včasných endozómov- EEA1 (Santa Cruz)
- ❖ myšia monoklonálna protilátka proti proteínom asociovaným s membránami lyzozómov (Santa Cruz)
- ❖ králičia polyklonálna protilátka caveolin- 1 (Santa Cruz)
- ❖ králičia polyklonálna protilátka proti VP1 proteínu SV40 vírusu (Abcam)

4.1.6.2. SEKUNDÁRNE PROTILÁTKY

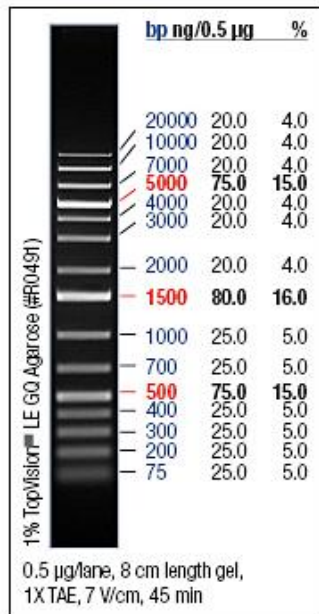
- ❖ kozia protilátka proti králičím imunoglobulínom konjugovaná s HRP (horse radish peroxidase) (BioRad)
- ❖ kozia protilátka proti myším imunoglobulínom konjugovaná s HRP (BioRad)
- ❖ oslia protilátka proti myším imunoglobulínom konjugovaná s Alexa Fluor 488 nm (Molecular Probes)
- ❖ oslia protilátka proti králičím imunoglobulínom konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)
- ❖ kozia protilátka proti králičím imunoglobulínom konjugovaná s Alexa Fluor 546 (Molecular Probes)
- ❖ kozia protilátka proti myším imunoglobulínom konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)

4.1.6.3. ENZÝMY

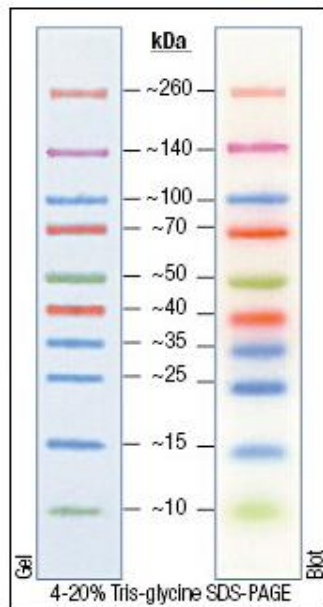
- ❖ FastAP termosenzitívna alkalická fosfatáza (Fermentas)
- ❖ Dna ligáza T4 bakteriofága (Fermentas)
- ❖ restričné enzýmy HindIII, XbaI, NotI, Sall, PstI, BglII, SmaI (Fermentas)
- ❖ NarI (New England BioLabs)
- ❖ Vent DNA polymeráza (New England BioLabs)
- ❖ RNáza A (Serva)

4.1.7. MARKERY MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ

- ❖ O`GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)- 75- 20 000 bp



- ❖ Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas)- 10- 260 kDa



4.1.8. BUNKOVÉ LÍNIE, BAKTERIÁLNE KMENE, VÍRUSY A PLAZMIDY

4.1.8.1. BUNKOVÉ LÍNIE

- ❖ RPTEC- lúnia ľudských epiteliálných buniek proximálných renálnych tubulov (Lonza)

- ❖ Sf9- línia hmyzích buniek zo Spodoptera frugiperda CRL-1711(Promochem)
- ❖ Sp2/0- línia myelómových B lymfocytov z Mus musculus HB-9311(Promochem)
- ❖ VERO- línia epiteliálnych obličkových buniek z opice Cercopithecus aethiops CCL-81 (Promochem)
- ❖ NIH 3T6- línia myších fibroblastov odvodených z embryonálnych tkanív, získaná zo zbierky American Type Culture Collection

4.1.8.2. BAKTERIÁLNE KMENE

- ❖ Escherichia coli XL-1 Blue – zdroj: Quik Change II XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)

4.1.8.3. VÍRUSY

- ❖ rekombinantný bakulovírus produkujúci VP1 proteín BK vírusu (V.Boháčová, Diplomová práca 2005)
- ❖ BKV-ľudský BK vírus získaný z American Type Culture Collection

4.1.8.4. PLAZMIDY

- ❖ pcDNA 3 5446 bp (Invitrogen)- slúžiaci pre vkladanie jednotlivých konštruktov YFP-VP3 v rôznych orientáciách
- ❖ pEYFP-N1 (Clontech)- obsahujúci celú sekvenciu žltého fluorescenčného proteínu YFP, ktorý slúžil ako templát pre PCR na vytvorenie C- a N-terminálneho fragmentu YFP

4.1.9. PRIMERY

- ❖ primery pre zhotovenie fragmentov oboch častí žltého fluorescenčného proteínu a VP3 proteínu sú uvedené pre väčšiu prehľadnosť v kapitole 5.2.2
- ❖ sekvenačné primery pre vektor pcDNA3

pcDNA3-HindIII-F: forward primer pre sekvenáciu vo vektore pcDNA3 na „sense“ reťazci:

5`- TCT GGC TAA CTA GAG AAC CCA CTG

pcDNA3-XbaI-R: reverse primer pre sekvenáciu vo vektore pcDNA na „antisense“ reťazci:

5`- TGG CAA CTA GAA GGC ACA GTC GAG

4.2. METÓDY

4.2.1. PRÁCA S TKANIVOVÝMI KULTÚRAMI

4.2.1.1. PASÁŽOVANIE HMYZÍCH BUNIEK

Z narastenej Petriho misky boli hmyzie bunky zoškrabané a prevedené do média s FBS a glutamínom (v sterilnej skúmavke). Podľa miery konfluencie na miskách bolo doplnené médium a po pretrepaní bolo médium s bunkami rozplňované na misky (Ø 6 cm) po 5 ml. Misky boli uložené do termostatu s teplotou 27°C.

4.2.1.2. PASÁŽOVANIE CICAŤČÍCH BUNIEK 3T6 A RPTEC

Z misiek (Ø 10 cm u 3T6 a Ø 6 cm u RPTEC) s konfluentne narastenými bunkami bolo odsaté médium a opláchnuté 2/1 ml verzénu. Po odsatí bolo pridaných 500 µl, u RPTEC 300 µl 0,2% trypsínu v PBS a bunky boli inkubované aspoň 1 minútu kým sa neuvoľnili od podkladu. Následne bolo pridaných 6 ml DMEM média s 10 % sérom, v prípade RPTEC 3 ml REBM média so sérom a suspenzia bola premiešaná pretiahnutím pipetou aspoň 3x. Do vopred pripravených misiek (Ø 10 cm u 3T6 a Ø 6 cm u RPTEC) s 9 ml DMEM média so sérom a 4 ml REBM média so sérom bol pridaný 1 ml bunkovej suspenzie a zmes bola premiešaná pretiahnutím pipetou aby boli bunky rovnomerne rozptýlené na miske. Takto boli bunky pasážované zase za 3 dni, v prípade RPTEC približn o týždeň, podľa miery narastenia. Bunky boli kultivované v CO₂ termostate pri 36,5°C a 5% CO₂.

4.2.1.3. PASÁŽOVANIE ĽUDSKÝCH RPTEC BUNIEK NA INFEKCIU

Z misiek bolo odsaté médium, boli opláchnuté verzénom a strypsinizované rovnako ako pri bežnej pasáži. Potom boli pridané 3 ml REBM média so sérom a suspenzia bola opäť premiešaná pipetou. Do jamiek so sklíčkami na 24- jamkovej doštičke bolo vopred pridaných 500 µl média, následne bolo pridaných 50- 100 µl suspenzie. Po

narastení buniek do 50-70 % konfluencie zhruba za 2-3 dni bolo v jamkách vymenené médium za bezsérové, aby boli bunky synchronizované. Po 20 hodinách boli bunky infikované BK vírusom.

4.2.1.4. INFЕКЦИЯ RPTEC BUNIEK

Od buniek s 50-70 % konfluenciou na sklíčkách bolo odsaté médium a bolo pridaných 100 µl bezsérové média. Doštička bola uložená na ľad a potom boli bunky infikované takým množstvom vírusového inokula, aby bola dosiahnutá požadovaná multiplicita infekcie. Po infikovaní všetkých jamiek bola doštička ponechaná 40 minút na ľade, aby sa prichytil vírus na bunkové receptory, potom bola doštička uložená do termostatu, doba infekcie bola počítaná od okamžiku uloženia do termostatu.

4.2.1.5. FIXÁCIA BUNIEK NA SKLÍČKACH

Bunky na sklíčkách boli opláchnuté PBS, ktoré bolo ihneď odsaté, potom boli 20 minút fixované 3 % paraformaldehydom v PBS, opäť 2 x opláchnuté PBS a následne boli permeabilizované 0,2 % Tritonom X-100 v PBS 5 minút alebo saponínom 10 minút. Potom boli bunky zase opláchnuté PBS aspoň 3 x 10 minút na kývačke.

4.2.1.6. IMUNOFLUORESCENČNÉ ZNAČENIE PROTEÍNOV V BUNKÁCH

Po fixácii a permabilizácii boli bunky vysýtené roztokom 0,25% želatiny a 0,25% BSA v PBS minimálne 30 minút. Potom boli opäť premývané aspoň 3 x 10 minút a inkubované s primárnou protilátkou nariedenou v blokačnom roztoku aspoň 1 hodinu alebo cez noc v chladničke. Po následnom premytí boli bunky inkubované so sekundárnou protilátkou nariedenou v blokačnom roztoku 30 minút v tme. Po ďalšom premytí PBS aspoň 3 x 10 minút boli sklíčka pinzetou vybraté z jamiek, opláchnuté demineralizovanou vodou a vyschnuté sa položili bunkovou stranou do kvapky 70%-ného glycerolu s DAPI (0,1 µg/ml) na podložnom sklíčku. Pre pozorovanie konfokálnym mikroskopom boli sklíčka na podložnom sklíčku ešte fixované lakom.

4.2.2. PRÍPRAVA ANTIGÉNU NA IMUNIZÁCIU MYŠÍ

4.2.2.1. IZOLÁCIA VP1 PSEUDOKAPSÍD

Línia hmyzích buniek bola spasážovaná do bezsérového média s 50% konfluenciou. Po prichytení buniek na dno misky (najskôr po 30 minútach) bolo odsaté médium a do každej misky bol pridaný 1 ml bakulovírusového inokula. Bolo infikovaných 25 misiek (\varnothing 10 cm) s multiplicitou 10 pfu (plaque formit unit). Bunky boli inkubované na kývačke pri laboratórnej teplote 1 hodinu a potom bolo pridané TNM- FH hmyzie médium s 10% FBS. Infikované bunky boli inkubované 72 hodín pri teplote 28°C.

Po 72 hodinách boli bunky zoškrabané do 50 ml skúmaviek a centrifugované 10 minút pri 1000 g pri teplote 4°C. Sedimenty boli premyté roztokom PBS, jednotlivé pelety spojené a uskladnené pri -86°C.

Pelet bol resuspendovaný v B pufre, následne bola suspenzia sonikovaná 3 x 30 sekúnd pri 10 W a scentrifugovaná 10 minút pri 2400 g a 4°C.

4.2.2.1.1. ULTRACENTRIFUGÁCIA CEZ SACHARÓZOVÝ VANKÚŠ

Supernatant bol prečistený centrifugáciou cez 10% sacharózový vankúš. Supernatanty v dvoch centrifugačných kyvetách boli podvrstvené 2 ml 10% sacharózy v B pufre, vyvážené a centrifugované 3 hodiny pri 35 000 rpm pri 4°C ultracentrifúgou Beckman Optima L-90K, rotor SW 41. Sediment bol resuspendovaný v B pufri a homogenizovaný.

4.2.2.1.2. ULTRACENTRIFUGÁCIA V ROVNOVÁŽNOM GRADIENTE CHLORIDU CÉZNEHO

Suspenzia B pufri obsahujúca vírus bola zmiešaná v hmotnostnom pomere 2,5:1,2 s CsCl, čo zodpovedá 7,9 g suspenzie v B pufri a 3,79 g CsCl. Následne bol zmeraný refraktometrický index zmesi, ktorý mal byť v rozmedzí 1,363-1,364. Zmes v ultracentrifugačných kyvetách bola prevrstvená parafínovým olejom, kyvety vyvážené a centrifugované 20 hodín pri 35 000 rpm pri 18°C na ultracentrifúge Beckman Optima L-90K, rotor SW41. Potom bol gradient rozdelený peristaltickou pumpou na frakcie po cca 600 μ l, jednotlivé frakcie boli nanosené na nitrocelulóзовú membránu a metódou Dot Blot bola zistená prítomnosť proteínu

VP1. U jednotlivých frakcií bol zmeraný refraktometrický index a na základe jeho hodnoty boli vybrané frakcie spojené do dvoch výsledných frakcií. Frakcie v rozmedzí 1,366-1,363 by mali obsahovať plné pseudokapsidy (obsahujú zvyškovú DNA hostiteľských buniek) a frakcie v rozmedzí 1,3625-1,360 prázdne pseudokapsidy.

4.2.2.1.3. DIALÝZA FRAKCIÍ

Obe získané frakcie boli dialyzované proti B pufru za účelom odstránenia CsCl, ten prechádza semipermeabilnou membránou do prostredia s nižšou koncentráciou. Vzorky boli nanesené do vopred 10 minút povarenej membrány Servapor (\varnothing 21mm, \varnothing póru 2,5 nm), uzatvorené dialyzačnými svorkami a dialyzované v 2 litroch pufru B cez noc za stáleho miešania pri 4°C. Po 3 hodinách bol B pufr vymenený za čerstvý. Po dialýze boli vzorky opäť zahustené centrifugáciou cez sacharózový vankúš podľa kap. 4.2.2.1.1 a resuspendované v B puFRE.

4.2.2.2. OVERENIE PRÍTOMNOSTI VP1 PROTEÍNU

Prítomnosť VP1 proteínu v záverečných dvoch frakciách bola overená metódou elektrónovej mikroskopie a metódou Western Blot. Obe frakcie boli následne použité na imunizáciu myší.

4.2.3. IMUNIZÁCIA MYŠÍ

Imunizácia myší bola prevedená RNDr. Alenou Morávkovou PhD.

Myš bola najprv uspatá roztokom Avertínu (zásobný roztok bol nariedený na 2,5%). Potom bola myš pomocou gumičiek zafixovaná na operačnú dosku a na ľavom boku bola oholená srst'. Pomocou sterilných nástrojov (vysterilizované plameňom po namočení v etanole) bola narezaná koža od rebier kaudálne a bolo otvorené peritoneum. Pinzetou bola jemne povytiahnutá slezina a bola injekovaná vopred pripravená dávka antigénu 5 μ l partikulí o koncentrácii 4,32 mg/ml v 15 μ l PBS. . Po ukončení bola operačná rana zašitá.

Operatívna imunizácia do sleziny bol opakovaná celkovo 3 krát s odstupom 11-14 dní. Po dvoch týždňoch bola myši odobraná krv z chvosta na overenie prítomnosti protilátok v krvnom sére metódou Dot Blot.

4.2.4. FÚZIA BUNIEK

4.2.4.1. PRÍPRAVA MYELÓMOVÝCH BUNIEK

Kultúry myelómových buniek boli 3 dni pred bunkovou fúziou vybraté z tekutého dusíka, kde boli skladované. Boli rozmrazené vo vodnom kúpeli o teplote 37°C a scentrifugované pri 150 g 5 minút. Mraziaci roztok bol zliaty, bunky boli resuspendované v RPMI 1640 médiu s pridaným 10% FCS a kultivované na Petriho miskách ø 6 cm. Po 3 dňoch boli použité na bunkovú fúziu.

4.2.4.2. PRÍPRAVA SLEZINNÝCH BUNIEK Z IMUNIZOVANEJ MYŠI

Myš bola uspatá dietyléterom a usmrtená cervikálnou dislokáciou, následne z nej bola stiahnutá koža od chvosta smerom k hlave jemne, aby nedošlo k poškodeniu peritonea. Ďalšia práca prebiehala v laminárnom boxe so sterilnými nástrojmi. Slezina myši bola vybratá a uložená na Petriho misku. Potom bola rozstrihaná na malé kusy, tie boli pretlačené cez silon do prepieracieho média RPMI 1640 s pridaným 2mM glutamínom. Cez ďalšiu vrstvu silonu boli slezinné bunky prefiltrované do 50 ml sterilnej skúmavky.

4.2.4.3. PREPIERANIE SLEZINNÝCH A MYELÓMOVÝCH BUNIEK

Suspenzie buniek získané z misiek boli doplnené do 50 ml vo skúmavke a scentrifugované 10 minút pri 150 g. Médium bolo zliate, bunky resuspendované v médiu a opäť scentrifugované. Z odobratých vzoriek (slezinných aj myelómových buniek) som určila celkový počet buniek v roztoku pomocou Bürkeovej komôrky a zmiešala v pomere 5:1 (slezinné: myelómové bunky). Po treťom, spoločnom prepieraní, a po zliatí média boli bunky pripravené na bunkovú fúziu.

4.2.4.4. PRÍPRAVA PODPORNÝCH BUNIEK

Podporné bunky boli pripravené a rozplnené na 96-jamkové doštičky deň pred bunkovou fúziou. Podporné bunky sa v médiu nemnožia a prežívajú okolo 7-10 dní. Na tento účel sa používa zmes buniek získaná výplachom peritonea myši, väčšinou sa jedná o peritoneálne makrofágy.

Laboratórna myš bola uspatá dietyléterom a opláchnutá bola etanolom. Smerom od hlavy k chvostu bola opatrne stiahnutá koža aby nebolo poškodené peritoneum. Ďalšia práca prebiehala v laminárnom boxe. Myš bola pripevnená špendlíkmi k operačnej podložke. Do striekačky bolo natiahnuté vopred ohriate HAT médium a striekačkou vpravené skrz trieslovú oblasť do brušnej dutiny myši. Po jemnej masáži bruška kvôli premiešaniu tekutiny bola striekačkou opäť vysatá tekutina a to z boku ľavej strany zvieraťa. Postup bol zopakovaný 3 až 4 krát, získaná tekutina bola doplnená do objemu 50 ml v sterilnej skúmavke. Takto pripravené bunky boli rozplnené po 100 µl do piatich 96-jamkových doštičiek.

4.2.4.5. BUNKOVÁ FÚZIA

Zmes slezinných a myelómových buniek bola jemne premiešaná a v priebehu jednej minúty bol k bunkám pridávaný 1 ml 50% vodného roztoku PEG 3350 Da. Následne bol v druhej minúte pridaný 1 ml média RPMI 1640 s pridaným 1% glutamínom, v tretej minúte bol pridaný ďalší 1 ml a vo štvrtej minúte bolo pridaných 8 ml média.

4.2.5. PRÁCA S HYBRIDÓMAMI

4.2.5.1. ROZPLNENIE HYBRIDÓMOV

Hybridómy vzniknuté bunkovou fúziou boli 10 minút centrifugované pri 150 g, supernatant bol zliaty a bolo pridaných 50 ml HAT média. Z tohto množstva bolo rozplnených päť 96-jamkových doštičiek po 100 µl do každej jamky na vopred nanesené podporné bunky.

4.2.5.2. LIEČBA GENETICÍNOM

Tri dni po bunkovej fúzii bol k hybridómom pridaný roztok geneticínu na ochranu proti mykoplasme, ktorá môže kontaminovať kultúry hybridómov. Lína myelómových buniek Sp2/0, teda aj novovzniknuté hybridómy sú rezistentné voči toxickému pôsobeniu geneticínu.

Po troch dňoch pôsobenia geneticínu na bunky bol geneticín z hybridómových kultúr odstránený. Sterilnou Pasteurovou pipetou bolo médium z buniek

odstránené a pridané 200 µl čerstvého HAT média. Po 12 hodinách bol postup zopakovaný, médium bolo odsaté a bolo pridané čerstvé.

4.2.5.3. TESTOVANIE A KLONOVANIE HYBRIDÓMOV

4.2.5.3.1. KONTROLA RASTU HYBRIDÓMOV

Po týždni od bunkovej fúzie boli hybridómy kontrolované a z jamiek, ktoré boli hybridómami zaplnené, bol celý obsah média odobratý na testovanie a hybridómom bolo pridané čerstvé HAT médium. V prípade pozitívneho signálu na prítomnosť žiadanej protilátky boli hybridómy klonované.

4.2.5.3.2. TESTOVANIE HYBRIDÓMOVÝCH MÉDIÍ NA PRÍTOMNOSŤ ŽIADANEJ PROTILÁTKY

Testovanie bolo prevádzané metódou Dot Blot, prietokovou cytometriou, imunofluorescenciou a metódou Western Blot.

4.2.5.3.3. KLONOVANIE HYBRIDÓMOV

Kultúra hybridómov pozitívna na prítomnosť protilátky pochádzajúca z jednej jamky bola ďalej rozklonovaná na jednu celú 96- jamkovú doštičku s vopred nanesenými podpornými bunkami. Z takýchto doštičiek boli testované jamky obsahujúce len jedinú kolóniu hybridómov metódou Dot Blot a FACS (prietoková cytometria).

4.2.6. PRÁCA S PROTEÍNMI

4.2.6.1. TESTOVANIE HYBRIDÓMOVÝCH MÉDIÍ PRIETOKOVOU CYTOMETRIOU

Ako antigén boli použité hmyzie bunky Sf9 infikované bakulovírusom produkujúcim kapsidový proteín VP1 BK vírusu. Bunky boli zoškrabané do sterilnej skúmavky 72 hodín po infekci. Médium bolo odcentrifugované (5 minút pri 150 g pri teplote 4°C.) a uskladnené pre ďalšie použitie. Pelet buniek bol resuspendovaný v 3- 4 ml PBS pre tkanivové kultúry a scentrifugovaný za rovnakých podmienok. Supernatant bol odsatý a pelet resuspendovaný v 3- 4 ml ľadovo vychladeného etanolu pre zafixovanie buniek po dobu maximálne 5 minút. Po centrifugácii bol zas pelet premytý PBS a scentrifugovaný a následne resuspendovaný v roztoku 0,2% želatiny a 5% séra v PBS pre tkanivové kultúry. Bunky boli takto vysytené aspoň 30 minút.

Pomocou Bürkeovej komôrky bol určený celkový počet buniek, objem bol doplnený tak, aby sa dal rozplniť do 96-jamkových doštičiek s oblým dnom. Potom bolo k bunkám pridané 100 µl média odobratého z hybridómových jamiek a určené na testovanie na prítomnosť žiadanej protilátky aspoň na 45 minút. Po 2 premytiach PBS pre tkanivové kultúry boli proteíny značené 30- minútovou inkubáciou s osliou sekundárnou protilátkou proti myším imunoglobulínom konjugovanou s Alexa Fluor 488. Bunky boli opäť premyté PBS pre tkanivové kultúry a resuspendované v 50 µl PBS a pripravené na meranie prietokovou cytometriou. Ako pozitívna kontrola bola použitá skôr pripravená králičia polyklonálna protilátka proti VP1 BKV a oslia sekundárna protilátka proti králičím imunoglobulínom konjugovaná s Alexa Fluor 488. V negatívnej kontrole boli bunky inkubované iba so sekundárnou protilátkou (bez špecifickej primárnej protilátky). Takto pripravené bunky boli analyzované pomocou fluorescenčnej prietokovej cytometrie.

4.2.6.2. SDS PAGE

4.2.6.2.1. PRÍPRAVA GÉLOV PRE ELEKTROFORÉZU

Aparatúra pre SDS elektroforézu bola zostavená a bolo overené tesnenie naliatím ddH₂O. Potom bola vysušená filtračným papierom. Do oboch strán aparatúry bol ako prvý naliaty spodný gél a to asi 0,5 cm pod znamienkom označujúcim koniec hrebeňa. Gel bol prevrstvený ddH₂O a ponechaný polymerizovať (aspoň 30 minút pri izbovej teplote).

Zloženie 12 ml spodného gélu bolo nasledovné: 4 ml 30% akrylamid, 4,5 ml 1M tris-HCl pH 8,8, 120 µl 10% SDS, 3,25 ml ddH₂O, 40 µl 10% amónium persulfát, 17 µl TEMED

Po polymerovaní spodného gélu bol odstránený nespolymerovaný akrylamid, sklá vysušené filtračným papierom a bol naliaty vrchný gél po horný okraj skla. Ihneď po naliatí bol do gélu opatrne vložený hrebeň aby sa pod ním nevytvárali bubliny. Vrchný gél tiež polymerizoval aspoň 30 minút.

Zloženie 3 ml vrchného gélu: 0,5 ml 30% akrylamid, 0,375 ml 1M tris-HCl pH 6,8, 30 µl 10% SDS, 2,11 ml ddH₂O. 20 µl 10% amónium persulfát, 5 µl TEMED

U oboch gélov boli ako posledné zložky pridané amónium persulfát a TEMED tesne pred naliatím gélu do aparatury.

4.2.6.2.2. ELEKTROFORÉZA

Po polymerovaní vrchného gélu boli odstránené hrebene a gély spolu so sklami boli vložené do aparatury a preliate 10 x nariedeným „running buffer“. Jednotlivé jamky boli prepláchnuté pomocou injekčnej ihly.

Do jamiek boli nanesené povarené vzorky a marker molekulových váh.

Vzorky putovali pri napätí asi 80 V kým nedorazili k rozhraniu oboch gélov a potom pri napätí 140 V kým bromfenolová modrá nedorazila k hranici spodného gélu.

4.2.6.2.3. FARBENIE A FIXÁCIA GÉLU PO SDS-PAGE

Gél bol fixovaný fixačným roztokom obsahujúcim 50% metanol, 5% CH₃COOH aspoň 1 hodinu a potom bol cez noc farbený farbiacim roztokom obsahujúcim 3,5% CH₃COOH, 0,5% Coomassie Brilliant Blue G 250. Na druhý deň bol farbiaci roztok zliaty pre ďalšie použitie a gel bol odfarbovaný cez noc v dH₂O.

4.2.6.2.4. WESTERN BLOT PO SDS-PAGE

Z nitrocelulózovej membrány, papiera Whatman 3 mm a filtračných papierov bol po namočení zostavený blotovací sendvič pre mokrý alebo polomokrý blotting nasledovne:

Na polomokrý blotting na spodok aparatury bola položená priehľadná fólia s otvorom o veľkosti gélu, na to papier Whatman a 4 filtračné papiere, nitrocelulózová membrána, gél, opäť 4 filtračné papiere a Whatman. Sendvič bol priklopený vrchnou časťou aparatury. Blotting prebiehal pri 0,8 mA/cm² (54 mA) 1 hodinu a 15 minút.

Na mokrý blotting bolo na čiernu mriežku uložená hubička a 4 kusy filtračného papiera, Whatman, gél a nitrocelulózová membrána, opäť Whatman, filtračné papiere a hubička. Sendvič bol prekrytý sivou mriežkou a upevnený gumičkami. Blotting prebiehal 3 hodiny pri 250 mA, 100V a 50W.

4.2.6.3. DOT BLOT

Vzorky proteínov boli po 2 µl nakvapkané na nitrocelulózovú membránu a následne detekované imunologicky.

4.2.6.4. IMUNOLOGICKÁ DETEKCIA PROTEÍNOV NA MEMBRÁNACH

Nitrocelulózo­vá membrána s nakvapkanými alebo blotovanými proteínmi bola vysýtená v 5% mlieku riedenom v PBS aspoň 1 hodinu alebo cez noc. Potom bola membrána prepláchnutá 3 x 10 minút v PBS a značená aspoň 1 hodinu s primárnou protilátkou riedenou v mlieku, v prípade testovacieho séra z hybridómových buniek médium nebolo riedené. Potom bola membrána opäť premytá 3 x 10 minút v PBS a značená sekundárnou protilátkou konjugovanou s HRP 30- 45 minút. Po ďalšom premytí v PBS boli proteíny na membráne detekované v tmavej komore roztokom luminolu 30 sekúnd. Membrána bola na 2-10 minút vložená do priehľadnej fólie a do vyvolávacej kazety a na vrch bol priložený RTG film (Medix, Foma Bohemia). Po vybratí bol film vyvolaný vo vývojke, opláchnutý vodou a zafixovaný vo fixačnom roztoku.

4.2.7. IZOLÁCIA BK VÍRUSU

Izolácia vírusu bola prevedená Violetou Bakardijevou. Ľudské RPTEC bunky narastené do 50- 70% konfluencie boli infikované BK vírusom. Kultivačné misky boli 3 x zmrazené v -80°C a rozmrazené, zoškrabané a centrifugované 30 minút na centrifúge Sigma 3K30 pri 4800 rpm. Supernatant bol uskladnený v chladničke a pelet resuspendovaný v 10 mM Tris-HCl pH=7,4, 1 ml na 1 skúmavku. Suspenzia bola homogenizovaná na ľade v sklenenom homogenizátore v 5-tich cykloch po 10-tich pohyboch piestom. K zmesi bol pridaný aprotinín- inhibitor proteáz 2 µg/ml zmesi a 5 µl neuraminidázy (0,01 U/ml) a bola inkubovaná cez noc na kývačke. Potom bola suspenzia centrifugovaná pri 4°C, 4800 rpm 40 minút na centrifúge Sigma 3K30. Supernatant bol spojený s predchádzim supernatantom a bol uschovaný pri 4°C. Pelet bol opäť resuspendovaný v 1 ml Tris-HCl a inkubovaný 4 hodiny na kývačke. Suspenzia bola znova centrifugovaná za rovnakých podmienok, supernatant bol pridaný k predchádzim a uschovaný. Centrifugácia cez sacharózový vankúš, ultracentrifugácia v rovnovážnom gradiente CsCl a dialýza frakcií sú uvedené v kap. 4.2.2.1.1, 4.2.2.1.2 a 4.2.2.1.3.

4.2.8. PRÁCA S BAKTÉRIAMI

4.2.8.1. KULTIVÁCIA BAKTÉRIÍ

Baktérie nesúce plazmid boli zaočkované do 5 alebo 10 ml živného bujónu č.2 s príslušným antibiotikom v Erlenmeyerovej banke, kultivované na trepačke pri teplote 37°C, 150 ot/min 12- 16 hodín.

4.2.8.2. SKLADOVANIE BAKTÉRIÍ

Petriho miska so živným agarom s príslušným antibiotikom a overenou bakteriálnou monokolóniou bola skladovaná v chladničke po dobu jedného mesiaca. Z overenej bakteriálnej kolónie boli urobené konzervy skladované pri -80°C dlhodobo. Konzervačná zmes bola pripravená zmiešaním baktérií kultivovaných cez noc v médiu so 40%- ným sterilným glycerolom v pomere 1:1.

4.2.8.3. PRÍPRAVA KOMPETENTNÝCH BUNIEK PRE ELEKTROPORÁCIU

Baktérie E.coli kmeň XL1- Blue boli zaočkované do 10 ml TPN média a aeróbne kultivované cez noc pri 37°C. Suspenzia bola nariedená 25- 50x a bola zmeraná optická denzita pri 560 nm. Baktérie boli nariedené do 400 ml média a ďalej kultivované. Po dosiahnutí optickej denzity 0,5- 0,7 pri 560 nm boli baktérie centrifugované 10 minút pri 4°C na 4000g. Pelet bol resuspendovaný v 400 ml demineralizovanej H₂O a opäť centrifugovaný za rovnakých podmienok. Potom bol pelet premytý v 200 ml ddH₂O a po následnej centrifugácii resuspendovaný v 16 ml 10% glycerolu. Suspenzia bola zas centrifugovaná a pelet resuspendovaný v 8 ml glycerolu. Po poslednej centrifugácii bol pelet resuspendovaný v 0,8 ml 10%- ného glycerolu a bunky boli rozdelené po 100 µl do mikroskúmaviiek a uschované v -80°C.

4.2.8.4. ELEKTROPORÁCIA BAKTÉRIÍ

Po rozmrazení kompetentných buniek v ľadovom kúpeli k nim bolo pridaných 3 µl ligačnej zmesi vektorovej DNA s požadovanými fragmentami v demineralizovanej vode. Zmes bola inkubovaná 2 minúty a potom bola prevedená do elektroporačnej kvety (na vzdialenosť elektród 2 mm). Na elektroporátore bol aplikovaný pulz

s nastavenými hodnotami 25 μ F, 2,5 kV a 200 Ω . Optimálna dĺžka pulzu je 4,5 ms. Hneď potom bol k baktériám pridaný 1 ml SOC média a boli kultivované 1 h pri 37°C. Potom boli vysiate na živný agar s ampicilínom a kultivované cez noc v termostate.

4.2.9. PRÁCA S DNA

4.2.9.1. IZOLÁCIA PLAZMIDOVEJ DNA QIAGEN KITOM

Cez noc kultivované baktérie boli stočené na 4000 g a DNA bola vyizolovaná Qiagen Kitom, overená elektroforézou a koncentrácia bola určená na Nanodrope.

4.2.9.2. MAXIIZOLÁCIA PLAZMIDOVEJ DNA QUAGEN KITOM

Pre maxiizoláciu baktérií bol použitý EndoFree Plasmid Maxi Kit. Kolónia baktérií vyrastená na selekčnom médiu s antibiotikom bola zaočkovaná do 5 ml LB média s príslušným antibiotikom a baktérie boli kultivované 8 hodín pri 37°C na trepačke. Potom bolo z tejto kultúry zaočkovaných 200 μ l do 100 ml LB média s antibiotikom a kultivované 16 hodín pri 37°C na trepačke. Baktérie boli centrifugované pri 6000 g a 4°C 15 minút a nasledoval postup podľa priloženého návodu.

4.2.9.3. MAXIPREPARÁCIA PLAZMIDOVEJ DNA- ALKALICKÁ METÓDA

16 hodín bola kultivovaná kultúra baktérií nesúcich plasmid na trepačke pri 37°C v objeme 500 ml 2,5 % vyklávaného bujónu s príslušným antibiotikom. Potom bola kultúra centrifugovaná 15 minút pri 4°C a 4000 g. Pelet bol resuspendovaný do dvoch falkoniiek po 10 ml roztoku I nasávacou pipetou na ľade. K nemu bolo pridaných 20 ml roztoku II do každej falkonky, premiešané otáčaním falkoniiek a boli inkubované 10 minút pri izbovej teplote. Potom bolo pridaných 15 ml roztoku III do každej falkonky a inkubované na ľade 20 minút. Zmes bola centrifugovaná 15 minút pri 4°C a 17 530 g a supernatant prefiltrovaný cez 4 vrstvy gázy. Supernatant bol rozdelený do 4 falkoniiek a bol pridaný 0,6 objemu izopropanolu, premiešaný a inkubovaný 10 minút pri izbovej teplote. Potom bola zmes centrifugovaná 30 minút pri 4°C a 20 000 g. Pelet bol premytý 80 % etanolom, vysušený pri izbovej teplote a resuspendovaný v 500 μ l TE pufru na každú falkonku a prevedený do eppendorfiiek.

4.2.9.4. ODSTRÁNENIE RNA RNÁZOU

Do každej eppendorfky bol pridaný 0,1 objem roztoku RNázy a inkubovaný pri laboratórnej teplote aspoň 1 hodinu. Následne bola RNáza odmytá fenol-chloroformovou metódou.

4.2.9.5. FENOL-CHLOROFORMOVÉ ČISTENIE PLAZMIDU

Do každej eppendorfky bol k DNA v TE pufre pridaný 1 objem fenolu, eppendorfky boli premiešané na vortexe a centrifugované na 10 000 g 5 minút. Po odobratí hornej fázy bol pridaný 0,5 objemu fenolu a 0,5 objemu chloroformu. Eppendorfky boli zvertexované a centrifugované na 10 000 g 5 minút. Po odobratí hornej fázy bol pridaný 1 objem chloroformu, zmesi boli opäť vortexované a centrifugované na 10 000 g 5 minút. Po odobratí hornej fázy bol pridaný 0,1 objem 3 M NaAc (pH 5,2) a 2,5 objemu 96% etanolu vychladeného na -20°C a zmes bola inkubovaná aspoň 30 minút v -80°C. Roztok s DNA bol centrifugovaný pri 20 000 g a 4°C 30 minút. Pelet bol následne premytý 80% etanolom a vysušený pri laboratórnej teplote, DNA bola rozpustená v 500 µl TE pufre a zamrazená.

4.2.9.6. MINIPREPARÁCIA REKOMBINANTNEJ PLAZMIDOVEJ DNA- ALKALICKÁ METÓDA

Do 700 µl živného bujónu č.2 s príslušným antibiotikom v eppendorfkách boli naočkované monokolónie baktérií vyrastené po elektroporácii na miskách. Baktérie boli inkubované cez noc pri 37°C na trepačke pri 150 ot/min. Potom boli eppendorfky centrifugované pri 4°C 4000 g 5 minút. Pelet bol resuspendovaný v 250 µl roztoku I a ihneď bolo pridaných 250 µl čerstvo pripraveného roztoku II, zmes bola premiešaná otáčaním a inkubovaná maximálne 10 minút. Bolo pridaných 200 µl ľadovo vychladeného roztoku III, opatrne premiešané otáčaním a inkubované 10 minút na ľade. Zmes bola centrifugovaná pri 4°C a 17 530 g 10 minút. K supernatantu bolo pridaných 500 µl izopropanolu, zmes bola premiešaná a inkubovaná 10 minút pri laboratórnej teplote. Potom bola zmes centrifugovaná pri 4°C a 20 000 g 20 minút. Pelet bol premytý 80 % etanolom, vysušený a rozpustený v 20 µl TE pufre. K DNA bola pridaná 1/10 objemu zásobného roztoku RNázy a zmes

bola inkubovaná 1 hodinu pri 37°C. Overenie jednotlivých kolónií bolo následne prevedené štiepením plazmidu restriktčnými endonukleázami. Potom bola celá vzorka použitá pre elektroforézu.

4.2.9.7. AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA

1 % agarózový gél bol pripravený rozpustením odpovedajúceho množstva agarózy v 0,5 x TBE pufre. Po ochladení (na teplotu znesiteľnú na predlaktí) bola suspenzia naliata do pripraveného bločku, následne bol pridaný zásobný roztok etídium bromidu do koncentrácie 0,5 µl/ml a bol tam vložený plastový hrebeň. Po stuhnutí suspenzie na gél bol hrebeň vytiahnutý, gél vložený do aparatury pre elektroforézu a zaliaty 0,5 x koncentrovaným TBE pufrom. Vzorky DNA boli zmiešané so vzorkovým pufrom 6 x Orange DNA Loading Dye od Fermentas a nanosené do jamiek v géli. Ako prvý bol nanosený marker molekulových váh. Aparatúra bola zapojená do zdroja napätia a prúd bol nastavený na 70 V. Po skončení bol gél prezretý na UV transluminátore.

4.2.9.8. ŠTIEPENIE DNA RESTRIKČNÝMI ENDONUKLEÁZAMI

DNA bola štiepená v restriktčnej zmesi obsahujúcej 0,5- 2 µg plazmidovej DNA, 1x koncentrovaný restriktčný pufo, 1- 10 jednotiek (U) restriktčného enzýmu doplnené demineralizovanou vodou do konečného objemu. Zmes bola inkubovaná 2 hodiny alebo cez noc v termostate pri 37°C.

4.2.9.9. LIGÁCIA DNA

Ligačná zmes bol pripravená tak, aby bol pomer linearizovanej plazmidovej DNA k DNA fragmentov 1:2- 1:3. Ligačná zmes obsahovala 150 µg plazmidovej DNA a DNA fragmentov, 2 µl 10 x koncentrovaného pufru pre T4 DNA ligázu a 2,5 u DNA ligázy T4 bakteriofága. Ligácia prebiehala 16- 24 hodín pri laboratórnej teplote a bola ukončená zahriatím na 65°C 10 minút. 2- 4 µl zmesi boli použité na elektroporáciu baktérií.

4.2.9.10. AMPLIFIKÁCIA DNA POLYMERÁZOVOU REŤAZOVOU REAKCIOU

PCR reakcia prebiehala vždy v objeme 50 μ l, najprv bola však pripravená reakčná zmes-master mix s objemom, ktorý zodpovedal počtu reakcií a jedným rezervným objemom nasledovne:

39,5 μ l sterilnej demineralizovanej H₂O

5 μ l 10x koncentrovaného pufru pre Vent polymerázu

1,5 μ l 10 μ M primeru F

1,5 μ l 10 μ M primeru R

1 μ l 10 μ M dNTP

1 μ l templátovej DNA

0,5 μ l Vent polymerázy

Pre negatívnu kontrolu bola miesto DNA použitá demineralizovaná voda.

Mikroskúmavky s 50 μ l reakčnej zmesi boli vložené do termocyklera a podľa programu prebiehala vlastná PCR reakcia. 1. krokom bola denaturácia DNA 3 minúty pri 94°C, potom 2. 40 sekúnd pri 94°C, nasledovalo 3. nasadenie primerov- 50 sekúnd pri teplote 56-64°C podľa konkrétneho primeru. Potom 4. polymerizácia 1 minútu pri 72°C a 5. 7 minút pri 72°C. Kroky 1- 4 prebiehali 30 x, potom nasledoval 5.a 6. krok.

5. VÝSLEDKY

5.1. PRÍPRAVA MONOKLONÁLNEJ PROTILÁTKY PROTI VP1 PROTEÍNU BK VÍRUSU

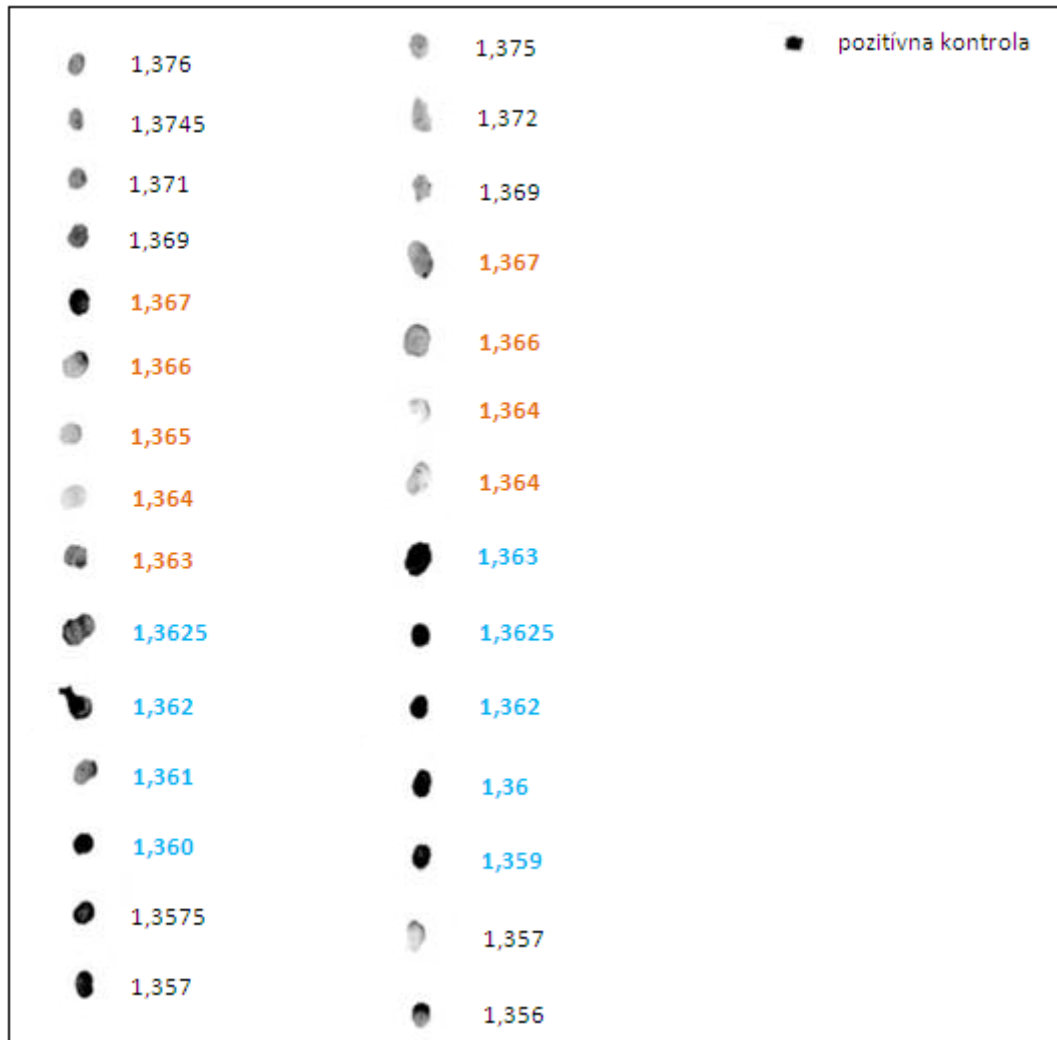
Predpokladom pre štúdium a prácu s vírusmi je disponovanie špecifickými protilátkami, ktoré umožňujú detekovať ich štruktúrne aj neštruktúrne proteíny. Detekciou kapsidového proteínu VP1 je možné sledovať pohyb vírusových častíc v čase a priestore v hostiteľských bunkách, čo nám dáva ďalšie informácie o správaní sa vírusu v bunkách, o prípadných interakciách s bunkovými súčasťami a tiež nevyhnutné informácie o životnom cykle vírusu. Keďže BK vírus je ľudský patogén rozšírený celosvetovo a spôsobuje vážne ochorenie u imunosuprimovaných ľudí, je jeho štúdium esenciálne. Keďže však naše laboratórium stále nedisponovalo monoklonálnou protilátkou proti VP1 BK vírusu, rozhodli sme sa zamerať najprv na tento krok prípravy detekčného mechanizmu umožňujúceho vizualizáciu vírusu.

5.1.1. IZOLÁCIA A OVERENIE PRÍTOMNOSTI VP1 PROTEÍNU Z INFIKOVANÝCH HMYZÍCH BUNIEK

Nevyhnutnou súčasťou pri príprave monoklonálnej protilátky je príprava antigénu v dostatočnom množstve pre imunizáciu myší. Pre produkciu VP1 proteínu BK vírusu bol využitý bakulovírusový expresný systém, ktorý sa v laboratóriu používa už mnoho rokov. Bol pripravený rekombinantný bakulovírus nesúci gén pre VP1 proteín BK vírusu Mgr. Veronikou Boháčovou PhD. Gén pre VP1 proteín je v bakulovírusovom genómepod vplyvom silného polyhedrinového promotora. Produkovaný proteín VP1 vytvára v jadrách hmyzích buniek VLPs, ktoré boli následne vyizolované, purifikované a overené elektrónovou mikroskopiou.

Pre izoláciu proteínu som použila lyzát z hmyzích buniek infikovaných rekombinantným bakulovírusom nesúcim gén pre VP1 proteín BK vírusu. Aby bol dostatok antigénu, bolo použitých 25 misiek (\varnothing 10 cm). Bunky boli sklidené 72hodín po infekcii, resuspendované v B pufri a sonikované 3x 1 minútu. Po odstránení bunkových zvyškov krátkou centrifugáciou som izolovala pseudokapsidy zo supernatantu ultracentrifugáciou v gradiente CsCl, jednotlivé frakcie rozobrala peristaltickou pumpou a zmerala refraktometrický index. Všetky frakcie som

naniesla na nitrocelulózovú membránu a previedla imunoreakciu s králičou polyklonálnou protilátkou proti VP1 BKV (obr.5.1.1). Následne som spojila frakcie z jednej kyvety s refraktometrickým indexom 1,367- 1,363 a z druhej kyvety frakcie s indexom 1,367- 1,364 do jednej frakcie, v ktorej by mali byť plné pseudoakapsidy, ktoré enkapsidujú fragmenty bunkovej alebo bakulovírusovej DNA. Frakcie s refraktometrickým indexom 1,3625- 1,360 z jednej kyvety a frakcie 1,363- 1,359 z druhej kyvety som spojila do druhej frakcie kde by mali byť prázdne pseudokapsidy.



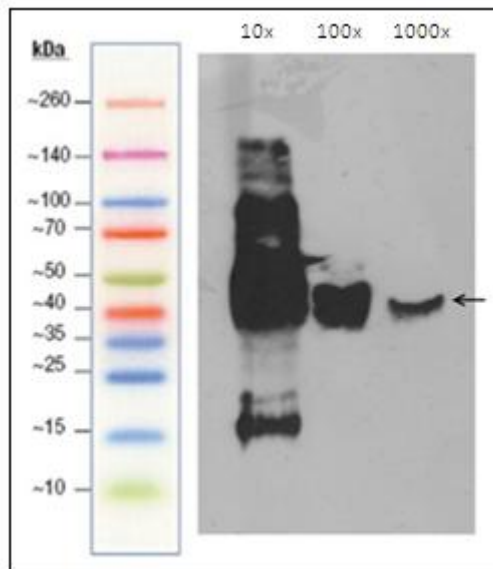
Obr.5.1.1: Dot Blot pre detekciu VP1 vo frakciách CsCl gradient. Pozitívne signály u jednotlivých frakcií, dva stĺpce frakcií 1- 15 z prvého delenia peristaltickou pumpou, a frakcie 1-14 z druhého delenia. Oranžovým plné pseudokapsidy spojené do jednej frakcie a modrým spojené prázdne pseudokapsidy. Použitá králičia polyklonálna primárna protilátka proti VP1 proteínu BK vírusu riedená 200 x (pripravená Mgr.Stančíkovou) a kozia sekundárna protilátka proti králičím imunoglobulínom konjugovaná s HRP riedená 1000 x. Na pozitívnu kontrolu použitá vzorka VP1 z lyzátu infikovaných 3T6 myších fibroblastov (poskytnuté Mgr.Horníkovou)

Po dialýze frakcií som stanovila množstvo proteínu v zriedených vzorkách oboch frakcií Bradfordovou metódou (Tab. 5.1.2).

vzorka proteínu so známou koncentráciou		frakcia	D	koncentrácia mg/ml
0,25 mg/ml	0,01	prázdne kapsidy	0,053	1,181
0,5 mg/ml	0,049	plné kapsidy	0,029	4,32
0,75 mg/ml	0,088			
1 mg/ml	0,137			

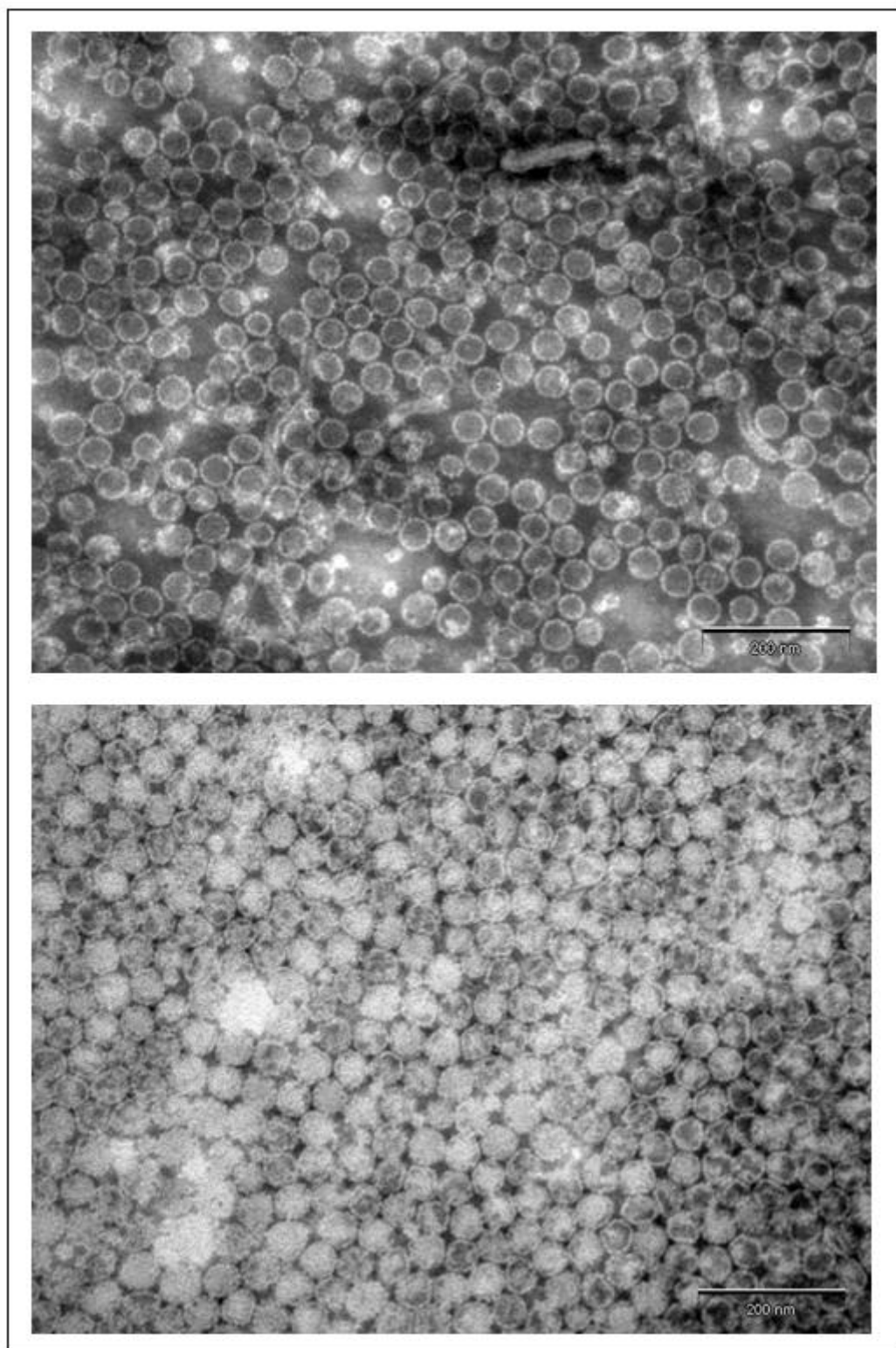
Tab. 5.1.2: Stanovenie koncentrácie proteínov v oboch frakciách

Následne boli vyizolované proteíny overené metódou Western blot a detekované pomocou králičej polyklonálnej protilátky proti myším imunoglobulínom (obr.5.1.3).



Obr. 5.1.3: Overenie vyprodukovaného VP1: Pozitívny signál u všetkých riedení, použitý antigén- VP1 partikule (10 x, 100 x, 1000 x), použitá myšia primárna polyklonálna protilátka proti VP1 (riedená 200 x) a kozia sekundárna protilátka proti myším imunoglobulínom konjugovaná s HRP (riedená 1000x).

Vzorky prázdnych aj plných kapsíd boli prezreté elektrónovým mikroskopom Mgr. Vojtěchom Žílou, sú znázornené na obr. 5.1.4:



Obr. 5.1.4: Elektronmikroskopické snímky prázdnych (hore) a plných (dole) pseudokapsíd

Z výsledkov elektrónovej mikroskopie vyplýva, že vo frakcii prázdnych kapsíd sú takmer všetky pseudokapsidy prázdne a na obrázku plných kapsíd, teda tých ktoré

enkapsidovali DNA hmyzích buniek, príp. históny a preto do kapsíd nevniklo farbivo, je naopak iba minimum prázdnych kapsíd.

Partikule boli použité na imunizáciu myší.

5.1.2. IMUNIZÁCIA MYŠÍ A FÚZIA BUNIEK

5.1.2.1. IMUNIZÁCIA

Pre imunizáciu myší BALB/c boli použité obe frakcie. Jedna myš bola imunizovaná intraperitoneálne dávkou 50 µg antigénu z frakcie plných kapsíd doplnené do 50 µl PBS a druhá myš bola imunizovaná dávkou 20 µg antigénu z frakcie prázdnych kapsíd doplnené do 20 µl PBS operatívne do sleziny. Obe myši boli opäť imunizované po 11-tich, 13-tich a zase 13-tich dňoch rovnakou dávkou antigénu a rovnakým spôsobom. Po 17-tich dňoch bola z oboch myší odobratá krv z chvosta a z nej získané sérum na testovanie metódou Dot blot.

Z výsledku Dot blotu vyplývalo že obe myši odpovedali na imunizáciu antigénu tvorbou protilátok. Pozitívne reakcie boli pozorované u myši imunizovanej do sleziny do riedenia 100x a u myši imunizovanej intraperitoneálne do riedenia 10x. Na bunkovú fúziu sme preto použili myš imunizovanú priamo do sleziny.

5.1.2.2. BUNKOVÁ FÚZIA

Fúziu buniek som robila podľa návodu v kap. 4.2.4.5 po dvoch mesiacoch od prvej imunizácie. Použili sme myelómovú líniu buniek Sp2/0. Bunky po fúzii sme rozplnili do 5-tich 96-jamkových doštičiek. Po 3 dňoch som k bunkám pridala geneticín a po ďalších 3 dňoch som ho odstránila. Kontrolovala som rast hybridómov a médium z jamiek, ktoré boli hybridómami zarastené som podrobila testovaniu.

5.1.3. TESTOVANIE HYBRIDÓMOV

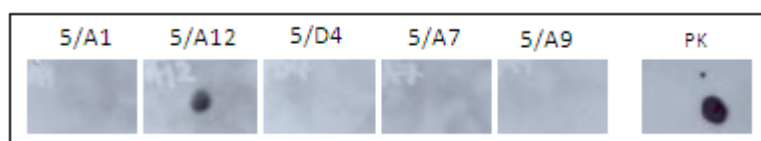
Ako antigén pre testovanie metódou Dot blot a Western blot som používala vyzolované prázdne VP1 pseudokapsidy. Pre testovanie prietokovým cytometrom som používala bunky Sf9 infikované rekombinantným bakulovírusom bac VP1 BKV. Pre testovanie imunofluorescenciou bol použitý antigén BK vírus, ktorým bola

infikovaná línia VERO buniek a potom aj RPTEC buniek. Prvé testovania boli robené metódou Dot blot, potom väčšinou už prietokovým cytometrom.

Získala som tieto pozitívne klony :

1. doštička- B4, B6, B8, D7, D9, E6, E8, E11, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, G5, G6, G7
2. doštička- A3, A4, A6, B3, B4, C2, C3, D3, E4, F4, H1, H2, H3, H5
3. doštička- A1, C3, D1, E1, G3
5. doštička- A4, A6, A7, A8, A9, A10, A12, B12, C8, D1, D2, D3, F1, F11, F12, G9, G10, G11, G12, H6, H7, H9, H10, H11, H12

U 4. doštičky bohužiaľ došlo ku kontaminácii a strate celej doštičky. S klonom 5/A12 z piatej doštičky na obr. 5.1.5 som ďalej pracovala.



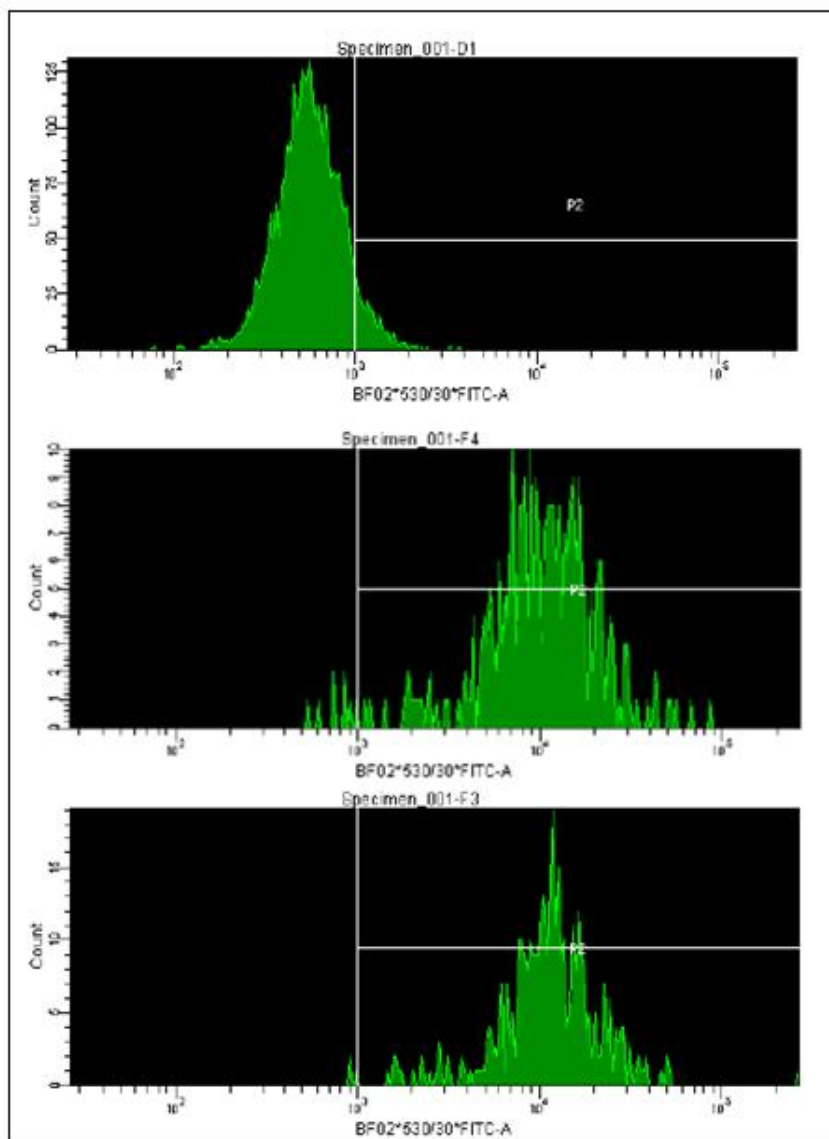
Obr.5.1.5: Príklad dot blot jednotlivých klonov, ako primárna protilátka použité média z hybridómov, na pozitívnu kontrolu králičia polyklonálna protilátka a sekundárna protilátka proti myším imunoglobulínom a sekundárna protilátka proti králičím imunoglobulínom. 5/A1 5/A12 5/D4 5/A7 5/A9

5.1.4. KLONOVANIE HYBRIDÓMOV

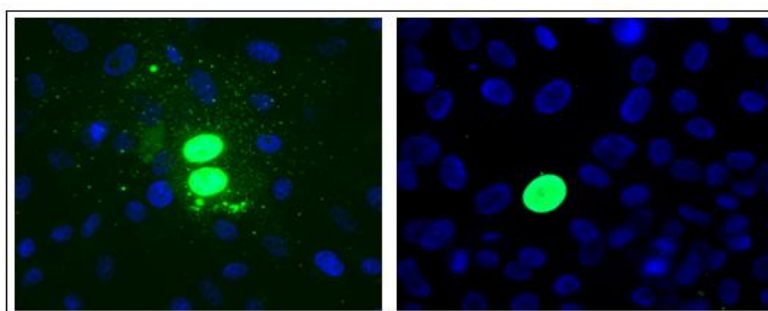
Pri pozitívnych kolóniách buniek bolo potrebné ich zase rozklonovať s cieľom získať pozitívne monokolonie. Vždy hybridómy z jednej jamky boli rozdelené do celého radu novej doštičky a riedené riediacou radou. Vo väčšine posledných jamiek sa už hybridómy nenachádzali. Zo všetkých vyššie uvedených klonov boli urobené kryokonzervy a niektoré z pozitívnych klonov boli ďalej klonované riedením na novú 96-jamkovú doštičku. Z pozitívneho klonu 5/A12, som získala pozitívne klony 5/A12/A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1 testované metódou Dot blot. Klon 5/A12/A1 bol ďalej klonovaný a boli urobené kryokonzervy. Boli klonované aj klony 5/A12/D1 a 5/A12/B1 ale ich ďalšie klony sa ukázali ako negatívne. Preto som pristúpila ku klonovaniu ďalších pôvodných pozitívnych klonov z prvej a piatej doštičky.

Okrem pôvodného 5/A12 som klonovala aj klon 1/D7 z ktorého som získala pozitívne 1/D7/B1, B3, B6, B8, B9, C2, C3, C7, D4, E5, F1, F2, F7, G1, G11, G12 a H1 testované prietokovým cytometrom (obr.5.1.6). Klon 1/D7/G11 bol ďalej klonovaný na novú doštičku, bohužiaľ celá doštička sa skontaminovala. Napokon som začala s

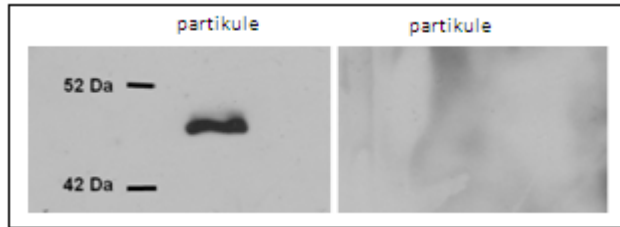
testovaním nových klonov z kryokonzerv 5/G10, G11, H6 a H9, z nich som nakoniec získala klony 5/G10/A5/B2/A8, 5/G10/A5/B2/H8, 5/G10/A5/B5. Protilátka 5/G10/A5/B2/A8 bola overená imunofluorescenciou s pozitívnym výsledkom (obr.5.1.7) a tiež použitá na Western blot avšak s negatívnym výsledkom (obr.5.1.8). Preto som ešte urobila Dot blot s denaturovaným antigénom, ktorý však potvrdil správnosť Western blotu, teda že protilátka nedetekuje denaturovaný antigén (obr.5.1.9). Protilátku som následne použila pre detekciu VP1 SV40 vírusu. 2 μ l koncentrovaného vírusu SV40 bolo aplikovaných na každý z dvoch štvorčekov nitrocelulózovej membrány a bola prevedená detekcia u jednej membrány hybridómovým médiom a u druhej membrány komerčnou protilátkou proti VP1 SV40. Výsledok detekcie hybridómovým médiom klonu 5/G10/A5/B2/A8 bol negatívny, čo značí špecificitu protilátky pre VP1 proteín BK vírusu (obr. 5.1.10).



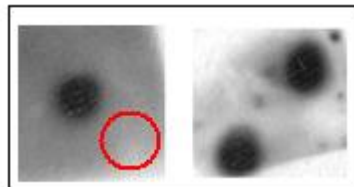
Obr. 5.1.6: Ukážka výsledkov z prietokového cytometra, hore negatívna kontrola - hmyzie bunky Sf9 infikované bac VP1 BKV, značené sekundárnou králičou protilátkou proti myším imunoglobulínom Alexa Fluor 488, s vynechaním primárnej protilátky. Obr. v strede a dole - pozitívne výsledky u jednotlivých klonov, primárnou protilátkou sú média z hybridómových jamiek a sekundárna protilátka oslej proti myším imunoglobulínom Alexa Fluor 488.



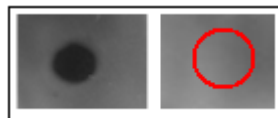
Obr. 5.1.7: Nepriama imunofluorescencia s použitím klonu 5/G10/A5/B2/8. Zorné pole s pozitívnymi signálmi s použitím primárnej hybridómovej protilátky 5/G10/A5/B2/8 proti VP1 BKV a sekundárnej oslej protilátky proti myším imunoglobulínom konjugovanej s Alexa Fluor 488 (riedená 1000 x) na VERO bunkách infikovaných BKV



Obr. 5.1.8: Western blot vzorky BKV VP1 parikulí. Vľavo pozitívny signál u partikulí s použitím primárnej králičej polyklonálnej protilátky proti VP1 BKV s použitím sekundárnej kozej protilátky proti myším imunoglobulínom, konjugovanej s HRP (riedená 1000 x) a vpravo negatívny signál s použitím primárnej hybridómovej protilátky 5/G10/A5/B2/8 proti VP1 BKV, s použitím sekundárnej kozej protilátky proti myším imunoglobulínom, konjugovanej s HRP.



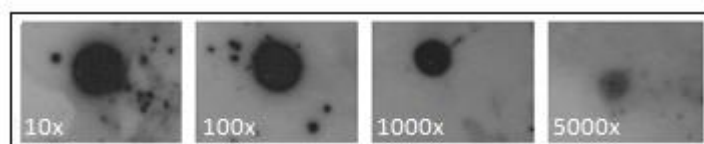
Obr.5.1.9: Dot blot pre detekciu natívneho a denaturovaného antigénu. Vpravo pozitívna kontrola s použitím denaturovaného (2 minúty povareného) aj nedenaturovaného antigénu, použitá primárna králičia polyklonálna protilátka a sekundárna kozia protilátka proti králičím imunoglobulínom konjugovaná s HRP. Vľavo pozitívny signál len u nedenaturovaného antigénu s použitím 5/G10/A5/B2/8. Červený krúžok označuje denaturovaný antigén.



Obr.5.1.10: Testovanie protilátky na reakciu s VP1 proteínom vírusu SV40. Vpravo negatívny signál pri použití hybridómovej protilátky 5/G10/A5/B2/8 pre vírus SV 40 s použitím sekundárnej kozej protilátky proti myším imunoglobulínom (v červenom krúžku), vľavo pozitívna kontrola použitím komerčnej myšej primárnej protilátky proti VP1 SV 40 vírusu (riedená 200 x) a kozia sekundárna protilátka proti myším imunoglobulínom konjugovaná s HRP (riedená 1000 x)

5.1.5. PURIFIKÁCIA PROTILÁTKY 5/G10/A5/B2/8

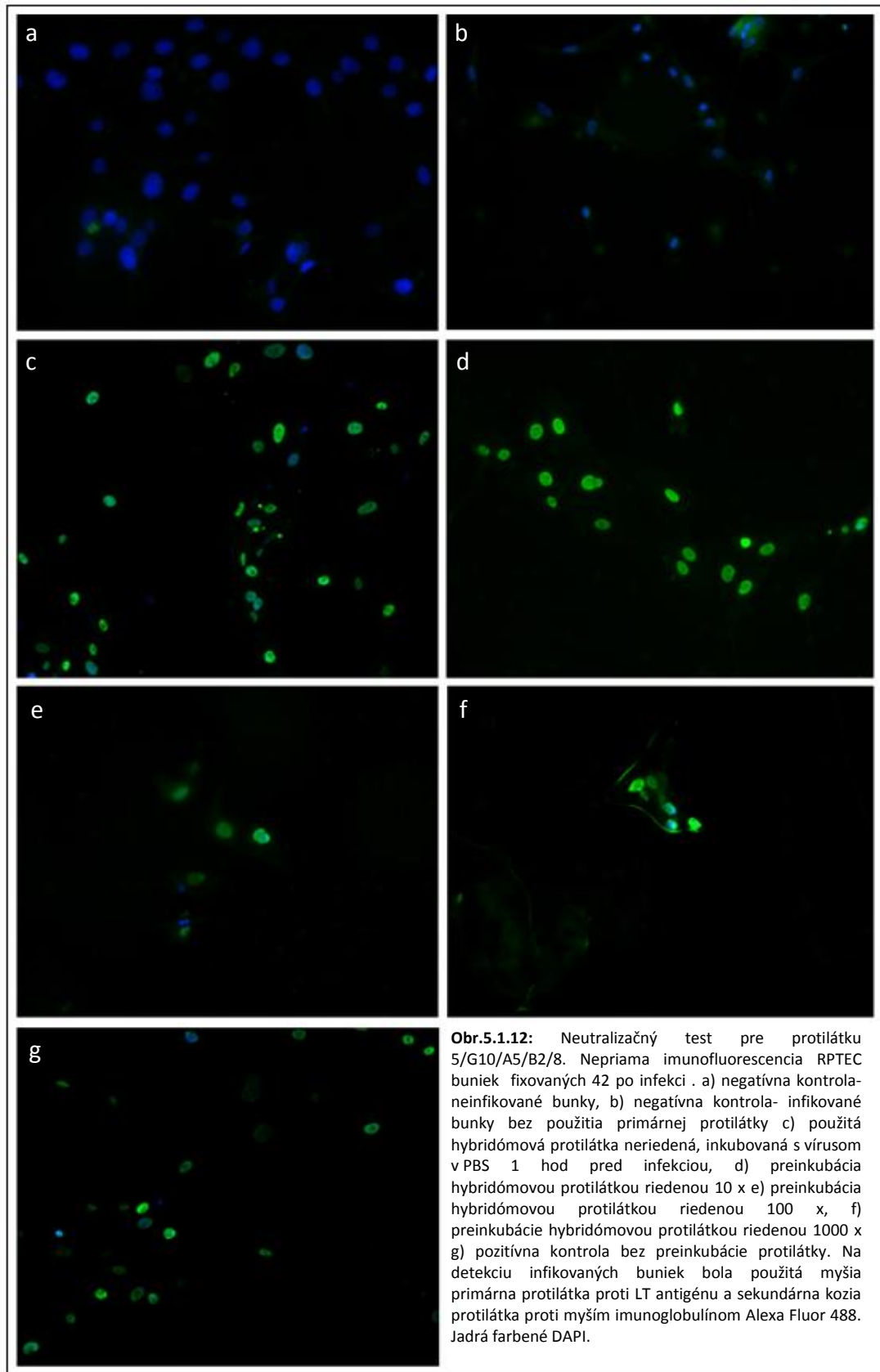
Získanú protilátku som purifikovala pomocou kolony HiTrap Protein G HP podľa priloženého návodu. Celkovo bolo na purifikáciu použitých 50 ml scentrifugovaného hybridómoveho média, z ktorého som získala 6 ml čistej protilátky. Urobila som Dot blot s riedením protilátky 10 x, 100 x, 1000 x a 5000 x, pričom pri všetkých riedeníach bol viditeľný pozitívny signál, znázornené na obr. 5.1.11.



Obr.5.1.11: Skúška sily protilátky riedením: zľava doprava riedenie 10 x, 100 x, 1000 x a 5000 x

5.1.6. NEUTRALIZAČNÝ TEST PROTILÁTKY

Pre budúce využitie protilátky bolo dobré zistiť či je protilátka neutralizujúca, t.z. či je schopná zabrániť naviazaniu a vstupu vírusu do bunky tým, že bráni interakcii VP1 proteínu s receptorom. Z toho dôvodu som urobila neutralizačný test na ľudských bunkách RPTEC (human renal proximal tubular epithelial cell). BK vírus bol najprv 1 hodinu pri izbovej teplote inkubovaný s protilátkou v riedení 10 x, 100 x, 1000 x a neriedenou protilátkou. Táto zmes vírusu a protilátky bola následne použitá na infekciu RPTEC buniek. Z výsledkov neutralizačného testu vyplýva, že protilátka neneutralizuje vírus (obr.5.1.12).



Po skontrolovaní schopnosti detekcie protilátky sme sa rozhodli vyskúšať protilátku pre detekciu viriónov BKV v bunkách konfokálnym mikroskopom.

5.1.7. VIZUALIZÁCIA VÍRUSU V BUNKÁCH DETEKČIOU VP1 PROTEÍNU MONOKLONÁLNOU PROTILÁTKOU PROTI VP1 PROTEÍNU BK VÍRUSU

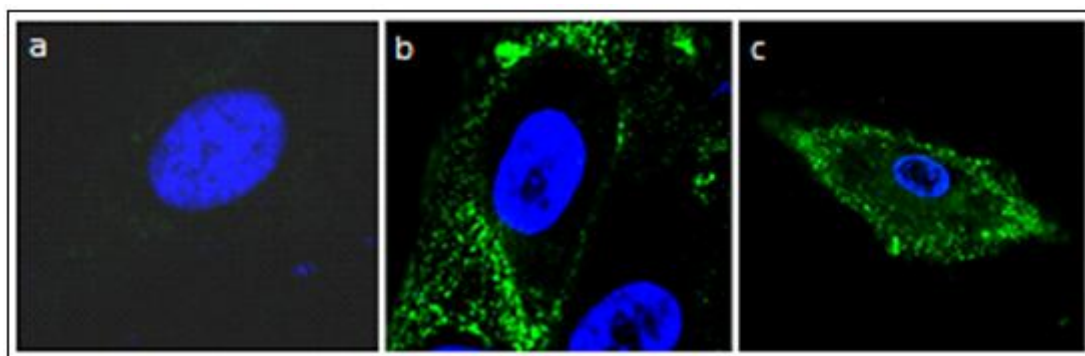
Keďže sme už pripravili monoklonálnu protilátku proti VP1 proteínu BK vírusu, chceli sme ju vyskúšať pre štúdium včasných fáz životného cyklu BK vírusu. Chceli sme zistiť mieru intracelulárnych kolokalizácií BK vírusu s kompartmentami buniek.

BK vírus bol vyzolovaný z RPTEC buniek infikovaných vírusom. Sú to primárne línie buniek z ľudských renálnych proximálnych mikrotubulov (RPTEC), ktoré sú prirodzene permissívne pre BK vírus. Vírus bol purifikovaný centrifugáciou cez vankúš 20% sacharózy, ultracentrifugovaný v rovnovážnom CsCl gradiente a rozdelený na frakcie. Frakcie obsahujúce vírus boli spojené a opäť zahustené centrifugáciou. Izoláciu BK vírusu robila Violeta Bakardijeva. Titer BK vírusu bol imunofluorescenciou stanovený na $6,0 \times 10^9$ infekčných viriónov na ml.

RPTEC bunky boli z konfluentne narastených \varnothing 6 cm misiek pasážované na sklíčka po 50 μ l bunkovej suspenzie do jamiek s vopred pripraveným médiom. Takto sa nechali do druhého dňa. Potom boli bunky synchronizované, t.j. 20 hodín pred samotnou infekciou im bolo vymenené médium za bezsérové.

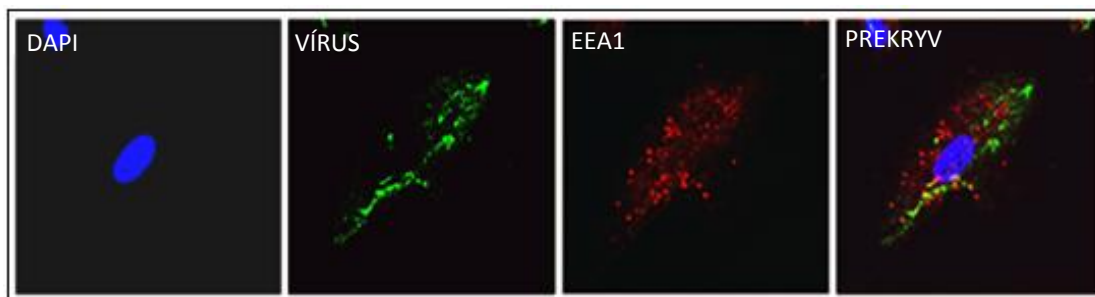
Infekcia prebiehala na ľade 40 minút, za ten čas sa vírus naadsorboval na bunky, médium s vírusom bolo odsaté a bolo pridané médium so sérom, doštička s bunkami bola uložená do termostatu. Tento čas sa rátal ako začiatok infekcie, $t=0$. Bunky boli po fixácii paraformaldehydom vysýtené roztokom želatiny a BSA v PBS. Proteíny boli následne imunologicky detekované značením primárnymi a sekundárnymi protilátkami. Mikroskopické sklíčka boli pinzetou vybraté z jamiek a uložené bunkovou stranou do glycerolu s DAPI a pozorované konfokálnym mikroskopom.

Najprv sme iba overili, či daná protilátka detekuje aj BKV virióny v bunkách (obr. 5.1.13).



Obr.5.1.13: Overenie protilátky proti VP1 proteínu BK vírusu konfokálnym mikroskopom. Zelené BK virióny značené myšou 5/G10/A5/B2/8 primárnou protilátkou proti VP1 BKV a kozou sekundárnou protilátkou proti myším imunoglobulínom konjugovanou s Alexa Fluor 488. Modrá DNA značená DAPI a) RPTec bunky neinfikované, b) a c) infikované bunky

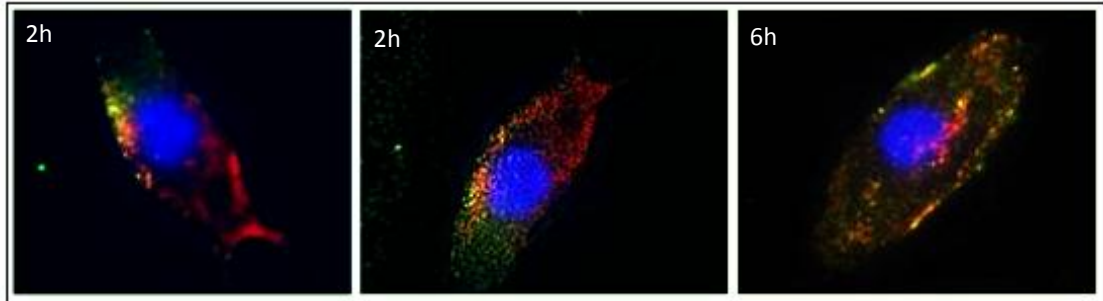
Potom sme vyskúšali dvojité značenie s použitím prtilátky proti markerom včasných endozómov EEA1. Bunky boli fixované 2 hodiny po infekcii a proteíny boli imunofluorescenčne značené vytvorenou primárnou monoklonálnou protilátkou proti VP1 proteínu BK vírusu a kozou primárnou protilátkou proti včasným endozómom (EEA1). Výsledky sú znázornené na obr. 5.1.14. Z obrázku je viditeľná iba čiastočná kolokalizácia BKV viriónov so včasnými endozómami. Bude potrebné vyskúšať viacero časov po infekcii k detekcii kolokalizácie BKV s týmto kompartmentom.



Obr.5.1.14: Kolokalizácia BKV a marker včasných endozómov EEA1. Bunky infikované 500 ffu/bunku, fixované 2 hodiny po infekcii. Modrá DAPI, zelená vírus značený myšou 5/G10/A5/B2/8 primárnou protilátkou proti VP1 BKV a oslou sekundárnou protilátkou proti myším imunoglobulínom konjugovanou s Alexa Fluor 488, červená EEA1 značené kozou primárnou protilátkou a sekundárnou oslou protilátkou proti kozím imunoglobulínom konjugovanou s Alexa Fluor 546. Konfokálny rez bunkou.

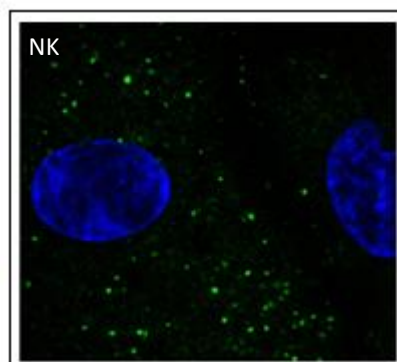
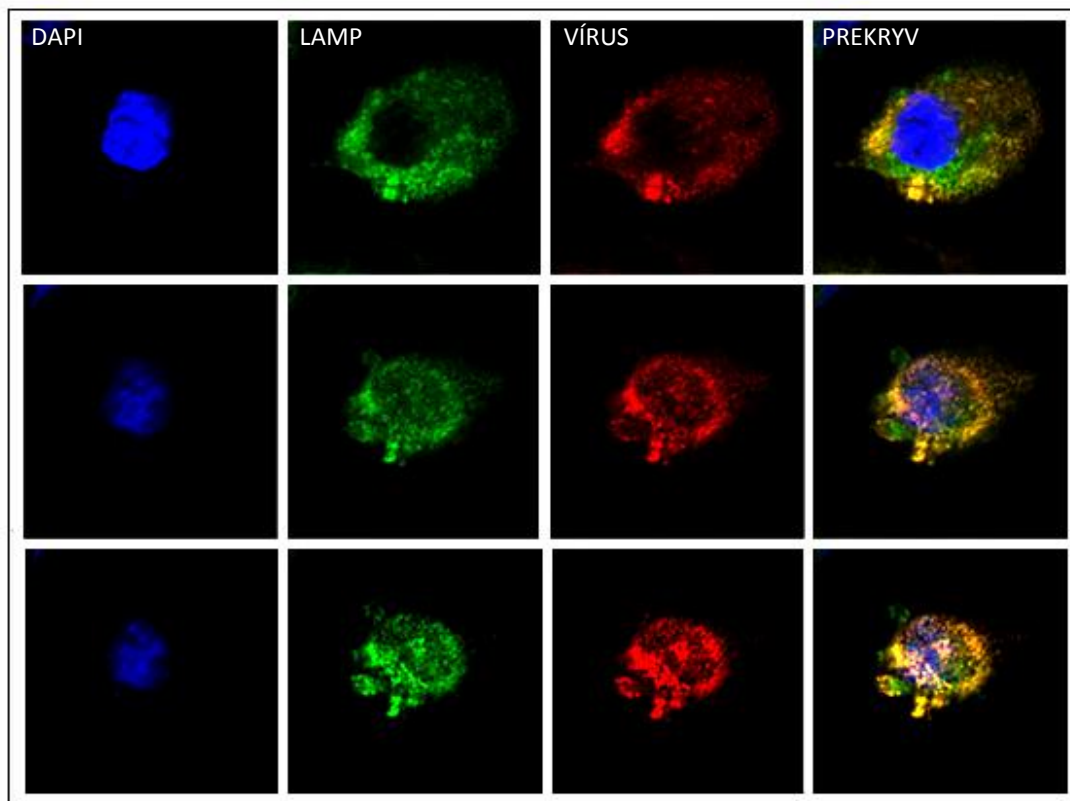
Ďalej sme vyskúšali dvojité značenie s použitím králičej primárnej protilátky proti caveolinu. Zvolili sme dva časy po infekcii, 2 hodiny a 6 hodín, aby sme videli či vírus kolokalizuje s endozómami odvodenými od caveolae a zaujímalo nás, či uvidíme kolokalizáciu s vačkami odvodenými od caveolae a tiež väčšie endozómy bohaté na caveolín. Výsledky sú znázornené na obr. 5.1.15. Z obrázkov je zrejماً kolokalizácia

BKV s endozómami bohatými na caveolin, ako v blízkosti membrán, tak aj hlbšie v bunkách. Je zaujímavé, že nie je viditeľný príliš veľký rozdiel v lokalizácii vírusu v dvoch zvolených časoch. Pokusy bude potrebné zopakovať sledovaním vírusu v rôznych časoch po infekcii. Aby sa predišlo dodatočnej infekcii, bude treba vírus odmyť ihneď po internalizácii neutralizačnou protilátkou, ktorú zatiaľ nemáme.



Obr.5.1.15: Kolokalizácia BKV a caveolinu RPTEC bunkách fixovaných po 2 a 6 hodinách po infekcii, značené myšou 5/G10/A5/B2/8 primárnou protilátkou proti VP1 proteínu BK vírusu (zelená) a králičou primárnou protilátkou proti caveolinu (červená). Modrá DAPI. Použité boli kozia sekundárna protilátka proti myším imunoglobulínom a kozia sekundárna protilátka proti králičím imunoglobulínom. Multiplicita infekcie 350 ffu/bunku. Konfokálne rezy rôznymi bunkami.

Ďalej nás zaujímalo, či BK vírus vstupuje do pozdných endozómov a lyzozómov. Chceli sme vidieť kolokalizáciu BK vírusu s proteínmi asociovanými s membránami lyzozómov (LAMP- lysosome associated membrane proteins). Avšak overením komerčnej potkanej protilátky proti LAMP2 sa zistilo, že nedostatočne detekuje LAMP. Preto sme boli nútení použiť ďalšiu jedinou dostupnú myšiu polyklonálnu protilátku proti LAMP1. V tomto prípade sme nemohli použiť novovytvorenú myšiu protilátku proti VP1 BKV. Na pozorovanie kolokalizácií BK vírusu s membránovými proteínmi asociovanými s lyzozómami 3 hodiny po infekcii, boli teda použité: králičia primárna protilátka proti VP1 proteínu BK vírusu a myšia primárna protilátka proti LAMP, kozia sekundárna protilátka proti králičím imunoglobulínom konjugovaná s Alexa Fluor 546 a oslia sekundárna protilátka proti myším imunoglobulínom konjugovaná s Alexa Fluor 488. Na obr. 5.1.16 je znázornená kolokalizácia VP1 BKV s LAMP. Z fotografií konfokálneho mikroskopu je viditeľná vysoká miera kolokalizácie BK vírusu s LAMP, z čoho vyplýva, že vírus vstupuje masívne do pozdných endozómov.

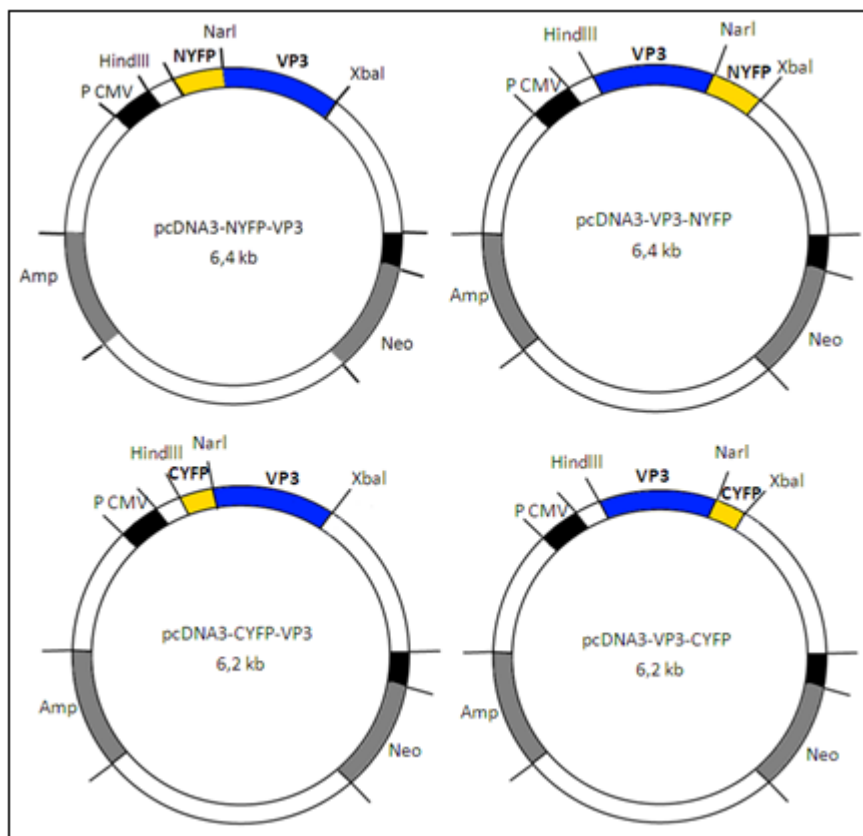


Obr.5.1.16: Kolokalizácia BKV s markerom lyzozómov. Bunky fixované 3hodiny po infekci 1000 ffu/bunku. Modrá farbená DAPI, zelené- farbené LAMP- marker lyzozómov, červená- VP1 proteín BK vírusu. Jednotlivé rezy bunkou, NK - negatívna kontrola neinfikované bunky s použitím oboch primárnych aj sekundárnych protilátok-pozitívny signál iba u detekcie lyzozómov v bunke

Ďalej bude potrebné zistiť, či vstup do lyzozomálneho kompartmentu je nutný pre prouktivnu infekciu BKV, alebo či vírus, ktorý sa do lyzozómov dostane skončí degradáciou.

5.2. PRÍPRAVA EXPRESNÝCH PLAZMIDOV PRE PRODUKCIU MINORITNÉHO ŠTRUKTÚRNEHO PROTEÍNU VP3 FÚZOVANÉHO S N- A C- KONCOVÝMI ČASŤAMI EYFP PRE ŠTÚDIUM OLIGOMERIZÁCIE MINORITNÝCH PROTEÍNOV U MYŠIEHO POLYOMAVÍRUSU

Pre štúdium oligomerizácie minoritných proteínov sme sa rozhodli vytvoriť expresné plazmidy pre produkciu minoritného štruktúrneho proteínu VP3, fúzovaného s N-terminálnou časťou EYFP v oboch orientáciách, to znamená na N- aj na C- konci VP3. Tak isto aj VP3 fúzovaný s C-terminálnou časťou v oboch orientáciách. Po vytvorení týchto plazmidov by bolo možné študovať, prípadne dokázať oligomerizáciu minoritného proteínu na membránach ER. Následne by bolo možné cez vklonované miesta pre restriktčné enzýmy vyskúšať túto schopnosť oligomerizácie aj u VP2 proteínu a potom to použiť aj na ostatné polyomavírusy. Pri koexpresii plazmidov v bunke by v prípade oligomerizácie malo dôjsť k rekonštitúcii žltého fluorescenčného proteínu, čo by malo byť následne detekovateľné mikroskopom. Zo sterických dôvodov bol medzi fúzne proteíny VP3 a časti N/CYFP vložený linker. Mali teda vzniknúť 4 konštrukty VP3 fúzované s N-koncovou časťou YFP na N- aj C- konci VP3 proteínu a VP3 fúzované s C-koncovou časťou YFP tiež na N- aj na C- konci, vložené do vektoru pcDNA3, ktorý obsahuje ako HindIII, tak aj XbaI štiepne miesta v tomto usporiadaní. Mali teda vzniknúť plazmidy nazvané: **pcDNA3-NYFP-VP3**, kde N-koncová časť YFP je fúzovaná na N- koniec VP3 proteínu, **pcDNA3-VP3-NYFP**, kde N-koncová časť YFP je fúzovaná na C- koniec VP3, **pcDNA3-CYFP-VP3**, kde C-terminálna časť je fúzovaná k N- konci VP3 proteínu a **pcDNA3-VP3-CYFP**, kde C-koncová časť YFP je pripojená k C- konci VP3 proteínu. Schémy všetkých štyroch konštruktov sú na obr. 5.2.1.

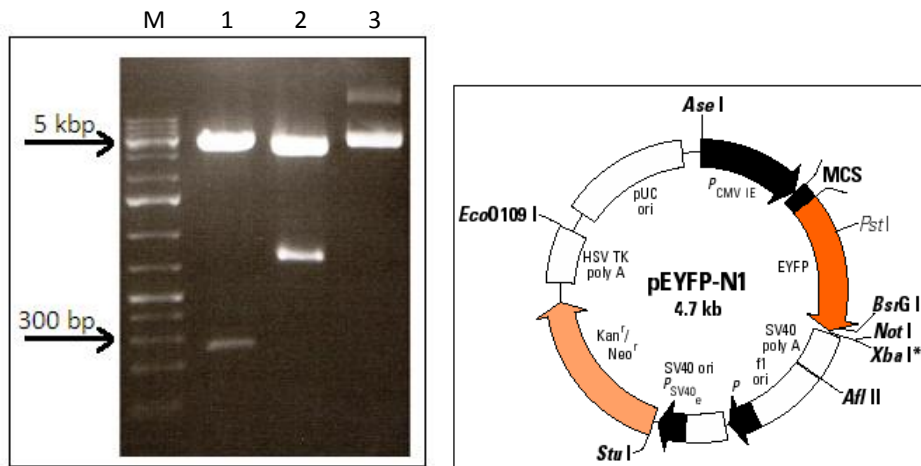


Obr. 5.2.1: Schéma štyroch konštruktov pre BiFC metódu. Hore vľavo pcDNA3-NYFP-VP3, kde N-koncová časť YFP je fúzaná na N-konci VP3 proteínu, 2. konštrukt hore vpravo pcDNA3-VP3-NYFP, kde N-koncová časť YFP je fúzaná na C-konci VP3, 3. konštrukt dole vľavo pcDNA3-CYFP-VP3, kde C-terminálna časť je fúzaná k N-konci VP3 proteínu a 4. konštrukt dole vpravo pcDNA3-VP3-CYFP kde C-koncová časť YFP je pripojená k N-konci VP3 proteínu. Znázornené sú štiepne miesta pre HindIII, NarI a XbaI.

5.2.1. PLAZMIDY pEYFP-N1 A pcDNA3+

Pre získanie a naklonovanie fragmentov žltého fluorescenčného proteínu bol použitý plazmid pEYFP-N1 (obr. 5.2.2).

Plazmid pEYFP-N1 bol vyzolovaný z kultúry baktérií vo výslednom množstve 600 μ l o koncentrácii 224ng/ μ l. Čistota plazmidovej DNA meraná pomerom absorbancií $A_{260}/A_{230} = 2,24$ a $A_{280}/A_{260} = 1,9$.



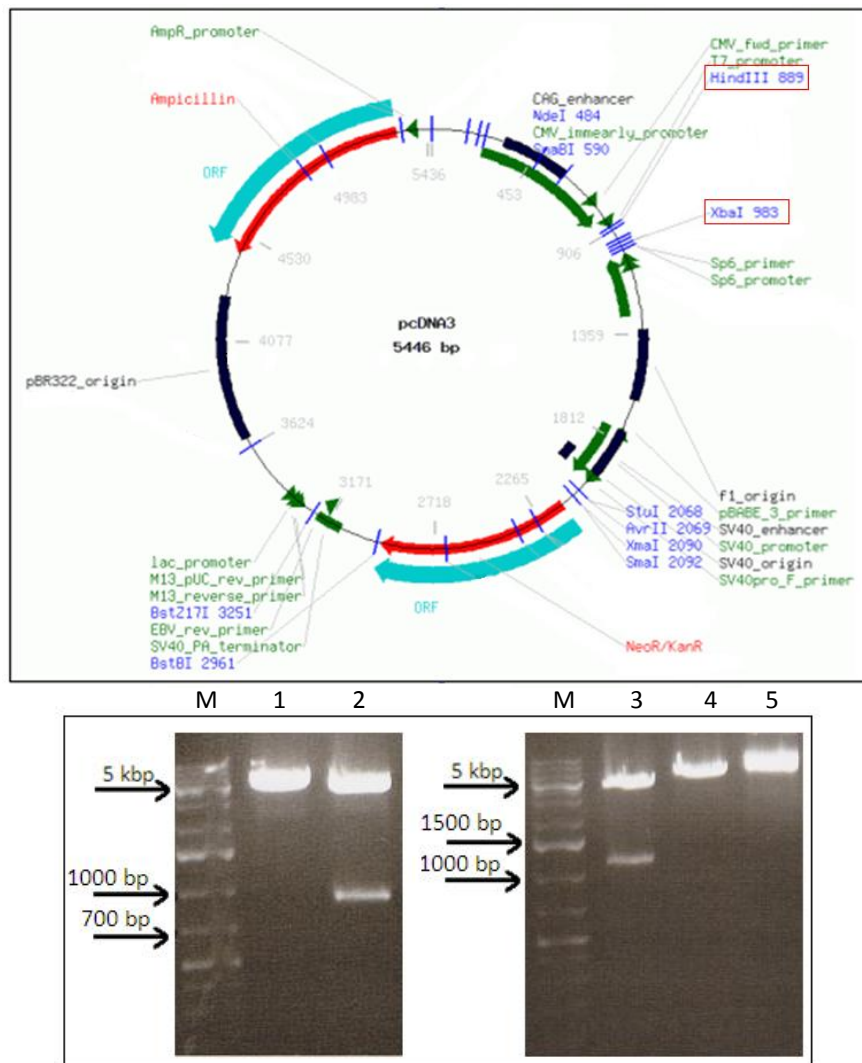
Obr. 5.2.2: Zjednodušená mapa plazmidu nesúceho gén pre EYFP proteín s vyznačeným cytomegalovírusovým promótorom na začiatku- 1-589 bp, MCS (multiple cloning site)- 591-671 bp, gén pre žltý fluorescenčný proteín- 679-1398, SV40 polyadenylačný signál, SV40 origin replikácie, SV40 promótor a gén pre kanamycínovú rezistenciu.

Vľavo overenie pEYFP-N1 plazmidu: M-marker veľkosti fragmentov, 1. plazmid štiepený PstI-fragment o veľkosti 252 bp a 4,5 kb, 3. plazmid štiepený NotI a Sall, vyštiepený fragment o veľkosti 760 bp a 4 kbp, 4. neštiepený plazmid o veľkosti 4,7 kbp.

Pre PCR reakcie k získaniu dvoch fragmentov YFP s pripojenými miestami pre restriktčné enzýmy boli navrhnuté primery uvedené v kap. 5.2.2. Primery boli navrhnuté tak, aby bol YFP proteín rozdelený na fragmenty NYFP- 1-154 aminokyselín a CYFP- 155-238, v pEYFP to zodpovedá NYFP- 680-1140 nt, CYFP- 1141-1404 nt.

Ako cieľový vektor bol vybraný pcDNA3+, ktorý obsahuje CMV promótor a polylinker (MCS) s miestami pre restriktčný enzým HindIII na pozícii 889 a miesto pre restriktčný enzým XbaI na pozícii 983. Medzi tieto dva restriktčné miesta boli vkladané vždy dva fragmenty N- alebo C- fragment YFP a VP3 proteínu naraz (ale vždy v rôznych orientáciách).

pcDNA3 bol vyzolovaný maxiizoláciou v celkovom množstve 500 μ l o koncentrácii 2367 ng/ μ l. Vzorky plazmidovej DNA 10 x riedenej mali pomer absorbancií A_{280}/A_{260} 1,9 a A_{260}/A_{230} 2,03. Po štiepení restriktčným enzýmom HindIII bol plazmid čistený fenol- chloroformovou metódou podľa kap. 4.2.9.5. Po nasledujúcom štiepení restriktčným enzýmom XbaI bol vektor zase čistený a výsledná koncentrácia bola 81 ng/ μ l s indexom čistoty A_{280}/A_{260} 1,84 a A_{260}/A_{230} 2,28.



Obr. 5.2.3: Schéma expresného plazmidu pcDNA3. Overenie pcDNA3 po izolácii: M- marker veľkosti fragmentov, 1. linearizovaný plazmid štiepený XbaI, 2. plazmid štiepený HindIII a BgIII- vyštiepený fragment o veľkosti 877 bp, 3. plazmid štiepený XbaI a SmaI, vyštiepený fragment o veľkosti 1109 bp, 4. linearizovaný plazmid štiepený HindIII, 5. neštiepený plazmid

5.2.2. NÁVRH PRIMEROV PRE PCR FRAGMENTY

Pre väčšiu prehľadnosť primerov sú uvádzané po dvojiciach, jedna dvojica slúžila vždy na PCR amplifikáciu jedného fragmentu.

- ❖ dvojica primerov navrhnutá pre vytvorenie fragmentu **HindIII-NYFP-NarI**, teda N-koncovkej časti YFP na N-konci so štiepnym miestom pre HindIII a na C-konci s vloženou časťou linkeru, v ktorom je obsiahnuté štiepne miesto pre NarI:

HindIII-NYFP-F: forward primer navrhnutý pre vloženie štiepneho miesta pre HindIII sense reťazca na 5`konci:

5`- CTCGA AAG CTI C GCC ACC ATG GTG AGC AAG

Žltým je vyznačená komplementárna časť ku začiatku YFP v pEYFP-N1 plazmide, pričom ATG kodón značí začiatok YFP proteínu, podtrhnuté je štiepne miesto pre HindIII, pričom jeho koncový tymín je už súčasťou komplementárnej časti plazmidu pEYFP-N1, v žltó vyznačenej časti je obsiahnutá aj Kozakova konsenzus sekvencia

NarI-NYFP-R: reverse primer navrhnutý pre vytvorenie časti linkeru s vloženým štiepnym miestom pre NarI antisense reťazca na 5`konci:

5`- CTCGA GGC GCC GCC TGA ACC GCT **CAT GAT ATA GAC GTT GTG GCT G**

Žltým je opäť vyznačená časť komplementárna ku koncu NYFP v pEYFP-N1 plazmide, podtrhnuté je štiepne miesto pre NarI

- ❖ dvojica primerov navrhnutá pre vytvorenie fragmentu **NarI-VP3-XbaI**, teda VP3 proteínu na N-konci s časťou linkeru, v ktorom je obsiahnuté štiepne miesto pre NarI a na C-konci s vloženým štiepnym miestom pre XbaI:

NarI-VP3-F: forward primer navrhnutý pre vytvorenie časti linkeru so štiepnym miestom pre NarI sense reťazca na 5`konci:

5`- CTCGA GGC GCC TCT GGG TCT GGC **ATG GCG TTG ATA CCA TGG C**

Modrým vyznačená je komplementárna časť k začiatku VP3 proteínu v plazmide pMJG, podtrhnuté je štiepne miesto pre NarI obsiahnuté v linkeru

XbaI-VP3-R: reverse primer navrhnutý pre vloženie štiepneho miesta pre XbaI antisense reťazca na 5`konci:

5`- CTCGA TCT AGA **TTA GAG ACG CCG CTT TTT C**

Modrým vyznačená je komplementárna časť ku koncovej časti VP3 proteínu v plazmide pMJG so stop kodómom, podtrhnuté je štiepne miesto pre XbaI

- ❖ dvojica primerov navrhnutá pre vytvorenie fragmentu **HindIII-CYFP-NarI**, teda C-koncovej časti YFP na N-konci s vloženým štiepnym miestom pre HindIII a na C-konci s vloženým linkerom obsahujúcim štiepne miesto pre NarI:

HindIII-CYFP-F: forward primer navrhnutý pre vloženie štiepneho miesta HindIII sense reťazca na 5`konci:

5`- CTCGA AAG CTT C GCC ACC **ATG GCC GAC AAG CAG AAG**

Žltým je vyznačená časť komplementárna ku začiatku CYFP v pEYFP-N1 plazmide, vložená je Kozakova konsenzus sekvencia, podtrhnuté je štiepne miesto pre HindIII

Narl-CYFP-R: reverse primer navrhnutý pre vytvorenie linkeru s vloženým štiepnym miestom pre Narl antisense reťazca na 5`konci:

5`- CTCGA GGC GCC TGA ACC GCT **CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC**

Žltým je vyznačená časť komplementárna ku koncu CYFP proteínu v pEYFP plazmide bez stop kodónu, podtrhnuté je štiepne miesto pre Narl obsiahnuté v linkeri

- ❖ dvojica primerov navrhnutá pre vytvorenie fragmentu **HindIII-VP3-Narl**, teda VP3 proteínu na N-konci s vloženým štiepnym miestom pre HindIII a na C-konci s linkerom s obsiahnutým štiepnym miestom pre Narl:

Hind-VP3-F: forward primer navrhnutý pre vloženie štiepneho miesta pre HindIII sense reťazca na 5`konci:

5`- CTCGA AAG CTT C GCC ACC **ATG GCG TTG ATA CCA TGG CG**

Modrým je znázornená komplementárna časť začiatku VP3 proteínu v pMJG plazmide, podtrhnuté je štiepne miesto pre HindIII, vložená je Kozakova konsenzus sekvencia

Narl-VP3-R: reverse primer navrhnutý pre vytvorenie linkera s vloženým štiepnym miestom pre Narl antisense reťazca na 5`konci:

5`- CTCGA GGC GCC GCC TGA ACC GCT **GAG ACG CCG CTT TTT CTT TTG**

Modrým je znázornená komplementárna časť ku koncu VP3 proteínu v pMJG plazmide bez stop kodónu, podtrhnuté je štiepne miesto pre Narl obsiahnuté v linkeri

- ❖ dvojica primerov navrhnutá pre vytvorenie fragmentu **Narl-NYFP-XbaI**, teda N-koncovej časti YFP s linkerom s vloženým štiepnym miestom pre Narl na N-konci YFP proteínu a vloženým štiepnym miestom pre XbaI na C-konci proteínu:

Narl-NYFP-F: forward primer navrhnutý pre vytvorenie linkeru so štiepnym miestom pre Narl sense reťazca na 5` konci:

5`- CTCGA GGC GCC TCT GGG TCT GGC **ATG GTG AGC AAG GGC GAG**

Žltým vyznačená je časť komplementárna ku začiatkovej časti NYFP proteínu v pEYFP-N1 plazmide, podtrhnuté je štiepne miesto pre Narl

XbaI-NYFP-R: reverse primer navrhnutý pre vloženie štiepneho miesta pre XbaI antisense reťazca na 5` konci:

5`- CTCGA TCT AGA **TTA CAT GAT ATA GAC GTT GTG GC**

Žltým je vyznačená časť komplementárna ku koncu NYFP proteínu v pEYFP-N1 plazmide s vloženým stop kodónom, podtrhnuté je štiepne miesto pre XbaI

- ❖ dvojica primerov navrhnutá pre vytvorenie fragmentu **NarI-CYFP-XbaI**, teda C-koncovej časti YFP proteínu s linkerom s obsiahnutým štiepnym miestom pre NarI na N-konci a s vloženým štiepnym miestom pre XbaI na C-konci proteínu:

NarI-CYFP-F: forward primer navrhnutý pre vytvorenie linkeru s vloženým štiepnym miestom pre NarI sense reťazca na 5' konci:

5'- GTCGA GGC GCC GGA TCT GGG TCT **GCC GAC AAG CAG AAG AAC**

Žltým je vyznačená časť komplementárna ku začiatku CYFP proteínu v pEYFP-N1 plazmide, podtrhnuté je štiepne miesto pre NarI

XbaI-CYFP-R: reverse primer navrhnutý pre vloženie štiepneho miesta pre XbaI antisense reťazca na 5' konci:

5'- CTCGA TCT AGA **TTA CTT GTA CAG CTC GTC C**

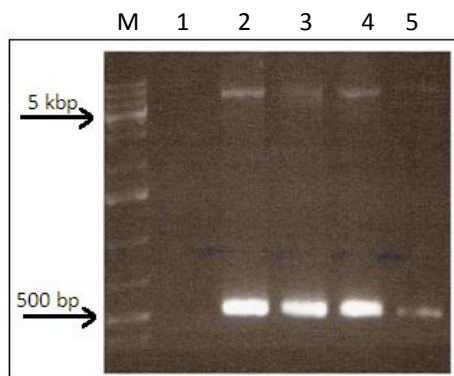
Žltým je vyznačená časť komplementárna ku koncu CYFP proteínu v pEYFP-N1 plazmide so stop kodónom, podtrhnuté je štiepne miesto pre XbaI.

Primery boli navrhnuté tak, aby bol medzi VP3 a N-koncový alebo C-koncový fragment YFP proteínu vložený linker pozostávajúci zo ser-gly-ser-gly-gly-ala-ser-gly-ser-gly, ktoré obsahovalo vložené štiepne miesto pre Nar I restriktčný enzým vyznačené modrým:

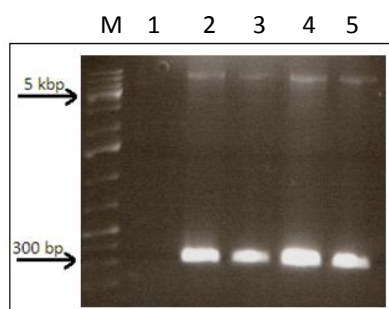
AGC GGT TCA GGC **GGC GCC** TCT GGG TCT GGC

5.2.3. AMPLIFIKÁCIE DNA PRE VYTVORENIE JEDNOTLIVÝCH FRAGMENTOV

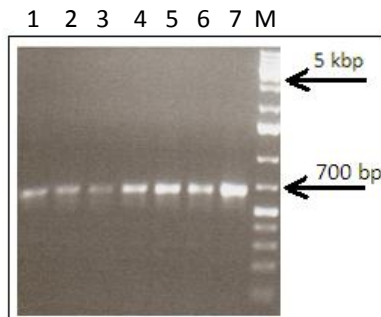
Na vytvorenie dostatočného množstva materiálu boli niekoľkokrát opakované polymerázové reťazové reakcie pre jednotlivé fragmenty s použitím konkrétnych primerov uvedených v kap. 5.2.2. Ako negatívne kontroly, boli vždy použité vzorky, u ktorých miesto templátovej DNA bolo do PCR mikroskúmavky pridané rovnaké množstvo vody. Elektroforézy z jednotlivých amplifikácií sú uvedené na nasledujúcich obrázkoch (obr. 5.2.4- 5.2.9).



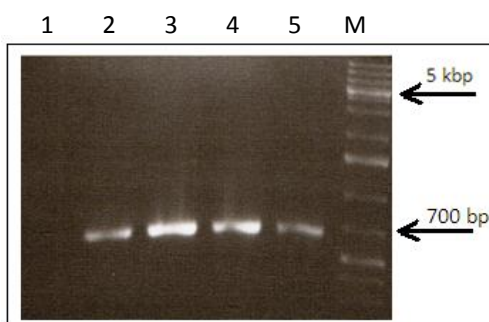
Obr. 5.2.4: Elektroforéza po amplifikácii fragmentu HindIII-NYFP-NarI, použité primery HindIII-NYFP-F a NarI-NYFP-R, fragment veľký 501 bp, M-marker veľkosti fragmentov, 1.negatívna kontrola PCR s použitím vody miesto templátu, 2.3.4. a.5 sú fragmenty HindIII-NYFP-NarI



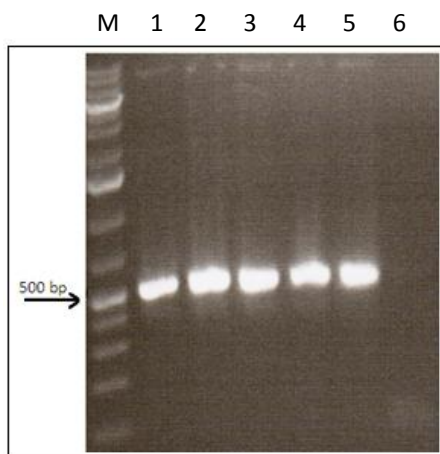
Obr. 5.2.5: Elektroforéza po amplifikácii fragmentu NarI-CYFP-XbaI, veľkosť fragmentu 297 bp, použité primery NarI-CYFP-F a XbaI-CYFP-R, M-marker veľkosti fragmentov, 1. negatívna kontrola- bez templátovej DNA, 2.3.4. a 5. sú fragmenty NarI-CYFP-XbaI



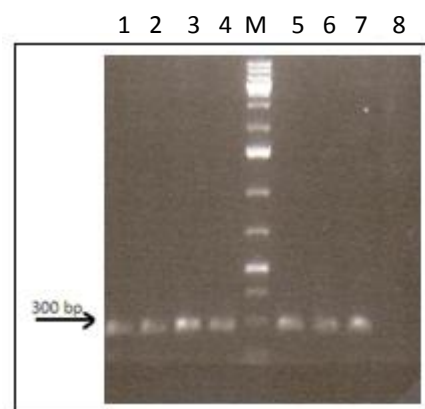
Obr.5.2.6: Elektroforéza po PCR fragmentu NarI-VP3-XbaI, veľkosť 649 bp, použité primery NarI-VP3-F a XbaI-VP3-R, 1.2.3.4.5.6 a 7. sú fragmenty NarI-VP3-XbaI, M-marker veľkosti fragmentov



Obr.5.2.7: Elektroforéza po PCR fragmentu HindIII-VP3-NarI, veľkosť 656 bp, použité primery HindIII-VP3-F a NarI-VP3-R, 1. negatívna kontrola- bez DNA, 2.3.4. a 5. sú fragmenty HindIII-VP3-NarI, M-marker veľkosti fragmentov



Obr.5.2.8: Elektroforéza po PCR fragmentu NarI-NYFP-XbaI, veľkosť 497 bp, použité primery NarI-NYFP-F a XbaI-NYFP R, M-marker veľkosti fragmentov, 1.2.3.4 a .5. sú fragmenty NarI-NYFP-XbaI, 6.negatívna kontrola- bez DNA



Obr.5.2.9: Elektroforéza po PCR fragmentu HindIII-CYFP-NarI, veľkosť 297 bp, použité primery HindIII-CYFP-F a NarI-CYFP-R, 1.2.3.4.5.6. a 7 sú fragmenty HindIII-CYFP-NarI, 8. negatívna kontrola- bez DNA M-marker veľkosti fragmentov

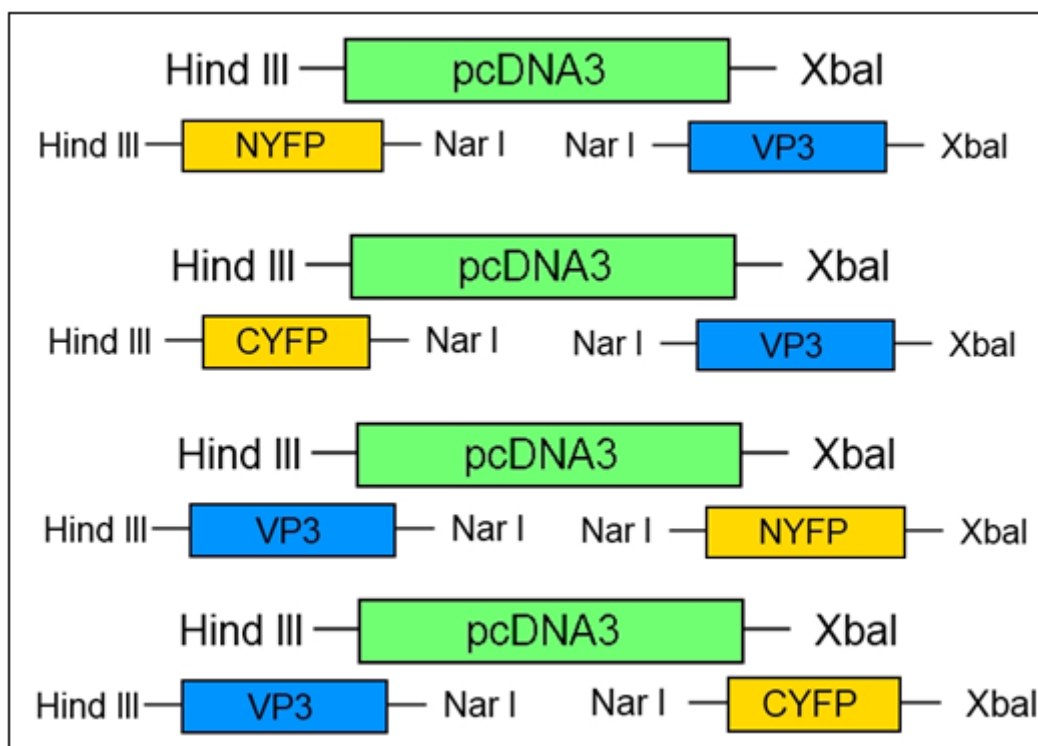
Postupne boli naklonované všetky fragmenty, jednotlivé PCR reakcie pre naklonovanie jedného fragmentu boli spojené, prezrážané a koncentrácia bola zmeraná na nanodrope. Výsledky sú zobrazené v nasledujúcej tabuľke.

fragment	veľkosť	koncentrácia	pomer 260/230	pomer 280/260
HindIII-NYFP-NarI	501 bp	2312 ng/μl	2,26	1,8
HindIII-CYFP-NarI	301 bp	516 ng/μl	2,11	1,72
NarI-CYFP-XbaI	297 bp	472 ng/μl	1,98	1,76
NarI-NYFP-XbaI	497 bp	900 ng/μl	2,18	1,73
NarI-VP3-XbaI	649 bp	2439 ng/μl	2,23	1,75
HindII-VP3-NarI	656 bp	216 ng/μl	2,14	1,76

Tab.5.2.10: Názvy fragmentov s hodnotami koncentrácie v ng/μl a čistoty vzorky DNA vyjadrenej pomerom A_{280}/A_{260} a A_{260}/A_{230} .

5.2.4. LIGAČNÉ ZMESI A MINIPREPARÁCIE DNA Z BAKTERIÁLNYCH KOLÓNII

Po získaní dostatočného množstva materiálu, boli jednotlivé fragmenty na koncoch poštiepené konkrétnymi enzýmami a tieto fragmenty boli potom použité na ligáciu spolu s vektorom. Vždy boli použité dva fragmenty a vektor, teda VP3 proteín a buď C-terminálny alebo N-terminálny fragment YFP:



Obr. 5.2.11: Prehľad fragmentov a vektoru vkladných do jednotlivých ligačných zmesí.

Oba vkladné fragmenty by sa mali spojiť cez Nar I miesto a s vektorom sa zaligovať cez HindIII a Xba I.

Ligačná zmes bola vnášaná do bakteriálneho kmeňa XL-1 Blue elektroporáciou podľa protokolu uvedeného v kap. 4.2.7.4. Baktérie boli po hodinovej inkubácii v trepačke vysiate na agarózové misky vždy po 10 μ l, 100 μ l a zvyšok. Narastené bakteriálne kolónie po cca 16 hodinách v termostate pri 37°C, ďalej boli prečiarkované na nové misky a zaočkované do 700 μ l živného bujónu v mikroskúmavke. Potom bola minipreparáciami získavaná DNA, ktorá bola testovaná restriktčným štiepením enzýmami HindIII a Xba I. Pri správnom zaklonovaní

sa mal vyštiepiť fragment zodpovedajúci súčtu veľkosti dvoch fragmentov, teda VP3 a N-koncovej alebo C-koncovej časti žltého fluorescenčného proteínu.

5.2.4.1. LIGAČNÉ ZMESI

Na ligáciu pre elektroporáciu fragmentov HindIII-NYFP-NarI a NarI-VP3-XbaI spolu s vektorom pcDNA3 boli použité nasledujúce množstvá:

400 ng vektoru pcDNA3

130 ng HindIII-NYFP-NarI

140 ng NarI-VP3-XbaI

Na ligáciu pre elektroporáciu fragmentov HindIII-VP3-NarI a NarI-CYFP-XbaI s vektorom pcDNA3 boli použité nasledujúce množstvá:

400 ng vektoru pcDNA3

141 ng HindIII-VP3-NarI

61,3 ng NarI-CYFP-XbaI

Na ligáciu pre elektroporáciu fragmentov HindIII-VP3-NarI a NarI-NYFP-XbaI s vektorom pcDNA3 boli použité nasledujúce množstvá:

400 ng pcDNA3

141 ng HindIII-VP3-NarI

106,5 ng NarI-NYFP-XbaI

Na ligáciu pre elektroporáciu fragmentov HindIII-CYFP-NarI a NarI-VP3-XbaI s vektorom pcDNA3 boli použité nasledujúce množstvá:

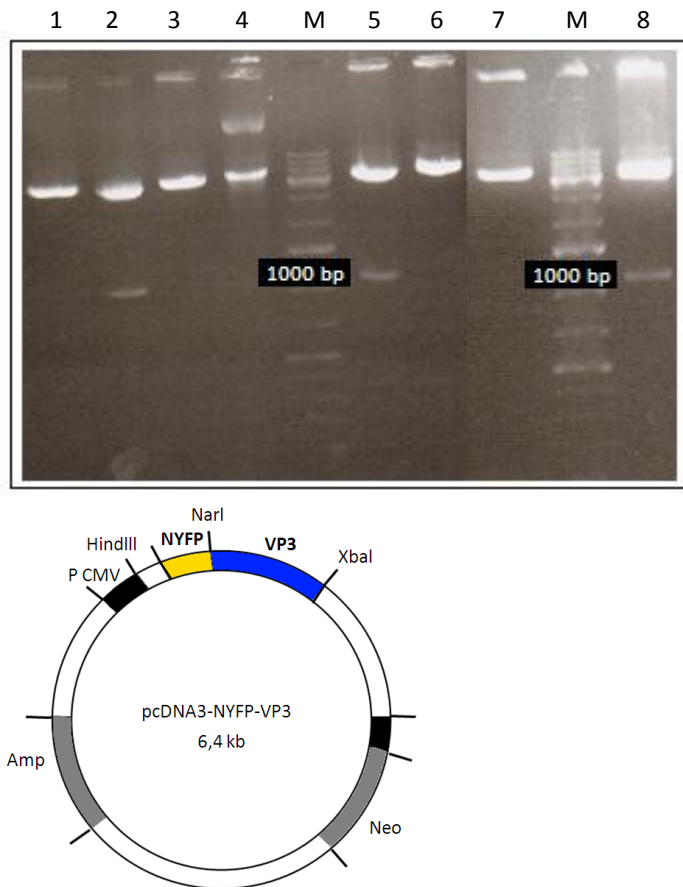
400 ng pcDNA3

63 ng HindIII-CYFP-NarI

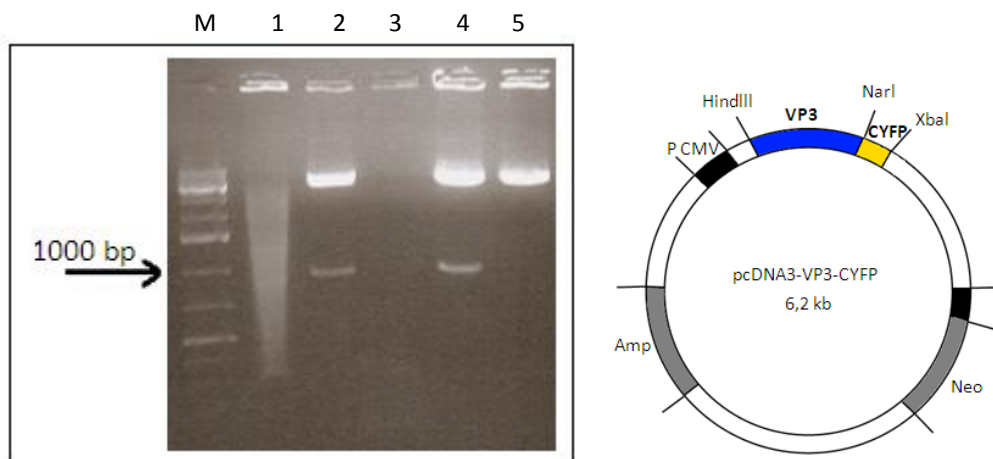
140 ng NarI-VP3-XbaI

5.2.4.2. MINIPREPARÁCIE DNA Z BAKTERIÁLNYCH MONOKOLÓNÍ

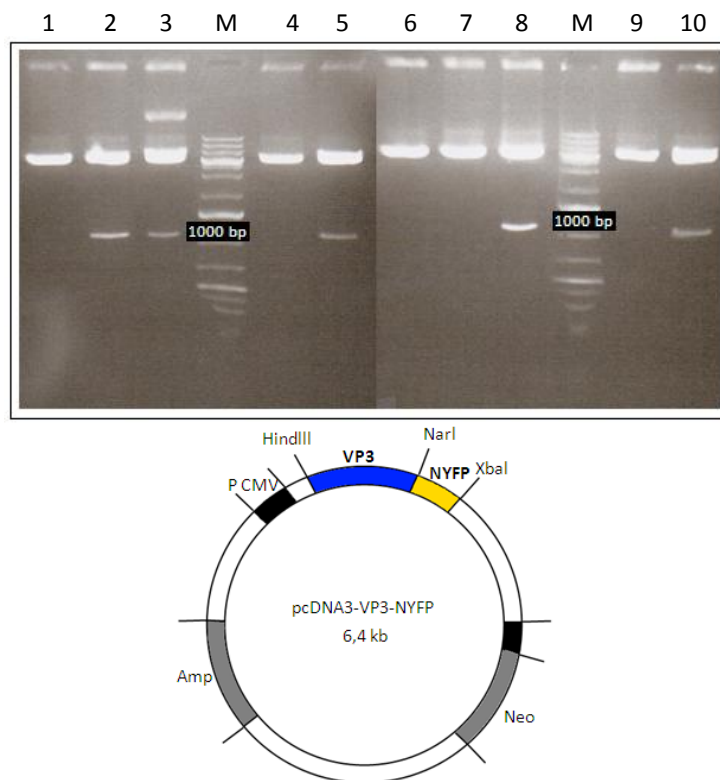
Výsledky kontrolných štiepení DNA vyizolovanej z bakteriálnych monokolóní restriktívnymi enzýmami HindIII a XbaI sú zobrazené na obrázkoch 5.2.12- 5.2.15. spolu so zobrazením konkrétneho konštruktú.



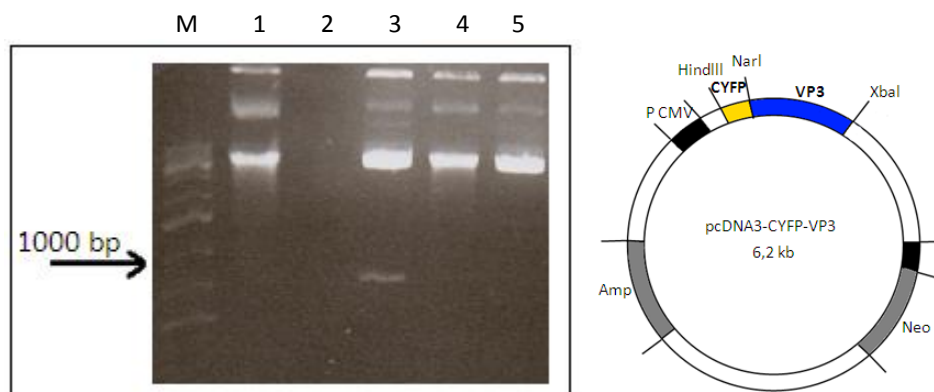
Obr. 5.2.12: Elektroforéza DNA izolovanej z vyrastených kolónií po elektroporácii ligačnou zmesou obsahujúcou fragmenty HindIII-NYFP-NarI a NarI-VP3-XbaI. Plazmid pcDNA3-NYFP-VP3 s veľkosťou 6470 bp bol štiepený enzýmami HindIII. U DNA z kolónií 2, 5 a 8 sa vyštiepil zaligovaný fragment o veľkosti zodpovedajúcej súčtu oboch vkladaných fragmentov, t.j 1118 bp. M- marker veľkosti fragmentov



Obr. 5.2.13: Elektroforéza po izolácii DNA z vyrastených kolónií po elektroporácii ligačnou zmesou obsahujúcou fragmenty HindIII-VP3-NarI a NarI-CYFP-XbaI. Plazmid pcDNA3-VP3-CYFP s veľkosťou 6270 bp bol štiepený HindIII a XbaI koncovými enzýmami. U pozitívnych kolónií sa mal vyštiepiť fragment z plazmidu o veľkosti 918 bp. Fragment sa vyštiepil u kolónií 2 a 4.



Obr. 5.2.14: Elektroforéza po izolácii DNA z vyrastených kolónií po elektroporácii ligačnou zmesou obsahujúcou fragmenty HindIII-VP3-NarI a NarI-NYFP-XbaI. Plazmid pcDNA3-VP3-NYFP s veľkosťou 6473 bp bol štiepený HindIII a XbaI enzýmami. Vyštiepil sa zaligovaný fragment z plazmidu o veľkosti 1121 bp u kolónií 2, 3, 5, 8 a 10.



Obr. 5.2.15: Elektroforéza po izolácii DNA z vyrastených kolónií po elektroporácii ligačnou zmesou obsahujúcou fragmenty HindIII-CYFP-NarI a NarI-VP3-XbaI. Plazmid pcDNA3-CYFP-VP3 bol štiepený HindIII a XbaI enzýmami. Iba u kolónie 3 sa vyštiepil zaligovaný fragment o veľkosti 918 bp

Získané pozitívne bakteriálne kolónie, teda u ktorých došlo v vyštiepení fragmentu s odpovedajúcou veľkosťou, boli znova napestované a bola z nich vyizolovaná DNA Quiagen Kitom, ktorá bola presne overená sekvenáciou. V prípade pozitívneho výsledku pri sekvenácii, bola daná kolónia baktérií uskladnená pri teplote -80°C podľa protokolu 4.2.7.2.

5.2.5. SEKVENÁCIE POZITÍVNYCH BAKTERIÁLNYCH KOLÓNÍÍ

Vzorky DNA pozitívnych bakteriálnych monokolónií boli poslané do sekvenačného laboratória spolu so sekvenačnými primermi, ktoré boli navrhnuté na oblasť asi 30 bp pred miestom pre restričný enzým HindIII v sense reťazci a oblasť asi 30 bp pred XbaI restričný enzým v antisense reťazci. V reakčnej zmesi s celkovým objemom 14 µl bolo vždy 300-500 ng výsledného vektoru s pravdepodobne zaklonovanými fragmentami a vždy 3,2 pmol sekvenačného primeru, zvyšok bol doplnený sterilnou destilovanou vodou.

5.2.6. VÝSLEDKY SEKVENACÍÍ DNA KONŠTRUKTOV

Overením prvého konštruktu **pcDNA3-NYFP-VP3** sekvenáciou sa zistilo, že sekvencia N-terminálneho fragmentu žltého fluorescenčného proteínu sa zhodovala so sekvenciou YFP v originálnom plazmide pEYFP-N1, aj sekvencia začiatočného linkeru medzi štiepnym miestom pre HindIII a sekvenciou NYFP bola správne zaklonovaná, podobne aj sekvencia medzi VP3 proteínom a restričným miestom pre XbaI. Sekvencia VP3 proteínu bola zaklonovaná správne porovnaním s originálnou sekvenciou VP3 v A3 kmeni. Ale v sekvencii stredového linkeru medzi sekvenciou NYFP a sekvenciou VP3 proteínu došlo k inzercii jedného nukleotidu, sekvenácia bola overená 2 x z oboch strán, vmedzerený nukleotid je vyznačený červenou :

5`-AGC GGT TCA GGC GGC **G** GCC TCT GGG TCT GGC

Preto boli osekvenované DNA ďalších pozitívnych kolónií, pri ktorých došlo z vektoru pcDNA3-NYFP-VP3 k vyštiepeniu fragmentu s odpovedajúcou veľkosťou boli opäť tieto kolónie overované sekvenáciou. U monokolónie č.1 sa zistilo, že sekvencie NYFP, VP3 proteínu, začiatočného, stredového aj koncového linkeru sú zaklonované správne. Preto bola táto bakteriálna monokolónia opäť kultivovaná a podľa kap. 4.2.7.2. uskladnená dlhodobo pri teplote -80°C. Naopak u monokolónie č.6 sa síce zaklonované sekvencie pre NYFP a VP3 proteín ukázali ako správne, ale nesprávne zaklonovaná bola sekvencia stredového linkeru. Každopádne sa podarilo z kolónie č.1 získať pozitívny, správne zaklonovaný vektor pcDNA3-NYFP-VP3.

Po sekvenácii konštruktu **pcDNA3-VP3-CYFP** sa zistilo, že bol vnútorný linker otočený a tým bola porušená aj začiatočná sekvencia CYFP fragmentu a to z dôvodu, že v primeri boli nedopatrením vytvorené dve štiepne miesta pre NarI restričný

enzým, vyznačené modrým. Forward primer NarI-CYFP-F bol prvýkrát navrhnutý ako:

5`- CTCGA **GGC GCC** TCT GGG TCT **GGC GCC** GAC AAG CAG AAG AAC

Potom bol navrhnutý nový primer s jedným štiepnym miestom pre NarI enzým, s ktorým sa urobila PCR pre vytvorenie nového fragmentu a ten bol použitý zase na ligáciu a zmes bola elektroporovaná do baktérií:

5`- CTCGA **GGC GCC** GGA TCT GGG TCT GCC GAC AAG CAG AAG AAC

Po ďalšej sekvenácii pozitívnych kolónií konštruktu pcDNA3-VP3-CYFP sa zistilo, že sekvencia C-terminálneho fragmentu YFP ako aj sekvencia VP3 proteínu porovnaním s originálnymi plazmidmi je zaklonovaná správne, podobne aj začiatkový linker medzi štiepnym miestom pre HindIII a sekvenciou VP3 proteínu, aj koncový linker medzi sekvenciou CYFP a miestom pre restričný enzým XbaI sú správne zaklonované. Avšak v stredovom linkeru došlo k zámene nukleotidov, chybné nukleotidy sú vyznačené červenou:

5`-AGC GGT TCA GGC GGC GCC TCT GGG TCT GGC

5`-AGC GGT TCA GGC GGC GCC **AGA CCC AGA** GGC

Avšak ani ďalšími minipreparáciami po elektroporáciách sa už nepodarilo získať pozitívne kolónie.

Overením konštruktu **pcDNA3-VP3-NYFP** sa zistilo, že sekvencie VP3 proteínu, N-terminálnej časti YFP a stredového (medzi sekvenciou VP3 proteínu a sekvenciou NYFP), aj sekvencia koncového linkeru (medzi NYFP a štiepnym miestom pre XbaI) boli správne. Ale v sekvencii začiatkového linkeru došlo k delícii vyznačeného nukleotidu:

5`-AAG CTT C GCC **ACC** ATG GCG

5`-AAG CTT C GCC CC ATG GCG

Avšak z tohoto konštruktu som mala ešte ďalšie 4 kolónie, pri ktorých došlo v minipreparáciách k vyštiepeniu fragmentu s odpovedajúcou veľkosťou, preto boli následne tieto monokolónie prečiarkované na novú agarózovú miskú, napestované a bola vyizolovaná DNA, ktorá bola opäť overená sekvenovaním. U všetkých týchto štyroch kolónií (2, 3, 8 a 10) bolo sekvenáciou dokázané správne zaklonovanie ako sekvencií VP3 proteínu a NYFP fragmentu, tak aj začiatkových, stredových

a koncových linkerov. Preto boli zo všetkých monokolónií vytvorené bakteriálne kryokonzervy podľa kap. 4.2.7.2. a boli uskladnené dlhodobo pri -80°C.

Overovaním plazmidov **pcDNA3-CYFP-VP3** bolo zistené, že sekvencia VP3 proteínu a koncového linkeru (medzi sekvenciou VP3 proteínu a štiepnym miestom pre XbaI restriktčný enzým) bola zaklonovaná správne, avšak k chybe v klonovaní došlo tentokrát aj v sekvencii CYFP a sekvencii začiatočného linkeru (medzi štiepnym miestom pre HindIII a sekvenciou CYFP).

Aj ďalšie plazmidy z ďalších sekvenovaných klonov mali sekvenčné poruchy. Boli tak získané 2 konštrukty u ktorých bola dokázaná správnosť klonovaných sekvencií. Na dokončení konštrukcií sa bude v laboratóriu pokračovať mimo rámec tejto diplomovej práce.

6. DISKUSIA

6.1. PRÍPRAVA MONOKLONÁLNEJ PROTILÁTKY PROTI VP1 PROTEÍNU BK VÍRUSU

Pre prípravu monoklonálnej protilátky proti proteínu VP1 BK vírusu bolo najprv treba pripraviť antigén pre imunizáciu myší. Pre jeho prípravu sme využili v našom laboratóriu skôr pripravený rekombinantný bakulovírus nesúci gén pre VP1 BKV.

Rekombinantným bakulovírusom sme infikovali hmyzie Sf9 - bunky z motýľa *Spodoptera frugiperda* s cieľom produkovať hlavný kapsidový proteín VP1 BK vírusu. Ako je uvedené v kap. 2.3.5.1, VP1 vytvára pentaméry, ktoré sa následne samovoľne usporiadávajú do vírusových kapsíd- VLPs. Tieto častice boli izolované z hmyzích buniek a overené elektrónovou mikroskopiou. Snímky z elektrónového mikroskopu izolátov plných aj prázdnych partikulí boli dostatočne čisté a koncentrované pre imunizáciu a obsahovali iba minimum rozpadnutého proteínového materiálu.

Týmito partikulami boli imunizované dve myši z kmeňa BALB/c, ktoré sú užitočné vo výskume rakoviny a v imunológii - tento kmeň je dobre známy svojou produkciou plazmacytómov - malígných nádorov plazmatických buniek a procesmi dôležitými pre produkciu monoklonálnych protilátok (Festing 1998). Jedna myš bola imunizovaná operatívne priamo do sleziny frakciou prázdnych pseudokapsíd, pričom túto operáciu vykonávala RNDr. Alena Morávková PhD. a druhá myš bola imunizovaná intraperitoneálne a to plnými pseudokapsidami. VLPs indukujú silnú špecifickú imunitnú odpoveď na VP1 proteín v myšiach (Frič et al., 2008, Hrušková et al., 2009). Túto reakciu bolo možné vidieť už pri výsledkoch z prvého odberu krvi z chvostovej žily, avšak aby sme dostali silnú špecifickú odpoveď na antigén, pokračovalo sa s imunizáciou myší 3 x. Pre odber sleziny bola napokon použitá myš, ktorá bola imunizovaná operatívne priamo do sleziny, pretože bol nepatrný rozdiel medzi imunitnou odpoveďou myši imunizovanej do sleziny a myši imunizovanej intraperitoneálne. Všetky manipulácie so živými zvieratami robila RNDr. Morávková, ostatné manipulácie po usmrtení zvierat, ako napríklad odoberanie podporných buniek z brušnej dutiny som vykonávala ja. Potom nasledovala samotná fúzia slezinných buniek s myelómovými bunkami, ktoré boli vopred pripravené a vzniknuté hybridómy boli rozplňované na 96-jamkové doštičky. Boli inkubované v

CO₂ termostate, pričom bol stále kontrolovaný ich rast v jednotlivých jamkách a keď boli jamky plné hybridómov, bolo odsaté médium na testovanie a bolo im pridané čerstvé médium. Po otestovaní jednotlivých médií boli hybridómy buď rozklonované ďalej v prípade pozitívneho výsledku, alebo boli odstránené v prípade negatívneho výsledku.

Testovanie bolo robené buď metódou Dot blot, ktorá je však zdĺhavá pri testovaní veľkého množstva hybridómových médií, kedy dochádza k značnému zťaženiu v dôsledku manipulácie s množstvom malých membrán, alebo vo väčšine prípadov bolo meranie uskutočňované prietokovým cytometrom RNDr. Morávkovou, ktorého nespornou výhodou je nespočetné množstvo otestovaných médií za relatívne krátky čas. Okrem toho v náš prospech bolo aj to, že pri takomto množstve testovaných médií bolo vždy nájdených viacero pozitívnych klonov, ktoré boli ďalej klonované a niektoré z nich uskladňované v tekutom dusíku. Keďže hybridómy vznikajú fúziou B-lymfocytov a myelómových buniek, dochádza teda k vzniku polyploidie, čo ich činí nestabilnými a môže dochádzať k strate genetického materiálu.

V prípade, že sa nám nepodarilo daný produkujúci klon stabilizovať klonovaním a došlo teda k strate klonu alebo boli niektoré klony kontaminované, som znova použila kryokonzervy zo zásob z tekutého dusíku a opätovne som pristúpila k ďalšiemu klonovaniu. Možnou malou nevýhodou práce s hybridómami je práca s 96 jamkovými doštičkami, kde pri nechcenej kontaminácii niektorej z jamiek často dochádza ku kontaminácii väčšinou celej doštičky v dôsledku práce s multikanálovou pipetou, ktorá potom kontaminuje aj nasledujúce rady.

Aj keď je metóda tvorby monoklonálnych protilátok zdĺhavá a náročnejšia na čas, aj vďaka efektívnosti prietokového cytometra sa nám podarilo vyizolovať klon so stabilnou produkciou monoklonálnej protilátky proti VP1 proteínu BK vírusu.

Bolo dokázané, že získanú protilátku je možné použiť pre metódu nepriamej imunofluorescencie. Vzhľadom k tomu, že jej testy pre metódu Western blot boli negatívne, rozpoznáva táto protilátka konformačný epitop. Týmto epitopom však nie sú sekvencie interagujúce s bunkovým receptorom ako bolo ukázané v neutralizačnom teste. Na získanie neutralizačnej protilátky bude treba izolovať a testovať ďalšie zmrazené primárne klony. Avšak myslím si, že by okrem testovania uskladnených hybridómov nebolo na škodu ani pristúpiť k novej imunizácii pre

zmenu s plnými pseudokapsidami a skúsiť získať pozitívny klon z tejto imunizácie. Plné a prázdne pseudokapsidy sa môžu líšiť povrchovou konformáciou a tým pádom aj prístupnosťou povrchových epitopov pre bunky imunitného systému myšiek a tak by asi bolo možné získať aj protilátky proti iným epitopom VP1. Pre isté získanie protilátky použiteľnej pre Western blot by bolo možné proteín VP1 pred imunizáciou denaturovať.

So získanou protilátkou sa plánuje študovať pohyb BK viriónov od bunkovej membrány smerom k bunkovému jadru. Predchádzajúce práce, ktoré sa transportom BK vírusu zaoberali (Eash et al., 2004, Moriyama et al., 2007), popisovali transport viriónov z vačkov odvodených od caveol do caveozómov a potom do endoplazmatického retikula, podobne ako to bolo popísané pre vírus SV40 (Pelkmans et al., 2001). Rozdiel, ktorý pozorovali v porovnaní s pohybom SV40, bola závislosť infekcie BK vírusom na kyslom prostredí endozómov. Nedávno však autori, ktorí caveozóm popísali ako novú organelu, v ktorej je zhromažďovaný vírus SV40 pred transportom do ER, celý concept caveozómu odvolali a caveozómy prehlásili za artefakt nadmernej expresie EGFP-caveolinu (Hayer et al., 2010).

Predbežné pokusy, v ktorých som využila protilátku ku štúdiu kolokalizácie viriónov s bunkovými markermi endozomálnych kompartmentov, ukazujú okrem kolokalizácie s caveolinom-1 a s markerom včasných endozómov EEA1, tiež výraznú kolokalizáciu s markerom lyzozómov, čo som ale musela dokázať s použitím králičej polyklonálnej protilátky proti VP1 BK vírusu, pretože sme nemali inú funkčnú protilátku proti markerom lyzozómov (LAMP) okrem myšej. To by mohlo ale poukazovať na to, že vírus prechádza pozdňými endolyzozomálnymi kompartmentami pred svojou cestou do ER, tak ako je to predpokladané u myšieho polyomavírusu (Qian et al., 2009).

Z týchto výsledkov je ale predčasné vyvodzovať nejaké závery, aj keď vírus v značnej miere kolokalizoval s caveolinom a membránovými proteínmi asociovanými s lyzozómami, pretože je potrebné vyskúšať kolokalizácie vírusu s komponentami buniek vo viacerých časoch od začiatku infekcie. Z dôvodu nedostatku času bude štúdiom včasných fáz predmetom budúceho štúdia v laboratóriu.

6.2. PRÍPRAVA EXPRESNÝCH PLAZMIDOV PRE PRODUKCIU MINORITNÉHO ŠTRUKTÚRNEHO PROTEÍNU VP3 FÚZOVANÉHO S N- A C- KONCOVÝMI ČASŤAMI EYFP PRE ŠTÚDIUM OLIGOMERIZÁCIE MINORITNÝCH PROTEÍNOV U MYŠIEHO POLYOMAVÍRUSU

Ako bolo ukázané v prácach Daniels et al., 2006a, Huerfano et al., 2010, minoritné proteíny sú schopné integrovať a viazať sa na membrány. VP3 by mohol byť integrovaný do membrán pomocou dvoch transmembránových segmentov, ktoré boli počítačovou analýzou detekované (Rainey-Barger et al., 2007). Sekvenčné usporiadanie dvoch transmembránových domén a poradie bázických aminokyselín ako sa vo VP3 nachádzajú je charakteristické pre proteíny tvoriace kanály alebo viroporíny. Daniels so spolupracovníkmi predpokladajú, že minoritné proteíny vírusu SV40 oligomerizujú v membránach endoplazmatického retikula a vytvárajú otvory, ktorými rozvoľnené virióny translokujú z ER do cytosolu aby sa dostali do bunkového jadra cez jadrové póry (Daniels et al., 2006).

Pre overenie schopnosti minoritných proteínov sme sa rozhodli využiť pomerne novú metódu rekonštitúcie fragmentov fluorescenčného proteínu fúzovaných k dvom rôznym alebo rovnakým proteínom záujmu, ktoré spolu nejakým spôsobom interagujú. Po objavení zeleného fluorescenčného proteínu z medúzy *Aequorea victoria* došlo k ďalšiemu prelomu v použití fluorescenčných proteínov zistením, že GFP alebo YFP je schopný tolerovať inzerciu nejakého peptidu bez zrušenia jeho fluorescenčnej vlastnosti a že oddelené dve GFP, ktoré nie sú fluorescenčné, každá pripojená k inému proteínu, môžu, pokiaľ sa dostatočne priblížia, komplementovať a môže byť plne obnovená fluorescencia (Abedi et al, 1998, Baird et al, 1999).

Prvú vizualizáciu proteínových interakcií *in vivo* s použitím žltého fluorescenčného proteínu ukázali Hu et al, 2002 v cicavčích bunkách. V súčasnosti sa metóda využíva s použitím rôznych variant fluorescenčných proteínov, pretože je relatívne nenáročná a nevyžaduje žiadne špeciálne zariadenie. My sme sa rozhodli vyskúšať túto metódu k dokázaniu oligomerizácie VP3 myšieho polyomavírusu s použitím

žltého fluorescenčného proteínu. Naše laboratórium disponuje plazmidom pEYFP-N1, ktorý obsahuje celú sekvenciu pre tento žltý fluorescenčný proteín.

Žltý fluorescenčný proteín je možné rozdeliť na viacerých miestach, a to medzi aminokyselinami 154-155 podľa vzoru práce Hu et al., 2002, ktorí BiFC použili pre cicavčie bunky, alebo medzi aminokyselinami 174-175 podľa práce Citovsky et al., 2006, ktorí BiFC použili pre rastlinné bunky. Viac menej preto sme sa rozhodli inšpirovať prácou Hu et al. a rozdeliť YFP na N- a C-terminálny fragment v úseku 154-155 aminokyselín.

Najprv sme navrhli sady primerov, ktoré mali slúžiť k naklonovaniu rôznych častí fragmentov ako N- aj C-terminálnych častí YFP a VP3 proteínu. Týmito primermi boli vytvorené začiatkové, koncové aj stredové linkery, v ktorých boli obsiahnuté štiepne miesta pre restriktčné enzýmy a podľa potreby pridané iniciačný alebo terminačný kodón, prípadne zrušený terminačný kodón. Po amplifikáciách všetkých fragmentov, boli fragmenty vždy na začiatkoch a koncoch poštiepené príslušnými enzýmami a cez tieto miesta boli fragmenty následne ligované. Ligačná zmes bola použitá na elektroporáciu baktérií, ktoré boli potom vysievané na misky a kultivované okolo 16 hodín v termostate. Väčšinou dochádzalo k vyrasteniu väčšieho množstva kolónií a preto boli kolónie prečiarkované na nové misky. Izoláciou DNA z kolónií a overenie správnosti klonovania analýzou restriktčnými enzýmami boli vybraté pozitívne klony, obsahujúce oba vkladané fragmenty (1/2 YFP + VP3). Monokolónie takto overených klonov boli znova kultivované a izolovaná DNA bola pre istotu overená aj sekvenáciou.

Z konštruktu pcDNA3-NYFP-VP3 bola najprv nájdená kolónia, pri ktorej sa osekvenovaním zistilo, že v stredovom linkeri došlo k inzercii jediného nukleotidu. Táto inzercia by nám spôsobila zmenu celého čítacieho rámca, čím by podľa genetického kódu dochádzalo k zámenám aminokyselín v proteíne a mohla by sa zmeniť funkcia aj konformácia proteínu. Preto sme museli pokračovať v hľadaní pozitívnych kolónií so správne zaklonovanými sekvenciami, čo sa aj podarilo. Z vytvoreného a správne zaklonovaného konštruktu pcDNA3-NYFP-VP3 boli uskladnené bakteriálne monokolónie pri -80°C.

Pri osekvenovaní konštruktu pcDNA3-VP3-CYFP bolo zistené, že došlo k zaklonovaniu úseku z komplementárneho reťazca s opačnými kodónmi, pretože

v povodnom navrhnutom primeri boli vytvorené nedopatrením 2 štiepne miesta pre NarI enzým. Podľa navrhovaného linkera by mali vznikáť aminokyseliny:

ser- gly- ser- gly- gly- ala- ser- gly- ser- gly

Avšak výmena reťazcov by dávala vznik nasledovným aminokyselinám v linkeri:

ser- gly- ser- gly- gly- ala- **arg- pro- arg-** gly

Glycín aj serín sú neutrálne, pomerne jednoduché aminokyseliny, zatiaľčo arginín je bázická aminokyselina, ktorá by mohla svojim charakterom nepriaznivo zasiahnuť do konformácie výsledného proteínu. Prolín by mohol spôsobiť konformačný ohyb na proteíne, preto sme sa rozhodli nepoužiť tento konštrukt na metódu BiFC.

Ďalšie konštrukty boli vytvárané súbežne a podarilo sa zase získať bakteriálnu monokolóniu so správne zaklonovaným fragmentom, avšak tiež N-terminálnou časťou YFP proteínu- pcDNA3-VP3-NYFP. Z ďalších dvoch konštruktov s C-terminálnou časťou YFP proteínu sa nepodarilo získať ani jeden, ktorý by nemal rôzne sekvenčné poruchy. Jedným z dôvodov začlenenia nesprávneho nukleotidu by mohla byť aj použitá Vent polymeráza, napriek tomu, že má nízku chybovosť (57×10^{-6} bází).

Pravdepodobne by bolo potrebné znova sa pokúsiť o vytvorenie novej ligačnej zmesi vektoru a oboch fragmentov, znova to elektroporáciou vnášať do baktérií a pokúsiť sa nájsť kolónie, u ktorých by pri minipreparácii plazmidovej DNA došlo k vyštiepeniu fragmentu s odpovedajúcou veľkosťou a tieto kolónie opäť overiť sekvenáciou.

7. SÚHRN

Príprava monoklonálnej protilátky proti hlavnému štruktúrnemu proteínu VP1 BK vírusu

1. Bola pripravená jedna hybridómová kolónia produkujúca špecifickú protilátku proti VP1 štruktúrnemu proteínu BK vírusu so stabilnou produkciou a mnoho ďalších produkujúcich kolónií, ktoré je ešte nutné klonovať, uložených v tekutom dusíku.
2. Bolo zistené, že získaná protilátka nie je schopná neutralizovať vírus a je namierená proti konformačnému epitopu a dá sa teda použiť pre metódy nepriamej imunofluorescencie, príp. imunoprecipitáciu, avšak nie pre detekciu denaturovaného antigénu.
3. Protilátka neinteraguje s VP1 proteínom sekvenčne príbuzného SV40 vírusu.
4. Protilátka bola vyskúšaná v predbežných pokusoch sledovania pohybu BK viriónov v bunkách.

Príprava expresných plazmidov pre produkciu minoritného štruktúrneho proteínu VP3 fúzaného s N- a C- koncovými časťami EYFP pre štúdium oligomerizácie minoritných proteínov u myšieho polyomavírusu

1. Boli skonštruované 4 vektory pre expresiu fúzných proteínov zložených z VP3 myšieho polyomavírusu a jednej alebo druhej polovice žltého fluorescenčného proteínu v 4 možných kombináciách pre štúdium oligomerizácie VP3 metódou BiFC.
2. Všetky 4 plazmidy boli overované sekvenovaním. Správnosť sekvencií bola potvrdená u dvoch konštruktov:

pcDNA3-NYFP-VP3 nesúci gén pre proteín VP3 fúzaný s N-terminálnou časťou žltého fluorescenčného proteínu na N-konci VP3

pcDNA3-VP3-NYFP nesúci gén pre proteín VP3 fúzaný s N-terminálnou časťou žltého fluorescenčného proteínu na C-konci

Sekvencia plazmidov pcDNA3-CYFP-VP3 a pcDNA3-VP3-CYFP preukázala sekvenčné poruchy v klonovaných sekvenciách a preto bude nutné klonovanie opakovať.

8. ZOZNAM LITERATÚRY

Abedi MR, Caponigro G, Kamb A: Green fluorescent protein as a scaffold for intracellular presentation of peptides. *Nucleic Acids Research* 1998, 26 (2): 623-630

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MAA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B: Identification of a Third Human Polyomavirus. *Journal of Virology* 2007, 81 (8) : 4130–4136

An K, Fattaey HK, Paulsen AQ, Consigli RA: Murine polyomavirus infection of 3T6 mouse cells shows evidence of predominant necrosis as well as limited apoptosis. *Virus Research* 2000, 67 (1): 81-90

Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY: Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96 (20): 11241-11246

Barouch DH, Harrison SC: Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *Journal of Virology* 1994, 68 (6): 3982-3989

Bohl DL, Brennan DC: BK virus nephropathy and kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007, 2: S36–S46

Brady JN, Winston VD, Consigli RA: Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *Journal of Virology* 1977, 23 (3): 717–724

Brady JN, Kendall JD, Consigli RA: In vitro reassembly of infectious polyoma virions. *Journal of Virology* 1979, 32 (2): 640-647

Butel JS, Lednicky JA: Cell and Molecular Biology of Simian Virus 40: Implications for Human Infections and Disease. *Journal of the National Cancer Institute* 1999, 91 (2): 119-134

Caspar DLD, Klug A: Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 1962, 27: 1-24

Cilmi SA: Expression of simian virus 40 capsid protein VP1 in Escherichia coli and biochemical characterization of the purified protein. Undergraduate senior honor thesis 1991, Harvard University, Cambridge, Mass

Citovsky V, Lee LY, Vyas S, Glick E, Chen MH, Vainstein A, Gafni Y, Gelvin SB, Tzfira T: Subcellular localization of interacting protein by bimolecular fluorescence complementation in planta. Journal of Molecular Biology 2006, 362 (5): 1120-1131

Clever J, Dean DA, Kasamatsu H: Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid protein Vp2 and Vp3. The Journal of Biological Chemistry 1993, 268 (28): 20877-20883

Clever J, Kasamatsu H: Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal. Virology 1991, 181 (1): 78-90

Cole CN, Fields BN, Knipe DM, Howley PM: Fundamental Virology 1996, 3rd edn, Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia: pp 917-946

Cole CN: Polyomavirinae: the viruses and their replication, Fields Virology 1996, In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p: 1997-2025

Colomar MC, Degoumois-Sahli C, Beard P: Opening and refolding of simian virus 40 an in vitro packaging of foreign DNA. Journal of Virology 1993, 67 (5): 2779-2786

Daniels R, Rusan NM, Wadsworth P, Hebert DN : SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid proteins VP1: implications for DNA translocation out of the ER. Molecular cell 2006a, 24 (6): 955-966

Daniels R, Rusan NM, Wilbuer AK, Norkin LC, Wadsworth P, Hebert DN: Simian virus 40 proteins possess lytic properties that render them capable of permeabilizing cellular membranes. *Journal of General virology* 2006b, 80 (13): 6575-6587

Daniels R, Sadowicz D, Hebert DN: A very late protein triggers the lytic repase of SV 40. *PlosPathogens* 2007, 3 (7): e98

Dhar R, Subramanian KN, Pan J, Weissman SM: Structure of a large segment of the genome of simian virus 40 that does not encode known proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977, 74 (3). 827-831

Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, Cubitt CL, Ramos E: BK polyoma virus allograft nephropathy: Ultrastructural features from viral cell entry to lysis. *American Journal of Transplantation* 2003, 3 (11): 1383–1392

Dugan AS, Eash S, Atwood WJ: An N-linked glykoprotein with $\alpha(2,3)$ -linked sialic acid is a receptor for BK virus. *Journal of Virology* 2005, 79 (22): 14442-14445

Dugan AS, Eash S, Atwood WJ: Update on BK virus entry and intracellular trafficking. *Transplant Infectious Disease* 2006, 8 (2): 62-67

Dugan AS, Gasparovis ML, Atwood WJ: Direct correlation between sialic acid binding and infection of cells by two human polyomaviruses (JC virus and BK virus). *Journal of Virology* 2008, 82 (5): 2560-2564

Dyson N, Bernards R, Friend SH, Gooding LR, Hassel JA, Major EO: Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *Jornal of Virology* 1990, 64: 1353-1356

Eash S, Atwood WJ: Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *Journal of Virology* 2005, 79 (18): 11734-11741

Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ: The human polyomaviruses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006, 63 (7-8): 856- 876

Eash S, Querbes W, Atwood WJ: Infection of Vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *Journal of Virology* 2004, 78 (21): 11583- 11590

Eddy BE, Stewart SE, Young R, Mider GB: Neoplasms in hamsters induced by mouse tumor agent passed in tissue culture. *Journal of the National Cancer Institute* 1958, 20 (4): 747–761

Fan JY, Cui ZQ, Wei HP, Zhang ZP, Zhou YF, Wang YP, Zhang XE: Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008, 367 (1) :47-53

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS: Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008, 319 (5866): 1096-1100

Ferguson AT, Subramani S: Complex functional interactions at the early enhancer of the PQ strain of BK virus. *Journal of Virology* 1994, 68, 4274-4286

Festing MFW: Inbred strains of mice:
<http://www.informatics.jax.org/external/feeding/mouse/docs/BALB.shtml>

Frič J, Marek M, Hrušková V, Holán V, Forstová J: Cellular and humoral immune responses to chimeric EGFP-pseudocapsids derived from the mouse polyomavirus after their intranasal administration. *Vaccine* 2008, 26 (26): 3242-3251

Garcea RL, Salunke DM, Caspar DLD: Site-directed station affecting polyomavirus capsid self-assembly in vitro. *Nature* 1987, 329 (6134): 86-87

Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D: Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections. *PLoS pathogens* 2007, 3 (5): e64

Gharakhanian E, Kasamatsu H: Two independent signal, a nuclear localisation signal and a Vp1-interactive signal, reside within the carboxy-35 amino acids of SV40 Vp3. *Virology* 1990, 178(1): 62-71

Ghosh I, Hamilton AD, Regan L: Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: application to the green fluorescent protein. *Journal of American Chemical Society* 2000, 122: 5658-5659

Gillock ET, Rottinghaus S, Chang D, Cai X, Smiely SA, An K, Consigli RA: Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *Journal of Virology* 1997, 71 (4): 2857-2865

Gordon-Shaag A, Yosef Y, El-Latif MA, Oppenheim A: The abundant nuclear enzyme PARP participates in the life cycle of simian virus 40 and is stimulated by minor capsid protein VP3. *Journal of Virology* 2003, 77 (7): 4273-4282

Gottlieb KA, Villarreal LP: Natural Biology of Polyomavirus Middle T Antigen. *Microbiology and molecular biology reviews* 2001, 65(2): 288–318

Griffith GP, Griffith DL, Rayment I, Marakami WT, Caspar DLD: Inside polyomavirus at 25 Å resolution. *Nature* 1992, 355 (6361): 652-654

Gross L: A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Society for Experimental Biology and Medicine* 1953, 83 (2): 414-421

Harris KF, Christensen JB, Imperiale MJ: BK virus large T antigen: Interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *Journal of Virology* 1996, 70 (4): 2378-2386

Hayer A, Stoeber M, Ritz D, Engel S, Meyer HH, Helenius A: Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *The Journal of Cell Biology* 2010, 191 (3): 615-629

Hernandez FP, Sandri-Goldin RM: Bimolecular fluorescence complementation analysis to reveal protein interaction in herpes virus infected cells. *Methods* 2011 (article in press)

Hirsch HH: BK virus: Opportunity makes a pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 2005, 41: 354-360

Hirsch HH, Steiger J: Polyomavirus BK. *The Lancet* 2003, 3: 611-623

Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK: Visualisation of interaction among zip and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell* 2002, 9 (4): 789-798

Huerfano S, Žíla V, Bouřa E, Španielová H, Štokrová J, Forstová J: Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS Journal* 2010, 277 (5): 1270-1283

Hrušková V, Morávková A, Babiarová K, Ludvíková V, Frič J, Vonka V, Forstová J: Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune responses in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles. *International Journal of Oncology* 2009, 35 (6): 1247-1256

Chang D, Haynes JI 2nd, Brady JN, Consigli RA: The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology* 1992, 189 (2): 821-827

Chang D, Cai X, Consigli RA: Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid proteins. *Journal of Virology* 1993, 67 (10): 6327-6331

Chen PL, Hsu PH, Fang CY, Chang CF, Ou WC, Wang M, Chang D: Phosphorylation of Ser-80 on VP1 and Ser-254 on VP2 are Essentials for human BK virus propagation in tissue culture. *The Journal of General Virology* 2011

Jach G, Pesch M, Richter K, Frings S, Uhrig JF: An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. *Nature Methods* 2006, 3 (8): 597-600

Jackson V, Chalkley R: Use of whole-cell fixation to visualize replicating and maturing simian virus 40: Identification of new viral gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981, 78: 6081-6085

Jay G, Nomura S, Anderson CW, Khoury G: Identification of the SV40 agnogene product: a DNA binding protein. *Nature* 1981, 291 (5813): 346-349

Jeffers LK, Madden V, Webster-Cyriaque J: BK virus has tropism for human salivary gland cell in vitro: Implications for transmission. *Virology* 2009, 394: 183-193

Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ: Early events during BK virus entry and disassembly. *Journal of Virology* 2009, 83 (3): 1350-1358

Johannessen M, Myhre MR, Dragset M, Tümmler, Moens U: Phosphorylation of human polyomavirus BK agnoprotein at Ser-11 is mediated by PKC and has an important regulative function. *Virology* 2008, 379: 97-109

Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, Major EO, Ramqvist T, Norkin LC: Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. Arch Virol 2011

Johnsen JI, Seternes OM, Johansen T, Moens U, Mäntyjärvi R, Traavik T: Subpopulations of non-coding control region variants within a cell culture-passaged stock of BK virus: semence comparison and biological characteristics. Journal of General Virology 1995, 76: 1571-1581

Johnsson N, Varshavsky A: Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America 1994, 91 (22): 10340-10344

Kanesashi S, Ishizu K, Kawano M, Han S, Tomita S, Watabe H, Kataoka K, Handa H: Simian virus 40 VP1 capsid protein forms polymorphic assemblies in vitro. Journal of General Virology 2003, 84: 1899- 1905

Kerppola TK: Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. Annual review of Biophysics 2008, 37: 465-487

Knipe DM, Howley PM: Fields Virology, 5th edition 2007, Lippincot Williams & Wilkins
Khalili K, White M, Hirofumi S, Nagashima K, Safak M: The agnoprotein of Polyomaviruses: A multifunctional auxiliary protein. Journal of Cellular Physiology 2005, 204: 1-7

Krauzewicz N, Streuli CH, Stuart-Smith N, Jones MD, Wallace S, Griffin BE: Myristylated polyomavirus VP2: Role in the life cycle of the virus. Journal of Virology 1990, 64 (9): 4414-4420

Lee W, Langhoff E: Polyomavirus and human cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology 2002, 73 (5)

Lee YR, Park JH, Hahm SH, Kang LW, Chung JH, Nam KH, Hwang KY, Kwon IC, Han YS: Development of bimolecular fluorescence complementation using Dronpa for visualization of protein-protein interactions in cells. *Mol Imaging Biol* 2010, 12 (5): 468-478

Leuenberger D, Andresen PA, Gosert R, Binggeli S, Ström E, Bodaghi S, Rinaldo CH, Hirsch HH: Human polyomavirus type 1 (BK virus) agnoprotein is abundantly expressed but immunologically ignored. *Clinical and Vaccine Immunology* 2007, 14 (8): 959-968

Li T, Takeda N, Kato K, Nilsson J, Xing L, Haag L, Cheng RH, Miyamura T: Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology* 2003, 311 (1): 115-124

Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC: Structure of simian virus 40 at 3,8 Å resolution. *Nature* 1991, 354 (6351): 278-284

Lilley BN, Gilbert JM, Ploegh HL, Benjamin TL: Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. *Journal of Virology* 2006, 80 (17): 8739- 8744

Losada MP, Christensen RG, McClellan DA, Adams BJ, Viscidi RP, Demma JC, Crandall KA: Comparing Phylogenetic Codivergence between Polyomaviruses and Their Hosts. *Journal of Virology* 2006, 80 (12): 5663–5669

Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ: Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *Journal of Virology* 2006, 80 (3): 1361-1366

Ludlow JW, Consigli RA: Localisation of calcium on the polyomavirus VP1 capsid protein. *Journal of Virology* 61 (9): 2934-2937

Magnuson B, Rainey EK, Benjamin T, Baryshev M, Mkrtchian S, Tsai B: ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Molecular Cell* 2005, 20 (2): 289-300

Mannová P, Liebl D, Krauzewicz N, Fejtová A, Štokrová J, Palková Z, Griffin BE, Forstová J: Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *Journal of General Virology* 2002, 83 (9): 2309-2319

Markowitz RB, Dynan WS: Binding of cellular proteins to the regulatory region of BK virus DNA. *Journal of Virology* 1988, 62 (9): 3388-3398

Mertz JE, Murphy A, Barkan A: Mutants deleted in the agnogene of simian virus 40 define a new complementation group. *Journal of Virology* 1983, 45 (1): 36-46

Moens U, Seternes OM, Johansen B, Rekvig OP: Mechanism of transcriptional regulation of cellular genes by SV40 large T and small T-antigens. *Virus Genes* 1997, 15 (2): 135-154

Moens U, Subramaniam N, Johansen B, Johansen T, Traavik T: A steroid hormone response unit in the late leader of the noncoding control region of the human polyomavirus BK confers enhanced host cell permissivity. *Journal of Virology* 1994, 68 (4): 2398-2408

Montross L, Watkins S, Moreland B, Mamon H, Caspar DLD, Garcea RL: Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cell expressing the major capsid protein VP1. *Journal of Virology* 1991, 65(9): 4991-4998

Moreland RB, Montross L, Garcea RL: Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *Journal of Virology* 1991, 65 (3): 1168-1176

Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, Sorokin A: Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *Journal of Virology* 2007. 81 (16): 8552- 8562

Moriyama T, Sorokin A: Intracellular trafficking pathway of BK virus in human renal proximal tubular epithelial cells. *Virology* 2008, 371 (2): 336- 349

Myhre MR, Olsen GH, Gosert R, Hirsch HH, Rinaldo CH: Clinical polyomavirus BK variants with agnogene deletion are non-functional but rescued by trans-complementation. *Virology* 2010, 398: 12-20

Nakagawa Ch, Inahata K, Nishimura S, Sugimoto K: Improvement of a Venus-based bimolecular fluorescence complementation assay to visualize bFos-bJun interaction in living cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2011, 75 (7):1399-401

Oliver FJ, de Murcia JM, de Murcia G: Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and dinase. *American Journal of Human Genetics* 1999, 64 (5): 1282-1288

Pattanaik S, Werkman JR, Yuan L. Bimolecular fluorescence complementation as a tool to study interactions of regulatory proteins in plant protoplasts. *Methods in molecular biology* 2011, 754: 185-193

Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A: Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology* 2001, 3 (5): 473-483

Pelletier JN, Campbell-Valois FX, Michnick SW: Oligomerization domain-directed reassembly of aktive dihydrofolate reduktase from rationally designed fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95 (21): 12141-12146

Pipas JM: Common and Unix features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *Journal of Virology* 1992, 66 (7): 3979-3985

Plaza S, Prince F, Adachi Y, Punzo C, Cribbs DL, Gehring WJ: Crossregulatory protein-protein interactions between Hox and Pax transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105 (36): 13439-13444

Qian M, Cai D, Verhey KJ, Tsai B: A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. *PLoS Pathogen* 2009, 5 (6): e1000465

Rainey-Barger EK, Magnuson B, Tsai B: A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Virology* 2007, 81 (23): 12996-3004

Richards FM: On the enzymic activity of subtilisin-modified ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1958, 44(2): 162-166

Rinaldo CH, Traavik T, Hey A: The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *Journal of Virology* 1998, 72 (7): 6233-6236

Rossi F, Charlton CA, Blau HM: Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by β -galactosidase complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, 94 (16): 8405-8410

Saka Y, Hagemann AI, Piepenburg O, Smith JC: Nuclear accumulation of Smad complexes occurs only after the midblastula transition in *Xenopus*. *Development* 2007, 134 (23): 4209-4218

Salunke DM, Caspar DLD, Garcea RL: Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophysical Journal* 1989, 56 (5): 887-900

Schelhaas M, Malmstrom J, Pelkmans L, Haugstetter J, Ellgaard L, Grunewald K, Helenius A: Simian virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* 2007, 131 (3): 516–529

Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB: Merkel Cell Polyomavirus and Two Novel Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin. *Cell Host Microbe*, 2010, 7 (6): 509–515

Seganti L, Mastromarino P, Superti F, Sinibaldi L, Orsi N: Receptors for BK virus on human erythrocytes. *Acta Virologica* 1981, 25 (4): 177-181

Shyu YJ, Liu H, Deng X, Hu CD: Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *Biotechniques* 2006, 40 (1): 61-66

Sinibaldi L, Viti D, Goldoni P, Cavallo G, Caroni C, Orsi N: Inhibition of BK virus haemagglutination by gangliosides. *Journal of General Virology* 1987, 68 (3): 879-883

Sinibaldi L, Goldoni P, Pietropaolo V, Longhi C, Orsi N: Involvement of gangliosides in the interaction between BK virus and Vero cells. *Archives of Virology* 1990, 113 (3-4): 291-296

Sinibaldi L, Goldoni P, Pietropaolo V, Cattani L, Peluso C, Di Taranto C: Role of phospholipids in BK virus infection and haemagglutination. *Microbiologica* 1992, 15 (4): 337-344

Stehle T, Gamblin SJ, Yan Y, Harrison SC: The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 1996, 4 (2): 165-182

Stewart SE, Eddy BE, Borgese N: Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *Journal of the National Cancer Institute* 1958, 20 (6): 1223–1243

Streuli CH, Griffin BE: Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* 1987, 326 (6113): 619-622

Sullivan C, Grundhoff A, Tevetia S, Pipas J, Ganem D: SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 2005, 435(7042): 682-686

Sundsford A, Flægstad T, Flø R, Spein A R, Pedersen M, Permin H, Julsrud J, Traavik T: BK and JC viruses in human immunodeficiency virus type 1-infected persons : prevalence, excretion, viremia, and viral regulatory regions. *Journal of Infectious Diseases* 1994, 169, 485-490

Sweet BH, Hilleman MR: The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1960, 105: 420–427

Touzé A, Bousarghin L, Ster C, Combita AL, Roingard P, Coursaget P: Gene transfer using human polyomavirus BK virus-like particles expressed in insect cells. *Journal of General Virology* 2001, 82 (12): 3005-3009

Tremolada S, Delbue S, Larocca S, Carloni C, Elia F, Khalili K, Gordon J, Ferrante P: Polymorphisms of the BK virus subtypes and their influence on viral in vitro growth efficiency. *Virus research* 2010, 149 (2): 190-196

Ullmann A, Perrin D, Jacob F, Monod J: Identification, by in vitro complementation and purification, of a peptide fraction of *Escherichia coli* beta-galactosidase. *Journal of Molecular Biology* 1965, 12 (3): 918-923

Ullmann A, Jacob F, Monod J. Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 1967, 24 (2): 339-343

Ullmann A, Jacob F, Monod J. On the subunit structure of wild-type versus complemented beta-galactosidase of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 1968, 32 (1): 1-13

van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC: Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathogens* 2010, 6(7): e1001024

van Ghelue M, Moens U, Bendiksen S, Rekvig OP: Autoimmunity to nucleosomes related to viral infection: a focus on hapten-carrier complex formation. *J Autoimmun* 2003, 20: 171-182

von Heijne G: On the hydrophobic nature of signal sequences. *European Journal of Biochemistry* 1981, 116 (2): 419-422

Yuen LKC, Consigli RA: Generation of capsids from unstable polyoma virions. *Journal of Virology* 1983, 47 (3): 620- 625

Zhang S, Ma C, Chalfie M: Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins. *Cell* 2004, 119 (1): 137-144

Zheng G, Bueno M, Camachos C, Randhawa P: Validation of BKV large T-antigen ATP-binding site as a target for drug discovery. *Antiviral Res.* 2009, 81 (2): 184-187